



HAL
open science

Les Benzo[e]pyridoindoles, une nouvelle famille d'inhibiteurs de kinase à activité anti-proliférative

Lien Vu Hong

► **To cite this version:**

Lien Vu Hong. Les Benzo[e]pyridoindoles, une nouvelle famille d'inhibiteurs de kinase à activité anti-proliférative. Biologie cellulaire. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV049 . tel-00738295

HAL Id: tel-00738295

<https://theses.hal.science/tel-00738295>

Submitted on 4 Oct 2012

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Hong Lien VU

Thèse dirigée par **Annie MOLLA**

préparée au sein du **Laboratoire CRI INSERM-UJF U823**
dans **l'École Doctorale de Chimie et Science du Vivant**

Les Benzo[e]pyridoindoles, une nouvelle famille d'inhibiteurs de kinase à activité anti-proliférative

Thèse soutenue publiquement le **03 Octobre 2011**,
devant le jury composé de :

Dr Patricia KRIEF

CR1, Hôpital St. Louis (Paris), Rapporteur

Dr Guy MOUCHIROUD

DR2, CNRS UMR 5534 (Villeurbanne), Rapporteur

Pr Catherine GHEZZI

Pr, INSERM U 1038 (La Tronche), Présidente

Dr Annie MOLLA

CR1, CRI INSERM-UJF U823 (La Tronche) Membre



REMERCIEMENT

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude à Annie MOLLA pour avoir dirigé cette thèse. Tu es très patiente de m'apprendre un nouveau domaine et m'avez accompagnée pendant tous ces années. Aucun mot ne peut exprimer mes sentiments pour toi et je te remercie encore une fois pour tout ce que tu as fait pour moi.

Je tiens à remercier le Dr Stefan DIMITROV pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Je remercie les Dr Patricia KRIEF et Dr Guy MOUCHIROUD pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi que le Pr Catherine GHEZZI pour avoir accepté de lire et d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier le Gouvernement Vietnamien (projet 322) pour son soutien financier.

Je remercie à Chi-Hung NGUYEN et Bertrand FAVIER pour la série des composés et les expériences *in vivo*.

Je tiens à remercier Aude, Véronique et toutes les personnes de l'équipe et de l'IAB pour la résolution de mes problèmes scientifiques et administratifs tout au long de cette thèse.

Je remercie tous mes amis : Xavier, Sophie, Aurélia, Sébatiens, Nicola, Leila, Tram, Nhung, Emilie, Jonathan, Peggy, Sevgi, Haluk, Ozge ... pour leur aide, leurs conseils ainsi que les moments inoubliables pendant ma thèse.

Et les derniers mots à ma famille pour leur soutien et leur amour, sans qui rien de tout ça ne serait arrivé.

RESUME

Les Benzo[e]pyridoindoles sont identifiés comme inhibiteurs des kinases Aurora. La molécule la plus active, C1, inhibe efficacement à la fois Aurora B et CHK2. Nous avons donc exploité cette potentialité dans des applications de traitements combinés en se basant sur la spécificité restreinte mais multiple de cet inhibiteur. Nous avons mis en place le traitement combiné (Etoposide et C1) sur des lignées cellulaires et des effets additifs pour H358 et synergiques pour U2OS et HL60 sont notés. Ce traitement empêche efficacement la croissance des sphéroïdes et l'expansion des xénogreffes cellulaires.

Un des avantages majeur de cette combinaison est la diminution des doses d'agents de dommages à l'ADN. C1 ouvre une piste pharmacologique basée sur l'altération simultanée de la mitose et de la réparation.

La famille des benzo[e]pyridoindoles possède une forme tétra-hétérocyclique avec 3 chaînes latérales dont les variations peuvent influencer l'activité inhibitrice.

Nous avons donc mesuré l'activité antimittotique de différents benzo[e]pyridoindoles. Cette étude structure/fonction permet de définir la contribution des chaînes latérales dans l'activité inhibitrice et d'orienter les futures synthèses.

Nous nous sommes également intéressés au composé C4 qui avait un profil atypique d'inhibition de phosphorylation de l'histone H3. Il inhibe cette phosphorylation uniquement en entrée de mitose. Nous avons ainsi pu montrer que la phosphorylation de l'histone H3 n'est pas nécessaire à l'assemblage des chromosomes.

Enfin, nous avons caractérisé l'efficacité de la molécule C21, un composé à forte activité anti-proliférative, sur différents modèles cellulaires et animaux.

Ce travail révèle les potentialités multiples des benzo[e]pyridoindoles comme nouvelles molécules anti-prolifératives

Mots clés : *Cycle cellulaire, mitose, kinases Aurora, CHK2, cancer, chimiothérapie*

ABSTRACT

Benzo[e]pyridoindole are identified as the novel Aurora inhibitors. The most potent compound, C1, inhibits efficiently both Aurora B and CHK2. Thus, we exploited the potency of this molecule in combined treatment applications based on its sharp and multiple specificities. We set up the combined treatments (Etoposide plus C1) on different cell lines and obtained an additive effect on H358 and a synergic one for HL60 and U2OS cells. This combination prevents the spheroid development as well as the cellular xenograft expansion. One of the main advantages of this combination is to decrease the dose of DNA damage agents in therapy leading to the reduction of their toxicity. C1 inhibiting both CHK2 and Aurora B open the way to targeted pharmacology based on simultaneous alteration of mitotic onset and DNA damage defences.

Benzo[e]pyridoindole family has a tetra-heterocyclic form with 3 lateral chains. The variations of these lateral chains can affect the inhibitory activity of the compounds.

We researched the antimittotic efficiency of several benzo[e]pyridoindoles. This structure/function study drives to define the contribution of lateral chains in inhibitory activity and will direct future synthesis.

We focused on compound C4 that induced an unusual profile of Histone H3 phosphorylation since it prevents it only in early mitosis. We found that H3-phosphorylation is not essential for chromosome organisation.

Finally, we characterized the molecule C21 that is a potent antiproliferative compound both *in cellulo* and *in vivo*.

This work reveals the potency of benzo[e]pyridoindoles as antiproliferative compounds.

Key words : *Cell cycle, mitosis, Aurora kinase, CHK2, cancer, chemotherapy*

TABLE DES MATIERES

ABREVIATION	6
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	8

INTRODUCTION

CHAPITRE I: LE CYCLE CELLULAIRE	12
I. L'interphase	12
II. La mitose	13
III. La cytotdiérèse	16
IV. La nouvelle vue de la progression mitotique	16

CHAPITRE II: LES KINASES MITOTIQUES	18
---	----

I. Les complexes Kinases Dépendantes des Cyclines/Cyclines	18
1. Les Cyclines	18
2. Kinases dépendantes des Cycline	19.
Les complexes CDK/Cycline	19
II. Les kinases Aurora	21
1. Aurora A	22
2. Aurora B	26
3. Aurora C	34
III. Polo-Like Kinase (PLK)	35
1. Régulation des PLK	36
2. Les substrats de PLK	37
3. Rôles de PLK1	38
4. Rôles des PLK2, PLK3, PLK4 et PLK5	40
IV. Les protéines kinases type NIMA et Nek	40

CHAPITRE III: LES KINASES, PROTEINES CLES DE L'AVANCEMENT DU CYCLE CELLULAIRE	42
--	----

I. Interconnexion entre les kinases mitotiques	42
II. La réponse aux dommages à l'ADN	44
1. La voie ATM/ATR-CHK1/CHK2	44
2. La voie MAPK	48
III. L'interconnexion entre les kinases mitotiques et les kinases des points de contrôle de dommage à l'ADN.....	50

CHAPITRE IV: THERAPIES ANTICANCEREUSES ET INHIBITEURS DE KINASES MITOTIQUES	53
--	----

I.	Cancer et chimiothérapie anti-mitotique	53
II.	Les inhibiteurs de CDK	54
III.	Les inhibiteurs de PLK1	56
IV.	Les inhibiteurs des kinases Aurora	59
V.	Les inhibiteurs ciblant la voie du point de contrôle du fuseau mitotique	65
VI.	Les inhibiteurs des kinases du point de contrôle des dommages de l'ADN	66
VII.	La thérapie personnalisée	69
VIII.	Des perspectives pour la thérapie anticancéreuse	71
	OBJECTIF DE THESE	73

MATERIELS ET METHODES

Chapitre I : TECHNIQUES D'ANALYSE DES PROTEINES	74
1. Extrait cellulaire	
2. Western Blot	
Chapitre II : TEST D'ACTIVITE KINASE	75
1. Criblage à haut débit	
2. Test <i>in vitro</i> de détermination d'IC50	
Chapitre III : BIOLOGIE CELLULAIRE	76
1. Lignées cellulaires et milieu de culture	
2. Condition de culture	
3. Entretien des cellules	
4. Conservation des cellules	
5. Transfection	
6. Test de viabilité	
7. Synchronisation des cellules	
8. Analyse du cycle cellulaire par Cytométrie de Flux	
9. Culture cellulaire en 3D (sphéroïde)	
Chapitre IV : TECHNIQUE D'IMAGERIE DE FLUORESCENCE	80
1. Immunofluorescence sur les cellules fixées	
2. Suivi de cellules vivantes	
Chapitre V: TECHNIQUE <i>IN VIVO</i>	82
1. Souris "nude"	
2. Xénogreffe de cellules	
3. Etude de croissance tumorale	
4. Traitement	
Chapitre VI : TAMPON	84
1. Biochimie	
2. Immunofluorescence	

RESULTATS

Partie I

COMBINAISON D'UN INHIBITEUR DES KINASES AURORA, C1, AVEC DES AGENTS DE DOMMAGE A L'ADN

I. Le composé C1 inhibe <i>in vitro</i> à la fois les kinases Aurora et les kinases du point de contrôle CHK1/2	85
II. C1 cible <i>in cellulo</i> la kinase CHK2	85
III. Effet du traitement combiné (C1 plus Etoposide) sur les cellules H358	88
1. En monocouche	
2. En 3-dimension (3D) ou sphéroïdes	
3. Chez les souris « nudes »	
IV. Comparaison de l'efficacité du traitement combiné sur différentes lignées cellulaires	90
V. Réponse des cellules HL60 au traitement combiné	93
1. <i>Sensibilité des cellules HL60 à l'Etoposide</i>	
2. <i>In cellulo</i>	
3. <i>In vivo</i>	
VI. Devenir des cellules H358 suite au traitement combiné	96
VII. Autres combinaisons envisageables	99
VIII. Efficacité et intérêt du traitement combiné	99
IX. Conclusion	100

Partie II

ETUDE STRUCTURE /FONCTION DES MOLECULES DE LA FAMILLE DES BENZO[E]PYRIDOINDOLES

I. Etude structure /fonction des molécules de la famille des benzo[e]pyridoindoles	101
1. Introduction	101
2. Efficacité des molécules <i>in cellulo</i>	103
3. Spécificité <i>in cellulo</i> de ces composés actifs vis-à-vis des kinases Aurora	106
4. Conclusion	107
II. Caractérisation de la molécule C4 un inhibiteur de la phosphorylation de l'histone H3 en entrée de mitose	109
1. Confirmation du retard de phosphorylation de l'histone H3 en mitose	109
2. C4 n'inhibe pas les kinases Aurora A et B	109
3. Localisation de différents marqueurs de la mitose en présence de C4	110
4. C4 accélère l'entrée en mitose et prolonge sa durée	116
5. Effet de C4 sur la prolifération cellulaire	117
6. Conclusion	117

III. Caractérisation du composé C21	119
1. Effet comparé vis-à-vis de la croissance de sphéroïdes	119
2. Efficacité de C21 sur les cellules	120
3. C21 n'est pas toxique sur les cellules quiescentes	122
4. C21 n'induit pas des dommages à l'ADN	122
5. C21 est un inhibiteur de protéines kinases à spécificité restreinte	123
6. C21 empêche l'expansion des xénogreffes de cellules HL60 chez les souris	125
7. Conclusion	126
 DISCUSSION	 127
PERSPECTIVES	130
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	131
BIBLIOGRAPHIE	132

ABBREVIATIONS – LEXIQUE

AML/LMA	Acute Myeloid Leukemia/Leucémie Myéloïde Aigüe
APC/C	Anaphase promoting complex/cyclosome
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosine Tri Phosphate
AurKAIP1	Aurora A Kinase Interacting Protein 1
ATR	Ataxia Telangiectasia and RAD3 related protein
BUB	Budding uninhibited by benzimidazole
BUBR/BUB1B	BUB homolog beta
CDK	Cyclin-dependent kinase
Cdc	Cell division control protein
CENP	CENtromere Protein
CIN	Chromosomal INstability
CHK	CHECKpoint Kinase
CML/LMC	Chronic Myeloid Leukemia/Leucémie Myéloïde Chronique
CPC	Chromosomal Passenger Complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FLT3	Fms-related tyrosine kinase
FRAP	Fluorescent Recovery After Photobleaching
GCK	Germinal center kinase
GSK3β	Glycogen synthase kinase 3 β
INCENP	INner CENtromere Protein
HDAC	Histone deacetylase
HEF	Focal adhesion scaffolding protein
KT	Kinétochore
LATS2	New member of the Lats tumor suppressor family
MARK3	MAP-microtubule affinity regulating kinase 3
MDS	MyeloDysplastic Syndrome
MELK	Maternal embryonic leucine zipper kinase
MPF	Maturation Promoting Factor
MPS1	MonoPolar Spindle 1
MT	Microtubule
MVA	Mosaic Variegated Aneuploid

MYT1	Myelin transcription factor 1
NEAA	Non Essential Amino Acid
NEDD9	Neuroal precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9
NSCLC	Non Small Cell Lung Carcinoma (Carcinome pulmonaire non à petites cellules)
PBD	Polo Box Domain
PCSS	Premature Chromatides Separation Syndrome
PDGFR	Plated-derived growth factor receptor
PKD1	Phosphoinositides dependent protein kinase 1
PKC	Protein kinase C
PLK	Polo Like Kinase
PP	Protein Phosphatase
RB	RetinoBlastoma protein family members
RCC	Renal cell carcinoma
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute medium
SAC	Spindle Assembly Checkpoint
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SCLC	Small Cell Lung Carcinoma (Carcinome pulmonaire à petites cellules)
SVF	Serum de Veau Fœtal
TACC	Transforming acidic coiled-coil
TPX2	Target protein for xenopus kinesine like protein 2
Trk	Tropomyosine receptor kinase
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

INTRODUCTION

CHAPITRE I : LE CYCLE CELLULAIRE

- Figure 1 :** Le cycle cellulaire
- Figure 2 :** Les phases de la mitose
- Figure 3 :** Illustration de cytotodiérèse
- Figure 4 :** La comparaison des phases mitotiques traditionnelles (en haut) et les transitions (en bas) proposées par Pine et al.

CHAPITRE II : LES KINASES MITOTIQUES

- Figure 5 :** Les complexes de CDK-Cycline au cours du cycle cellulaire
- Figure 6 :** Illustration de la localisation d'Aurora A dans le cycle cellulaire
- Figure 7 :** La localisation de la kinase Aurora B en phase de Mitose
- Figure 8 :** Schématisation des marqueurs épigénétiques centromériques.
- Figure 9 :** Schématisation des différents types d'attachements entre microtubules et kinétochores
- Figure 10 :** Mécanisme de correction par Aurora B des erreurs d'attachement au cours de la mitose
- Figure 11 :** Illustration de l'action du point de contrôle du fuseau mitotique
- Figure 12 :** Localisation de PLK1 en mitose
- Figure 13 :** Illustration des rôles de Polo-like kinase 1 (PLK1) dans le cycle cellulaire chez les mammifères

Tableau 1 : Les substrats de kinase Aurora A

Tableau 2 : Les substrats d'Aurora B chez les vertébrales et chez les levures

Tableau 3 : Les substrats de la kinase PLK1

CHAPITRE III: LES KINASES, PROTEINES CLES DE L'AVANCEMENT DU CYCLE CELLULAIRE

- Figure 14 :** La relation des principales protéines mitotiques et de leurs partenaires en mitose
- Figure 15 :** Schéma représentant la voie ATM/ATR-CHK2/CHK1 dans la réponse aux dommages de l'ADN
- Figure 16 :** L'activité de la kinase CHK1 dans la réponse au dommage de l'ADN

- Figure 17 :** Le schéma représente l'activation de CHK2
- Figure 18 :** Le schéma illustre le système de régulation des points de contrôle G1-S et G2-M par la voie MAPK
- Figure 19 :** Simplification de la voie JNK en réponse aux stress cellulaires
- Figure 20 :** Interconnexion des protéines kinases mitotiques et des kinases des points de contrôle des dommages à l'ADN

CHAPITRE IV: THERAPIES ANTICANCEREUSES ET INHIBITEURS DE KINASES MITOTIQUES

- Figure 21 :** La régulation du cycle cellulaire par les protéines kinases et leur intérêt dans les thérapies anticancéreuses
- Figure 22 :** Illustration de l'obtention de sphéroïdes par la technique de la goutte pendante
- Tableau 4 :** Les inhibiteurs de CDK1/CDC2 en essais cliniques
- Tableau 5 :** Les inhibiteurs de PLK1 en essais cliniques
- Tableau 6 :** Les inhibiteurs des kinases Aurora
- Tableau 7 :** Les inhibiteurs de CHK1 et CHK2 en clinique

MATERIELS ET METHODES

- Tableau 8 :** Liste de lignées cellulaires humaines et milieux de culture utilisés
- Tableau 9 :** Liste des anticorps primaires utilisés pour les expériences en western blot et immunofluorescence
- Tableau 10 :** List des détails des anticorps secondaires utilisés pour western Blot et immunofluorescence

RESULTATS

PARTIE I : COMBINAISON D'UN INHIBITEUR DES KINASES AURORA, C1, AVEC DES AGENTS DE DOMMAGE A L'ADN

- Figure 23 :** C1 cible CHK2 *in cellulo* suite à des dommages double-brin de l'ADN
- Figure 24 :** Efficacité du traitement combiné sur les cellules H358
- Figure 25 :** Efficacité du traitement combiné sur les sphéroïdes H358
- Figure 26 :** Efficacité du traitement combiné sur les xénogreffes de cellules H358 chez les souris « nudes »
- Figure 27 :** Efficacité du traitement combiné sur les différentes lignées cellulaires

- Figure 28 :** L'efficacité du traitement combiné sur les lignées H358 et U20S
- Figure 29 :** L'effet de différentes concentrations d'Etoposide sur les cellules HL60
- Figure 30 :** Analyse des réponses des cellules HL60 au traitement combiné *in cellulo* au cours du cycle cellulaire
- Figure 31 :** Efficacité de la combinaison *in vivo*
- Figure 32 :** Devenir des cellules H358 et HeLa suite au traitement combiné
- Figure 33 :** Efficacité du traitement en combinaison de C1 avec l'Intoplicine ou le Cisplatine
- Tableau 11 :** Efficacité comparée de C1 et VX-680, *in vitro*
- Tableau 12 :** IC50 de viabilité des cellules en présence d'un agent de dommage à l'ADN

Partie II

ETUDE STRUCTURE /FONCTION DES MOLECULES DE LA FAMILLE DES BENZO[E]PYRIDOINDOLES

- Figure 34 :** Forme générale de la famille benzo[e]pyridoindole portant trois chaînes latérales (R1, R2 et R3)
- Figure 35 :** Composés inhibant l'activité d'Aurora B *in cellulo*
- Figure 36 :** Composé n'inhibant pas l'activité kinase d'Aurora B *in cellulo*
- Figure 37:** Test de l'efficacité des molécules sur des cellules U2OS
- Figure 38 :** C4 perturbe la phosphorylation de l'histone H3
- Figure 39 :** C4 n'a pas d'effet sur l'activité kinase des Aurora A et B
- Figure 40 :** L'absence de phosphorylation de l'histone H3 en entrée de mitose
- Figure 41 :** Localisation de la protéine Survivine suite à l'action de C4
- Figure 42 :** Impact de C4 sur la localisation de partenaires du complexe passager
- Figure 43 :** La délocalisation de la Survivine dans les cellules en mitose
- Figure 44 :** Influence de C4 sur le cycle cellulaire au cours du temps
- Figure 45 :** Effet des composés sur les sphéroïdes H358
- Figure 46 :** Variation de l'efficacité de C21 sur les cellules Mahlavu et SK-HepG1
- Figure 47 :** Efficacité des composés sur les cellules H358 quiescentes
- Figure 48 :** Comparaison de la capacité de l'Etoposide et C21 à induire des dommages à l'ADN
- Figure 49 :** Profil d'inhibition de C21 à la concentration de 1 μ M
- Figure 50 :** L'impact de C21 sur évolution du volume des tumeurs chez les souris « nudes »

Tableau 13 : Test *in vitro* avec des composés benzo[e]pyridoindole

Tableau 14 : Viabilité des différentes lignées cellulaire en présence de C4 (1,5 μM)

Tableau 15 : Effet antiprolifératif de C21 sur différentes lignées cellulaire

Tableau 16 : Cibles trouvées parmi 106 kinases

Tableau 17 : Profil d'inhibition de C21 à concentration 1 μM

Tableau 18 : IC50 d'inhibition *in vitro* de C21 vis-à-vis de quelques kinases

CHAPITRE I: LE CYCLE CELLULAIRE

Le cycle cellulaire est l'ensemble des événements que traverse une cellule entre deux divisions successives. Il comprend deux grandes parties : l'interphase et la mitose (M).

I. L'interphase

L'interphase est la période préparant la cellule à sa division. Elle est subdivisée en plusieurs phases : G0 («Gap 0»), G1 («Gap 1»), S (Synthèse) et G2 («Gap 2») (**Figure 1**).

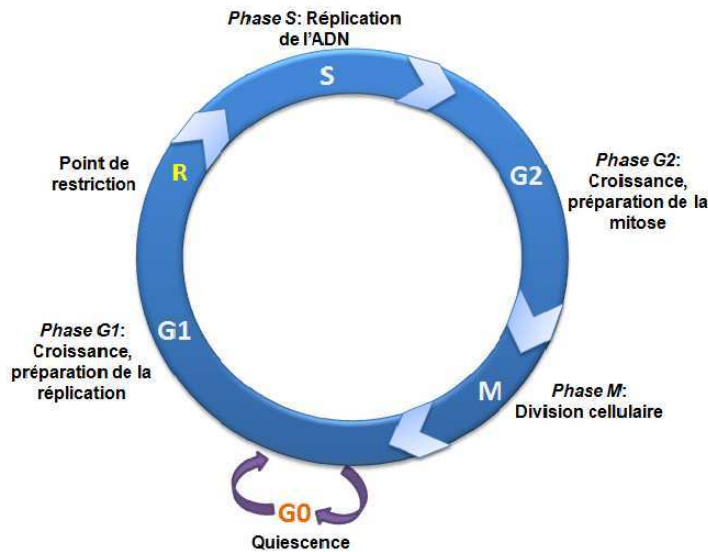


Figure 1 : Le cycle cellulaire
Le cycle cellulaire est divisé en deux grandes parties : l'interphase (G0, G1, S, G2) et la Mitose (M). En G0, les cellules sont en phase de quiescence.

La phase G0 : C'est une période dite de quiescence ; les cellules ne pouvant passer le point de restriction pour entrer en phase G1 sont souvent en manque de facteurs de croissance ou d'éléments nutritifs. Durant cette phase, la machinerie du cycle cellulaire est démantelée et les cyclines et les kinases "cycline-dépendantes" sont absentes. Si certaines cellules telles que les neurones restent en G0 une fois leur différenciation terminée, d'autres, comme les hépatocytes, restent en phase G0 jusqu'à ce qu'elles reçoivent des signaux leur indiquant qu'elles doivent entrer à nouveau dans le cycle. Il est intéressant de noter que les cellules cancéreuses ne peuvent pas passer en phase G0 et sont donc condamnées à cycliser indéfiniment.

La phase G1 : C'est une période de croissance cellulaire. Au cours de cette phase, la cellule passe le point de restriction (R) à partir duquel elle est irréversiblement engagée vers la division. Cette étape permet également la préparation de la réplication de l'ADN: les protéines nécessaires sont synthétisées, comme l'ADN polymérase.

La phase S : Cette phase est cruciale puisque au cours de celle-ci s'effectue la réplication du matériel génétique. Il est absolument nécessaire que l'information génétique intégrale soit transmise de manière identique de la cellule mère aux deux cellules filles. Comme il se produit souvent des lésions génomiques durant la phase S, la réparation de l'ADN est initiée dès que la réplication se termine. Si la réparation se déroule normalement, la cellule continue sa progression vers la phase G2 sinon le cycle cellulaire s'arrête, et la cellule peut entrer en apoptose. En fin de phase S, chaque chromosome comporte 2 molécules d'ADN double hélice identiques.

La phase G2 : Une fois la réplication menée à son terme avec succès, les cellules entrent en phase G2, la dernière phase de l'interphase. Durant cette période, le noyau est encore défini et entouré par l'enveloppe nucléaire, les chromosomes ne sont pas clairement organisés dans le noyau car ils ne sont encore sous la forme de fibres chromatiques pas totalement compactés. A la fin de G2, un point de contrôle déterminera si les cellules peuvent entrer en mitose ou si elles doivent prolonger cette phase. Le point de contrôle G2 aide à maintenir la stabilité génomique puisqu'il empêche les cellules d'entrer en mitose avec de l'ADN endommagé. Il fournit donc une opportunité de réparer l'ADN et ainsi d'empêcher la prolifération des cellules endommagées.

II. La mitose

Au cours de la phase M, la séparation des chromosomes est un élément très important pour produire deux cellules filles génétiquement identiques. Le but principal de la mitose est de ségréger les chromatides sœurs dans les deux cellules naissantes de telle sorte que chaque cellule fille hérite d'un ensemble complet de chromosomes. Si durant la division cellulaire la séparation chromosomique est perturbée, il en résulte un nombre anormal de chromosomes et une instabilité génomique dans les cellules filles. Ces deux phénomènes sont des étapes cruciales du développement des cancers (Draviam, Xie et al. 2004). La mitose, qui se déroule en cinq parties (prophase, métaphase, anaphase et télophase) doit être un processus extrêmement régulé. La mitose est représentée dans la **Figure 2** ci-après :

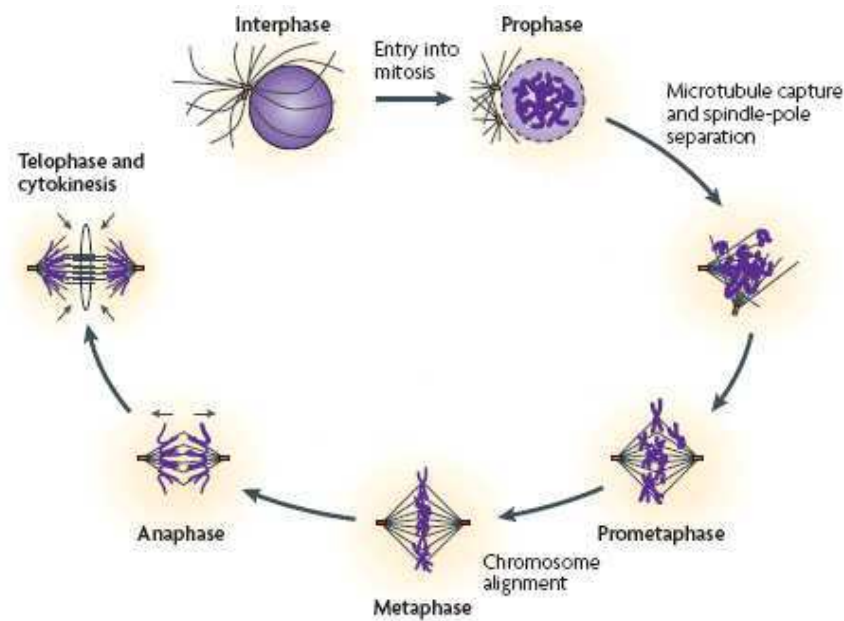


Figure 2: Les phases de la mitose

La mitose est un processus continu et dynamique. Elle comprend cinq phases : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase, suivie par la cytotodièrèse (Adapté de (Jackson, Patrick et al. 2007))

La prophase : Durant celle-ci, les chromatides achèvent leur condensation et forment une structure ordonnée appelée chromosome. Cette condensation est accompagnée par la phosphorylation des protéines histones ou non-histones.

La prométaphase : Cette phase a lieu immédiatement après la prophase et est considérée parfois comme faisant partie intégrante de la prophase. Au tout début de cette phase, l’enveloppe nucléaire est rompue et des microtubules rayonnent des centrosomes et envahissent l’espace nucléaire. Ensuite, ils interagissent avec les kinétochores. Durant la prométaphase, le kinétochore est capturé initialement par un microtubule unique qui se prolonge à partir du pôle du fuseau et qui sera ensuite rejoint par d’autres microtubules pour atteindre un nombre de filaments compris entre 15 et 40 par kinétochore chez les mammifères. Ce point d’ancrage supportera la force de traction générée par les microtubules et qui est nécessaire pour séparer les deux chromatides sœurs de chaque chromosome. Cette interaction microtubules/kinétochore est donc très dynamique (Nigg 2001). La prométaphase s'achève lorsque tous les chromosomes sont correctement attachés. Si tel n'est pas le cas, le chromosome mal attaché envoie un signal inhibiteur et la cellule doit attendre que le problème soit résolu pour passer en métaphase puis en anaphase. Ce phénomène de contrôle de la tension du fuseau aide ainsi à minimiser les risques de mauvaise ségrégation (Yu 2006).

La métaphase : Cette étape est caractérisée par l'alignement des chromosomes condensés au centre de la cellule pour former la plaque équatoriale. Les événements précoces de la métaphase commencent avec les événements tardifs de la prométaphase quand les microtubules s'arriment aux kinétochores. Les centres des chromosomes convergeront vers la plaque équatoriale. Le point de contrôle du fuseau mitotique est encore actif durant cette phase puisqu'il peut retarder l'entrée en anaphase en cas de mauvais arrimage ou de défaut d'alignement des chromosomes.

L'anaphase : Durant cette phase très rapide de la mitose, qui est initiée par la désactivation du point de contrôle du fuseau, les chromosomes homologues sont séparés et tirés vers leur pôle respectif, à l'opposé de la cellule. Cette phase peut encore être subdivisée en deux parties.

L'anaphase A tout d'abord, où les chromatides se déplacent en direction d'un pôle sur les microtubules kinétochoriens, qui raccourcissent en se dépolymérisant au fur et à mesure que le kinétochore se déplace. Le vrai moteur du déplacement des chromatides n'est pas la dépolymérisation des microtubules mais plutôt la présence de dynéine, un moteur moléculaire utilisant l'ATP, qui tracte les chromosomes sur les microtubules.

L'anaphase B durant laquelle les pôles du fuseau mitotique s'éloignent l'un de l'autre en entraînant avec eux les chromatides. Les centrosomes s'éloignent l'un de l'autre sous l'action des microtubules polaires qui glissent les uns par rapport aux autres vers les pôles sous l'action de protéines motrices. De plus, les protéines motrices situées sur les microtubules des asters interagissent avec la membrane cellulaire et tirent les pôles vers la périphérie, ce qui les éloigne.

La télophase : C'est la dernière étape de la mitose. Une structure microtubulaire appelée fuseau médian se forme à mi-chemin des pôles. Au cours de télophase, les chromatides atteignent les pôles. Les microtubules kinétochoriens deviennent de plus en plus courts et se dépolymérisent. En revanche, les microtubules non kinétochoriens continuent de s'allonger, étirant encore plus la cellule. Ensuite, les chromosomes se décondensent, chaque lot est entouré par une nouvelle enveloppe nucléaire. Chaque noyau possède une copie complète du génome de la cellule d'origine et l'étirement commence à séparer physiquement les deux cellules filles.

III. La cytotodiérèse

C'est le dernier événement du cycle cellulaire (**Figure 3**). La division du cytoplasme débute en fin d'anaphase ou lors de télophase. Au cours de la cytotodiérèse, la cellule se divise, perpendiculairement à l'axe longitudinal du fuseau mitotique, par contraction d'un anneau constitué de filaments d'actine, en interaction avec des filaments de myosine. Cela se traduit dans la région sus-jacente, à la surface de la cellule, par la formation d'un sillon de division qui devient de plus en plus profond. Des petits fragments du fuseau peuvent encore subsister pendant quelques temps entre les deux cellules, jusqu'à ce que les membranes cytoplasmiques de la constriction fusionnent, entraînant la séparation totale des deux cellules filles.

Il existe un point de contrôle final appelé « NoCut » qui retarde la cytotodiérèse en réponse aux défauts en anaphase. De nombreuses protéines sont retrouvées au niveau du corps intermédiaire durant la cytotodiérèse tels que des GTPase, phosphatases, kinases, des protéases ainsi que des composants des points de contrôle des dommages à l'ADN et du fuseau. Récemment, il a été indiqué que Rab 35, une protéine GTPase, était nécessaire à l'abscission finale en contrôlant la distribution subcellulaire de la septine 2 et de PiP2 (Kouranti, Sachse et al. 2006).

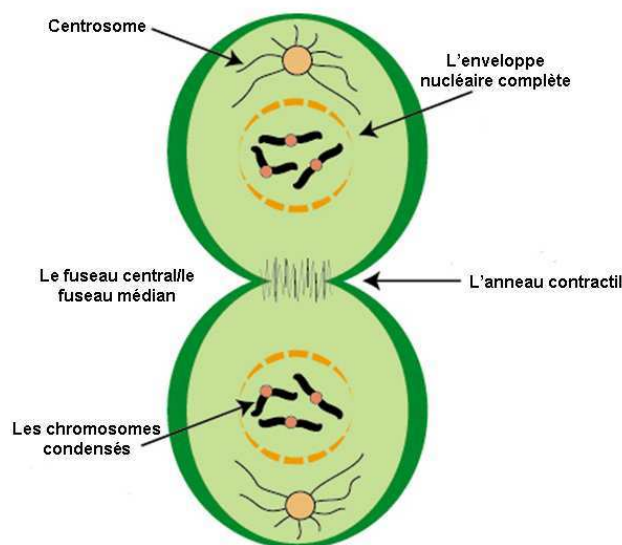


Figure 3: Illustration de cytotodiérèse

Des figures majeures et des organelles importantes sont indiquées. (Adapté de <http://www.sparknotes.com/biology/cellreproduction/mitosis/section3.rhtml>)

IV. La nouvelle vue de la progression mitotique

Pine et Rieder ont suggéré une nouvelle vue de la progression mitotique (**Figure 4**) principalement basée sur des études chez les vertébrés. Ils proposent donc de définir la mitose en cinq transitions caractérisées par l'apparition des activités des différents régulateurs, en particulier l'apparition des activités des CDKs/Cyclines, des kinases mitotiques et de l'APC/C. Ces étapes pourraient donner des définitions plus exactes de la progression

mitotique. La première transition, ou antéphase, correspondrait à la fin de la phase G₂ et au début de la prométaphase, avant la condensation des chromosomes. A ce stade, le complexe CDK1/Cycline A, les protéines Aurora A et PLK (Polo-like kinase) sont activées. La deuxième étape correspond à l'entrée en mitose de façon définitive. Elle est caractérisée par l'activation de CDK1/Cycline B et par la rupture de la membrane nucléaire. La troisième étape correspond parfaitement à la prométaphase. C'est une phase de contrôle qui se traduit par l'activation d'APC/C/Cdc20 et par l'attachement des kinétochores sur les chromosomes. Ce point de contrôle est caractérisé par l'activation de BUBR1 et MAD2, et est indispensable au bon déroulement de la séparation des chromosomes. L'étape 4 s'étend du début de la métaphase au milieu de l'anaphase et correspond à la dégradation des sécurines par l'APC/C Cdc20, amenant à la séparation des chromatides sœurs de chaque chromosome. La Cycline B est également détruite rapidement. La cinquième et dernière étape correspond au retour en interphase, APC/C/Cdc20 est remplacé et dégradé par APC/C/cdh1 qui prend alors en charge Aurora A, B ou encore PLK1 (Pines and Rieder 2001).

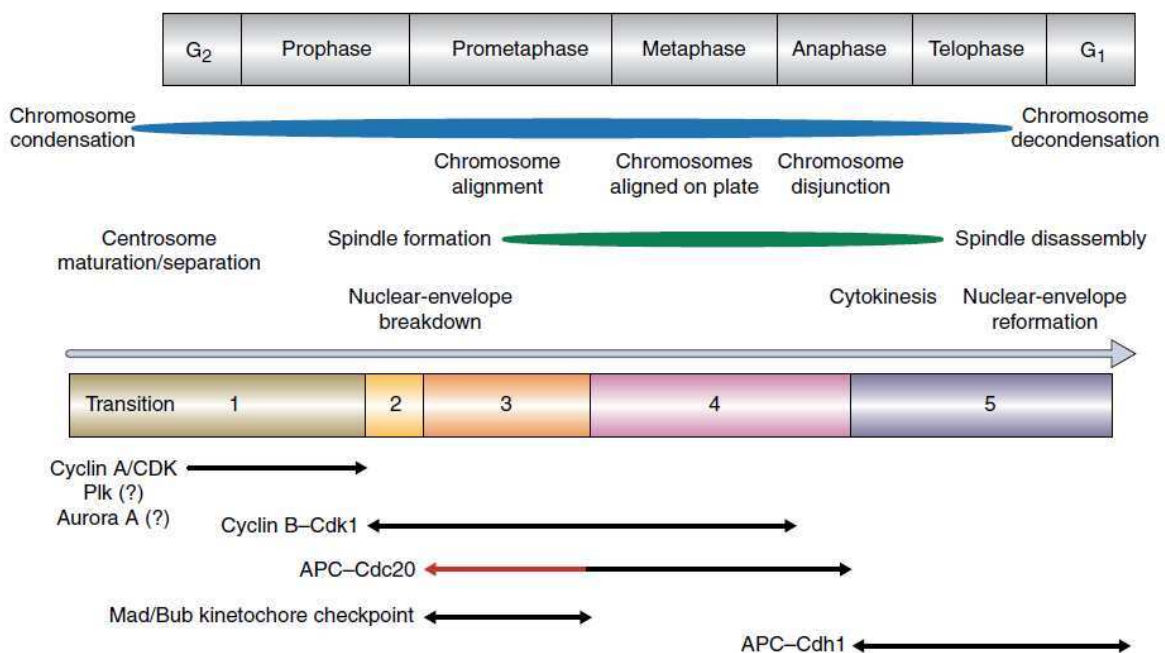


Figure 4: La comparaison des phases mitotiques traditionnelles (en haut) et les transitions (en bas) proposées par Pine et al.

Les changements morphologiques utilisés pour définir la mitose sont exposés au dessus de la ligne représentant les transitions. Les changements dans les régulateurs du cycle cellulaire définissant les transitions sont exposés (Pines and Rieder 2001).

CHAPITRE II: LES KINASES MITOTIQUES

Le cycle cellulaire est un évènement extrêmement régulé (Nurse 2002). Chacune de ses phases ne peut débuter que, si et seulement si, la phase précédente s'est correctement déroulée. Pour contrôler le bon déroulement de ces phases, il existe des points dits de restrictions (point de contrôle des dommages à l'ADN, point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique) et point de contrôle final « NoCUT », et la participation de nombreuses protéines kinases qui interviennent tout au long du cycle cellulaire.

I. Les complexes Kinases Dépendantes des Cyclines/Cyclines

1. Les Cyclines

Les Cyclines sont une famille de protéines qui subissent d'importantes variations de leur taux d'expression au cours du cycle cellulaire. La famille des Cyclines est divisée en deux classes principales : les Cyclines exprimées en phase G1 (Cycline C, Cycline D et Cycline E) avec une accumulation limitée pour permettre la progression de la phase G1 à la phase S et les Cyclines mitotiques (Cycline A et Cycline B) contrôlant la transition entre les phases G2 et M et la mitose elle-même.

Les Cyclines de type D sont au nombre de trois chez l'homme et sont les premières à apparaître lors d'une stimulation par des mitogènes. La synthèse de Cycline D est initiée durant phase G1, tant que les facteurs de croissance restent dans le milieu. Si bien que les taux des Cyclines D varient assez peu au cours du cycle, avec néanmoins un pic d'expression en transition G1-S. Inversement, dès que le mitogène est retiré du milieu, les Cyclines D sont rapidement recyclées, quelle que soit la phase du cycle dans laquelle se trouve la cellule. Si la cellule a dépassé le point de restriction (point R), la destruction des Cyclines D est sans effet. Au contraire, si la cellule est encore en phase G1, cela empêchera la cellule d'aller plus loin dans le cycle. Ceci montre bien que la fonction primaire de ces Cyclines est de contrôler la progression en phase G1.

L'expression de la Cycline E est maximale en fin de phase G1, après que le pic d'expression des Cyclines D est atteint (Koff, Cross et al. 1991). La Cycline E est indispensable pour la transition G1/S car l'injection d'anticorps neutralisants dans des cellules en phase G1 inhibe l'entrée en phase S. Une surexpression de la Cycline E entraîne un raccourcissement de la durée de la phase G1, diminue la taille de la cellule et sa dépendance aux facteurs de croissance et enfin prolonge la durée de la phase S (Resnitzky, Gossen et al.

1994; Ohtsubo, Theodoras et al. 1995). Durant de la phase S, la Cycline E diminue car elle est dégradée par le protéosome.

Les Cyclines mitotiques sont représentées par les Cyclines A et B. Le taux de ces Cyclines mitotiques augmente progressivement au cours de la phase S et de la phase G2 pour atteindre un pic d'expression en mitose.

La Cycline A contrôle l'entrée en phase S. Les Cyclines E et A participent au passage de phase S, mais ont des fonctions différentes. La Cycline A est nécessaire pour débiter la réplication de l'ADN puisque sa neutralisation par un anticorps spécifique inhibe la synthèse de l'ADN dans les cellules humaines (Pagano, Pepperkok et al. 1992; Cardoso, Leonhardt et al. 1993).

Il existe trois Cyclines B : B1, B2 et B3. La Cycline B1, la plus étudiée, joue un rôle important dans les mécanismes de déclenchement de la mitose. Cycline B est cytoplasmique lors de l'interphase (en association avec les microtubules et les centrosomes) et ce jusqu'à la fin de la prophase. Elle est transférée brutalement dans le noyau tandis que la Cycline A reste nucléaire. Il est à noter que la Cycline B une des premières protéines du cycle cellulaire dont la régulation est non seulement temporelle mais aussi spatiale. Dès l'entrée en anaphase, la Cycline B est détruite par « phospho-ubiquitination ».

2. Kinases dépendantes des Cyclines

La transition d'une phase du cycle cellulaire à une autre a lieu de façon ordonnée et est régulée par différentes protéines cellulaires. Ces régulateurs-clés sont les kinases « Cycline-dépendantes » (CDK), une famille de kinases sérine/thréonine, qui est activée spécifiquement lors de points bien précis du cycle cellulaire. Chez les mammifères, on en dénombre huit types. Les propriétés des CDK1 (Cdc2 chez la levure), CDK2, CDK4, CDK6 et CDK7 sont bien établies. En revanche, les fonctions de CDK3, CDK5 et CDK8 sont encore incertaines.

3. Les complexes CDK/Cycline

L'activation des CDKs requiert leur association avec une sous-unité Cycline régulatrice. Au cours du cycle cellulaire, différents groupes de complexes peuvent se distinguer (Murray 2004) (**Figure 5**):

- Les Cyclines D associée aux CDK4 et CDK6 en phase G1.
- Les Cyclines E et A associées à la CDK2 pendant la phase S. Le complexe CDK2-Cycline E a une forte activité kinase juste avant l'entrée des cellules en phase S et phosphoryle la protéine du rétinoblastome (pRB). Le complexe CDK2-Cycline A se lie au

facteur de transcription PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) au niveau de sites de réplication de l'ADN

- Les Cyclines B et A s'associent à CDK1. Le CDK1-Cycline A induit l'entrée en mitose en fin de phase G2 et au début de la mitose. La décision d'entrée en mitose est régulée par le couple CDK1-Cycline B.

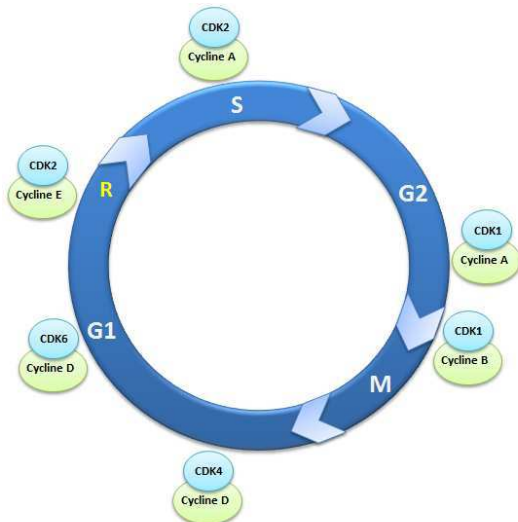


Figure 5: Les complexes de CDK-Cycline au cours du cycle cellulaire

Complexe CDK1-Cycline B

La plus importante modification en début de mitose est l'activation du complexe CDK1-Cycline B, autrefois connu sous le nom de « maturation promoting factor » (MPF). La teneur des cellules en CDK1-Cycline B augmente pendant la phase S, mais le complexe est conservé sous forme inactive par l'action des kinases MYT1 et WEE1 qui phosphorylent CDK1 sur la thréonine 14 et tyrosine 15 respectivement. WEE1 et MYT1 sont activées durant les phases S et G2 et ces deux phosphorylations inhibent l'activité kinase de ces protéines, empêchant l'entrée prématurée en mitose (Porter and Donoghue 2003).

L'activation du complexe CDK1-Cycline B passe par trois étapes combinées. Premièrement, la phosphorylation de la thréonine 161, induite par CAK (CDK Activating Kinase) en fin de phase G2, provoque l'ouverture du domaine catalytique de la CDK1 jusqu'à la dégradation de la Cycline B en fin de mitose (Fesquet, Labbe et al. 1993). Ensuite, PLK1 (Polo-like kinase) phosphoryle CDK1 sur la sérine 147 et entraîne sa migration vers le noyau. La dernière activation de CDK1 met en jeu la déphosphorylation sur thréonine 14 et tyrosine 15 réalisée par la famille de phosphatase Cdc25 (Porter and Donoghue 2003).

De plus, PLK1 peut phosphoryler Cdc25C sur la sérine 198, entraînant ainsi son activation. Cette phosphorylation induit la migration de Cdc25C vers le noyau où Cdc25C

devient hyperphosphorylée en interagissant avec le complexe CDK1-Cycline B créant ainsi une boucle de rétrocontrôle positive augmentant l'activité du couple CDK1-Cycline B (Roshak, Capper et al. 2000).

L'inactivation de Cdc25C se fait par phosphorylation sur sa sérine 216, par les kinases CHK1, CHK2, C-TAK1 ou PLK3, créant un site de liaison avec la protéine 14-3-3. Cela induit sa séquestration dans le cytoplasme et empêche ainsi son interaction avec CDK1-Cycline B (Ouyang, Li et al. 1999; Porter and Donoghue 2003).

CDK1-Cycline B participe à de nombreuses transformations. Il phosphoryle Eg5, une kinésine impliquée dans l'établissement du fuseau bipolaire permettant la formation du fuseau mitotique (Blangy, Lane et al. 1995). Ce complexe modifie le réseau de microtubules, les micro-filaments d'actine et les lamines nucléaires, participant ainsi à la dégradation de l'enveloppe nucléaire, par phosphorylation (Lamb, Fernandez et al. 1990; Peter, Nakagawa et al. 1990; Dessev, Iovcheva-Dessev et al. 1991). En fin de mitose, CDK1-Cycline B est pris en charge par le système ubiquitine-ligase ce qui entraîne la dégradation de la Cycline B et le recyclage de CDK1.

L'entrée en mitose s'accompagne d'une vague de phosphorylations massives telle la phosphorylation de l'histone H3, CENP-A, Cyclines, moteurs ... accompagnée par l'expression de kinases mitotiques (Aurora, Polo like kinase, NEK ...).

II. Les kinases Aurora

Les kinases Aurora sont une famille de sérine/thréonine kinases dont la structure a été conservée au cours de l'évolution eucaryote. Les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* n'expriment chacune qu'une seule kinase Aurora, Aurora Ip11 (increase-in ploide 1) et Ark (Aurora related kinase) respectivement. Chez des organismes plus évolués, comme *D. melanogaster* et *C. elegans*, on dénombre 2 types de kinases Aurora, les kinases A et B. Enfin, chez les mammifères, il en existe 3 : Aurora A, B et C (Meraldi, Honda et al. 2004).

Ces protéines kinases sont subdivisées en deux domaines, un domaine régulateur en N-terminal et un domaine catalytique en C-terminal. Elles divergent dans leur partie régulatrice, mais présentent un domaine catalytique très conservé avec 71% d'identité entre Aurora A et B (Carmena and Earnshaw 2003). Malgré leur grande homologie de structure, les Aurora ont de grandes différences de fonctions et de localisations.

1. Aurora A

La kinase Aurora A, aussi connue sous les noms d'Aik, BTAK ou STK15. Chez l'homme, son gène est localisé sur le chromosome 20 en q13.2-q13.3, une région amplifiée dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses et dans les tumeurs primaires (sein, col de l'utérus, colorectale, pancréatique, ovaire, prostate ...) (Barr and Gergely 2007).

La localisation d'Aurora A est illustrée dans la **Figure 6**. En fin de phase G1 et au début de phase S, Aurora A est présente dans le matériel péri-centriolaire, mais son expression est faible (Stenoien, Sen et al. 2003). Elle s'associe aux centrosomes durant la fin de la phase S et le début de la phase G2 (Berdnik and Knoblich 2002). Son pic d'expression est obtenu au début de mitose (Katayama, Brinkley et al. 2003). Aurora A se localise strictement aux centrosomes en phase G2 et au début de la mitose. En métaphase-anaphase, on la retrouve aussi sur les microtubules, près des pôles du fuseau. En fin de mitose, elle est observée au centre du fuseau et sur le corps intermédiaire (Wittmann, Wilm et al. 2000; Gruss, Wittmann et al. 2002; Sugimoto, Urano et al. 2002) (**Figure 6**).

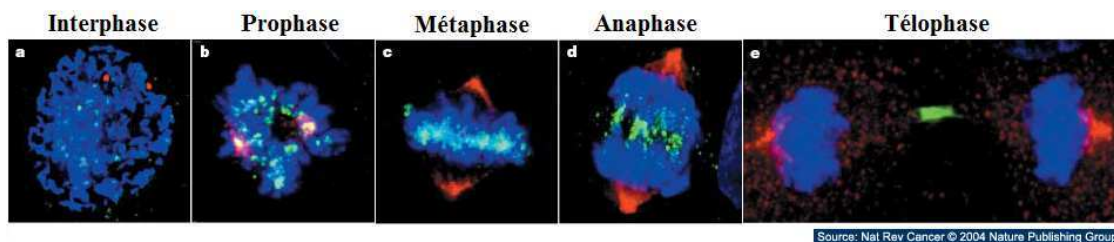


Figure 6 : Illustration de la localisation d'Aurora A dans le cycle cellulaire

La kinase Aurora A et B est en rouge et vert, respectivement et l'ADN est en bleu (Adapté de (Keen and Taylor 2004)).

Aurora A s'associe à plusieurs co-activateurs durant la division cellulaire qui, en retour, lui dictent sa localisation, son activation et ses substrats. Ces derniers sont résumés dans le **Tableau 1** suivant :

Tableau 1: Les substrats de kinase Aurora A

Substrat	Interacteur	Cofacteurs	Fonction
Aurora A(T288)	TPX2		L'activité maximale d'Aurora A
	AurKAIP1	GSK-3 β	La dégradation d'Aurora A
	HEF1		L'activation d'Aurora A (l'amplification des centrosomes)
TPX2	TPX2 (Ser 204)	PLK1	La localisation d'Aurora A aux centrosomes L'activation d'Aurora A Longueur du fuseau/ la nucléation de MT des chromosomes
PLK1 (T210)	BORA	BORA	L'activation de l'entrée en G2/M de CDK1, la libération d'Aurora A and le recrutement de TPX2
Xl-p53 (S129/190) H-p53 (S315)	TPX2		La stabilisation de p53 (Met II méiose) L'ubiquitination par MDM2 et sa protéolyse
	Cycline B1		La stabilisation de la Cycline B (prévenir l'interaction d'APC)
Cdc25B (S353)			L'activation CDK1-Cycline B1/la transition G2-M
LATS 2 (S83)			La localisation centrosomique de LATS 2 kinase
Hs-TACC3 /maskin (S558) D-TACC1(S863)		MAP215	L'interaction des MAP (dynamique du pôle de fuseau MT). La stabilisation des microtubules associés au centrosome
HDAC6	HEF 1/Cas-L (NEDD9)		Le désassemblage du cil primaire (dé-acétylation des microtubules)
D-Par 6		Numb	La polarité neuronale/ La division asymétrique L'orientation du fuseau
	Ajuba		L'activation d'Aurora A

(TPX2, Target protein for xenopus kinesine like protein 2 ; PLK1, polo-like kinase, AurKAIP1, Aurora A Kinase Interacting Protein 1, HEF1, focal adhesion scaffolding protein, LATS2, new member of the Lats tumor suppressor family, TACC, transforming acidic coiled-coil, MAP, microtubule associated protein, HDAC histone deacetylase, NEDD9, neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9, Par-6, partitioning defective 6 homolog alpha, a regulatory subunit of atypical protein kinase C (aPKC), X1 *Xenopus laevis* ; D, *Drosophila* et hs, *Homo sapiens*) (Emprunté à (Molla, 2010, Biol Mol Concepts).

Régulation d'Aurora A

Les quantités d'ARNm et de protéines Aurora A sont très faibles durant les phases G1 et S pour atteindre ensuite un pic d'expression en phase G2 et M avant de disparaître en fin de mitose. La variation du taux d'ARNm est le fruit d'une régulation très fine du gène qui reste mal connue à l'heure actuelle.

Aurora A est régulée par phosphorylations sur la thréonine 288, et les sérines 51 et 342. La phosphorylation sur la sérine 53 chez le *Xénope*, équivalente à la sérine 51 chez l'homme, empêche la dégradation de la protéine (Littlepage and Ruderman 2002). L'autophosphorylation d'Aurora A sur la thréonine 288 est indispensable pour promouvoir

l'activité kinase. La phosphorylation sur la sérine 342, quant à elle, bloque l'activité kinase de l'enzyme (Crane, Kloepfer et al. 2004).

Katayama et al. ont montré qu'Aurora A et la protéine phosphatase PP1 pouvaient se lier entre elles et se réguler réciproquement (Katayama, Zhou et al. 2001). Lors de la mutation des sites de liaison de PP1 sur Aurora A, cette dernière est hyperphosphorylée, suggérant ainsi que PP1 régulerait négativement Aurora A en déphosphorylant au moins un des résidus impliqués dans son activation. Aurora A peut également phosphoryler PP1 et l'inhiber. La phosphorylation de la sérine 342 inhiberait la liaison de PP1 à Aurora A et protégerait l'enzyme de la déphosphorylation notamment au niveau de la thréonine 288 ou des autres sites indispensables à son activité kinase.

Ajuba (Hirota, Kunitoku et al. 2003) est un activateur d'Aurora A. Elle est impliquée dans la maturation des centrosomes et interagit avec Aurora A en phase G2 du cycle cellulaire. *In vitro*, la protéine Ajuba stimule l'autophosphorylation d'Aurora A sur sa thréonine 288. Cette activation semble constituer la première phase d'activation de cette kinase, elle permet également l'activation du complexe CDK1-Cycline B sur des centrosomes. En effet, Aurora A phosphoryle la sérine 353 de Cdc25B les centrosomes sur et l'active (Dutertre, Cazales et al. 2004). La phosphatase Cdc25B peut alors éliminer la phosphorylation en thréonine 15 du complexe CDK1-Cycline B entraînant alors son activation (De Souza, Ellem et al. 2000).

Des études réalisées sur le xénope et sur des cellules humaines montrent que la destruction d'Aurora A est dépendante de l'ubiquitine ligase APC/C cdh1 (Castro, Arlot-Bonnemains et al. 2002; Littlepage and Ruderman 2002; Crane, Kloepfer et al. 2004).

Rôle d'Aurora A

Préparation de l'entrée en mitose

Durant la phase G2, Aurora A est responsable de l'activation initiale de PLK1 par phosphorylation directe sur thréonine 210 dans la boucle T de PLK1. Une fois activée, PLK1 phosphoryle à son tour Cdc25C et WEE1 et libère le complexe Cycline B/CDK1 (Seki, Coppinger et al. 2008). Cette fonction d'Aurora A dépend du facteur BORA. Il est à noter que le complexe BORA/Aurora A participe à l'entrée en mitose en phosphorylant également Cdc25B sur sa sérine 353.

La maturation des centrosomes

En phase G2 et en début de mitose, Aurora A joue un rôle important dans la maturation des centrosomes. Elle fonctionne comme une protéine d'ancrage pour recruter les protéines péricentriolaires : chTOG/MAP215, γ -tubuline, TACC3, LATS2... Les phosphorylations de LATS2, Nedl-1 et TACC3 par la kinase Aurora A permettent leur recrutement aux centrosomes et favorisent la maturation de ces structures. En absence d'Aurora A, les centrosomes sont incapables de recruter des composants de la matrice protéique péricentriolaire comme la γ -tubuline et la masse du fuseau diminue de 60% (Toji, Yabuta et al. 2004; Kinoshita, Noetzel et al. 2005) (Conte, Delaval et al. 2003). De plus, Aurora A phosphoryle la kinésine MCAK, ce qui entraîne la dépolymérisation des microtubules et perturbe la localisation d'Aurora A (Zhang, Ems-McClung et al. 2008).

L'assemblage du fuseau bipolaire

Au cours de la mitose, BORA interagit avec PLK1 phosphorylée pour libérer Aurora A. Aurora A recrute ensuite TPX2 (Target Protein for Xenopus kinesin-like protein 2), une protéine interagissant avec les microtubules et qui est le plus étudié des substrats d'Aurora A. L'interaction entre Aurora A et TPX2 limite l'effet inhibiteur de PP1 (Phosphatase Protein 1) sur Aurora A et permet alors son auto-activation par phosphorylation sur sa thréonine 288. Dans les cellules humaines, cette interaction est aussi nécessaire pour la nucléation des microtubules sur les kinétochores et l'obtention d'une longueur de fuseau correcte (Bird and Hyman 2008; Sardon, Peset et al. 2008).

Aurora A interagit aussi avec p53 et la phosphoryle sur la sérine 315, ce qui facilite l'ubiquitinylation et la déstabilisation de celle-ci par Mdm2 (Murine double minute) (Katayama, Sasai et al. 2004).

Régulation de la cytodivision

Bien qu'Aurora A soit dégradée en anaphase et en télophase, une petite proportion de la kinase est associée avec le fuseau central et le corps intermédiaire. Néanmoins, la fonction exacte d'Aurora A lors de ces événements n'est pas claire (Lens, Voest et al. 2010). Des travaux ont montré que l'introduction d'un anticorps neutralisant Aurora A dans des cellules lors de la mitose, après séparation complète des centrosomes et formation du fuseau bipolaire, empêchait la division complète de ces cellules et entraînait l'apparition de cellules multinucléées (Marumoto, Honda et al. 2003). De plus, la surexpression d'Aurora A mène également à l'absence de cytodivision, entraînant la formation de cellules binucléées (Zhang, Hirota et al. 2004).

2. Aurora B

Aurora B est nommée Aurora 1, STK12, AIM1 ou ARK2. C'est une protéine essentielle pour la progression de la mitose. Des études ont montré que la location d'Aurora B était dynamique durant la mitose. Le gène d'Aurora B chez l'Homme se localise sur le chromosome 17 en p13.1, très près du gène p53 dans une région sensible à la perte allélique dans les tumeurs.

Aurora B et le complexe de protéines passagères

Aurora B est une protéine passagère qui s'associe avec : INCENP (INner Centromere Protein), Survivine et Boréaline pour former un complexe passager chromosomique (CPC).

Les protéines passagères chromosomiques sont absentes en interphase. Elles sont présentes dans le noyau, en fin de la phase G2 et leur pic d'expression se situe en transition G2/M. Ces protéines sont caractérisées par leur localisation particulière durant la mitose. En prophase, les protéines passagères sont présentes sur la longueur des chromosomes condensés et progressivement elles se concentrent aux centromères. En prométaphase et métaphase, le CPC s'accumule sur le centromère interne. Lors de la transition métaphase-anaphase, le CPC est transféré sur le fuseau central et s'associe aux microtubules. Durant la cytotélerèse, les protéines passagères sont concentrées sur le corps intermédiaire (Cooke, Heck et al. 1987; Vagnarelli and Earnshaw 2004) (**Figure 7**).

Dans le complexe, la kinase Aurora B est le seul membre possédant une activité enzymatique. Survivine et INCENP sont à la fois des substrats d'Aurora B et des activateurs de la fonction kinase. Par exemple, INCENP se lie à Aurora B et induit un état d'activation intermédiaire en stabilisant une conformation ouverte du site catalytique de la kinase. Lorsqu'INCENP est phosphorylée, elle active de façon maximale la fonction kinase d'Aurora B (Bolton, Lan et al. 2002; Sessa, Mapelli et al. 2005). Boréaline est phosphorylée par MSP-1 (Monopolar spindle 1). Cette forme active est nécessaire pour l'activation d'Aurora B (Jelluma, Brenkman et al. 2008).

Dit autrement, l'activité de la kinase Aurora B est modulée par les membres du CPC qui agissent comme des sous-unités régulatrices de l'enzyme. En fait, dans le complexe, la partie C-terminale de Survivine interagit avec la partie N-terminale d'INCENP et avec Boréaline formant une triple hélice (Jeyaprakash, Klein et al. 2007) alors qu'INCENP interagit avec Aurora B par sa partie C-terminal. Notre étude du CPC par FRAP (Fluorescent Recovery After Photobleaching) révèle qu'Aurora B et ses partenaires d'interaction INCENP et Boréaline sont totalement immobiles en prométaphase et métaphase. Survivine est mobile

jusqu'au déclenchement de l'anaphase et puis elle reste associée à ses partenaires d'interaction quand le complexe est transféré vers les microtubules. Ces résultats montrent que les interactions entre les différents membres du CPC sont fortes. (Delacour-Larose, Molla et al. 2004; Delacour-Larose, Thi et al. 2007; Delacour-Larose, Vu et al. 2009).

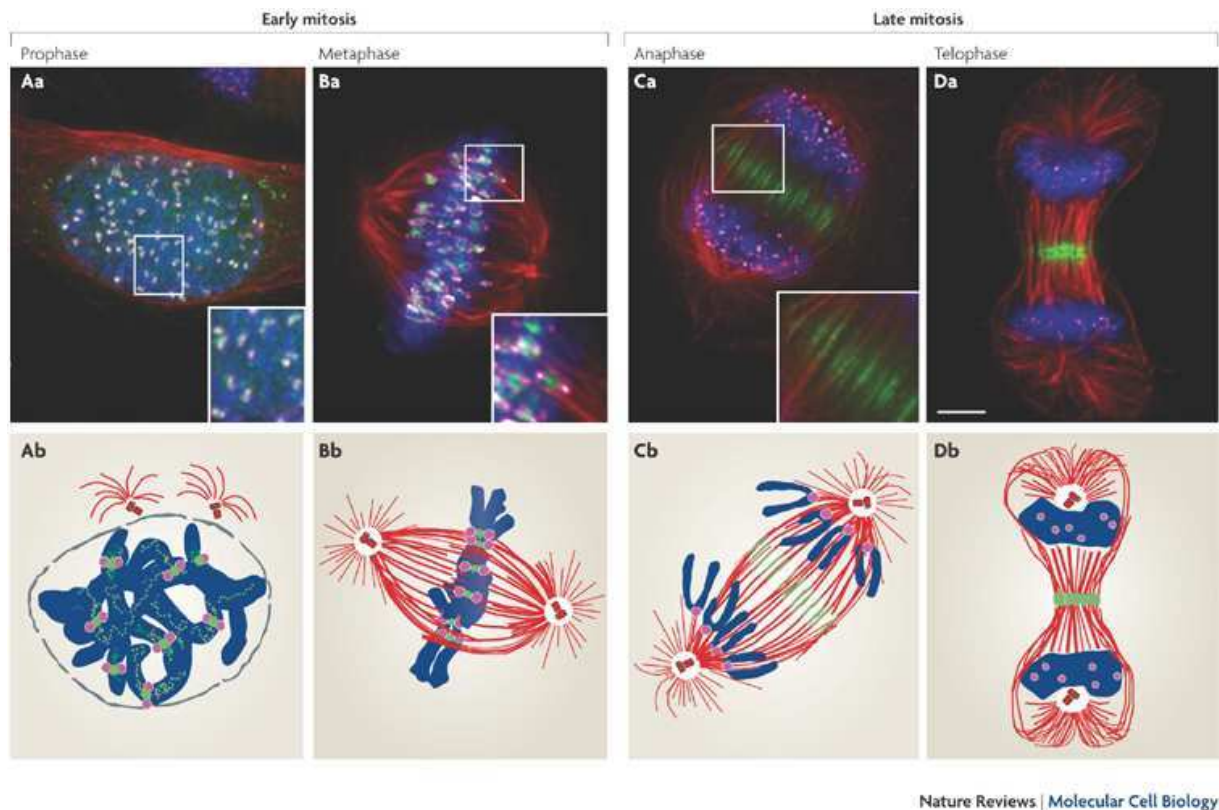


Figure 7: La localisation de la kinase Aurora B en phase de Mitose

Photos d'immunofluorescence (en haut) et représentation schématique (en bas) de la localisation d'Aurora B dans les cellules HeLa en mitose. Aurora B est en vert, α -tubuline est en rouge, les kinétochores sont en rose et l'ADN est en bleu. En prophase, Aurora B est sur le bras des chromosomes et commence à l'accumuler aux centrosomes entre les kinétochores. En métaphase, les chromosomes alignent sur l'équateur du fuseau. La tension au kinétochore est détectée par Aurora B centrosomique. En anaphase, Aurora B se concentre au corps intermédiaire (Adapté de (Ruchaud, Carmena et al. 2007)).

Les substrats de l'Aurora B

Les substrats d'Aurora B sont indiqués dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Les substrats d'Aurora B chez les vertébrales et chez les levures

<i>Substrats d'Aurora B</i>	<i>Phase de la mitose</i>
Protéines passagères	
Survivine	Mitose
INCENP	Mitose
Protéines associées aux chromosomes	
Histone H3	G2-métaphase
Complexe Ndc80	Métaphase
Ndc10p	Métaphase
Boi1 et Boi2	Métaphase
CENP-A	Métaphase
Topoisomérase II alpha	Métaphase
BUBR1	Métaphase
Protéines associées au cytosquelette	
Damp1	Métaphase
MCAK	Métaphase
MgcRac1GAP	Métaphase
Stathmine	Métaphase
Chaîne légère de la Myosine II	Cytodiérèse
Desmine	Cytodiérèse
Vimentine	Cytodiérèse

(Les lettres en gras indiquent les substrats reportés aussi chez les levures)

Régulation d'Aurora B

Comme pour d'autres kinases, le degré de phosphorylation régule directement son activité kinase. La déplétion de RKIP (Raf1 Kinase Inhibitor Protein) induit une délocalisation partielle d'Aurora B phosphorylée des kinétochores et la perte de son activité kinase (Eves, Shapiro et al. 2006).

CHK1 phosphoryle Aurora B et augmente son activité catalytique *in vitro* (Zachos, Black et al. 2007). Dans les cellules déficientes en CHK1, la localisation aberrante d'Aurora B dans la zone intermédiaire et le corps intermédiaire piège la chromatine non résolue au sillon de clivage durant la cytotiérèse et induit la régression de la cytotiérèse et la binucléation. Il est donc possible que CHK1 soit un régulateur ainsi qu'un senseur dans la voie de point de contrôle de la scission, voie contrôlée par Aurora B (Steigemann, Wurzenberger et al. 2009).

Aurora B s'autophosphoryle sur sa thréonine 232 ; C'est un mécanisme de régulation essentiel pour son activation (Yasui 2004). La protéine phosphatase 1 (PP1), présente au

niveau des kinétochores, est connue pour contrarier l'activité d'Aurora B (Sugiyama, Sugiura et al. 2002; Trinkle-Mulcahy, Andrews et al. 2003).

La poly(ADP-ribosyl)ation est une réponse cellulaire immédiate aux cassures de l'ADN qui est catalysée par les enzymes dépendant de NAD, poly(ADN-ribose) polymérase (PARP). Monaco et al décrivent la régulation de l'activité kinase d'Aurora B par poly(ADP-ribosyl)ation. L'activation de PARP en réponse aux dommages de l'ADN entraîne le blocage de la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 et cet événement est spécifique car aucunes autres modifications de l'histone H3 ne sont observées. Aurora B associée à PARP-1 et est fortement poly(ADP-ribosyl)ée en réponse aux cassures causées par les radicaux libres et les radiations ionisantes (RI). Cette modification cause l'inhibition uniquement de la kinase Aurora B car Aurora A n'est pas associée à PARP et n'est pas poly(ADP-ribosyl)ée.

Concernant sa dégradation, Aurora B est prise en charge par la voie d'ubiquitine-protéosome via le complexe APC/C (Nguyen et al. 2005). Celle-ci n'a lieu que si les domaines KEN et A-box sont intacts. APC/C-Cdh1 reconnaît spécifiquement Aurora B par son domaine D-box situé dans sa partie C-terminale. La cinétique de la dégradation d'Aurora B semble couplée avec l'initiation, la progression et la finalisation de la cytotélerèse (Stewart and Fang 2005).

Les rôles d'Aurora B

La condensation et la cohésion des chromosomes :

La condensation des chromosomes est accompagnée par une vague de phosphorylations de protéines histones et non-histones. La phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 est une des modifications épigénétiques principales de la chromatine en mitose. Aurora B phosphoryle les sérines 10 et 28 de l'histone H3 en mitose (Goto, Yasui et al. 2002; Carmena and Earnshaw 2003). Aurora B participe à la maintenance de la condensation des chromosomes car son inhibition induit la décondensation des chromosomes et la fuite du CPC de la chromatine (Hoang, Favier et al. 2009). La phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 serait responsable de la dissociation de HP1 (Heterochromatin Protein 1) de l'hétérochromatine centromérique, pour peut-être permettre la réorganisation de la chromatine en mitose (Fischle, Tseng et al. 2005; Hirota, Lipp et al. 2005).

Aurora B ne phosphoryle pas seulement la sérine 10 de l'histone H3 mais aussi le variant CENP-A sur la sérine 7. Ces phosphorylations de concert avec d'autres marques épigénétiques jouent un rôle clé dans le recrutement et la stabilisation du complexe passager sur les chromosomes (**Figure 8**). En mitose, l'histone H3 est le siège d'une phosphorylation sur la

thréonine 3 suite à l'activation de la kinase Haspine. D'après les travaux des groupes de Higgins et Funabiki, la phosphorylation de la thréonine 3 de l'histone H3 intervient en amont du recrutement du complexe passager (Kelly, Ghenoïu et al. 2010; Wang, Dai et al. 2010). En effet, Survivine reconnaît cette thréonine phosphorylée via son doigt de zinc de type BIR (Baculoviral IAP Repeat) et elle sert, par la suite, de plate-forme pour le recrutement des autres membres du complexe (Kawashima, Yamagishi et al. 2010; Yamagishi, Honda et al. 2010). La déplétion de la kinase Haspine dans les cellules eucaryotes entraîne un faible recrutement de MCAK aux centromères et prévient le déclenchement de l'anaphase via l'activation du point de contrôle du fuseau. Des effets similaires peuvent être observés par microinjection de peptide H3-Thr3-P ou d'un mutant Survivine D70A/71A. En fait, toutes ces manipulations compromettent la localisation de la kinase Aurora B sur le centromère. Le groupe de Watanabe a montré que la phosphorylation de l'histone H3 sur thréonine 3 agissait de concert avec une autre modification portée par l'histone H2A (Hoang, Favier et al. 2009; Tsukahara, Tanno et al. 2010). En effet, au cours de la mitose, la kinase BUB1 est présente sur les centromères internes et phosphoryle la sérine 210 de l'histone H2A recrutant ainsi les protéines Shugoshine (Yamagishi et al. 2010). Watanabe et al. suggèrent que la phosphorylation de l'histone H2A permet le recrutement des protéines Sgo qui attirent à leur tour la protéine Boréoline phosphorylée par CDK1 (Cdc2)-Cycline B. *In fine*, cela permet le recrutement ou la stabilisation du complexe passager (Kawashima, Yamagishi et al. 2010; Tsukahara, Tanno et al. 2010; Yamagishi, Honda et al. 2010).

Aurora B est nécessaire pour une dissociation efficace de la cohésine des bras chromosomiques en prophase. Chez les vertébrés, la cohésine est enlevée des chromatides durant la mitose par deux mécanismes distincts. Le premier dépend de PLK1 et d'Aurora B (Losada, Hirano et al. 2002; Sumara, Vorlaufer et al. 2002; Gimenez-Abian, Sumara et al. 2004). L'activité d'Aurora B empêche la localisation de Sgo1 sur les bras chromosomiques et la restreint à la région centromérique (Dai, Sullivan et al. 2006) (Resnick, Satinover et al. 2006; Lipp, Hirota et al. 2007). Alternativement, HP1 influence le recrutement de la cohésine sur la chromatine (Bernard, Maure et al. 2001; Nonaka, Kitajima et al. 2002) et comme nous venons de le décrire sa rétention sur les chromosomes est dépendante d'Aurora B.

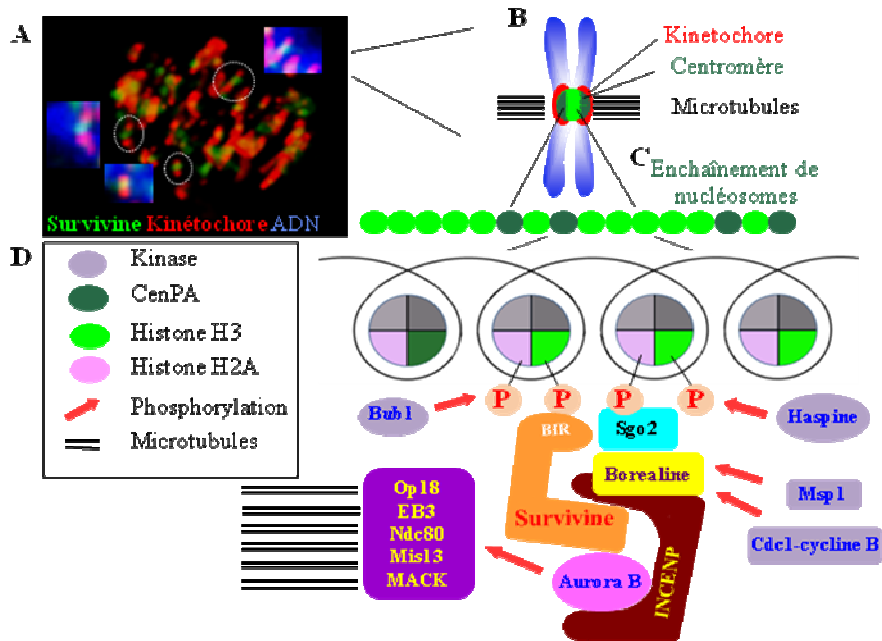


Figure 8: Schématisation des marqueurs épigénétiques centromériques.

A : Visualisation de la présence de la protéine Survivine sur le centromère interne.

B : Schématisation de l'interface centromère-kinétochore sur un chromosome mitotique et visualisation de la répartition des histones H3 (vert clair) et CENP-A (vert foncé).

C : Agencement de l'enchaînement des nucléosomes centromériques en mitose

D : Cascade d'évènements sur la chromatine centromérique. La phosphorylation d'Histone H3 en Thr3 par Haspine induit le recrutement de la protéine Survivine tandis que les phosphorylations concomitantes de Boréaline par CDK1-Cycline B et de Shugoshine par Bub1 assurent l'ancrage du complexe passager sur le centromère interne. D'autres kinases facilitent l'interaction entre les différents partenaires au sein du complexe passager (Msp-1, PLK1, ...). La kinase Aurora B activée par Survivine et INCENP phosphoryle ses substrats à savoir CENP-A, Histone H3, MCAK, Op18, Mis13.

L'assemblage du fuseau mitotique :

Aurora B phosphoryle aussi MCAK (Mitotic Centromere Associated Kinase), un de ses substrats clé, et la stathmine 1. MCAK se localise aux centromères des chromosomes et participe au mouvement de congression des chromosomes ainsi qu'à la formation du fuseau bipolaire. MCAK dépolymérise les microtubules permettant ainsi à d'autres microtubules de venir s'attacher sur les kinétochores libres (Andrews, Ovechkina et al. 2004). Par d'ailleurs, la phosphorylation de MCAK par Aurora B permet l'interaction entre MCAK et une protéine activatrice du nom d'ICIS (pour Inner Centromere KinI Stimulator) (Ohi, Coughlin et al. 2003). La localisation d'ICIS aux centromères permet d'activer MCAK. Le couple MCAK/ICIS déstabilise alors les attachements entre microtubules et kinétochores localisés à proximité du centromère (attachement syntéliques et mérotéliques)

Aux centromères, l'inhibition du complexe op18/stathmine suite à sa phosphorylation par Aurora B est nécessaire pour un assemblage correct du fuseau (Gadea and Ruderman 2006).

La précision nécessaire à la ségrégation des chromosomes exige que toutes les chromatides dupliquées soient attachées aux microtubules qui émanent des pôles opposés du fuseau mitotique. Dans les cellules traitées par l'Hesperadine, un inhibiteur d'Aurora B, les attachements entre kinétochores et microtubules sont en grande partie de type syntéliques (**Figure 9**) et le nombre d'attachements de type monotélique est diminué. Aurora B, en déstabilisant les microtubules mal attachés, est essentielle pour la bi-orientation chromosomique (Tanaka, Rachidi et al. 2002; Hauf, Cole et al. 2003; Lampson, Renduchitala et al. 2004) (**Figure 10**).

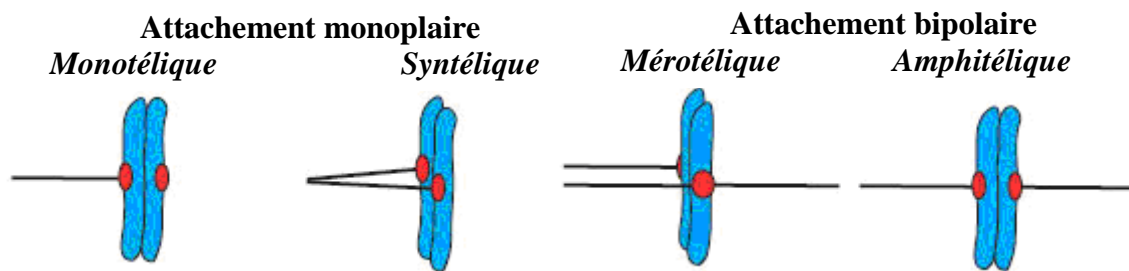


Figure 9: Schématisation des différents types d'attachements entre microtubules et kinétochores (Cimini and Degrossi 2005)

Les microtubules qui s'attachent de façon non-bipolaire ne créent pas de tension mécanique sur les centromères et en conséquence, le kinétochore reste proche d'Aurora B sur le centromère intérieur (Tanaka, Rachidi et al. 2002; Andrews, Ovechkina et al. 2004; Liu, Vader et al. 2009). En absence de tension, Aurora B phosphoryle les substrats du kinétochore incluant HEC1, KNL1, qui à la fois déstabilisent les attachements des microtubules et réduisent le recrutement de PP1 aux kinétochores. En présence d'une tension, ces substrats s'éloignent et sont déphosphorylés par PP1 entraînant la stabilisation des attachements biorientés (Liu, Vader et al. 2009; Liu, Vleugel et al. 2010).

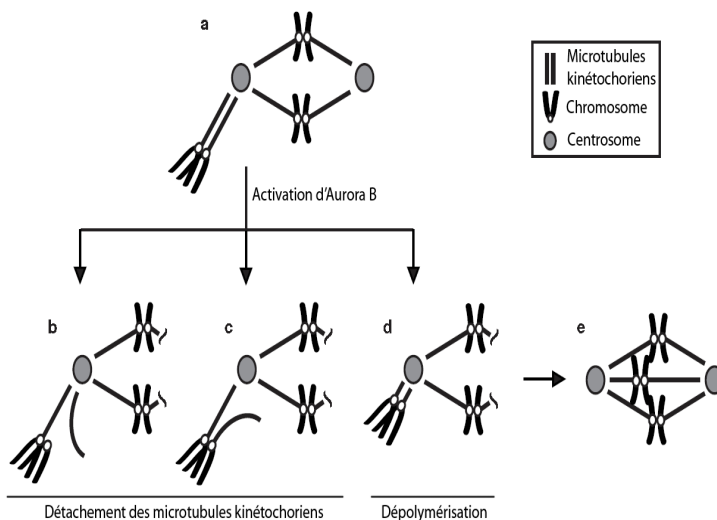


Figure 10: Mécanisme de correction par Aurora B des erreurs d'attachement au cours de la mitose.

(a) Les attachements syntéliques entre microtubules et kinétochores correspondent à l'attachement de deux chromatides sœurs au même centrosome. L'activité kinase d'Aurora B est impliquée dans la correction de ces attachements. Cela peut se produire par déstabilisation des microtubules à partir des kinétochores (b) ou des centrosomes (c). (d) Les chromatides migrent alors jusqu'au pôle avant d'être réalignées sur la plaque métaphasique (Lampson, Renduchitala et al. 2004).

Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau :

Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau (SAC : Spindle Assembly Checkpoint, **Figure 11**) supervise la transition de la métaphase vers l'anaphase. Le complexe SAC comprend MPS1, MAD (MAD1, MAD2 ou MAD3/BUBR1) et BUB (BUB1 et BUB3). Le SAC contrôle l'activité d'APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome).

Des études indiquent que le maintien de l'association de MAD2 et BUBR1 avec les kinétochores nécessite l'activité d'Aurora B (Ditchfield, Johnson et al. 2003). En effet, elle est impliquée directement dans le recrutement des protéines du kinétochore comme BUB1, BUB3, CENP-E, MAD1 ou MAD2 (Vigneron, Prieto et al. 2004).

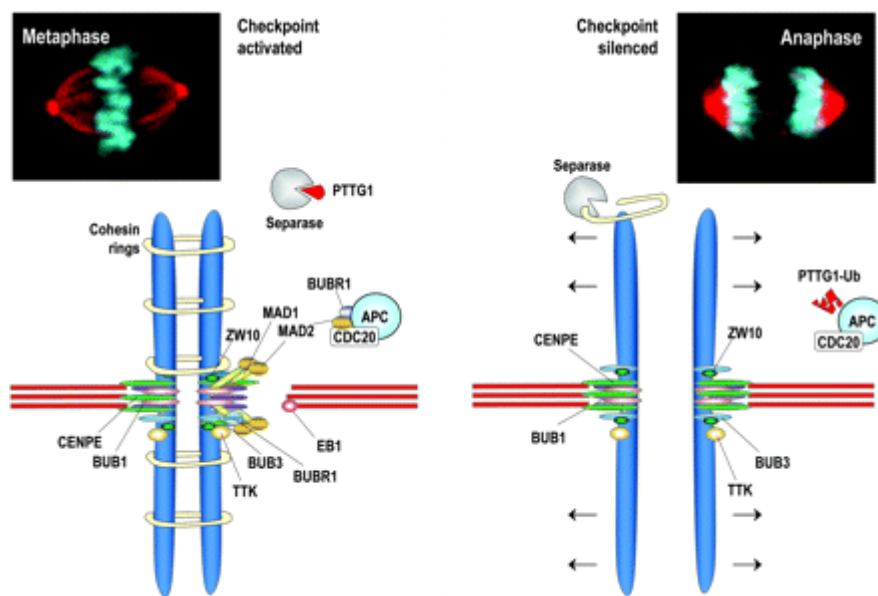


Figure 11 : Illustration de l'action du point de contrôle du fuseau mitotique.

La cohésion des chromatides sœurs est maintenue jusqu'à la métaphase par le complexe cohésine dont la stabilité est assurée par la voie de la signalisation qui détecte les kinétochores non attachés. Le manque d'attachement est détecté par les kinases BUB1, BUBR1 ou TTK, CENPE. Ces protéines recrutent des hétérodimères MAD1/MAD2. MAD2 séquestre rapidement Cdc20 et inhibe l'activité d'APC/C. Après l'attachement microtubulaire, MAD2 est libérée du complexe APC/C ce qui entraîne son activation, l'ubiquitination puis la destruction de PTTG1. Ensuite, la séparase est activée, ce qui désassemble le complexe cohésine. La tension est ensuite générée entre les kinétochores bi-orientés causant leur séparation durant l'anaphase. Les photos représentent les cellules NIH3T3 en métaphase et anaphase. L'ADN est en bleu et les microtubules sont en rouge (Perez de Castro, de Carcer et al. 2007).

La kinase MPS1 (Mono Polar Spindle 1, connue aussi sous le nom de TTK) est une sérine/thréonine kinase qui joue un rôle critique dans la signalisation de SAC en contrôlant l'alignement des chromosomes et en influençant la stabilité de l'interaction kinétochore-microtubule. Dans les cellules mammifères, MPS1 est nécessaire pour la correction des erreurs d'attachement kinétochore-microtubule (Jelluma, Brenkman et al. 2008; Santaguida, Tighe et al. 2010; Sliedrecht, Zhang et al. 2010) par phosphorylation directe de Boréaline

(Jelluma, Brenkman et al. 2008; Bourhis, Lingel et al. 2009; Kwiatkowski, Jelluma et al. 2010; Sliedrecht, Zhang et al. 2010). Par suite, elle entraîne l'augmentation de l'activité d'Aurora B (Espeut, Gaussen et al. 2008; Maciejowski, George et al. 2010; Santaguida, Tighe et al. 2010).

La sortie de la mitose et la cytotérière :

Aurora B contribue à la réussite de la cytotérière par phosphorylation de MgcRacGAP et de la kinésine 6 (Minoshima, Kawashima et al. 2003; Cimini 2007). Elle phosphoryle aussi plusieurs protéines impliquées dans la cytotérière comme la vimentine, la desmine et GFAP, MKLP1 ou la condensine1. Par exemple, en absence de la phosphorylation par Aurora B de la vimentine, les deux cellules filles restent attachées l'une à l'autre et la cytotérière échoue (Goto, Yasui et al. 2003; Minoshima, Kawashima et al. 2003; Lipp, Hirota et al. 2007). Aurora B phosphoryle la myosine II et l'inhibition d'Aurora B cause la perte de localisation de la myosine II et donc la perturbation de l'organisation du corps intermédiaire (Straight, Cheung et al. 2003).

La cytotérière doit être coordonnée avec la séparation et la ségrégation des chromosomes afin d'assurer la maintenance d'un génome intact. Elle n'a donc lieu que quand le matériel chromosomique a disparu du sillon de division. Récemment, Steigemann et al. ont montré que le CPC et Aurora B participaient au point de contrôle appelé NoCut qui empêche l'abscission en réponse à la présence d'ADN (Steigemann, Wurzenberger et al. 2009).

En sortie de mitose, la région de D-box d'Aurora B est reconnue par APC/C entraînant son ubiquitination et la dégradation d'Aurora B comme indiqué ci-dessus (Stewart and Fang 2005).

En résumé, Aurora B est responsable de la marque épigénétique clé de la mitose : la phosphorylation de l'histone H3. La kinase Aurora B est directement impliquée dans la séparation des chromosomes en phosphorylant MCAK et en activant les protéines responsables du point de contrôle du fuseau mitotique lorsque les kinétochores ne sont pas attachés correctement. Elle participe aussi à la cytotérière en phosphorylant des éléments du corps intermédiaire.

3. Aurora C

Aurora C est connue sous les noms d'Aurora 3, STK13, AIK3 ou AIE-2 et a été peu étudiée. Elle a été découverte dans le sperme puis dans les ovaires de souris (Tseng, Chen et al. 1998). Aurora C est surexprimée dans les testicules et dans certaines lignées cancéreuses

comme HepG2, HeLa, HuH7 et MDA-MB-453 (Meraldi, Honda et al. 2004; Giet, Petretti et al. 2005). Les protéines Aurora B et C ont un haut niveau de similitude dans leur domaine catalytique (Barr, Sillje et al. 2004; Chen, Tang et al. 2005). Aurora C participe durant la spermatogenèse, à la formation du fuseau méiotique (Hu, Chuang et al. 2000). Récemment, Aurora C a été montrée comme étant essentielle pour la fertilité masculine chez l'Homme (Dieterich, Soto Rifo et al. 2007) et la souris (Kimmins, Crosio et al. 2007). La déficience en Aurora C cause l'échec de la cytodierèse en méiose I chez la souris (Matthew, Yen et al.). La dérégulation d'Aurora C, tout comme celle d'Aurora B, pourrait être associée à une mauvaise séparation des chromosomes lors de la méiose.

III. Polo-Like Kinase (PLK)

Les Polo-like kinases (PLK) sont une famille de sérine-thréonine kinases régulatrices très conservées, qui jouent un rôle clé dans la division cellulaire. Les génomes de *D.melanogaster*, *S.cerevisiae* et *S. pombe* n'ont qu'une seule PLK (Polo, Cdc5 et Plo1, respectivement). Cinq membres de cette famille présentant une architecture unique sont identifiés chez les mammifères: PLK1, PLK2 (SNK), PLK3 (FNK ou PRK), PLK4 (SAK) et PLK5 (Lens, Voest et al. 2010).

Le domaine polo-box (PBD) très conservé dans la partie C-terminal de la protéine est une caractéristique commune des PLKs. Les PBDs sont des motifs de localisation dépendant de la phosphorylation qui emmènent la kinase à proximité de ses substrats (Barr, Sillje et al. 2004).

PLK1 se localise dans le cytoplasme et le noyau durant la phase G2 et est retrouvée sur les centrosomes. Au début de mitose, PLK1 se trouve aux centrosomes et aux kinétochores et ce jusqu'à sa dégradation. Une fraction de PLK1 est transférée au corps intermédiaire en fin de mitose (Figure 12).

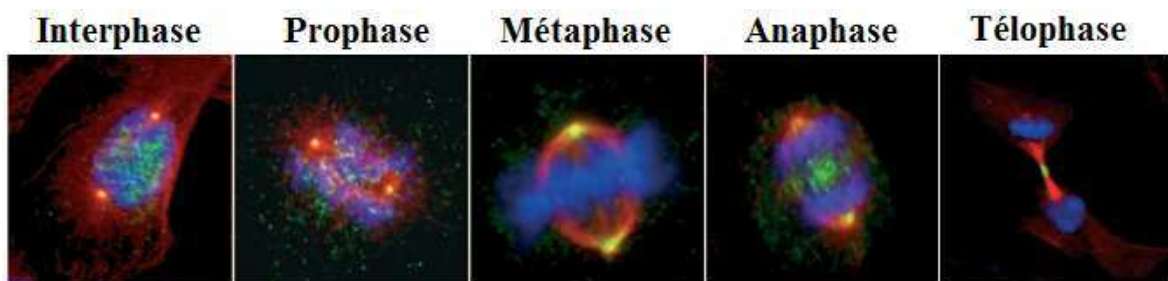


Figure 12 : Localisation de PLK1 en mitose. PLK1 est en vert, la tubuline est en rouge et l'ADN est en bleu (Perez de Castro, de Carcer et al. 2007).

1. Régulation des PLK

L'activité de PLK1 est régulée à la fois dans le temps et l'espace. Le contrôle temporel est réalisé par la régulation transcriptionnelle, la phosphorylation et la protéolyse; le contrôle spatial est réalisé par des interactions protéiques. Les mécanismes régulateurs des PLK pourraient différer entre les espèces et même au sein d'un même organisme.

Les niveaux d'expression des ARNm et de la protéine PLK sont faibles durant la phase G1 et augmentent au cours de la phase S pour atteindre leur maximum pendant les phases G2-M; PLK revient à un niveau basal en fin de mitose (Uchiyama, Longo et al. 1997). p53 et sa cible p21 sont des régulateurs de la transcription de PLK1, peut-être via l'élément CDE/CHR (Cell cycle Dependent Element/Cell cycle gene Homology Region) (Martin and Strebhardt 2006). Les protéines de la famille RB (Retino-Blastoma) répriment aussi la transcription des PLK de manière dépendante d'E2F et indépendante de CDE/CHR (Uchiyama, Longo et al. 1997; Ren, Cam et al. 2002; Gunawardena, Siddiqui et al. 2004).

Comme les autres kinases, les kinases PLK sont activées par phosphorylation sur la boucle d'activation (boucle T). La phosphorylation de la thréonine 210 de PLK1 est cruciale pour son activation. Plusieurs études récentes proposent que la kinase Aurora A, avec l'aide de son co-facteur BORA, initie l'activation des PLK au cours de la phase G2 (Macurek, Lindqvist et al. 2008; Seki, Coppinger et al. 2008).

Les kinases PLK peuvent être inactivées par la déphosphorylation de la thréonine 210. PP1 et son adaptateur MYPT1 (Myosin Phosphatase Targeting subunit 1) répriment PLK. La déplétion de MYPT1 sauve des défauts mitotiques causés par la déplétion de PLK 1 et entraîne l'augmentation de la phosphorylation de PLK1 sur thréonine 210 (Yamashiro, Yamakita et al. 2008).

Les PLKs sont régulées par les phosphorylations supplémentaires sur d'autres résidus. PLK1 est phosphorylée sur la sérine 137 en fin de la mitose et cet événement modifie la spécificité de substrat du domaine kinase (van de Weerd, van Vugt et al. 2005). Dans les cellules humaines, la phosphorylation de la sérine 49 de PLK1 par PAK1 (p21-Activated protein Kinase 1) induit la fonction de PLK1 lors de la transition métaphase-anaphase (Maroto, Ye et al. 2008).

Le PBD (le domaine Polo-box) jouerait un rôle dans la régulation spatiale de PLK1 par interactions protéiques. Les séquences de reconnaissance consensus de nombreuses protéines liant PBD sont ciblées par des kinases comme les CDKs et les protéines kinases activées par des mitogènes. Les liaisons de PLK1 en début et milieu de mitose avec INCENP (Goto,

Kiyono et al. 2006), BUB1 (Qi, Tang et al. 2006), et peut-être BUBR1 (Wong and Fang 2007) semblent être amorcées par la phosphorylation de CDK1.

En fin de mitose, lorsque l'activité de PLK1 n'est plus requise, elle est dégradée par la voie ubiquitine-protésome via le complexe APC/C Cdc20. La déplétion de CDH1 (Cdc Homologue 1), un adaptateur d'APC, entraîne l'accumulation de PLK1 chez les mammifères. De même, la déplétion de Cdc20, un autre adaptateur d'APC, entraîne aussi l'augmentation significative de PLK1 dans les fibroblastes embryonnaires de souris dérivés des embryons déficients en *Cdh1*^{-/-} (Garcia-Higuera, Manchado et al. 2008).

2. Les substrats de PLK

Les substrats de PLK1 sont listés dans le **Tableau 3** ci-après :

Tableau 3: Les substrats de la kinase PLK1

Localisation du substrat	Substrats
Centrosome	Cycline B WEE1 Cdc25C Asp Stathmine/OP18 Emi1 Nlp1
Kinétochore Fuseau Centrosome	APC1 APC5 Cdc16 Cdc23 Cdc27 TCTP
Fuseau central	MLKP1 MLKP2 Nir2 NUDC
Chromatine	Claspine SCC1
L'appareil de Golgi	Grasp65 MYT1

(MKLP, mitosis kinesin-like protein; NUDC, nuclear distribution protein C homologue; Nir2, the peripheral Golgi *protein*; SCC, Spirochetal Coiled-Coil protein; Nlp, Ninein like protein; MYT1, Myelin Transcription factor 1; TCTP, translationally controlled tumor *protein*; Cdc, cell division cycle; APC, Adenomatous polyposis coli; Grasp65, Golgi-associated protein; MYT1, early mitotic inhibitor 1; WEE1, a nuclear kinase) (Adapté de (van Vugt and Medema 2005)).

3. Rôles de PLK1

PLK1 est la plus caractérisée des PLKs chez les mammifères. Elle contrôle les étapes critiques de la mitose comprenant l'initiation de l'entrée en mitose, la maturation et la séparation des centrosomes nécessaires pour la formation du fuseau mitotique bipolaire, la transition de la métaphase à l'anaphase, la sortie de mitose (Schoffski 2009) (**Figure 13**).

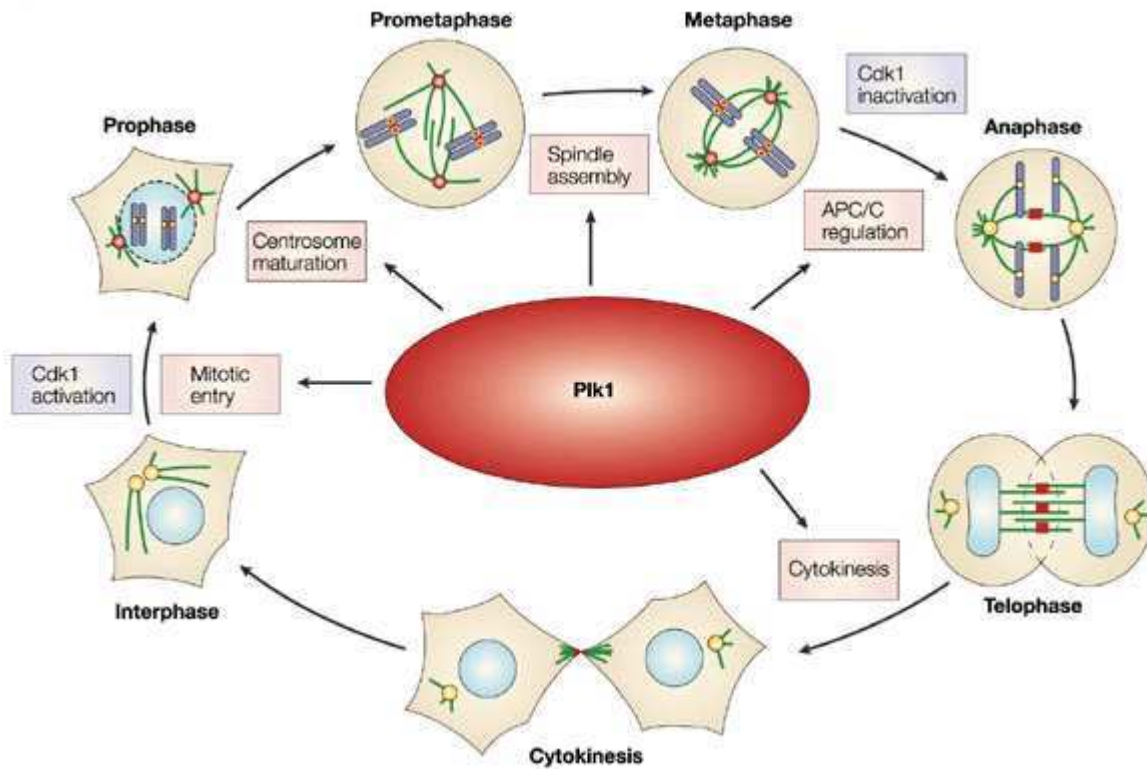


Figure 13 : Illustration des rôles de Polo-like kinase 1 (PLK1) dans le cycle cellulaire chez les mammifères.

Les différentes étapes de la division cellulaire pendant lesquelles PLK1 est active. L'ADN et les chromosomes sont présentés en bleu, les microtubules sont en vert, les centrosomes et les kinétochores sont en jaune. Tandis que PLK1 est en rouge (Barr, Sillje et al. 2004).

Préparation de l'entrée en mitose:

PLK1 participe à l'activation du complexe CDK1-Cycline B, essentiel à la mitose. Elle induit directement l'entrée en mitose en phosphorylant d'une part Cycline B sur la sérine 147, ce qui favorise sa location nucléaire (Toyoshima-Morimoto, Taniguchi et al. 2001), et d'autre part Cdc25C, ce qui entraîne sa migration vers le noyau (Toyoshima-Morimoto, Taniguchi et al. 2002). PLK1 induit le recrutement de la kinase Aurora A aux centrosomes en fin de phase G2 ; Aurora A recrute ensuite la Cycline B et phosphoryle Cdc25B.

La formation du fuseau mitotique bipolaire

PLK1 participe à la maturation des centrosomes. PLK1 phosphoryle Nlp (Ninein like protein), une protéine centrosomique en interphase et un régulateur de la nucléation des

microtubules. Cette phosphorylation recrute la γ -tubuline (Casenghi, Meraldi et al. 2003). En plus, elle phosphoryle également Kizuna pour préserver l'intégrité des centrosomes. Un défaut de Kizuna ou l'inhibition de sa phosphorylation par PLK1 sur la thréonine 379 entraîne une déstabilisation des centrosomes (Feng, Yuan et al. 2006; Oshimori, Ohsugi et al. 2006).

La cohésion des chromatides sœurs et la fonction des kinétochores:

Chez les vertébrés, en prophase et prométhaphase, l'enlèvement des cohésines des bras chromosomiques est régulé par WAPL (WingAPart-Like homologue), une protéine se liant à la cohésine (Gandhi, Gillespie et al. 2006; Kueng, Hegemann et al. 2006) et par la déphosphorylation dépendante de PLK1 de Sa2 (Stromal antigen 2), une sous-unité de la cohésine (Losada, Hirano et al. 2002; Gimenez-Abian, Sumara et al. 2004; Hauf, Roitinger et al. 2005).

PLK1 participe également à l'attachement chromosomes-fuseau. Elle interagit avec INCENP après la phosphorylation de celui-ci par CDK1 sur la thréonine 388. Cette interaction est importante pour la localisation de PLK1 aux kinétochores et pour emmener PLK1 à proximité d'Aurora B. L'inhibition de PLK1 cause un retard mitotique car les kinétochores sont détachés et le point de contrôle ne peut donc pas être désactivé, indiquant que PLK1 favorise la formation d'attachements stables (Sumara, Gimenez-Abian et al. 2004; van Vugt, van de Weerdt et al. 2004; Lenart, Petronczki et al. 2007).

La sortie de mitose et la cytodièrese:

Une fois l'alignement des chromosomes réussi, Cycline B et Sécurine sont dégradées par le complexe APC/C lié avec Cdc20 et les cellules entrent en anaphase. La diminution de l'activité de CDK1 induit la translocation d'Aurora B et de PLK1 vers le fuseau central. Des travaux ont indiqué que PLK1 est clairement nécessaire pour l'initiation de la cytodièrese tandis qu'Aurora B serait plus importante pour l'accomplissement de celle-ci. PLK1 et INCENP sont nécessaires pour le recrutement de MKLP2 (Mitotic Kinesin Like Protein 2) au fuseau central et, à son tour, MKLP2 dirige la localisation au fuseau central d'Aurora B et de PLK1 (Neef, Gruneberg et al. 2007; Hummer and Mayer 2009). L'inhibition de PLK1 provoque une mauvaise localisation d'Aurora B et d'autre part la déplétion d'INCENP perturbe la localisation de PLK1.

HsCyk4 est une protéine RhoGAP localisée sur le fuseau intermédiaire. Durant l'anaphase, elle interagit avec RhoGEF Ect2 (Rho Guanine-nucleotide Exchange Factor Epithelial cell transforming 2), ce qui permet son recrutement sur le fuseau intermédiaire. La phosphorylation de hsCyk4 par PLK1 induit la formation du complexe entre Cyk4 et ECT2.

Cet événement est nécessaire pour activer la GTPase RhoA et suit l'assemblage et l'ingression de l'anneau contractile (D'Avino, Savoian et al. 2005; Barr and Gergely 2007).

4. Rôles des PLK2, PLK3, PLK4 et PLK5

Les rôles de la kinase PLK1 dans le cycle cellulaire sont bien étudiés, ceux de PLK2 et PLK3 sont assez peu connus.

PLK2 est une cible transcriptionnelle de p53 et est impliquée dans la duplication des centrioles. Les fonctions les plus connues de PLK2 concernent le système nerveux où la kinase est définie comme étant un régulateur de la plasticité synaptique (Burns, Fei et al. 2003; Warnke, Kemmler et al. 2004; Ang, Seeburg et al. 2008; Seeburg, Feliu-Mojer et al. 2008; Seeburg and Sheng 2008; Inglis, Chereau et al. 2009). Concernant le cycle cellulaire, PLK2 pourrait agir en phase S au niveau du point de contrôle (Matthew, Yen et al. 2007). PLK3 est nécessaire pour la transition de phase G1-S (son pic d'expression est obtenu en G1) et se localise dans les nucléoles, en interphase. Elle est nécessaire à l'expression de Cycline E et l'entrée en phase S. L'interaction avec Cdc25A pourrait réguler l'entrée en phase S car l'épuisement en Cdc25A entraîne l'atténuation de l'expression de Cycline E (Zimmerman and Erikson 2007). PLK3 pourrait aussi activer p53 lors de réponses à différents types de stress cellulaires (Xie, Wu et al. 2001).

PLK4 se trouvent sur ou près des centrioles tout au long du cycle cellulaire. PLK4 a un rôle de régulateur clé de la duplication des centrosomes et sa fonction est essentielle pour l'embryogenèse précoce (Nigg 2007).

Récemment, PLK5 a été impliquée dans les réponses aux dommages à l'ADN (Andrysik, Bernstein et al. 2010; Lens, Voest et al. 2010).

IV. Les protéines kinases type NIMA et Nek

NIMA (Never In Mitosis A) est une kinase mitotique essentielle qui a été décrite la première fois chez des mutants thermosensibles d'*Aspergillus nidulans* (Osmani, McGuire et al. 1991). Ces mutants sont en arrêt en phase G2 à température restrictive alors que la surexpression de NIMA accélère l'entrée en mitose (Osmani, Pu et al. 1988; Osmani, McGuire et al. 1991) causant la rupture de l'enveloppe nucléaire, la condensation des chromosomes et la formation prématurée du fuseau mitotique. Le niveau de NEK2 est élevé dans les tumeurs de cancers du sein, du col de l'utérus et du carcinome de la prostate. Chez

l'humain, le gène *Nek2* localisé sur le chromosome 1 en q32, est trouvé amplifié dans les cancers du sein et de l'estomac (Hayward and Fry 2006).

Il y a au moins 11 NRK ou NEK (NIMA-related kinase, NEK 1-11) identifiées chez l'Homme. NEK2 semble être la protéine la plus homologue aux protéines NIMA d'après sa structure et sa fonction et elle est bien caractérisée. Il existe 2 variants de NEK2 identifiés: NEK2A et NEK2B. NEK2B est une version courte de NEK2A. Il lui manque en effet deux parties, la « KEN box » et la « destruction box », trouvées en C-terminal de la protéine NEK2A ce qui fait que, NEK2B est exprimée plus longtemps que NEK2A en mitose.

L'expression de NEK2 augmente en transition G1/S et son pic d'expression est trouvé durant les phases S et G2. Les deux variants s'associent aux centrosomes tout au long de la mitose, mais leurs signaux diminuent rapidement car elles sont dégradées durant celle-ci.

Jusqu'à maintenant, le rôle exact de NEK2 et son mécanisme d'action dans le cycle cellulaire ne sont pas encore connus, mais quelques pistes sont proposées. Elle pourrait participer à l'assemblage et à la maturation des centrosomes, à la séparation des centrosomes en s'associant à C-Nap1 et contribuerait la transition G2/M et à la progression en mitose (Osmani, Pu et al. 1988; Osmani, McGuire et al. 1991; Fry, Mayor et al. 1998; Sonn, Khang et al. 2004)

CHAPITRE III: LES KINASES, PROTEINES CLES DE L'AVANCEMENT DU CYCLE CELLULAIRE

I. Interconnexion entre les kinases mitotiques

La mitose est une phase critique et savamment orchestrée du cycle cellulaire. La progression en mitose requiert la participation de nombreuses protéines kinases qui doivent fonctionner harmonieusement. L'interconnexion entre les kinases mitotiques est présentée dans le schéma ci-après (**Figure 14**, adapté de Molla, 2010). Ces protéines kinases coopèrent pour activer les points de contrôle mitotiques à savoir :

- Le point de contrôle en G2 qui permet l'entrée en mitose, implique l'activation du complexe Cdk1/Cycline B. L'activation de ce complexe requiert la phosphorylation de CDK1 par CAK et PLK ainsi que la déphosphorylation de CDK1 par la famille des phosphatases Cdc25. Suite à sa phosphorylation par Aurora A et son partenaire Bora, PLK1 est activée. La phosphorylation de Cdc25C par PLK1 augmente l'activité de cette phosphatase. Aurora A phosphoryle aussi Cdc25B et induit l'activation de cette phosphatase. Greatwall (MASTL chez l'homme) participe à l'activation le complexe Cdk1/Cycline B par augmentation de l'activité de Cdc25C. Cette kinase maintient aussi l'activité du complexe Cdk1/Cycline B durant la mitose. Une fois activé, le complexe Cdk1/Cycline B migre dans le noyau où il trouve la plupart de ses substrats. MELK (Maternal embryonic leucine zipper kinase) est capable de phosphoryler Cdc25B sur la sérine 323 et son inhibition accélère l'entrée en mitose.

- Le point de contrôle du fuseau mitotique est sensible à la tension des kinétochores. Ce système permet la vérification de l'attachement des chromosomes au fuseau et empêche que la cellule entre en l'anaphase tant que tous les chromosomes ne sont pas correctement orientés et alignés sur la plaque métaphase. Il est activé soit par la présence des chromosomes non attachés soit par l'absence de tension entre kinétochores appareillés. Les kinétochores non-attachés attirent les composants senseurs du point de contrôle comme BUB, MAD, CENP-E et MPS1. Ces protéines fonctionnent comme des transducteurs de signaux causant l'inhibition du complexe APC/^{CCcd20}. PLK1 est nécessaire pour cibler MAD2 et BUBR1 aux kinétochores et pour la stabilisation des interactions microtubule-kinétochore créant la tension. La phosphorylation de Boréoline par MPS1 augmente l'activité de la kinase Aurora B qui est nécessaire pour la correction des erreurs d'attachement. La kinase NEK2 contribue

aussi l'attachement correct des kinétochores aux microtubules par phosphorylation de HEC1, une protéine kinétochorienne clé.

- Le point de contrôle NoCUT est important pour maintenir la stabilité chromosomique. En effet, une cytotérière dérégulée peut causer une rupture chromosomique, probablement un réarrangement des chromosomes et l'aneuploïde. NoCUT est activé par la présence des chromatides non ségréés et d'ADN dans le sillon de division. Aurora B joue un rôle crucial dans ce point de contrôle car sa présence au centre du fuseau aide à détecter les chromosomes non- ou mal- ségréés et activer le point de contrôle NoCUT. Ce point de contrôle est désactivé quand toutes les chromatides sont ségréés correctement et les deux lots d'ADN séparés. Ensuite, la cytotérière peut avoir lieu (Mendoza, Norden et al. 2009).

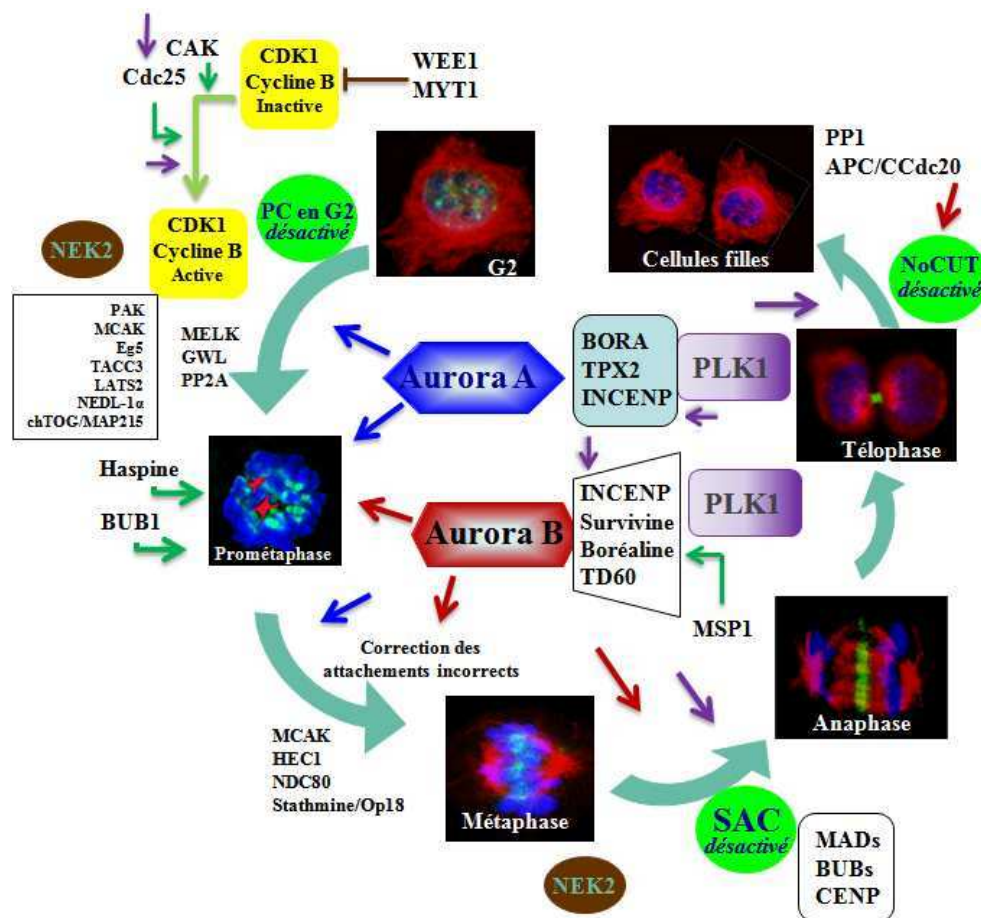


Figure 14 : La relation des principales protéines mitotiques et de leurs partenaires en mitose

Les différentes phases de la mitose sont représentées par les images d'immunofluorescence. Aurora B est visualisé en vert, la tubuline est en rouge et l'ADN en bleu.

L'implication de chaque kinase clé aux différentes phases est visualisée par les flèches en couleur: bleues pour Aurora A, rouges pour Aurora B et violettes pour PLK1, vertes pour les autres kinases. La fonction de kinases est expliquée dans le texte ci-dessus. Pour assurer la progression mitotique, les cellules doivent désactiver des points de contrôle (PC): 1) Le point en G2 contrôle l'intégrité génomique, 2) le point du fuseau (SAC) contrôle la tension des kinétochores et finalement, 3) le point de contrôle NoCUT assure que la cytotérière est complète. Ces trois points de contrôle indiqués en vert sont sous la dépendance des kinases Aurora (Adapté de Molla, 2010, Biol Mol Concepts).

II. La réponse aux dommages à l'ADN

Le point de contrôle de G2 est aussi sous la dépendance des voies de la réparation de l'ADN via des protéines kinases.

La réponse aux dommages de l'ADN représente un système de signalisation régulant de multiples voies incluant les points de contrôle, la réparation de l'ADN, la régulation transcriptionnelle et l'apoptose. Quand des cassures sont causées par des agents de dommage à l'ADN, les points de contrôle sont activés et bloquent l'entrée de la phase S (le point de contrôle G1-S), retardent la progression de la phase S (le point de contrôle de phase S) ou préviennent l'entrée en mitose (le point de contrôle de la phase G2-M). Ensuite, ces événements dirigent les mécanismes de réparation par transcription de gènes spécifiques pour la réparation. Si la réparation échoue, les points de contrôle provoquent l'apoptose indépendamment ou dépendamment de p53. Finalement, les points de contrôle représentent les chefs d'orchestre centraux du réseau de réponses aux dommages de l'ADN.

1. La voie ATM/ATR-CHK1/CHK2

a. Les transducteurs ATR (*Ataxia Telangiectasia et RAD-3 related*) et ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*)

La première étape de l'activation du point de contrôle des dommages de l'ADN est la reconnaissance de l'ADN endommagé. Les complexes MRN (MRE11-RAD50-NBS1) et ATRIP (ATR Interacting Protein) recrutent ATM et ATR aux cassures de l'ADN, respectivement, où ils sont initialement activés. La phosphorylation d'H2AX sur la sérine 139 dépendante d'ATM est un des signes les plus précoces des dommages de l'ADN et est nécessaire pour une réparation efficace. Les foyers de γ H2AX sont observés seulement quelques minutes après exposition aux radiations ionisantes (RI) et la phosphorylation est maximum après 30 minutes (Celeste, Fernandez-Capetillo et al. 2003; Pilch, Sedelnikova et al. 2003). γ H2AX est donc considéré comme un marqueur de dommage de l'ADN (**Figure 15**).

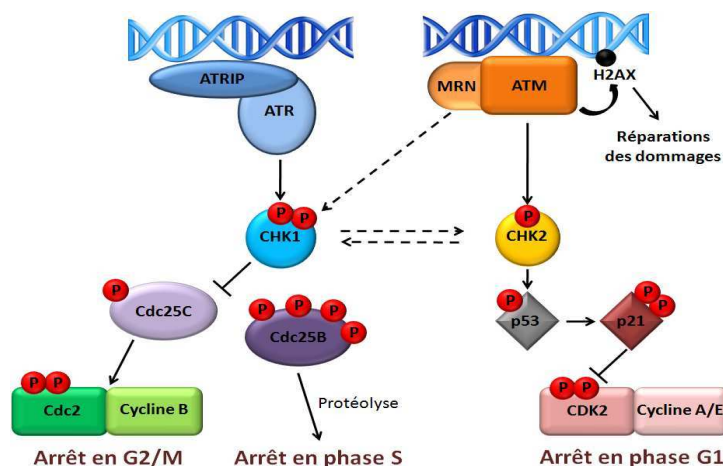


Figure 15 : Schéma représentant la voie ATM/ATR-CHK2/CHK1 dans la réponse aux dommages de l'ADN.

L'ADN endommagé induit le recrutement des kinases transductrices ATM et ATR aux sites de cassure où elles sont activées. Après activation, ces kinases phosphorylent leurs substrats CHK1 et CHK2 et induisent l'arrêt du cycle cellulaire en G1, phase S ou G2-M.

Chez les mammifères, ATR et ATM sont des acteurs principaux du point de contrôle des dommages de l'ADN. Tandis que la voie ATR répond à diverses lésions de l'ADN et au stress de la réplication, la voie ATM répond essentiellement aux dommages double-brin de l'ADN (Bartek and Lukas 2007). Néanmoins, des inter-relations existent entre ces voies puisque certaines lésions peuvent les activer toutes les deux. Par exemple, les radiations ionisantes induisent des dommages double-brin de l'ADN, la voie ATM est activée en premier de façon transitoire puis la voie ATR est activée secondairement d'une manière soutenue (Jazayeri, Falck et al. 2006).

Une fois activée, ATM et ATR phosphorylent une multitude de protéines, et initient une cascade induisant l'arrêt du cycle cellulaire et facilitant la réparation de l'ADN. Les deux cibles les plus étudiées d'ATR/ATM sont des kinases du point de contrôle (CHK1, CHK2) qui avec ATM et ATR, agissent pour réduire l'activité des CDK par différents mécanismes, dont certains sont dus à l'activation du facteur transcriptionnel p53. Les cellules ayant une protéine p53 fonctionnelle s'arrêtent principalement en phase G1 tandis que les cellules déficientes en p53 (plus de 50% des tumeurs humaines) échouent à s'arrêter en G1 mais s'arrêteront éventuellement en phase S ou G2 (Giono and Manfredi 2006).

b. La kinase du point de contrôle 1 (CHK1)

L'activation de CHK1

CHK1 est activée par divers stimuli via ATM et ATR. En général, l'activation de CHK1 est majoritairement initiée par des cassures simple-brin de l'ADN.

ATR phosphoryle CHK1 sur les sérines 317 et 345, entraînant ainsi directement son activation. L'activation de CHK1 par ATR a besoin aussi du complexe 9-1-1 (Rad9-Rad1-Hus1). La Claspine se lie directement à CHK1 et augmente sa stabilité. La phosphorylation de la Claspine induit le recrutement et la phosphorylation de BRCA1, suivi par l'adressage de CHK1 vers ATR. La Topoisomérase Binding Protéine 1 (TopBP1) active directement ATR/ATRIP et induit la phosphorylation de CHK1 par ATR.

Actuellement, il existe deux modèles d'activation de CHK1 : 1) les phosphorylations sur les résidus en C-terminal bloquent des interactions intramoléculaires et 2) la phosphorylation des sérines 317 et 345 entraîne la libération de CHK1 de la chromatine, sous forme inactive, et son accumulation au centrosome où il prévient l'activation de CDK1 et l'entrée en mitose.

Les substrats de CHK1

Les substrats principaux de CHK1 sont Cdc25A, Cdc25C, p53, WEE1, p73 alpha et TLK1 (Tousled liked kinase 1).

Les rôles de CHK1 dans les points de contrôle du cycle cellulaire (**Figure 16**)

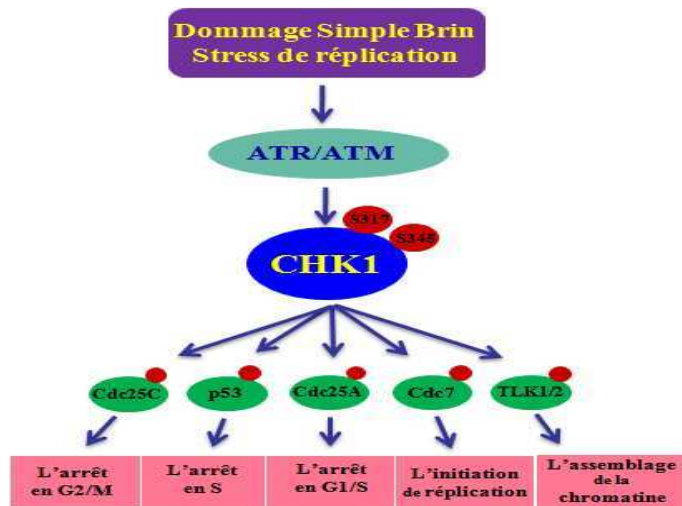


Figure 16 : L'activité de la kinase CHK1 dans la réponse au dommage de l'ADN

CHK1 est phosphorylée et activée par ATR/ATM après des cassures de l'ADN. CHK1 activé phosphoryle ses substrats comme Cdc25A, Cdc25C, p53, entraînant l'arrêt cellulaire. CHK1 phosphoryle aussi Cdc7 et TLKs qui sont impliqués dans l'initiation de la réplication et l'assemblage de la chromatine.

- **Le point de contrôle de la phase G1-S** : Le complexe de CDK2-Cycline E/A est inactivé via sa déphosphorylation rapide et réversible par l'action Cdc25A, ou par une induction de p21 lente et soutenue par p53. Ceci cause l'arrêt en G1 et prévient l'entrée en phase S après des dommages à l'ADN (de Bruin and Wittenberg 2009).

- **Le point de contrôle de la phase S** : L'activation de CHK1 par ATR joue un rôle dominant dans la réponse aux stress réplicatifs. CHK1 phosphoryle directement les kinases essentielles de la phase S, Cdc7 et TLK1. La phosphorylation/activation de Cdc7 est nécessaire pour l'initiation de la réplication de l'ADN (Liu, Barkley et al. 2006). La phosphorylation de TLK1 par CHK1 cause l'inhibition de TLK1, son activation est nécessaire pour l'assemblage de la chromatine. En outre, l'activation de CHK1 perturbe l'élongation et tout particulièrement celle des ARNm des gènes cibles de p53 quand la réplication de l'ADN est bloquée (Beckerman, Donner et al. 2009).

- **Le point de contrôle de la phase G2-M** : CHK1 est une kinase essentielle pour cette étape. Elle phosphoryle Cdc25A sur ses sérines 76 et 124 et Cdc25C sur la sérine 216, causant l'ubiquitination et la dégradation de Cdc25A ou la séquestration de Cdc25C dans le cytoplasme par liaison avec les protéines 14-3-3 (RAD24 et RAD25). CHK1 phosphoryle et stabilise aussi WEE1, kinase essentielle pour l'entrée en mitose (Kuntz and O'Connell 2009).

c. La kinase du point de contrôle 2 (CHK2)

La structure de CHK2

La protéine CHK2 comprend trois domaines fonctionnels distincts : un domaine cluster SQ/TQ (SCD, résidus 19-69), un domaine FHA (Forkhead Associated domain, résidus 112-175) et un domaine sérine/thréonine (résidus 220-486) (Durocher and Jackson 2002).

L'activation de CHK2

L'activation de CHK2 est induite par les dommages de l'ADN, principalement par des facteurs qui produisent des cassures double-brin dans l'ADN comme les radiations ionisantes ou les agents chimiothérapeutiques.

Dans les cellules non perturbées, CHK2 existe sous forme monomérique. Suite à des dommages de l'ADN, CHK2 est phosphorylée sur sa thréonine 68 par ATM. Ensuite, elle subit une dimérisation par laquelle une région comprenant la thréonine 68 phosphorylée d'une molécule CHK2 se lie avec le domaine FHA de la deuxième molécule (Ahn and Prives 2002; Xu, Tsvetkov et al. 2002). La dimérisation est suivie par de multiples événements de phosphorylation intermoléculaire sur des thréonines 383 et 387 dans une boucle auto-inhibitrice, entraînant l'activation de la fonction kinase de CHK2 (Ahn, Urist et al. 2004; Antoni, Sodha et al. 2007). L'autophosphorylation de la sérine 516 dans le domaine kinase est nécessaire pour une activation complète. La mutation de ce résidu prévient la sensibilisation aux radiations par CHK2, suggérant le rôle fonctionnel de l'autophosphorylation (Wu and Chen 2003).

La phosphorylation de thréonine 68 semble être un événement déclencheur de la dimérisation et de l'activation car son maintien n'est pas nécessaire pour une activité kinase soutenue (Ahn and Prives 2002) (**Figure 17**).

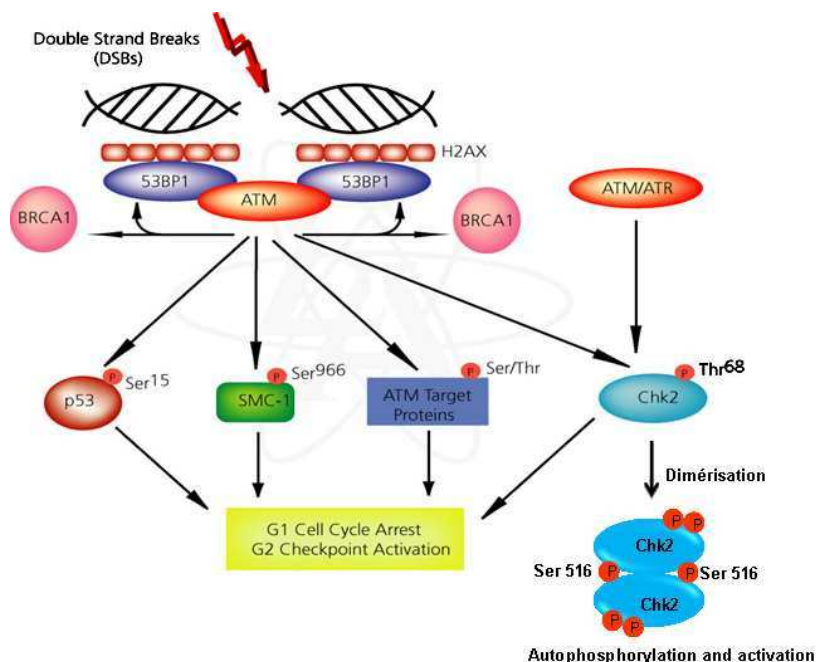


Figure 17: Le schéma représente l'activation de CHK2

Suite à des dommages double-brin de l'ADN, CHK2 est phosphorylée sur la thréonine 68 par ATM. Ensuite, elle se dimérise et s'autophosphoryle sur des sérines différentes dont la sérine 516 pour une activation complète. Une fois activée, CHK2 phosphoryle ses substrats qui activent le point de contrôle en G2 ou l'arrêt cellulaire en G1

Les substrats de CHK2

CHK2 activée peut phosphoryler plusieurs substrats clés incluant Cdc25C, Cdc25A, p53, BRCA1, PML (« promyleocytic leukemia protein »), et E2F-1, qui sont nécessaires pour

induire l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose (Bartek and Lukas 2003; Ahn, Urist et al. 2004; Antoni, Sodha et al. 2007).

Les rôles de CHK2 dans les points de contrôle du cycle cellulaire

De manière similaire à CHK1, CHK2 peut phosphoryler Cdc25C sur sa sérine 216 causant l'arrêt de transition de G2 à la phase M. Elle phosphoryle Cdc25A sur ses sérines 123, 178 et 292 ce qui induit la liaison de Cdc25A au complexe ubiquitine-ligase SCF^{β-TrCP} et cause ensuite sa dégradation par le protéasome, prévenant l'activation de CDK2 en transition G1-S.

p53 est une autre cible clé de CHK2 dans la réponse aux dommages de l'ADN. La kinase CHK2 phosphoryle p53 sur la sérine 20 et ceci perturbe l'interaction entre p53 et MDM2 provoquant la stabilisation et l'accumulation de p53 dans les cellules endommagées (Chehab, Malikzay et al. 2000; Shieh, Ahn et al. 2000). Ces événements entraînent l'activation transcriptionnelle de p21 qui à son tour, se lie au complexe CDK2-Cycline E, déclenchant l'arrêt cellulaire en transition G1-S. CHK2 est donc impliquée dans la régulation directe de p53 et il est suggéré qu'elle provoque l'arrêt cellulaire et l'apoptose dépendants de p53 suite à des dommages génotoxiques (Jack, Woo et al. 2002). De plus, CHK2 peut soutenir l'apoptose indépendante de p53 par phosphorylation du facteur transcriptionnel E2F-1 sur sa sérine 364 (Stevens, Smith et al. 2003).

Parallèlement à la voie ATR/ATM-CHK1/CHK2, la famille des MAPK (Mitotic Activated Protein Kinase) est devenue de plus en plus importante dans le point de contrôle du cycle cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN (Wu, Shi et al. 2006).

2. La voie MAPK

La voie MAPK est activée après divers stimuli cellulaires et régule de nombreux processus physiologiques, en particulier la division cellulaire. Les MAP kinases répondant aux dommages à l'ADN sont divisées en trois sous groupes : p38s, JNK et ERKs (Extracellular signal Regulated Kinases) (**Figure 18**).

a. La voie MAPK p38

MAPK p38 peut réguler à la fois les deux points de contrôle G1-S et G2-M du cycle cellulaire en réponse aux stress génotoxiques. ATM semble activer indirectement p38 par phosphorylation de la kinase Tao (Thousand And One kinase) (Raman, Earnest et al. 2007).

L'activation de p38 induit du point de contrôle en G1-S en réponse au stress osmotique, aux espèces réactives de l'oxygène et à la sénescence cellulaire. MAPK p38 active p53

entraînant l'accumulation de p21 qui inactive CDK2 pour établir le point de contrôle G1-S (Kim, Mercer et al. 2002). La phosphorylation de Cdc25A par p38 induit la dégradation de cette phosphatase contribuant à l'arrêt en G1-S (Goloudina, Yamaguchi et al. 2003). MAPK p38 régule aussi ce point de contrôle par phosphorylation et stabilisation de HBP1 (HGM-Box protein 1), la phosphorylation directe de la Cycline D1 ou la sur-expression des gènes *p19ARF* et *p16INK4a*.

Les dommages double-brin induits par les UV et les agents chimiothérapeutiques activent la voie p38 et causent l'arrêt en G2-M par phosphorylation directe de Cdc25B ou indirecte par l'activation de MK2 (MAPK Associated Protein 2) (Thornton and Rincon 2009). Chez l'homme, la phosphorylation de p53 sur les sérines 15 et 392 par p38 entraîne la dissociation de p53 et de MDM2 et induit l'accumulation de p53. Une augmentation de la stabilité de p53 est induite par l'association de p38 avec les protéines GADD45 α (Growth arrest and DNA damage inducible 45 α) et entraînent la transcription des gènes cibles de p53 (*Gadd45 α* , *p21*, *14-3-3*). Ces protéines néosynthétisées activent directement ou indirectement le complexe CDK1-Cycline B.

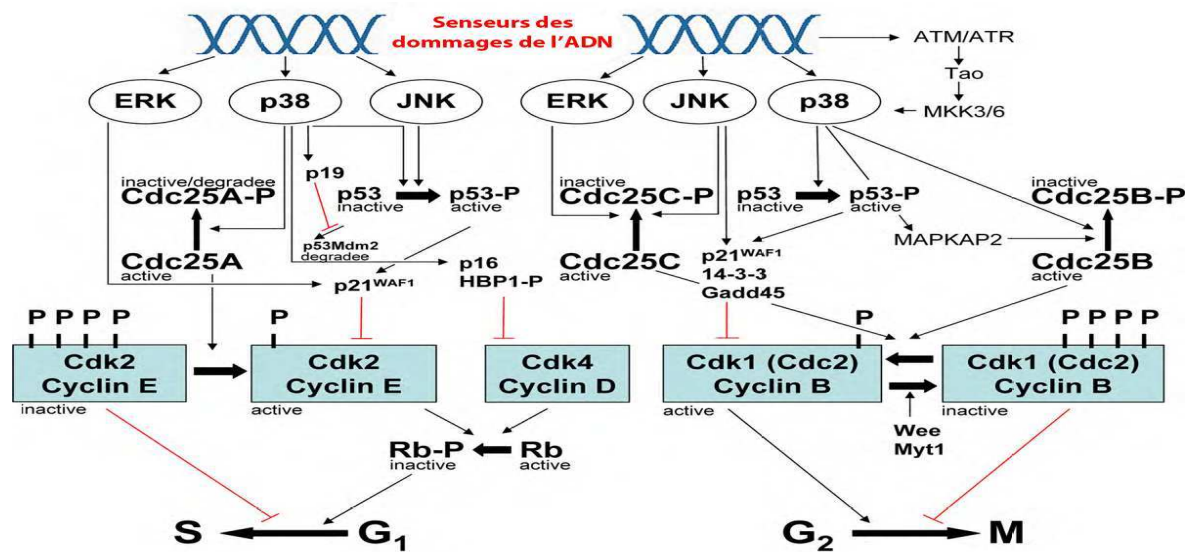


Figure 18 : Le schéma illustre le système de régulation des points de contrôle G1-S et G2-M par la voie MAPK (Poehlmann and Roessner 2010).

b. La voie JNK (c-Jun NH₂-terminal Kinases)

Le rôle de JNK dans le contrôle du cycle cellulaire est limité aux tissus matures. Cette voie est activée suite aux stress environnementaux tels que les mitogènes, les cytokines, les agents endommageant l'ADN et les stress cellulaires. JNK activé phosphoryle p53 sur la thréonine 81 et participe à l'action de p53 (Figure 19). Cette phosphorylation cause l'arrêt en G1-S

(Buschmann, Potapova et al. 2001). Récemment, Gutierrez et al ont montré que JNK joue un rôle central dans le contrôle du cycle cellulaire pour à la fois une transition correcte de G2-M en conditions physiologiques et un arrêt cellulaire en G2-M suite à l'endommagement de l'ADN. JNK régule l'activité de Cdc25C par la phosphorylation de sa sérine 168 (Gutierrez, Tsuji et al. 2010). JNK induit aussi l'arrêt en G2-M par l'induction de l'expression de p21^{WAF1} après le stress oxydatif (Kardassis, Papakosta et al. 1999; Seomun, Kim et al. 2005)

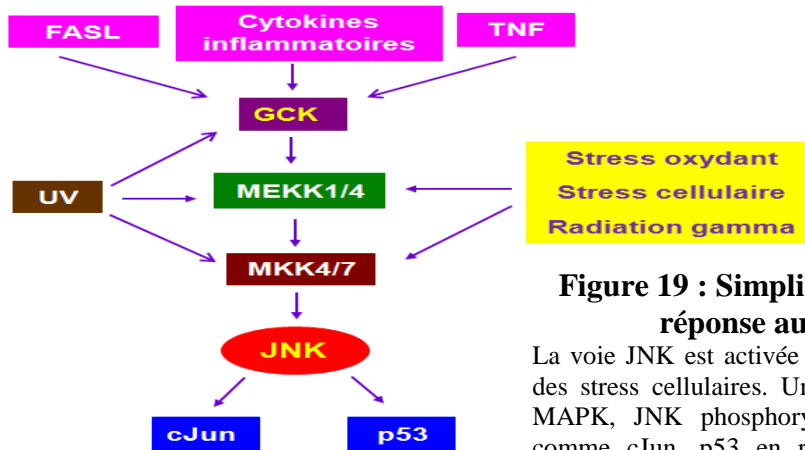


Figure 19 : Simplification de la voie JNK en réponse aux stress cellulaires

La voie JNK est activée par des signaux inflammatoires et des stress cellulaires. Une fois activé par des cascade de MAPK, JNK phosphoryle ses substrats dans le noyau comme cJun, p53 en réponse aux stress. (TNF, tumor necrosis factor ; GCK, germinal central kinase ; MEKK, MEK kinase; MKK, MAP kinase kinase.

c. La voie de MAPK/ERK (Extracellular signal regulated kinase)

Le rôle d'ERK1/2 est bien étudié dans la régulation des progressions de la transition G1-S et de la phase S. L'activation d'ERK1/2 facilite l'expression soutenue de p21^{WAF1} entraînant l'arrêt en G1 (Ciccarelli, Marampon et al. 2005). De plus, ERK3 centromérique joue un rôle dans le point de contrôle de l'assemblage du fuseau (Kallio, McClelland et al. 2002; Chung and Chen 2003). ERK régule Cdc25C via sa phosphorylation durant la transition G2-M dans les cellules mitotiques et méiotiques (Wang, He et al. 2007).

III. L'interconnexion entre les kinases mitotiques et les kinases des points de contrôle de dommages à l'ADN.

Le point de contrôle de dommages à l'ADN en G2 empêche l'entrée en mitose suite à l'endommagement de l'ADN. Bien que les kinases des points de contrôle ne soient pas impliquées directement dans la mitose, elles sont capables d'influencer le système mitotique (**Figure 20**):

D'après Peddibhotla et Rosen, l'abrogation de CHK1 dans les cellules de mammifères en mitose entraîne l'augmentation des chromosomes traînants ou l'inhibition de leur

disjonction et par suite la régression de la cytodiérèse et la binucléation. Ces auteurs indiquent qu'Aurora B est incorrectement localisée le long de la plaque métaphasique et du corps intermédiaire lors de la cytodiérèse en absence d'activité CHK1. Des études précédentes ont aussi montré que CHK1 est nécessaire pour la régulation du contrôle du fuseau par Aurora B et BUBR1 ; protégeant aussi la cellule contre une ségrégation incorrecte et spontanée des chromosomes durant la division cellulaire (Zachos, Black et al. 2007). Dans les cellules déficientes en CHK1, la localisation aberrante d'AURORA B dans le corps intermédiaire piège la chromatine non résolue au sillon du clivage durant la cytodiérèse et induit la binucléation. Aurora B est considérée comme une cible mitotique de CHK1. CHK1 phosphoryle Aurora B et augmente son activité au centromère par un mécanisme restant encore à déterminer (Zachos, Black et al. 2007). Ces résultats montrent que CHK1 n'est pas seulement nécessaire pour la fonction du point de contrôle mais est aussi essentielle, pour la cytodiérèse (Peddibhotla, Lam et al. 2009; Peddibhotla and Rosen 2009).

Katayama et al ont montré qu'Aurora A interagit et phosphoryle p53 sur la sérine 315, facilitant l'ubiquitination par MDM2 et la déstabilisation de p53. La surexpression d'Aurora A, causant la perte de la fonction de p53, confère la résistance aux agents induisant des dommages de l'ADN (comme le cisplatine) (Katayama, Sasai et al. 2004).

La protéine BRCA1 est une cible directe de la kinase CHK2 et est phosphorylée sur sa sérine 988 non seulement après les dommages de l'ADN mais aussi durant la mitose en absence de dommage. Cette phosphorylation mitotique de BRCA1 explique le rôle mitotique de CHK2. En fait, la perte de *BRCA1* ou la déficience de sa phosphorylation par CHK2 cause un assemblage incorrect du fuseau mitotique et induit l'instabilité génétique dans les cellules somatiques humaines (Stolz, Ertych et al. 2010).

Plusieurs études indiquent que PLK3 est un médiateur important dans la réponse aux dommages de l'ADN. L'activité de PLK3 est induite en cas de stress oxydatif et de dommages de l'ADN induits par des drogues mimant les radiations ionisantes. Son activation est dépendante d'ATM. PLK3 interagit avec p53 et la phosphoryle sur sa sérine 20 *in vitro*. Cette interaction est augmentée en réponse à l'ADN endommagé (Xie, Wu et al. 2001). PLK3 interagit aussi physiquement avec CHK2. Elle phosphoryle CHK2 sur un résidu différent de la thréonine 68 et contribue peut-être à l'activation complète de CHK2 (Bahassi el, Conn et al. 2002; Myer, Bahassi el et al. 2005) en complément de l'activation d'ATM.

Dans les cellules de mammifères, Van Vugt et al ont montré que PLK1 modifiait directement CHK2 (van Vugt, Gardino et al. 2010). En réponse aux dommages de l'ADN, CHK2 co-localise et interagit avec PLK1 sur les centrosomes et le corps intermédiaire dans

les cellules humaines (Tsvetkov, Xu et al. 2003). Ceci suggère que CHK2 couple les fonctions centrosomiques et d'assemblage du fuseau de la kinase PLK1. Lee et al ont montré que PLK1 est aussi déphosphorylée par la voie ATM/CHK1 (Lee, Hwang et al. 2010).

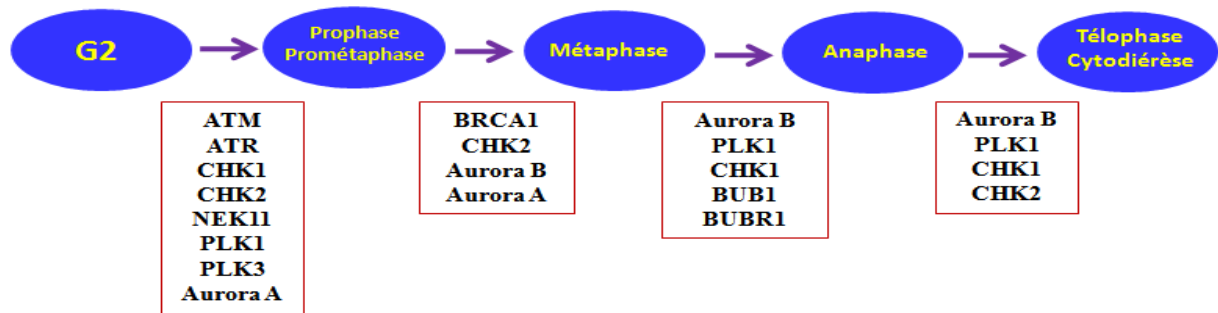


Figure 20 : Interconnexion des protéines kinases mitotiques et des kinases des points de contrôle des dommages à l'ADN

Le cycle cellulaire et en particulier la mitose, sont strictement régulés par ces nombreuses protéines kinases. Les kinases mitotiques ainsi que les kinases des points de contrôle qui surveillent l'état de l'ADN jouent un rôle clé et coopèrent dans chaque phase du cycle cellulaire pour une division parfaite. Ces kinases sont donc des cibles intéressantes pour les thérapies anticancéreuses. L'intérêt des inhibiteurs des kinases mitotiques et des kinases des points de contrôle sont détaillés dans le chapitre suivant.

CHAPITRE IV: THERAPIES ANTICANCEREUSES ET INHIBITEURS DE KINASES MITOTIQUES

I. Cancer et chimiothérapie anti-mitotique

Le cancer est un problème majeur de santé publique. Les cancers les plus fréquemment diagnostiqués dans le monde sont ceux du poumon (12,7%), du sein (10,9%) et le cancer colorectal (9,7%). Les décès les plus fréquents sont provoqués par le cancer du poumon (18,2%), de l'estomac (9,7%) et le cancer du foie (9,2%). Les cancers du col de l'utérus et du foie sont beaucoup plus fréquents dans les régions en développement, tandis que ceux de la prostate et du côlon-rectum ont une incidence plus grande dans les régions développées. D'après les données et statistiques de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le nombre de nouveaux cas diagnostiqués sera de 15 millions en 2020 à comparer à 10 millions de cas en 2000.

La chimiothérapie systématique forme le principal traitement anticancéreux ; les agents traditionnels incluant des toxines des microtubules comme le taxol, les dérivés des taxanes et les alcaloïdes *Vinca* ont une efficacité prouvée en clinique et sont fréquemment utilisés dans des traitements de divers types de cancer. Ces drogues se lient aux microtubules et inhibent la fonction du point de contrôle du fuseau mitotique, arrêtent le cycle cellulaire en mitose et induisent l'apoptose (Jordan and Wilson 2004; Pasquier, Honore et al. 2006). Néanmoins, ces composés n'agissent pas seulement sur les cellules tumorales proliférantes, mais aussi sur les cellules ne se divisant pas comme les neurones dans lesquels les microtubules sont essentiels. Par conséquent, de nouvelles drogues qui épargneraient les microtubules mais inhiberaient la progression de la mitose seraient particulièrement intéressantes pour le développement de nouveaux composés antimitotiques.

Les événements importants du cycle cellulaire sont hautement régulés par les kinases et la surexpression ou l'absence de ces kinases sont décrits dans de nombreux types de cancers d'où, leur intérêt dans les thérapies anticancéreuses (**Figure 21**). Récemment, plusieurs nouveaux inhibiteurs ciblant les kinases Aurora et PLK ou les kinésines mitotiques ont été développés et testés en clinique (Jiang, Wang et al. 2006; Jackson, Patrick et al. 2007).

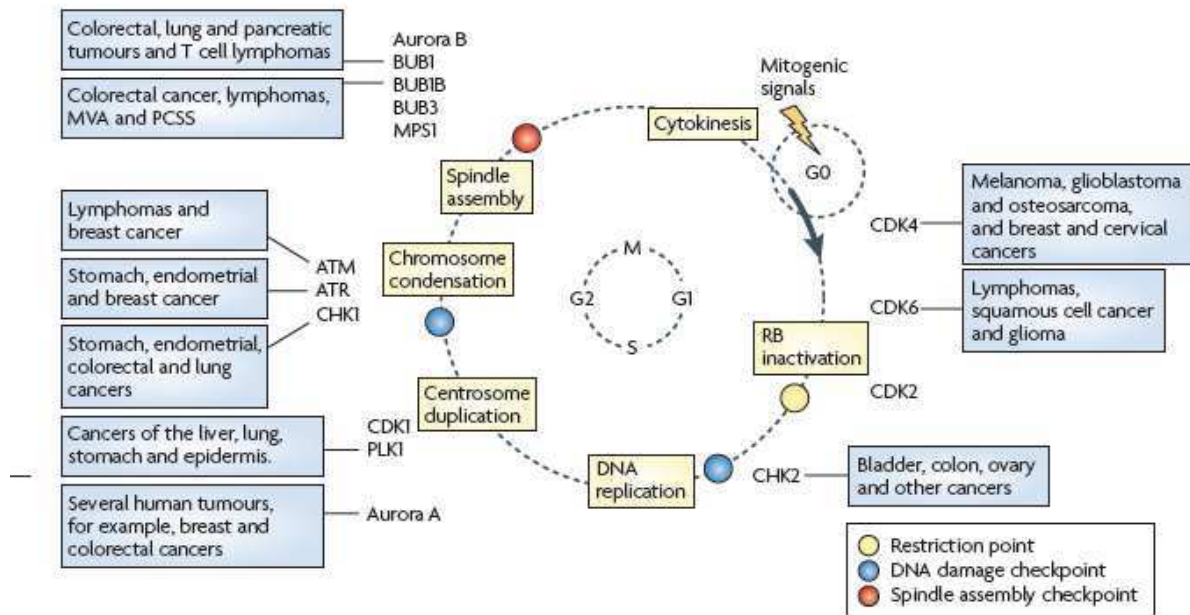


Figure 21: La régulation du cycle cellulaire par les protéines kinases et leur intérêt dans les thérapies anticancéreuses

Les kinases CDKs (Cycline-dependent kinase) entraînent les cellules à sortir de la quiescence (G0) et au-delà du point de restriction, les engagent vers la transition de phase S. Les kinases du point de contrôle des dommages de l'ADN (CHKs, ATR, ATM ...) agissent comme des protéines senseurs qui peuvent induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et G1-S en réponse aux lésions d'ADN. CDK1, CDK2, PLK1 et Aurora A sont impliquées dans la régulation du cycle du centrosome, tandis que les kinases Aurora B, BUBs, MPS1 participent au contrôle de l'assemblage du fuseau assurent la ségrégation correcte d'ADN durant la mitose (M). Les différentes kinases peuvent agir sur plusieurs étapes du cycle cellulaire et moduler les activités d'autres kinases liées au cycle. Les cancers associés à l'altération de kinases spécifiques sont indiqués en bleu.

(ATM, ataxia telangiectasia mutated; ATR, ataxia telangiectasia et RAD3 related protein; BUB1, "budding uninhibited by benzimidazoles 1"; BUB1B, BUB1 homologue beta (BUBR1); MPS1, monopolar spindle 1; MVA, mosaic variegated aneuploidy; PCSS, premature chromatid separation syndrome; RB, Retinoblastoma protein family members (Lapenna and Giordano 2009).

II. Les inhibiteurs de CDK

Les sous-unités catalytiques des complexes CDK-Cycline sont rarement mutées dans les cellules cancéreuses. Les CDK sont souvent suractivées dans les cancers humains en raison de divers événements génétiques et épigénétiques qui affectent leurs voies régulatrices. L'effet global est la perte d'intégrité des points de contrôle entraînant une prolifération incontrôlée (Malumbres and Barbacid 2009).

Il y a eu une recherche intensive de petites molécules ciblant les CDKs pendant deux décennies mais aucune n'a été approuvée pour usage thérapeutique. Les composés de première génération incluant les inhibiteurs pan-CDK comme le flavopiridol, l'olomoucine n'ont pas satisfait les espoirs nés des études précliniques. Ceci pourrait refléter un échec de

l'identification des cibles principales ou secondaires des inhibiteurs et/ou un échec de l'optimisation du barème de dose et de la pharmacocinétique de ces composés.

La nouvelle génération des inhibiteurs compétitifs de l'ATP des CDKs sont en cours d'essais cliniques (**Tableau 4**). La flavone synthétique P276-00 appartient à la même classe de molécules que le flavopiridol mais possède une sélectivité d'inhibition des CDKs supérieure, particulièrement pour les CDK4-Cycline D, CDK1-Cycline B et CDK9-Cycline T1 et une activité antiproliférative 2-3 fois plus forte dans les cellules tumorales humaines. Ce composé réduit les niveaux de Cycline D1, un effet qui pourrait dépendre de l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de CDK9 (Joshi, Rathos et al. 2007; Joshi, Rathos et al. 2007). Actuellement, P276-00 est en essai clinique de phase I-II pour traiter les myélomes multiples, les lymphomes et les mélanomes caractérisés par la surexpression de la Cycline D.

Tableau 4 : Les inhibiteurs de CDK1/CDC2 en essais cliniques

<i>Inhibiteurs (source)</i>	<i>IC50 in vitro</i>	<i>Information d'essais cliniques</i>
SNS-032 (Sunensis)	CDK9 : IC50 = 4 nM CDK7 : IC50 = 38 nM CDK2 : IC50 = 62 nM GSK-3 α : IC50 = 46 nM	Phase I/II ; cancer du sein avancé, mélanome, NSCLC et malignités hématopoïétiques
AT-7519 (Astex)	CDK9 : IC50 < 10 nM CDK5 : IC50 = 13 nM CDK2 : IC50 = 47 nM CDK4 : IC50 = 100 GSK-3 β : IC50 = 89 nM	Phase I/II : les tumeurs solides avancées et lymphomes
R-547 (Hoffman-LaRoche)	CDK1, 2, 4 : Ki = 1-3 nM	Phase I : les tumeurs solides avancées et myélomes multiples réfractaires et/ou rechute
P276-00 (Nocholas Piromal)	CDK9 : IC50 = 20 nM CDK4 : IC50 = 63 nM CDK1 : IC50 = 79 nM CDK2 : IC50 = 4 nM CDK7 : IC50 = 85 nM	Phase I/II : néoplasme, myélomes multiples en rechute et/ou réfractaires
ZK-304709 (Bayer Schering Pharma AG)	CDK2, 4, 7 et 9 CDK9 : IC50 = 5 nM CDK4 : IC50 = 61 nM CDK1 : IC50 = 50 nM	Phase I : les tumeurs réfractaires et/ou en rechute
Flavopiridol (Sanofi-Aventis)	CDK9 : IC50 = 3 nM CDK4 : IC50 = 20-40 nM CDK6 : IC50 = 60 nM	Phase I/II : leucémie, myélome multiple, lymphome, sarcome, et les tumeurs solides en monothérapie et en combinaison avec des agents des dommages de l'ADN ou les autres drogues cytotoxiques.
Roscovitine (Seliciclib ou CYC202) (Cyclacel)	CDK1 : IC50 = 330 nM CDK2 : IC50 = 220 nM CDK5 : IC50 = 270 nM CDK7 : IC50 = 800 nM CDK9 : IC50 = 230 nM	Phase I : les tumeurs solides avancées, cancer du sein Phase II : carcinome pulmonaire à non petites cellules

(Ignacio Pérez de Castro 2008)

Le rôle des CDKs dans le point de contrôle induit par l'ADN endommagé et la réparation suggère que les inhibiteurs de ces molécules améliorent la réponse aux dommages à l'ADN. Ce mécanisme contribue probablement aux effets synergiques observés lors de

combinaison du cisplatine et de RO-3306, un inhibiteur de CDK1 (Johnson, Cai et al. 2009; Kojima, Shimanuki et al. 2009). RO-3306 perturbe la fonction de BRCA1 sans arrêter complètement le cycle cellulaire dérégulé des cellules tumorales. Il bloque l'activation du point de contrôle en phase S et ainsi la réparation de l'ADN. Le cycle cellulaire n'est pas arrêté puisque CDK2 peut compenser la perte en CDK1. De manière très intéressante, cette compensation ne semble pas se produire dans les cellules non transformées qui s'arrêtent complètement en G2 après l'inhibition sélective de CDK1. Ainsi, la sensibilisation cytotoxique induite par le cisplatine devient sélective pour les cellules transformées.

Un autre inhibiteur des CDKs, la silibinine, montre une capacité de sensibilisation des cellules prostatiques à l'inhibition de croissance induite par le cisplatine, le carboplatine, la doxorubicine et la mitoxantrone, causant l'arrêt du cycle et/ou la mort par apoptose (Tyagi, Singh et al. 2002; Dhanalakshmi, Agarwal et al. 2003; Flaig, Su et al. 2007). L'usage combiné de la silibinin avec les platines et la doxorubicine induit des inhibitions synergiques de la croissance cellulaire et l'apoptose dans des cellules issues de cancer du sein (Tyagi, Agarwal et al. 2004). La combinaison de silibinin augmente l'efficacité et réduit la toxicité de doxorubicine dans un modèle de xéno greffe de cellules cancéreuses pulmonaires (Singh, Mallikarjuna et al. 2004).

En résumé, ces études suggèrent que la combinaison des inhibiteurs des CDKs avec des agents chimiothérapeutiques pourrait diminuer la toxicité et augmenter l'efficacité des drogues et ainsi réduire les possibilités de développement de résistance.

III. Les inhibiteurs de PLK1

La surexpression de PLK réprime la prolifération cellulaire (Jang, Lin et al. 2002).. PLK1 est surexprimée dans de nombreux cancers du sein (Wolf, Hildenbrand et al. 2000), colorectaux (Takahashi, Sano et al. 2003), carcinome pulmonaires non à petites cellules (Wolf, Elez et al. 1997), pancréatiques (Gray, Bearss et al. 2004), de la peau (Kneisel, Strebhardt et al. 2002), de l'estomac et de l'œsophage (Tokumitsu, Mori et al. 1999) et cette surexpression est quasiment toujours associée à un mauvais pronostic (Strebhardt and Ullrich 2006). Sa surexpression est étroitement corrélée avec le développement de l'instabilité chromosomique et l'aneuploïdie observée dans les néoplasies (Eckerdt, Yuan et al. 2005). Néanmoins, la preuve de l'implication de la mutation de PLK1 dans les tumeurs humaines ou dans les lignées cellulaires n'est pas encore très convaincante. Une seule mutation cause la déstabilisation de PLK1 (Simizu and Osada 2000) ce qui suggère que la contribution de la surexpression de PLK1 à la tumorigénèse est minime. La preuve irréfutable du rôle des autres

PLK dans l'expansion tumorale est encore attendue, même si elle est suggérée par certaines études qui rapportent la surexpression de PLK4 dans le cancer colorectal (Macmillan, Hudson et al. 2001).

Tous les PLKs sont susceptibles de fonctionner comme des suppresseurs tumoraux. *PLK2* est fréquemment méthylée et son expression éteinte au cours de la néoplasie des cellules B (Syed, Smith et al. 2006) ; l'expression de *PLK3* est réduite dans divers cancers humains (Li, Ouyang et al. 1996; Dai, Li et al. 2000).

PLK1 est proposée comme cible thérapeutique potentielle vu son association forte avec la prolifération cellulaire et son expression élevée dans diverses tumeurs. Elle est souvent associée avec un mauvais pronostic vital (Takai, Hamanaka et al. 2005). *PLK1* induit l'arrêt prolongé en mitose et le début de l'apoptose. L'inhibition de *PLK1* peut avoir potentiellement le même effet que les toxines dirigées contre les microtubules en causant l'arrêt mitotique, sans perturber la dynamique des microtubules dans les cellules non proliférantes. Ainsi il serait possible de contourner les effets secondaires apparaissant après perturbation de la tubuline dans les cellules non cancéreuses. En effet, les cellules normales semblent être moins sensibles à l'inhibition de *PLK* que les cellules transformées (Guan, Tapang et al. 2005; Liu, Lei et al. 2006).

Les inhibiteurs de *PLK1* provoquent un phénotype typique appelé 'l'arrêt Polo' : les cellules s'arrêtent en mitose avec leur fuseau monopolaire ou désorganisé et la plupart finissent par mourir (phénomène de mort cellulaire mitotique) (Steehmaier, Hoffmann et al. 2007). De nombreux composés ont été potentiellement identifiés comme bloquant l'activité de *PLK* et ce, de manière compétitive de l'ATP.

BI 2536, un dérivé de la dihydropteridine, développé par Boehringer Ingelheim – Allemagne, est le premier composé de la classe prototype des inhibiteurs de *PLK1*. C'est un inhibiteur de *PLK1* compétitif de l'ATP qui inhibe l'activité de l'enzyme avec un IC50 de 0,8 nM et possède une sélectivité plus de 10 000 fois supérieure pour *PLK* comparativement à un large « panel » d'autres tyrosine and sérine/thréonine kinases. Il cause l'arrêt en prométaphase, des anomalies mitotiques et l'apoptose dans plus de vingt lignées cellulaires cancéreuses testées (Lenart, Petronczki et al. 2007; Steegmaier, Hoffmann et al. 2007). Des fuseaux monopolaires sont obtenus dans les cellules traitées avec une forte concentration. Remarquablement, BI 2356 a une efficacité élevée *in vivo* à dose maximale tolérée et cause la régression tumorale dans plusieurs modèles de xénogreffes (Steehmaier, Hoffmann et al. 2007). Ce composé, en monothérapie, est en cours d'évaluation dans trois essais cliniques en phase II chez les patients atteints de NSCLC, de cancers pancréatiques avancés et de cancers

de la prostate réfractaires aux hormones (HRPC) (Blumenschein, Khuri et al. 2008; Mross, Frost et al. 2008; Pandha 2008). Les bénéfices cliniques obtenus donnent de bonnes raisons de développer ce composé à l'avenir.

Plusieurs inhibiteurs de PLK sont actuellement testés dans différents essais cliniques et sont présentés dans le **Tableau 5** suivant.

Tableau 5: Les inhibiteurs de PLK1 en essais cliniques

<i>Composé (source)</i>	<i>IC50 in vitro (PLK1)</i>	<i>Application en essais cliniques</i>
ON01910.Na (benzylstyryl sulphone) Onconova Therapeutics, Inc.	9-10 nM	Phase I en cours de recrutement Leucémie, myélomes-multiples (NCT00861510) Syndromes myélodysplasiques (NCT00533416)
GSK461364 (dérivé de thiophene) GlaxoSmithKline	IC50 < 50 nM dans > 83% des 120 lignées cancéreuses testées Ki= 2,2 nM	Phase I complétée Tumeurs solides avancées, Lymphome Non-Hodgkinien (NCT00536835)
BI 2536 (dérivé de dihydropteridinone) Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals	0,83 nM	Phase II complétée Leucémie myéloïde aigue (NCT00701766) Carcinomes non à petites cellules (NCT00376623) Cancer pancréatique avancé incurable (NCT00710710) Carcinome à petites cellules (NCT00412880) Cancer prostatique (NCT00706498) Phase I en cours de recrutement pour Lymphome Non-Hodgkinnien avancé en rechute ou réfractaire
BI 6727 (dérivé de dihydropteridinone) Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals	0,87 nM	Phase I complétée pour les tumeurs solides (NCT01145885) Recrutement pour phase II pour le cancer de l'ovaire (NCT01121406)

Adapté de (Strebhardt 2010)

La sous-régulation de la kinase PLK augmente la sensibilisation des cellules du cancer du sein au paclitaxel L'inhibiteur de PLK, ON01910 améliore l'effet de plusieurs agents chimiothérapeutiques et des essais cliniques en combinaison avec des drogues chimiothérapeutiques classiques sont en cours (Gumireddy, Reddy et al. 2005; Strebhardt and Ullrich 2006). L'essai clinique de phase I complété sur la combinaison d'ispinesib et de docetaxel sur des patients avec des tumeurs solides avancées est évalué positivement avec un profil de toxicité acceptable (Blagden, Molife et al. 2008).

PLK est particulière parmi les kinases mitotiques (CDK, Aurora) de par son domaine « Polo Box » (PBD). Ce domaine est nécessaire pour la localisation intracellulaire de PLK ainsi que pour le ciblage des substrats de PLK. Donc, PBD est une cible intéressante pour développer des nouveaux inhibiteurs de PLK1. Des inhibiteurs spécifiques du PBD comme la Poloxine, le Poloxipan ou la Purpurogalline sont en cours d'évaluation.

Les stratégies alternatives pour l'inhibition de PLK1 incluant l'usage de petits ARN interférents modifiés chimiquement ou de nanoparticules enrobées d'albumine sont aussi en cours de développement.

IV. Les inhibiteurs des kinases Aurora

Les kinases Aurora sont surexprimées dans de nombreux cancers. La surexpression d'Aurora A ou l'amplification de son gène ont été identifiées dans plusieurs types de tumeurs malignes incluant le cancer du sein, le cancer pulmonaire, le cancer colorectal et les cancers de la tête et du cou (Tanaka, Kimura et al. 1999; Reiter, Gais et al. 2006; Xu, Ma et al. 2006; Nishida, Nagasaka et al. 2007; Nadler, Camp et al. 2008). Dans ces études, la surexpression d'Aurora A est associée avec des tumeurs faiblement différenciées, un mauvais pronostic vital et une instabilité génomique. Une corrélation entre la surexpression d'Aurora A et l'aneuploïde est notée dans le cancer gastrique ; L'amplification et la surexpression d'Aurora A sont corrélées à l'aneuploïde et à un mauvais pronostic (Sakakura, Hagiwara et al. 2001). La surexpression d'Aurora A induit la transformation oncogénique dans des fibroblastes immortalisés de rongeurs ainsi que la tétrapolyploidisation suggérant qu'Aurora A pourrait promouvoir la tumorigénèse en augmentant l'instabilité chromosomique (Anand, Penrhyn-Lowe et al. 2003). Néanmoins, la surexpression d'Aurora A dans les cellules primaires n'est pas un inducteur puissant de la transformation cellulaire indiquant qu'Aurora A a besoin d'antécédents oncogéniques pour promouvoir celle-ci.

La kinase Aurora B est surexprimée dans de nombreux types de cancers, néanmoins, son amplification et son activité de transformation des cellules ne sont pas clairement démontrées. La surexpression d'Aurora B ne transforme pas les fibroblastes de rongeurs mais potentialise la transformation induite par H-Ras (Kanda, Kawai et al. 2005). Dans le cas du carcinome de l'endomètre, l'expression d'Aurora B est augmentée significativement dans les tumeurs de haut grade et les patientes avec un carcinome positif pour Aurora B ont un plus mauvais pronostic par comparaison aux carcinomes négatifs (Kurai, Shiozawa et al. 2005). L'expression élevée d'Aurora B est corrélée avec des états avancés dans les cancers colorectaux et sa surexpression est suspectée d'induire les métastases (Giet, Petretti et al. 2005; Sorrentino, Libertini et al. 2005). Une analyse immunohistochimique a montré que l'expression d'Aurora B était élevée dans les tissus de carcinomes thyroïdiens anaplasiques, son expression n'étant pas détectable dans les tissus thyroïdiens normaux (Sorrentino, Libertini et al. 2005). Dans diverses lignées cellulaires leucémiques (HL60, NB-4), les surexpressions d'Aurora A et d'Aurora B sont détectées. De plus, les lignées AML isolées de

patients montrent des niveaux élevés de surexpression d'ARNm d'Aurora A et d'Aurora B (Ikezoe, Yang et al. 2007).

En plus d'Aurora B, ses partenaires du complexe passager (CPC) sont aussi dérégulés dans les cellules cancéreuses. L'expression de Boréoline est corrélée significativement avec la surexpression de Survivine et de Ki67 dans les tissus de cancers gastriques. Son expression est réprimée dans la réponse à la signalisation de p53/Rb et l'accumulation nucléaire de Boréoline est liée à un mauvais pronostic dans les cancers gastriques (Chang, Chen et al. 2006). Des études ont indiqué que Survivine jouait un rôle important dans la tumorigénèse, spécialement dans les cancers colorectaux et les carcinogénèses induites par des infections (Li and Ling 2006). Une surexpression très élevée de Survivine a été montrée dans plusieurs tumeurs comme celles du poumon, du sein, de l'estomac, de l'œsophage, du pancréas et du foie (Fukuda and Pelus 2006). Les niveaux d'INCENP sont élevés dans les cellules cancéreuses colorectales et ceci contribue à la progression tumorale soit en stabilisant Aurora B soit en modifiant ses cibles. De plus, des anomalies du couple d'INCENP/Aurora entraînent des aneuploïdies qui contribuent à la progression tumorale (Date, Jacob et al. 2007).

Avec leurs implications notables dans le cancer et leurs rôles importants dans la mitose, les kinases Aurora A et B sont considérées comme d'excellentes cibles thérapeutiques et des inhibiteurs de ces kinases ont été développés. Les expériences basées sur l'utilisation d'ARNi ont montré que l'inhibition soit Aurora A soit Aurora B entraînait des phénotypes différents.

L'inhibition sélective d'Aurora A cause l'inhibition de son autophosphorylation sur sa thréonine 288, l'inhibition de la phosphorylation de p53, l'accumulation des cellules en mitose, la formation anormale du fuseau mitotique suivie par l'apoptose ou de l'entrée en sénescence (Huck, Zhang et al. 2010). L'inhibition sélective d'Aurora B, seule ou concomitante avec celle d'Aurora A, entraîne la progression de la mitose avec l'apparition de cellules polyploïdes puis l'apoptose (Carmena and Earnshaw 2003; Carpinelli and Moll 2008). L'inhibition de la phosphorylation de l'histone H3 sur sérine 10 est un outil clinique car c'est un biomarqueur de l'inhibition d'Aurora B (Carpinelli and Moll 2008). De plus, des études *in vivo* avec des inhibiteurs d'Aurora dans les modèles animaux différents montrent une régression tumorale quelle que soit la sélectivité des iso-formes d'Aurora ciblées. Ces inhibiteurs sont actuellement à différentes étapes de développement clinique (Cheung, Coumar et al. 2009). A l'exception de MLN8054, MLN8237, ENMD-2076 et MP529 qui induisent un retard mitotique similaire à celui observé après l'inactivation d'Aurora A par

ARNi, tous les autres composés induisent des phénotypes cellulaires qui sont conformes à la perturbation des fonctions d'Aurora B (Cheung, Coumar et al. 2009).

Les inhibiteurs des kinases Aurora développés à ce jour se lient au site de l'ATP. De par ce fait, il est difficile d'obtenir des inhibiteurs capables de discriminer les membres de la famille Aurora car ce domaine est très conservé.

Les premiers inhibiteurs d'Aurora caractérisés, l'Hesperadine de Boehringer et ZM447439 d'Astra Zeneca, semblent pouvoir inhiber *in vitro* toutes les kinases Aurora. Les phénotypes observés après traitement de cultures cellulaires étaient en accord avec ceux observés après une perte d'Aurora B (alignement des chromosomes incorrect, inhibition de l'activation du point de contrôle du fuseau après traitement au taxol, perte de la phosphorylation de l'histone H3 et polyploïdisation due à l'inhibition de la transition métaphase-anaphase) (Ditchfield, Johnson et al. 2003; Ganesh, Babu et al. 2003; Hauf, Cole et al. 2003). Ces résultats sont similaires avec ceux obtenu en utilisant VX-680 (MK-0457, Vertex) qui a fait l'objet d'essais cliniques de phase I et II (Lu, Chen et al. 2010). Néanmoins, en 2007, Merck a décidé d'arrêter les essais avec VX-680 (et avec VX-667) car des patients ont développé des anomalies d'électrocardiogramme (prolongation QTc) (Cheung, Coumar et al. 2009).

Plus récemment, des inhibiteurs plus spécifiques d'une kinase ont été présentés. Par exemple, MLN-8054 (Millenium), qui est un inhibiteur ayant une sélectivité particulière pour Aurora A qu'il inhibe avec un IC50 de 4 nM, comparativement à l'IC50 de 172 nM obtenu contre Aurora B (Manfredi, Ecsedy et al. 2007). A faible concentration, l'activité d'Aurora B n'est pas modulée *in vivo* par MLN-8054 car il n'inhibe pas la phosphorylation de l'histone H3 sur sérine 10 mais il bloque l'autophosphorylation d'Aurora A sur la thréonine 288 (Ohashi, Sakashita et al. 2006). Par contre, à une concentration plus forte, il induit la formation de cellules polyploïdes, ce qui indique qu'Aurora B peut être aussi une cible efficace *in vivo*. Dans des xénogreffes tumorales humaines, MLN-8054 est efficace et des études cliniques sont en cours (Gerullis, Bergmann et al. 2009; Yuan, Lv et al. 2009).

Les inhibiteurs des kinases Aurora avec leurs effets cellulaires sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Les inhibiteurs des kinases Aurora (Adapté de (Hong-Lien VU 2010))

Les inhibiteurs sont classés par leurs activités parmi les kinases Aurora. L'inhibition de l'histone H3 ou la phosphorylation d'Aurora A sont indiquées par: H3-P ou Aurora A Thr288. Les inhibiteurs d'Aurora B induisent l'endoréduplication, la désactivation de point contrôle du fuseau et causent la polyploïdisation (cellules 8 N). ND: non déterminé. Dans la partie **d**,) quelques molécules sont représentées.

* C1 est l'inhibiteur identifié par notre groupe à l'IAB. Cette molécule appartient à la chimiothèque de l'Institut Curie (Chi Hung Nguyen, Orsay)

a) Les inhibiteurs des kinases Aurora

<i>Composé</i>	<i>Molécule</i>	<i>Cibles secondaires</i>	<i>IC50 pour les kinases Aurora A et B</i>	<i>L'effet cellulaire/inhibition</i>
C1*	Benzo[e]pyrido-indole	CHK2 MELK FLT3	IC50 A : 29 nM IC50 B : 31 nM	<ul style="list-style-type: none"> ▪ H3 -P ▪ Cellules 8N
VX-680 MK-0457	4,6 diamino pyrimidine	FLT3 JAK Abl T315I	IC50 A : 13 nM IC50 B : 37 nM	<ul style="list-style-type: none"> ▪ H3 -P ▪ Cellules 8N
PHA-739358	Aminopyrazole	Tyr-kinase FLT3 Abl T315I	IC50 A : 13 nM IC50 B : 79 nM	<ul style="list-style-type: none"> ▪ H3 -P ▪ L'endoreduplication
PHA-680632	Aminopyrazole	FGFR1 PLK1	IC50 A : 27 nM IC50 B : 135 nM	<ul style="list-style-type: none"> ▪ H3 -P ▪ Aurora A Thr 288 ▪ Cellules 8N
Reversine	2-(4-morpholino-anilino)-N6-cyclohexyladenine	MEK1 PDK1 PKA	Non disponible	<ul style="list-style-type: none"> ▪ H3 -P ▪ Cellules 8N
AK-001	Benzimidazole	FLT3 CHK1 KDR	IC50 A : 4 nM IC50 B : 5 nM	<ul style="list-style-type: none"> ▪ H3 -P ▪ Aurora A Thr 288 ▪ La séparation des centrosomes
AT9283	pyrazole benzimidazoles	JACK3 Abl T315I	IC50 A : < 3 nM IC50 B : < 3 nM	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Les cellules polyploïdes
CYC116	Thiazol-5-pyrimidin	VEGFR2 FLT3	IC50 A : 44 nM IC50 B : 19 nM	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Le retard de l'entrée en mitose ▪ Cellules polyploïdes
SNS-314	Phenyl-benzamide	FLT-4 Trk A/ B	IC50 A : 9 nM IC50 B : 31 nM	<ul style="list-style-type: none"> ▪ H3 -P ▪ Cellules 8N
OM137	aminothiazole	CDK1 CDK5/p25	IC50 A : 21,7 µM IC50 B : 2,4 µM	<ul style="list-style-type: none"> ▪ H3 -P ▪ Le point de contrôle du fuseau

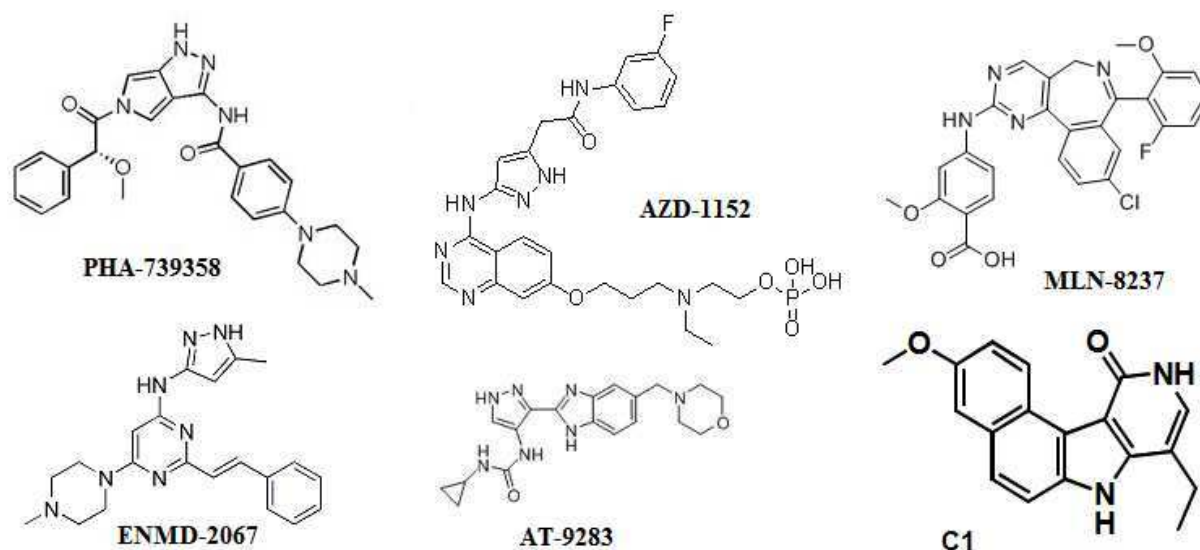
b) Les inhibiteurs spécifiques Aurora B

<i>Composé</i>	<i>Molécule</i>	<i>Cibles secondaires</i>	<i>IC50 pour les kinases Aurora A et B</i>	<i>L'effet cellulaire/inhibition</i>
AZD-1152	Pyrazoloquinazoline	None identifié	IC50 A : 1370 nM IC50 B : 0,3 nM	Cellules 8N
GSK 1070916		FLT1/4 FGFR TIE2	IC50 A : 1100nM IC50 B : 3,5 nM	ND

c) Les inhibiteurs spécifiques Aurora A

<i>Composé</i>	<i>Molécule</i>	<i>Cibles secondaires</i>	<i>IC50 pour les kinases Aurora A et B</i>	<i>L'effet cellulaire/inhibition</i>
MLN8054	Benzazepine + aminopyrimidine	Abl EphA Yes TrkA	IC50 A : 4 nM IC50 B : 172 nM	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aurora A Thr 288 ▪ Accumulation en G2/M
TC-28	Quinazoloïne derivative	EGFR/IGFR/FGFR /Flt4 : Sup 100 microM	IC50 A : 2,7 µM IC50 B : sup 100 µM	<ul style="list-style-type: none"> ▪ L'inhibition de la progression en G2/M
MLN8237	Benzazepine + aminopyrimidine		IC20 A : 1 nM IC50 B : 1100 nM	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fuseau mitotique anormal ▪ Apoptose et senescence ▪ Accumulation mitotique

d) Représentation de quelques molécules en phase II/III des essais cliniques et la molécule C1



La liste des inhibiteurs des kinases Aurora s'allonge de jour en jour. Bien que les cibles cellulaires A versus B ne puissent pas être discriminées clairement et que les mécanismes exacts de l'induction de l'apoptose ne soient pas clairs, les inhibiteurs des kinases Aurora sont actuellement en essais clinique de phase I et II pour le traitement des tumeurs solides ou des malignités hématologiques. Parmi ceux-ci, cinq inhibiteurs d'Aurora en essais cliniques de phase II: MLN8237, AZD1152, ENMD2076, PHA739358, AT9283 (**Tableau 6, d**). MLN8237, par exemple, est un inhibiteur d'Aurora de deuxième génération en cours de test et les patients sont recrutés pour une phase II d'essai clinique. L'inhibition de la croissance est associée avec des anomalies du fuseau mitotique, l'accumulation des cellules en mitose, la polyploïdie et l'apoptose. Cet inhibiteur est disponible oralement.

Le traitement avec des inhibiteurs mitotiques (taxane, paclitaxel ...) induit l'activation du point de contrôle et l'arrêt mitotique suivie par un glissement mitotique et l'induction de l'apoptose. Néanmoins, les cellules cancéreuses possèdent un point de contrôle peu actif accompagné avec l'activation de divers signaux de pro-survie même en présence d'inhibiteurs mitotiques. A cet égard, Anand et al ont démontré que la surexpression d'Aurora A dans les cellules cancéreuses est retrouvée dans certains cas de résistance au taxol (Anand, Penrhyn-Lowe et al. 2003). En effet, l'inhibition de la kinase Aurora A diminue la chimiorésistance des cellules pancréatiques au taxol (Hata, Furukawa et al. 2005). Par conséquent, la combinaison d'agents basés sur le taxol avec des inhibiteurs des kinases mitotiques pourrait diminuer la chimiorésistance et augmenter l'efficacité de la chimiothérapie.

MLN8237 en combinaison avec Rituximab (anti-CD20) réduit la tumeur avec une efficacité additive et/ou synergique dans des modèles tumoraux de lymphomes non-Hodgkiniens (Zhang, Wang et al. 2009). Actuellement, il est utilisé en monothérapie ou en combinaison avec d'autres drogues (comme la bortezomib (inhibiteur du protéosome), le pactalixel, ...) pour traiter des patients porteurs des carcinomes des ovaires, des tumeurs solides avancées ou réfractaires, atteints de leucémie et de lymphomes Non-Hodgkiniens agressifs. En particulier, un essai clinique en phase II (NCT00830518) ayant inclus des patients adultes atteints de leucémie myéloïde aiguë et de syndromes myélodysplasiques avec un grade élevé a été complété mais les résultats ne sont pas publiés.

AZD1152 est le seul inhibiteur des Aurora en cours de test clinique en phase II/III (NCT00952588) en monothérapie ou en combinaison avec LDAC (Low Dose Cytosine Arabinosine) pour des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë.

CYC116, un inhibiteur d'Aurora B, est combiné avec une série d'agents de dommages de l'ADN différents comme la doxorubicine, la doxetaxeline, le cisplatine, la 5-FU, l'irinotecane et la gemcitabine sur des lignées cellulaires cancéreuses différentes. Les études montrent que CYC116 n'a pas d'effet synergique avec le doxetaxel dans les lignées cellulaires de cancer prostatique. Par contre, des effets synergiques sont obtenus *in cellulo*, en combinaison avec d'autres agents sur la formation de colonie et les tests de cytotoxicité. CYC116 augmente les dommages de l'ADN et la mort cellulaire induits par l'irinotecane (MacCallum AACR Meeting 2008, San Diego).

En combinaison avec des agents chimiothérapeutiques, les inhibiteurs des kinases Aurora pourrait améliorer leur efficacité. Des études *in vitro* ont montré qu'AZD1152, un inhibiteur d'Aurora B, induisait l'apoptose dans des lignées cellulaires de Leucémie Myéloïde Aigue (LMA) et dans les blastes primaires. Il augmente la sensibilité aux agents dépolymérisant la tubuline, aux inhibiteurs de topoisomérase et améliore la réponse aux radiations ionisantes (Shiloh 2003; Hickson, Zhao et al. 2004). L'AZD1152 agit synergiquement avec la gemcitabine, le docetaxel, l'irinotecan, l'oxaliplatine, 5-FU et la vinorelbine. L'administration de gemcitabine ou d'irinotecane avant traitement par un inhibiteur des Aurora réduit l'efficacité de celui-ci. Ceci suggérant la nécessité d'un protocole thérapeutique précis d'administration des molécules (Alberts, Schroeder et al. 2004).

Les cellules leucémiques contiennent de nombreuses anomalies caryotypiques, incluant des aneuploïdies. La surexpression des kinases Aurora est quelquefois oncogénique mais l'inhibition de ces kinases cause une mitose aberrante entraînant des catastrophes mitotiques dans ces cellules. Une récente étude a montré *in vivo* que MLN8237 possédait une

activité anticancéreuse potentielle dans des modèles de LMC et d'ALL avec PH+ (Leucémie Lymphoblastique Aigue Chromosome Philadelphia Positive). Il augmente aussi l'efficacité du nilotinib, un inhibiteur de Bcr-Abl (Nawrocki, 2008 ASH Annual Meeting, San Francisco). L'application la plus prometteuse pour les inhibiteurs des kinases Aurora à ce jour semble être pour le traitement des leucémies myéloïdes aiguës avec mutation de la kinase FLT3 et l'AML Ph+/CML résistante à l'imatinib, particulièrement pour la mutation de T315I de Bcr-Abl.

Toute perturbation du complexe passager induira une perte d'activité d'Aurora B. Les protéines du complexe des protéines passagères chromosomiques sont donc des cibles thérapeutiques potentielles. Par exemple, des essais précliniques et cliniques sont actuellement en cours avec des inhibiteurs de petits poids moléculaires (YM155) et deux inhibiteurs oligonucléotidiques antisens (LY2181308 et SPC3042) de Survivine, un partenaire d'Aurora B.

V. Les inhibiteurs ciblant la voie du point de contrôle du fuseau mitotique

La voie de signalisation du point de contrôle du fuseau pourrait aussi représenter une cible attractive pour la thérapie anticancéreuse. Le rationnel de ce concept est basé sur les observations suivantes :

Une faible expression des protéines contrôlant le point de contrôle du fuseau dans les lignées cellulaires tumorales entraîne l'aneuploïdie et la résistance aux drogues ; Une répression de MAD2 ou BUBR1 entraîne une ségrégation incorrecte massive des chromosomes durant la mitose et est associée à l'apoptose (Michel, Liberal et al. 2001; Kops, Foltz et al. 2004; Michel, Diaz-Rodriguez et al. 2004; Kienitz, Vogel et al. 2005).

- La suppression hétérozygote de MAD2, BUB3 ou BUBR1 chez des souris génère une instabilité chromosomique, mais la suppression homozygote est létale précocement pour l'embryon (Dobles, Liberal et al. 2000; Kalitsis, Earle et al. 2000; Michel, Liberal et al. 2001; Babu, Jeganathan et al. 2003; Dai, Wang et al. 2004).

- La suppression partielle de l'activité kinase de BUBR1 est suffisante pour porter atteinte au point de contrôle du fuseau à un niveau qui n'est plus compatible avec la survie (Kops, Foltz et al. 2004).

Les kinases du SAC (« Spindle Assembly Checkpoint ») sont considérées comme des cibles dans les thérapies anticancéreuses via la désactivation du point de contrôle mitotique. Les mutations des kinases SAC associées aux tumeurs sont montrées comme affaiblissant la signalisation du point de contrôle (Kops, Weaver et al. 2005). Néanmoins, un affaiblissement

supplémentaire ou une désactivation de la voie du point de contrôle du fuseau peut être létal pour ces cellules (Kops, Weaver et al. 2005; Weaver, Silk et al. 2008). A ce jour, parmi les kinases de ce point de contrôle, il n'y a que les inhibiteurs de MPS1 et d'Aurora B qui ont été identifiés.

Par exemple, MPS1 a été montré comme étant un des 25 gènes les plus surexprimés dans les instabilités chromosomiques et les tumeurs aneuploïdes (Carter, Eklund et al. 2006). La kinase MPS1 est sur-régulée dans de nombreux types de tumeurs (sein, poumon, œsophage, prostate, vessie et thyroïde anaplasique) (Salvatore, Nappi et al. 2007; Finetti, Cervera et al. 2008; Landi, Dracheva et al. 2008; Mizukami, Kono et al. 2008). Des inhibiteurs de MPS1, la cincréasine (Dorer, Zhong et al. 2005) et SP600125 (Schmidt, Budirahardja et al. 2005) bloquent le point de contrôle mitotique et causent une ségrégation incorrecte des chromosomes. Colombo et al. ont prouvé que NMS-P715, le premier inhibiteur de MPS1 administré par voie orale, inhibait son activité en compétant avec l'ATP et réduisait sélectivement la prolifération cellulaire. De façon intéressante, il est pratiquement sans dommage sur les cellules normales. NMS-P715 accélère la mitose et entraîne une localisation et une interaction des composants des kinétochores anormale et une aneuploïdisation massive. Ceci cause la mort cellulaire dans de nombreuses lignées issues de différents types de cancers et inhibe la croissance tumorale des modèles cellulaires précliniques (Colombo, Caldarelli et al. 2010). Ces résultats confirment que l'inhibition de SAC par un inhibiteur de MPS1 peut représenter une nouvelle approche pour le traitement des cancers avec un blocage potentiellement sélectif de la prolifération des cellules tumorales.

VI. Les inhibiteurs des kinases du point de contrôle des dommages de l'ADN

Dans les cellules proliférant normalement, le point de contrôle de l'ADN empêche la réplication de l'ADN endommagé et la progression vers la mitose. Néanmoins, dans les cellules cancéreuses, la réponse aux dommages génomique est couramment altérée par l'accumulation de mutations sur les régulateurs du point de contrôle, particulièrement sur les kinases ATM, CHK2 et sur p53. Les mutations de *CHK2* sont associées avec l'oncogénèse. Les mutations de *CHK2* sont présentes dans le cancer du sein, de la vessie, du colon, de la vulve, des ovaires, les lymphomes, les ostéosarcomes et le syndrome de Li-Fraumeni.

ATM joue un rôle clé dans la maintenance de l'intégrité génomique. Les patients porteurs de mutations hétérozygotes de cette protéine sont hypersensibles aux radiations ionisantes et aux drogues qui induisent des cassures double-brin de l'ADN. Il a donc été

proposé que l'inhibition pharmacologique d'ATM puisse promouvoir la radio-sensibilisation et la chimio-sensibilisation. Deux inhibiteurs de l'ATM, KU55933 (morpholinyl-thianthrenyl-pyranone) et CP466722 (triazolamine) ont été décrits. Ces composés ciblent ATM en bloquant son site de liaison à l'ATP et montrent une spécificité et un potentiel plus élevé que les inhibiteurs utilisés précédemment, la wortmannine et les xanthines, qui ciblent d'autres membres de la famille des PI3K kinase.

La kinase CHK1 est essentielle pour l'arrêt en phase G2 dont dépend la chimiothérapie induite par les dommages de l'ADN. Elle peut être efficacement inhibée par le composé UCN-01 qui agit de manière compétitive avec l'ATP (Wang, Fan et al. 1996; Eastman 2004). Le traitement séquentiel des cellules déficientes en p53 avec des agents endommageant l'ADN et UCN-01 entraîne une abrogation de l'arrêt en G2 et l'entrée en mitose (Vogel, Hager et al. 2007). UCN-01 est en essais cliniques de phases II sur les lymphomes. Plusieurs essais cliniques en phase I sont en cours afin de mesurer l'efficacité d'UCN-01 en combinaison avec divers inhibiteurs de topoisomérase et agents chimiothérapeutiques incluant l'irinotecan (Jimeno, Rudek et al. 2008; Fracasso, Williams et al. 2010), le topotecan (Hotte, Oza et al. 2006; Welch, Hirte et al. 2007), le cisplatine (Lara, Mack et al. 2005; Perez, Lewis et al. 2006), le carboplatine (Edelman, Bauer et al. 2007), le 5-fluorouracil (Kortmansky, Shah et al. 2005) ou la cytarabine dans les traitements des leucémies, des cancers pulmonaires et des tumeurs solides avancées. Dans les biopsies, le niveau de germinine, un marqueur de la phase S-G2 (McGarry and Kirschner 1998), augmente après le traitement avec le cisplatine, ce qui est cohérent avec l'arrêt en S-G2, et diminue après traitement avec UCN-01, ce qui correspond au contournement du point de contrôle (Perez, Lewis et al. 2006). Dans une autre étude de combinaison d'UCN-01 avec la cytarabine sur des patients atteints de LMA, les auteurs ont observé une diminution de la phosphorylation de CHK1, l'inhibition de la voie AKT et l'activation de JNK (JaNus kinase) au cours de la thérapie. Les patients avec des malignités tumorales solides ont été traités avec UCN-01 et l'irinotecan. Une diminution significative de pS6 (protéine ribosomique) phosphorylée dans les biopsies post-traitement est observée. Les patientes avec un cancer du sein triple négatif répondent à la thérapie et leur tumeurs sont toutes p53-déficientes (Fracasso, Williams et al. 2010).

Ces résultats sont cohérents avec les conclusions précliniques indiquant qu'UCN-01 agissait en synergie avec les agents de dommages de l'ADN, en particulier dans le traitement des tumeurs mutées pour *TP53*. Grâce à ces résultats encourageants concernant ces combinaisons, des essais cliniques supplémentaires de phase I et II pour des tumeurs solides avancées, les leucémies et les cancers pulmonaires sont en cours.

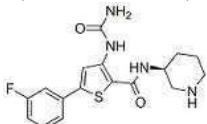
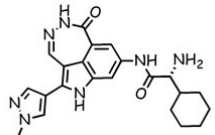
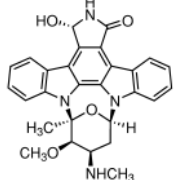
UCN-01 est le composé le plus avancé mais d'autres inhibiteurs de CHK1 sont actuellement testés en préclinique ou clinique. Les candidats aux essais cliniques comprennent XL-844, AZD7762 et PF-477736 (Schmidt and Bastians 2007) (**Tableau 7**).

Récemment, deux inhibiteurs compétitifs de l'ATP ciblant CHK2 ont été décrits, VRX046617 (isothiazole carboximidamine) (Carlessi, Buscemi et al. 2007) et NSC 109555 (bis-guanylhydrazone) (Jobson, Cardellina et al. 2007). VRX046617 ne modifie pas la cytotoxicité des agents de dommages de l'ADN, comme la doxorubicine et le cisplatine. Ce résultat est cohérent avec le phénotype des souris knock-out $CHK2^{-/-}$ qui sont plus résistantes aux agents génotoxiques grâce à l'activation transcriptionnelle des gènes régulés par p53 (Takai, Naka et al. 2002). L'inhibition de CHK2 pourrait être exploitée pour protéger les tissus sensibles (tissu lymphoïde, tissu épithélial) des effets secondaires de la radiothérapie ou des agents des dommages de l'ADN (Bartek and Lukas 2003).

Les travaux *in vitro* et *in vivo* ont indiqués que XL-844, un inhibiteur ciblant CHK1 et CHK2 et, disponible en voie orale, améliore l'activité antitumorale de la gemcitabine, un médicament antimétabolique, dans des cellules de cancer prostatique (Blagden, Molife et al. 2008). Actuellement, XL-844 est l'objet d'essai clinique de phase I en monothérapie ainsi qu'en combinaison avec la gemcitabine chez des adultes présentant des malignités avancées.

Une nouvelle génération d'inhibiteurs plus sélectifs de CHK1 est en cours d'évaluation en clinique en combinaison avec des agents qui soit induisent des dommages de l'ADN soit interfèrent avec la réplication, avec pour objectif l'amélioration de la cytotoxicité de ces composés.

Tableau 7: Les inhibiteurs de CHK1 et CHK2 en clinique

<i>Inhibiteur (compagnie)</i>	<i>Cibles principales (autres cibles)</i>	<i>Essai clinique</i>
<p>AZD7762 (AstraZeneca)</p> 	<p>CHK1 (IC₅₀ = 5 nM) CHK2 (IC₅₀ < 10 nM)</p>	<p>Phase I: les tumeurs avancées, en monothérapie et en combinaison avec la gemcitabine (un drogue antimétabolique) ou l'irinotecan (un inhibiteur de topoisomerase I)</p>
<p>PF-477736 (Pfizer)</p> 	<p>CHK1 (K_i = 0,49 nM) (CHK2 avec K_i = 47 nM)</p>	<p>Phase I: les tumeurs solides avancées en combinaison avec la gemcitabine</p>
<p>UCN-01/7-hydroxystaurosporine</p> 	<p>CHK1 (IC₅₀ = 11 nM) MARK3 (IC₅₀ = 27 nM) (CHK2 (IC₅₀ = 1040 nM), PKC (IC₅₀ = 7 nM), PDK1 (IC₅₀ = 33 nM), CDK1 (IC₅₀ = 31 nM), CDK2 (IC₅₀ = 30 nM) GSK3β (IC₅₀ = 70 nM),)</p>	<p>Phase I: leucémie et syndromes myélodysplasiques (avec la perifosine, un inhibiteur de PI3K/AKT), les tumeurs solides (avec l'irinotecan), lymphome et les tumeurs solides (avec le prednisone, un corticostéroïde) Phase II: carcinomes rénaux, mélanome et lymphome (en monothérapie); SCLC (avec le topotecan un inhibiteur de topoisomérase I)</p>
<p>XL844/EXEL-9844 (Exelixis)</p>	<p>CHK1 (IC₅₀ = 2,2 nM) CHK2 (IC₅₀ = 0,02 nM) (VEGFR2, VEGFR3, FLT3 et PDGFR avec IC₅₀ < 20 nM)</p>	<p>Phase I: les tumeurs solides avancées, en monothérapie et en combinaison avec la gemcitabine</p>

CDK, Cycline dependent kinase ; CHK, checkpoint kinase ; FLT3, fms-related tyrosine kinase ; GSK3β, glycogen synthase kinase 3β; MAPK2, mitogen activated protein kinase 2; MARK3, MAP-microtubule affinity regulating kinase 3; MDS, myelodysplastic syndromes; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; PDK1, phosphoinositide-dependent protein kinase1; PKC, protein kinase C; SCLC, small cell lung carcinoma; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor (Adapté de (Lapenna and Giordano 2009)).

VII. La thérapie personnalisée

Les inhibiteurs sélectifs de kinase émergent en tant que classe importante d'agents anticancéreux ayant une efficacité clinique et des profils de toxicité acceptable en particulier quand les traitements conventionnels n'ont offert que de modestes bénéfices. En conséquence, des efforts substantiels sont en cours pour identifier des cibles pertinentes en thérapeutique anticancéreuse, développer et tester des inhibiteurs de ces kinases sur une diversité de malignités humaines. Néanmoins, le bénéfice clinique associé avec ces composés est typiquement limité à la sous population de patients présentant une lésion génomique

spécifique dans leurs cellules cancéreuses. Cette découverte a entraîné des efforts pour sélectionner les patients avant traitement avec ces inhibiteurs de kinase en utilisant des biomarqueurs génomiques spécifiques afin d'optimiser la réponse clinique (McDermott and Settleman 2009).

Des inhibiteurs de kinases sont utilisés avec succès en thérapie anticancéreuse mais des résistances apparaissent souvent suite à des traitements répétés. Un exemple typique est le cas des inhibiteurs de tyrosine kinase dirigés contre BCR-ABL, l'imatinib. Bien que le traitement donne d'excellents résultats dans le cadre de la leucémie, il existe malheureusement des patients résistants à cette thérapie. Un défi est donc de trouver des inhibiteurs ciblant la kinase mutée et pouvant prendre le relai de la thérapie précédente. Des mutations sur le domaine kinase d'ABL apparaissent chez approximativement 45 % de patients Ph+ traités. Un taux de mutation plus élevé est observé chez des patients « en crise » LMC (LMC_{BC}) et la mutation T315I de BCR-ABL est fréquemment retrouvée (Soverini, Colarossi et al. 2006). Dans les cellules résistant aux inhibiteurs de la tyrosine kinase, mutant T315I inclus, la signalisation de Bcr-Abl est inhibée par des inhibiteurs d'Aurora kinase (Young, Shah et al. 2006; Gontarewicz, Balabanov et al. 2008). Ces résultats cliniques ouvrent une nouvelle piste prometteuse pour traiter les patients ayant développé des tumeurs résistantes suite à une thérapie par l'imatinib en poursuivant la chimiothérapie avec des inhibiteurs des kinases Aurora. Au préalable, le suivi de la kinase BCR-ABL au cours de la maladie est capital pour orienter la thérapie.

Le cancer du sein triple négatif (CSTN) est un sous-ensemble agressif du cancer du sein. Ce type de cancer est caractérisé par l'absence de l'expression des protéines RE (récepteurs d'estrogène), RP (récepteur de progestérone) et HER2 (récepteur de du facteur de croissance épidermique humaine 2) (Dent, Trudeau et al. 2007; Millikan, Newman et al. 2008). Par conséquent, les patients de CSTN ne répondent pas aux traitements appliqués au cancer du sein HER2 positif et sensible à l'endocrine. Les observations ont montré que CSTN partage des caractéristiques cliniques et pathologiques avec les cancers déficients en *BRCA* connus pour présenter des mécanismes de réparation de l'ADN déficients. Compte tenu de ces caractéristiques, les patients CSTN peuvent bénéficier des traitements pour les cancers déficients en *BRCA*. Les inhibiteurs de PARP sont des candidats prometteurs avec les résultats préliminaires des essais cliniques en phase II (Jones, Holmes et al. 2009; Vahdat, Pruitt et al. 2009).

Les agents basés sur le platine représentent une base de traitement chimiothérapeutique du carcinome pulmonaire non à petites cellules (CPNPC). Des efforts sont donc entrepris pour

identifier des marqueurs moléculaires capables de prédire la résistance clinique au cisplatine et ses dérivés. L'ERCC1 (Excision Repair Cross Complementation group 1) est un biomarqueur prédictif prometteur dans le cadre du carcinome pulmonaire non à petites cellules avancé (Liedtke, Mazouni et al. 2008; Pal and Mortimer 2009). L'expression faible de l'ARNm d'ERCC1 est associée à une augmentation de la sensibilité à la chimiothérapie après traitement par carboplatine (Vilmar and Sorensen 2009) et à une réponse clinique positive des patients atteints de CPCPC après thérapie par cisplatine/gembacine (Lord, Brabender et al. 2002).

VIII. Des perspectives pour la thérapie anticancéreuse

Le cycle cellulaire est une série d'événements hautement régulés. En complément des cibles principales et importantes comme CDKs, PLK ou les kinases Aurora, la progression des connaissances sur le cycle cellulaire fait émerger d'autres cibles potentielles comme les kinases Haspine, MELK ainsi que des protéines du point de contrôle du fuseau (MSP1, BUBR1 ou BUB1). MPS1 phosphoryle Boréoline pour contrôler l'activité d'Aurora B, l'alignement chromosomique et la fonction du point de contrôle du fuseau mitotique. Des inhibiteurs de MSP1 devraient être capables d'arrêter la prolifération cellulaire. Haspine est une cible candidate pour la recherche médicale car c'est une kinase essentielle pour la cohésion des chromatides sœurs et que sa disparition entraîne l'arrêt mitotique (Dai and Higgins 2005). La famille de BUB régule la fonction de SAC et elle est souvent mutée dans les cancers humains. MELK est une kinase méiotique et mitotique qui joue un rôle clés dans le développement des glioblastomes ; elle serait présente sur les cellules souche cancéreuses (Nakano, Masterman-Smith et al. 2008) mais, son potentiel thérapeutique est à évaluer.

Les cellules souches cancéreuses représentent aussi une cible thérapeutique très intéressante car elles existent dans presque tous les types de cancer (Collins, Berry et al. 2005; Dalerba, Cho et al. 2007; Dalerba and Clarke 2007; Dalerba, Dylla et al. 2007; Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007; Eramo, Lotti et al. 2008; Harris, Yang et al. 2008; Yang, Ho et al. 2008; Curley, Therrien et al. 2009) et semblent augmenter la résistance aux traitements antitumoraux standards comme la chimiothérapie et la radiothérapie (Bao, Wu et al. 2006; Eramo, Lotti et al. 2008; Roesch, Fukunaga-Kalabis et al. 2010). En effet, la radiothérapie et chimiothérapie enrichissent la fraction de cellules exprimant des marqueurs de cellules souches cancéreuses qui ont une capacité d'autorenouvellement et une tumorigénèse plus importante. Donc, la découverte de drogues spécifiquement efficaces contre ces cellules

souches est un nouvel objectif mais requière la caractérisation de cette population de cellules (Garvalov and Acker).

Actuellement, de nombreuses molécules sont en court de test mais beaucoup ne passeront pas l'épreuve des tests cliniques. Les cellules tumorales étant soumises à une forte pression sélective par les différentes chimiothérapies, il est nécessaire de trouver sans cesse de nouvelles molécules. Les inhibiteurs possèdent souvent des cibles secondaires, ceci permet d'envisager de nouvelles stratégies permettant de maximiser les effets d'un composé sans multiplier les toxicités.

Les travaux de l'équipe ont permis d'identifier une nouvelle famille d'inhibiteurs des kinases Aurora, les benzo[e]pyridoindoles. Des résultats préliminaires indiquent que la molécule C1 pourrait être un candidat intéressant pour de futurs essais cliniques (Hoang, Favier et al. 2009). Au cours de ma thèse, nous nous sommes concentrés sur les applications potentielles en thérapie combinée basée sur la spécificité restreinte et multiple de cet inhibiteur.

OBJECTIF DE THESE

Empêcher la division des cellules cancéreuses est la pierre angulaire de l'oncologie médicale. En conséquence, les protéines kinase impliquées dans la mitose constituent des cibles de choix pour la recherche de nouveaux médicaments anti-tumoraux.

Les Aurora kinases sont des sérine/thréonine kinases dont l'activité est essentielle pour la progression mitotique. Elles contrôlent la duplication des centrosomes, la mise en place du fuseau mitotique, l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique et l'induction de l'anaphase ainsi que la cytodierèse.

Dans la recherche de molécules inhibitrices de l'activité Aurora kinase, nous avons réalisé un crible à haut débit sur la chimiothèque de l'Institut Curie. Nous avons identifié de puissants inhibiteurs des kinases Aurora et parmi ceux-ci, plusieurs molécules de la famille des benzo[e]pyridoindoles synthétisées par Chi-Hung Nguyen, à l'Institut Curie d'Orsay (Hoang, Favier et al. 2009). La famille des benzo[e]pyridoindoles possède une forme en «croissant de lune » déterminée par la fusion des cycles benzo[e]. Les tests *in vitro* et *in vivo* indiquent que les molécules les plus actives inhibent *in vitro* les kinases Aurora avec des IC50 de l'ordre du nano-molaire. Les travaux de Hoang et al. sur la molécule la plus active, C1, ont montré qu'elle inhibe la phosphorylation de l'histone H3 dans les cellules en mitose, induit la sortie de la mitose sans ségrégation des chromosomes, un phénotype aussi observé en inactivant Aurora B. Ce composé empêche aussi la multiplication des cellules de diverses lignées tumorales cultivées en 2 et en 3 dimensions, tout en étant peu toxique pour les cellules quiescentes. Notre meilleur composé est parfaitement toléré par les souris « nude » et retarde la croissance de tumeurs établies à partir des cellules tumorales de poumon non à petites cellules. A noter d'ailleurs que C1 a une spécificité restreinte parmi les kinases, mais inhibe des cibles secondaires, ce qui ouvre la voie à des traitements combinés et/ou ciblés sur un type tumoral (Hoang, Favier et al. 2009).

Au cours de cette thèse, nous avons poursuivi l'étude de la famille des benzo[e]pyridoindoles. Nous avons décrit dans le **Chapitre I** des résultats une application possible pour le composé le plus actif C1 ciblant simultanément d'Aurora B et CHK2. Ensuite, dans le **Chapitre II**, nous avons étudié la relation structure/fonction parmi les molécules de la famille benzo[e]pyridoindole. Nous avons identifié trois molécules potentiellement intéressantes pour des applications fondamentales ou thérapeutiques et nous avons caractérisé partiellement deux nouvelles molécules.

MATERIELS ET METHODES

Chapitre I : TECHNIQUES D'ANALYSE DES PROTEINES

1. Extrait cellulaire

Les cellules sont récupérées et dénaturées par récupération dans l'urée 9M puis du tampon de charge type Laemmli (contenant du SDS, β -mercapto dans le tampon indiqué IV) est ajouté. Les lysats cellulaires sont bien mélangés et bouillis 10 minutes à 95°C et puis centrifugés 5 minutes à 10 000 tpm.

2. Western Blot

Les protéines extraites du lysat cellulaire sont séparées sur gel SDS-PAGE et transférées sur une membrane de nitrocellulose. Le « Western Blot » commence par une saturation des sites aspécifiques de la membrane, pendant 1 heure, dans le tampon de saturation. La membrane est incubée dans le tampon I contenant l'anticorps primaire pendant 1 heure. Trois lavages à l'eau sont réalisés suivis par un lavage de 5 minutes dans du PBS 0,05 % Tween 20 et par trois lavages supplémentaire à l'eau. La membrane est mise en présence de l'anticorps secondaire lié à la peroxydase (1 μ g/ml) pendant 1 heure dans le tampon II. Les étapes de lavage sont répétées.

La révélation de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase du raifort (HRP) est réalisée par le système ECL+ (Roche). Le signal impressionne les films autoradiographiques.

Note:

Les incubations et les lavages sont réalisés à température ambiante et sous agitation. Le temps de l'incubation de l'anticorps primaire est variable selon les protéines à détecter et les anticorps utilisés.

Chapitre II : TEST D'ACTIVITE KINASE

1. Criblage à haut débit

Les molécules benzo[e]pyridoindoles sont synthétisées par Chi-Hung Nguyen. Leur pureté estimée par HPLC est supérieure à 95 %. Les synthèses sont partiellement décrites dans (Nguyen, Bisagni et al. 1992; Nguyen, Lavelle et al. 1992).

2. Test *in vitro* de détermination d'IC₅₀

Les tests sont réalisés sur la plateforme RBC (Reaction Biology Corp, USA) comme décrit précédemment (Hoang, Favier et al. 2009). En résumé, la molécule C1 et Vx-680 sont testées contre les kinases CHK1 et CHK2 en 10 dilutions sériées en commençant à 2 μM ; la concentration en ATP utilisée est 1 μM pour chacune des réactions. Les essais sont en duplicat et la Staurosporine est utilisée comme contrôle interne. L'IC₅₀ est la concentration inhibant 50 % de l'activité kinase.

Les profils d'inhibition sont réalisés par le MRC (Dundee, Ecosse) à la concentration de 1 μM en présence de 1 μM ATP vis à vis de 106 kinases représentatives des différentes variétés de kinases.

Chapitre III : BIOLOGIE CELLULAIRE

1. Lignées cellulaires et milieu de culture

Nous utilisons les lignées cellulaires suivantes :

Tableau 8 : Liste de lignées cellulaires humaines et milieux de culture utilisés

<i>ATCC</i>	<i>Lignée</i>	<i>Milieu de culture</i>	<i>Origine</i>
CRL-5807	H358	RPMI	Cancer bronchioalveolaire non à petites cellules
CCL-185	A549	RPMI	Cancer bronchioalveolaire non à petites cellules
CRL-5803	H1299	RPMI	Cancer bronchioalveolaire non à petites cellules
CRL-5806	H322	RPMI	Cancer bronchioalveolaire non à petites cellules
HTB-96	U2OS	McCoy's 5A	Ostéosarcome
CCL-2	HeLa	DMEM (Glucose 1 g/l)	Adénocarcinome du col de l'utérus
CCL-40	HL60	RPMI	Leucémie promyélocytaire
HB-8065	HepG2	DMEM * (Glucose 4,5 g/l)	Hépatocarcinome
HTB-52	SK-HepG1	DMEM * (Glucose 4,5 g/l)	Adénocarcinome du foie
	Mahlavu	DMEM * (Glucose 4,5 g/l)	Hépatocarcinome
HTB-19	BT-20	MEM **	Carcinome du sein
CRL-2315	HCC70	RPMI***	Carcinome du sein
ECACC 89081403	U373	DMEM (Glucose 4,5 g/l)	Astrocytome

Le milieu complet contient 10% de sérum fœtal de veau décomplémenté par la chaleur (30 minutes à 56°C), 2 mM L-glutamine et 100 IU/ml Pénicilline-Streptomycine. Le milieu de culture est choisi selon les recommandations de l'ATCC.

Note : (*) : Sodium pyruvate 1 mM, NEAA 0,1 mM

(**) : Sodium pyruvate 1 mM, sodium carbonate 7,5 %, NEAA 0,1 mM

(***) : Sodium pyruvate 1 mM, HEPES 10 mM

2. Condition de culture

Les cellules sont cultivées sur des boîtes de pétri « traitées culture » dans une étuve à 37°C et en présence de 5% de CO₂ et d'humidité. La récupération des cellules se fait par une solution de trypsine (trypsine 0,5g/l, EDTA 0,2g/l) qui dégrade le matrice extracellulaire, permettant de décoller les cellules de leur substrat et de les individualiser.

3. Entretien des cellules

L'entretien de cellule est réalisé quand des cellules sont à confluence. Le milieu est enlevé. Les cellules sont décollées par une solution de trypsine (trypsine 0,5 g/l, EDTA 0,2 g/l). Après la trypsination, les cellules sont aspirées doucement avec le milieu complet. Un aliquote de suspension cellulaire permet de réensemencer de nouvelles cultures avec du milieu complet frais et d'obtenir des cellules en croissance exponentielle.

4. Conservation des cellules

Les cellules sont soumises à l'action de la trypsine, puis centrifugées 5 mn à 1200 tpm. Le culot est repris par un mélange de milieu de culture contenant 50 % de SVF, 10 % de DMSO et transférées immédiatement sur glace. Chaque ampoule contient 1×10^6 cellules. Les cellules sont congelées lentement puis conservées à -80°C ou dans de l'azote liquide.

5. Transfection

Les cellules à 60 % de confluence sont transfectées à l'aide du Lipofectamine (Invitrogen), suivant les instructions suivantes :

- Enlever l'ancien milieu et ajouter Opi-MEM (Invitrogen) sur les cellules.
- Pour chaque transfection dans la plaque de 6 puits ou dans la boîte de culture de 35 mm, diluer 2,2 μg d'ADN dans 25 μl d'Optimem (solution A) et mélanger doucement.
- Diluer 1,5 μl de Lipofectamine dans 25 μl d'Optimem (Solution B) et mélanger doucement pendant 5 minutes.
- Combiner les 2 solutions et mélanger doucement de temps en temps pendant 25 minutes. Déposer goutte à goutte la solution combinée sur les cellules.
- Après 4 h d'incubation, ajouter le milieu complet sans enlever la solution de transfection. Le milieu est changé après 24 h.

Etablissement de lignée stable : 24 h après transfection, le milieu des cellules est additionné d'antibiotique généticine (à concentration de 500 à 700 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Les cellules sont cultivées sous sélection pendant environ 15 jours. Puis les cellules sontensemencées dans la boîte de culture 96 puits à la concentration de 0,5 à 2 cellules/puits ou dans de boîtes de culture 6 puits à des concentrations décroissantes de 10^3 à 10 cellules/puits. Les clones résistants à la généticine sont conservés et analysés en microscopie de fluorescence.

6. Test de viabilité

Par MTS : La viabilité cellulaire est déterminée à l'aide du test CellTiter 96® AQ (Promega). Ce test est basé sur la détermination de l'activité mitochondriale. Les cellules sont

ensemencées en plaque 96-puits dans les conditions normales de culture et incubées avec des composés pendant des temps variables. Puis, 20 µl de MTS [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenol)-2-(4sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] sont ajoutés à 100 µl de milieu dans chaque puits. La plaque est incubée pendant 1-4 heures à 37°C. La DO₄₉₂ est déterminé par un lecteur de microplaque Wallac. L'absorbance à 492 nm reflète la quantité de cellules vivantes dans chaque puits, via l'activité de l'enzyme déhydrogenase mitochondriale.

Par le bleu de trypan : La coloration au bleu de trypan est une méthode de coloration des cellules mortes. Cette méthode est couramment utilisée lors de numération cellulaire. Les cellules en suspension sont diluées 1:1 (v/v) avec solution de bleu de trypan 0,4%. Les cellules sont comptées grâce à une cellule de Mallassez. Les cellules non colorées représentent les cellules vivantes.

7. Synchronisation des cellules

Les méthodes suivantes sont appliquées pour synchroniser les cellules:

a. Synchronisation G1/S par double blocage thymidine :

Les cellules sont exposées dans le milieu complet en présence de 3 mM thymidine. Après 20 h, la thymidine est enlevée par lavage au PBS stérile et les cellules sont incubées dans du milieu de culture complet pendant 10 h. En suite, un deuxième blocage thymidine est réalisé dans les mêmes conditions pendant 18h. Les cellules sont ensuite mise en culture dans du milieu complet.

b. Synchronisation cellulaire par carence en sérum :

La synchronisation cellulaire par carence en sérum utilise le fait que les cellules ont besoin de facteurs de croissance pour initier les synthèses. En absence de sérum les cellules sont bloquées en phase G0/G1.

Les cellules sont synchronisées par le milieu sans sérum pendant 48h, puis, remises en milieu complet pour ré-initier le cycle.

c. Synchronisation cellulaire par carence en sérum et thymidine

Nous combinons ces deux méthodes de synchronisation : carence en sérum et thymidine pour obtenir les cellules en phase S. Les cellules sont synchronisées, dans le milieu sans sérum, pendant 48 h. Ensuite, elles sont mises dans le milieu complet avec de la thymidine (3 mM), pendant 20 h avant l'attention des composés.

d. Synchronisation en mitose par l'ajout de Nocodazole ou de Taxol.

Les cellules sont exposées dans le milieu complet en présence de Nocodazole 0,1 µg/ml (Sigma) ou de Taxol 33 nM (Sigma). Après 12-18h, le cycle cellulaire est arrêté en Mitose à

cause du blocage de l'inhibition de la polymérisation (Nocodazole) ou la dépolymérisation (Taxol) des microtubules.

8. Analyse du cycle cellulaire par Cytométrie de Flux

Les cellules éventuellement synchronisées et traitées par des composés sont récoltées, puis lavées avec du PBS froid. Après avoir récolté les cellules, celles-ci sont lavées avec du PBS froid, puis fixées par de l'éthanol 70% froid pendant 1 heure. Elles sont ensuite incubées avec une solution colorante incluant de la RNase A sans traces de DNase (0,2 mg/ml) et du iodure de propidium (50 µg/ml) dans du PBS, pendant 30 minutes, à 37°C. Les cellules sont analysées au FACScan (Beckton Dickinson). Le cycle cellulaire est déterminé grâce au logiciel Cell Quest.

9. Culture cellulaire en 3D (sphéroïde)

Nous avons utilisé la technique de la goutte-pendante pour créer des sphéroïdes de diamètre semblable. Une goutte (20 µl) contenant 1 400 cellules H358 est mise sur le couvercle d'une plaque 24 puits, pendant 48 h. Les sphéroïdes sont récupérés soigneusement et mis doucement dans les puits tapissés d'une couche d'agarose stérile et contenant 500 µl de milieu de culture. La croissance du sphéroïde est évaluée suite à la mesure quotidienne de deux diamètres opposés (d_1 et d_2). Le volume est calculé comme suit :

$$V = 3/4\pi \times r^3 \text{ où } r = 1/2 \sqrt{(d_1 \times d_2)}$$

Le rapport de croissance du sphéroïde est calculé par $(V-V_0)/V_0$ avec V_0 – volume de contrôle ; V - volume au jour de la mesure.



Figure 22 : Illustration de l'obtention de sphéroïdes par la technique de la goutte pendante.

Chapitre IV : TECHNIQUE D'IMAGERIE DE FLUORESCENCE

1. Immunofluorescence sur les cellules fixées

Les cellules sont ensemencées sur des lamelles de verre disposées dans des plaques de culture 24 puits contenant 500 µl de milieu de culture. Ces plaques sont maintenues en culture au moins une nuit. Après lavage au PBS les cellules sont fixées dans une solution de p-formaldéhyde 4% (Accustain Formalin Solution - SIGMA) 15 min, à 37°C. Après deux lavages de 5 min au PBS, les cellules sont perméabilisées par du PBS 0,2 % Triton X-100, pendant 5 minutes, à température ambiante, puis elles sont incubées avec de l'albumine de sérum bovine (BSA 0,2 mg/ml) pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules sont alors mises successivement en présence de l'anticorps primaire (dilué dans le tampon I) puis de l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (Tampon I) pendant 30 à 60 minutes, à température ambiante. L'excès d'anticorps est éliminé par 3 lavages PBS contenant 0,2 % de Tween 20. Le marquage de l'ADN s'effectue en incubant les cellules 10 minutes dans une solution de Hoechst 33342 (1 µg/ml)/PBS (Sigma) avant montage dans du liquide de montage pour microscopie de fluorescence (DakoCytomation).

Pour les sphéroïdes, le protocole est réalisé comme ci-dessus sauf les temps d'incubation modifiés ainsi : fixation pendant 30 minutes, perméabilisation pendant 30 minutes et saturation pendant 1 h. L'anticorps primaire est incubé toute la nuit à 4°C et les marquages fluorescents pendant 1 h.

Les acquisitions sont réalisées sur un microscope confocal ZEISS 510. Les lasers utilisés sont l'Argon pour une excitation à 488 nm, l'Helium-Néon pour une excitation à 543 nm et le biphoton Titanium (Tsunami) pour une excitation biphotonique à 720 nm (Hoescht). Les images sont analysées à l'aide du logiciel LSM 510

2. Suivi de cellules vivantes

Les cellules sont ensemencées sur des plaques LabTek à fond lamelle (NUNC). Les cellules sont maintenues à 37°C et 5 % de CO₂ pendant toute la durée de l'expérimentation. Les acquisitions sont réalisées avec un objectif à eau PlanApochroma 40x sur un microscope confocal ZEISS 510. La puissance du laser Argon (excitation de la GFP à 488 nm) varie de 1 à 5 % de la puissance maximale.

Table 9 : Liste des anticorps primaires utilisés pour les expériences en western blot et immunofluorescence

Anticorps primaire	Dilution IF	Dilution WB	Espèce	Provenance
Anti- α tubuline	1/2 500	1/4 000	Souris	Sigma
Anti- β actine		1/5 000	Souris	Sigma
Anti-H2AX Ser139-P	1/2 000	1/2 000 (3h)	Souris	Upstate
Anti-Chk2		1/1 000	Souris	SantaCruz
Anti-Chk2 Ser516-P		1/1 000 1/8 000	Lapin	USbiological Assay designe
Anti-Chk2 Thr68-P		1/10 000	Lapin	Santa Cruz
Anti-AuroraA Thr288	1/1 600	1/1 000 (ON)	Lapin	Cell Signalling
Anti-Aurora B		1/10 000	Lapin	Epitomics
Anti-Aurora B Thr232		1/1 000	lapin	Stressgen
Anti-tubuline acétylée		1/5 000	Souris	Sigma
Anti-MPM2-P		1/1 000	Souris	Upstate
Anti-H3K9 acétylée		1/5 000	lapin	Upstate
Anti-H3 Ser10-P	1/2 000	1/2 000	Lapin	Upstate
Anti-H3 Ser28-P		1/2 500	Lapin	Upstate
Anti-H2B		1/2 500	Lapin	Upstate
Anti-CenP-A Ser7-P		1/1 000	Lapin	Cell Signaling
Anti-MKLP1	1/100		Lapin	Santa Cruz
Anti-humain centromere	1/2 000		Humain	Immunovision

(ON, toute la nuit ; WB, western blot ; IF, immunofluorescence, P : protéine phosphorylée)

Table 10 : Liste des détails des anticorps secondaires utilisés pour western Blot et immunofluorescence

Anticorps secondaire	Dilution IF	Dilution WB	Espèce	Provenance
Couplé Alexa488	1/500		Chèvre	Molecular probes
Couplé Alexa546	1/500		Chèvre	Molecular probes
Couplé Hylite555	1/500		Chèvre	Anaspec
Couplé Hylite 647	1/500		Chèvre	Anaspec
Anti-humain IgG	1/200		Chèvre	Gene Tex
Couplé HRP (souris)		1/5 000	Mouton	Roche
Couplé HRP (lapin)		1/5 000	Ane	Roche

(WB, western blot ; IF, immunofluorescence)

Chapitre V: TECHNIQUE *IN VIVO*

1. Souris "nude"

Des souris femelles Nude swiss (4 semaines) ont été fournies par Iffa Credo, Marcy l'Etoile, France. L'adaptation à la nouvelle ambiance de l'animalerie dure une semaine. Elles sont maintenues dans des conditions confinées.

2. Xénogreffe de cellules

Pour créer la tumeur, les cellules de la lignée H358 ou HL-60 ont été lavées et resuspendues dans du PBS stérile. Elles ont été mélangées avec du matri-gel sans facteur de croissance (1:1, Beckton Dickinson), elles sont ensuite injectées aux souris par la voie sous-cutanée, dans la région dorsale à raison de dix millions de cellules dans un volume de 0,2 ml.

3. Etude de croissance tumorale

Des tumeurs sont établies après 5 jours d'injection. Les souris dans chaque cage sont divisées au hasard en 4 groupes, le volume moyen des tumeurs étant semblable dans chaque groupe. La croissance tumorale est évaluée suite à la mesure hebdomadaire de deux diamètres opposés grâce à un pied à coulisse. Le volume est calculé comme suit :

$$V = d_1^2 \times d_2 \text{ où } d_1 \text{ correspond à la largeur et } d_2 \text{ à la longueur du nodule}$$

Les animaux sont pesés chaque semaine. Au terme de l'expérience, les souris sont autopsiées et différents prélèvements analysés (sang, foie, rein, tumeur).

4. Traitement

a. Par C1 et Etoposide sur les xénogreffes de cellules H358

Quatorze jours après l'établissement des tumeurs des cellules H358, les souris sont injectées avec C1 ou avec Etoposide ou avec les deux drogues ou avec le véhicule. Les souris reçoivent 24 injections de C1 (160 µg pour 20 g de souris dans le véhicule (PEG300/DMSO 16 %) 4 fois par semaine ou avec le véhicule seul. La moitié des souris a reçu 3 injections d'Etoposide (1 mg/souris/injection). Le volume des tumeurs est mesuré une fois par semaine.

b. Par C1 et Etoposide sur les xénogreffes des cellules HL60

Les souris sont traitées chaque jour par C1 (17 jours consécutifs par 160 µg de C1 pour 20 g de souris dans le véhicule PEG 300/DMSO 16 %) par voie intra-péritonéale. Le traitement commence cinq jours après l'établissement des tumeurs. Trois injections d'Etoposide (100 µg/souris/injection) sont réalisées aux jours 5, 10 et 17. Les souris contrôle reçoivent soit le véhicule, soit Etoposide soit C1. Le volume des tumeurs est déterminé au cours du temps.

c. *Par C21 sur les xénogreffes des cellules HL60*

Les souris portant des xénogreffes HL60 sont traitées par voie intrapéritonéale quotidiennement. Le traitement commence cinq jours après l'établissement des tumeurs. Les souris reçoivent 17 injections, soit le véhicule PBS soit C21 (5 µg pour 20 g de souris soluble dans PBS). L'évolution de volume des tumeurs est déterminée au cours du temps.

Chapitre VI : TAMPON

1. Biochimie

Tampon de charge Laemmli 6X:

- 10,3 % (v/v) de SDS
- 36 % (v/v) de glycerol
- 5 % (w/v) de β -mercaptoethanol
- 1,2 % (w/v) de blue de bromophenol
- 0,35 M de Tris (HCl), pH 6,8

Tampon de migration 10X (1L): 30,2 g de Tris base, 188 g de Glycine, 10% (v/v) SDS

Tampon I : 0,2 % (v/v) de Tween 20, 10 % (v/v) de sérum d'agneau dans PBS

Tampon II : 0,2 % (v/v) Tween 20, 1 % (w/v) de lait écrémé dans PBS

Tampon de lavage: 0.05 % (v/v) Tween 20 dans PBS

2. Immunofluorescence

Tampon I : PBS supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal, 0,2 % (v/v) de Tween 20

Perméabilisation : 0,2 % (v/v) Triton X-100 dans PBS

Saturation : BSA 0,5 mg/ml dans PBS

Tampon de lavage : 0,2 % (v/v) de Tween 20 dans PBS

Partie I

COMBINAISON D'UN INHIBITEUR DES KINASES AURORA, C1, AVEC DES AGENTS DE DOMMAGE A L'ADN

Nous avons identifié les benzo[e]pyridoindoles comme des nouveaux inhibiteurs des kinases Aurora ; la molécule C1 est la plus active de la série comme le montre les travaux de Hoang (Hoang, Favier et al. 2009 et thèse 2008). Dans cette partie, nous avons exploité le potentiel de la molécule C1 dans des applications de traitements combinés en se basant sur la spécificité restreinte mais multiple de cet inhibiteur. La majorité de ces données sont présentes dans l'article Vu et al, reproduit en fin de manuscrit.

I. Le composé C1 inhibe *in vitro* à la fois les kinases Aurora et les kinases du point de contrôle CHK1/2

In vitro, les IC₅₀ d'inhibition des kinases Aurora par C1 sont de l'ordre du nanomolaire (nM) donc semblables à ceux trouvés pour VX-680, un inhibiteur de référence pour les kinases Aurora (Hoang, Favier et al. 2009).

Les essais *in vitro* indiquent que C1 inhibe à la fois les kinases Aurora et les kinases du point de contrôle (CHK) (**Tableau 11**). Les IC₅₀ pour les kinases Aurora B et CHK2 sont très semblables. Ces données suggèrent que l'on peut inhiber de façon simultanée les deux kinases dans un environnement cellulaire.

Tableau 11 : Efficacité comparée de C1 et VX-680, *in vitro*

Kinase	IC ₅₀ C1 (nM)	IC ₅₀ VX-680 (nM)
Aurora A	61	13
Aurora B	31	37
Aurora C	124	117
CHK1	224	Sup 1000
CHK2	29	Sup 1000

(Les valeurs, *in vitro*, d'IC₅₀ d'inhibition de l'activité kinase sont indiquées pour cinq kinases ciblées par C1. En comparaison, les valeurs d'IC₅₀ obtenues avec VX-680 pour les mêmes kinases sont aussi notées. Les mesures d'IC₅₀ pour les deux composés sont faites dans mêmes conditions, et en duplicat. IC₅₀, concentration inhibant 50 % de l'activité kinase).

II. C1 cible *in cellulo* la kinase CHK2

Nous avons montré que C1 inhibait la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 et induisait la sortie de mitose par inactivation du point de contrôle du fuseau, ces effets sont caractéristiques de l'inactivation d'Aurora B (Hoang, Favier et al. 2009). Une question se pose : Est-ce que C1 pourrait aussi cibler CHK2 dans les cellules ?

CHK2 est activée et phosphorylée sur la thréonine 68 (CHK2-Thr68) par ATM suite à des dommages à l'ADN. CHK2-Thr68 phosphorylée s'homodimérise, entraînant la trans-activation des autophosphorylations des thréonines 383 et 387 ainsi que la cis-phosphorylation de la sérine 516. Donc, les niveaux de phosphorylation de la thréonine 68 et de la sérine 516 reflètent l'activité kinase de CHK2 (**Figure 17**, partie Introduction). Un moyen d'activer CHK2 est l'action des agents de dommages à l'ADN.

Réponse aux drogues anti-tumorales

Nous avons vérifié si C1 pouvait modifier la réponse cellulaire aux drogues anti-tumorales connues comme les inhibiteurs de l'ADN topoisomérase II tel l'Etoposide. Les cellules U2OS sont traitées par Etoposide (10 μ M) et mises en récupération en présence ou en absence de C1 (1 μ M). Nous observons la phosphorylation de CHK2 et de H2AX durant 28 h de récupération (**Figure 23**). L'Etoposide provoque des cassures sur l'ADN et induit l'activation les points de contrôle des dommages à l'ADN. Nous avons observé que les signaux de la phosphorylation de CHK2 sur la thréonine 68 (CHK2-T68-P) sont intenses dans le contrôle montrant la réponse aux dommages à l'ADN suite au traitement par Etoposide (**Figure 23A**). L'autophosphorylation de CHK2 sur la sérine 516 est aussi détectée parallèlement à CHK2-T68-P (**Figure 23A**). Nous avons noté que ces marques sont encore présente 28 h plus tard en absence de C1. Au contraire, les signaux de phosphorylation de CHK2 sur les deux résidus sont moins forts en présence de C1 montrant que CHK2 est rapidement déphosphorylée. Ceci suggère une balance en faveur des phosphatases dans ces conditions. CHK2 n'est pas activée durant la récupération en présence de C1 (28 h après des dommages). H2AX-Ser139 est détectée dans le traitement de l'Etoposide mais diminue rapidement en absence de C1 et lentement en sa présence (**Figure 23A**). La phosphorylation d'H2AX est faible à 28 h alors que CHK2 est activée très fortement (**Figure 23A**, 28 h).

Les différences de signaux de H2AX-Ser139 phosphorylée sont illustrées par des expériences d'immunofluorescence (**Figure 23B**). Dans le contrôle, H2AX-Ser139 est ponctuée, elle est intense tandis que la distribution est homogène en présence de C1 (**Figure 23B**, 24 h de récupération). Pour étudier l'application possible de ces données, nous avons vérifié si C1 pouvait empêcher la réparation de l'ADN dans les cellules n'exprimant pas p53. Les cellules H358 sont traitées par l'Etoposide et mise en récupération en présence ou en absence de C1 pendant 4 h, 20 h et 28 h. La cinétique du dépôt de H2AX-Ser139 phosphorylée est clairement différente dans les deux conditions. Après 28 h de récupération, le signal de H2AX-Ser139 phosphorylée est encore très fort en présence de C1 tandis qu'il diminue et apparaît ponctué dans le contrôle (**Figure 23B**). Les histogrammes (**Figure 23B**)

indiquent que dans les deux lignées cellulaires, la phosphorylation de H2AX est fortement maintenue en présence de C1 jusqu'à 24 h (U2OS) et 28 h (H358) après le traitement tandis qu'elle revient pratiquement au niveau basal dans le contrôle. Ceci montre que C1 inhibe aussi la réparation de l'ADN dans les cellules déficiente en p53.

Ces résultats prouvent que C1 inhibe l'activité de CHK2 *in cellulo* suite aux dommages à l'ADN induits par un inhibiteur de Topoisomérase, l'Etoposide.

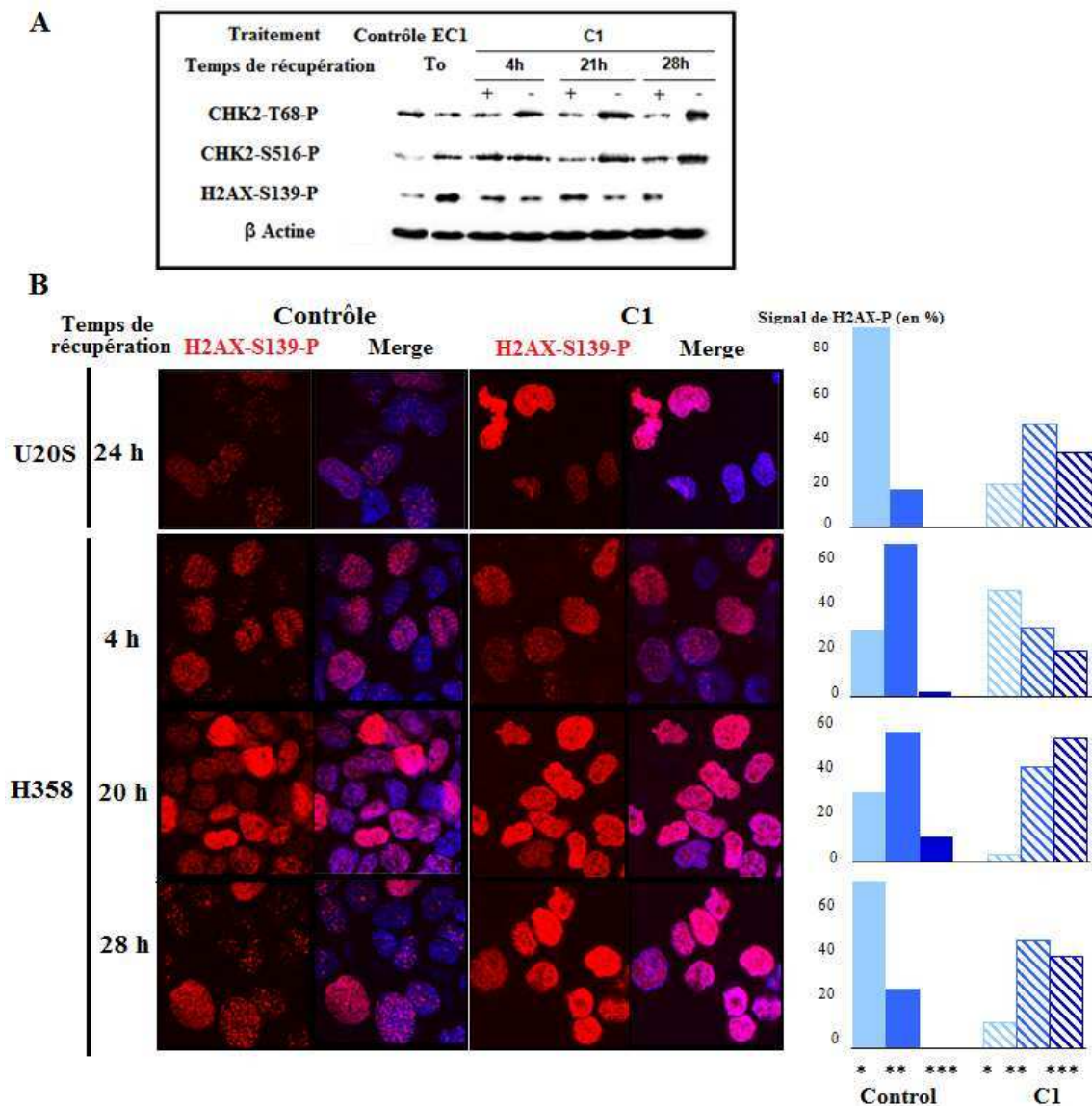


Figure 23 : C1 cible CHK2 *in cellulo* suite à des dommages double-brin de l'ADN

A : Les cellules U2OS sont traitées par Etoposide (10 μ M) et mises en récupération en présence (+C1) ou en absence de C1 (-C1). Différents marqueurs sont suivis sur les extraits cellulaires par western blot. La β -actine est utilisée comme contrôle interne. La variation de la phosphorylation de CHK2 sur la thréonine 68 (CHK2-T68-P) et la sérine 516 (CHK2-S516-P) est détectée. Les signaux de H2AX-Ser139 sont plus élevés quand CHK2 est inhibée, suggérant une réparation de l'ADN moins efficace en présence de C1.

B : Une expérience similaire est réalisée par immunofluorescence sur les cellules U2OS et H358. Le niveau de H2AX-Ser139 est visualisé par le fluorochrome rouge (Hylite 546, partie gauche) et quantifié (partie droite, histogrammes). Les étoiles illustrent l'intensité de H2AX-Ser139. L'ADN est marqué par le Hoescht 33342 (en bleu).

III. Effet du traitement combiné (C1 plus Etoposide) sur les cellules H358

1. En monocouche

Afin de vérifier l'efficacité du traitement combiné (Etoposide + C1), nous avons mesuré la viabilité des cellules. Les cellules sont traitées par Etoposide (5 μ M) pendant 24 h avec ou sans C1 avant une étape de récupération de 48 h. Dans ces conditions, 85 % des cellules sont viables suite au traitement par l'Etoposide, 68 % suite au traitement par C1 et seulement 49 % suite au traitement combiné (**Figure 24**). Les deux traitements s'additionnent puisque nous attendons environ 58 % de cellules vivantes si les effets sont cumulatifs.

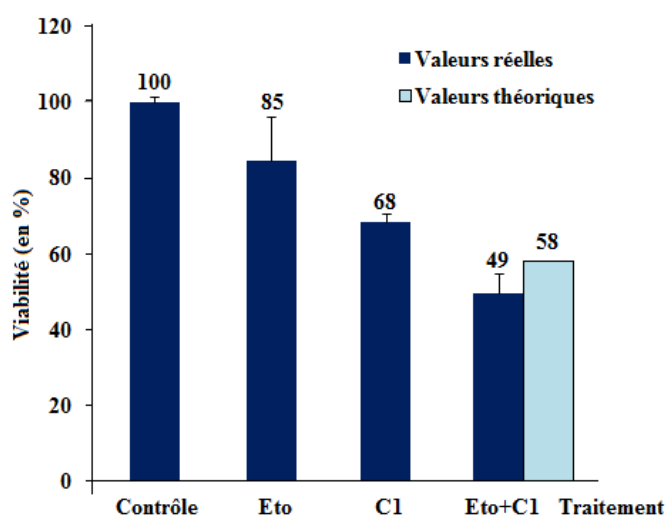


Figure 24 : Efficacité du traitement combiné sur les cellules H358

Les cellules H358 reçoivent individuellement l'Etoposide (5 μ M, pendant 24 h suivi d'une récupération dans le milieu) ou C1 (1 μ M, pendant 72 h). Dans le traitement combiné, elles sont traitées en même temps par Etoposide et C1 pendant 24 h et ensuite, sont mises en récupération en présence de C1. La viabilité cellulaire est notée après 72 h. La valeur théorique est calculée comme suite : $\% \text{ C1} * \% \text{ Eto} / 100$. Nous avons obtenu un effet additif du traitement combiné (Etoposide et C1).

2. En 3-dimension (3D) ou sphéroïdes

Pour avoir des cultures à long terme et approcher l'organisation tumorale, nous avons adapté le modèle tumorale multicellulaire ou sphéroïde aux cellules H358. Nous avons observé la croissance des sphéroïdes pendant environ 12 jours (**Figure 25C**, losanges bleus). La structure des sphéroïdes est mise en évidence grâce à la phalloïdine marquée rhodamine et les cellules mitotiques sont détectées par la phosphorylation de l'histone H3. Les observations en microscopie de fluorescence indiquent que les sphéroïdes obtenus sont réguliers (diamètre supérieur à 470 μ m, **Figure 25A**). Ces sphéroïdes sont toujours en expansion puisque nous détectons des cellules mitotiques (**Figure 25B**). Ces cultures en 3D conviennent pour tester l'efficacité des drogues. La variation de croissance est mesurée suite aux traitements par C1, Etoposide, Etoposide plus C1. C1 diminue la croissance pendant 4 jours puis, il semble que son efficacité diminue et finalement, les sphéroïdes sont un tiers plus petits que les contrôles

(**Figure 25C**, triangles verts). L'Etoposide réduit plus efficacement la croissance des sphéroïdes (ratio de croissance de 1 comparé à 3 dans les contrôles ; **Figure 25C**, carrés roses). L'Etoposide plus C1 empêche le développement des sphéroïdes et cet effet est observé durablement jusqu'à 11 jours (**Figure 25C**, à droite, ronds orange). Les drogues combinées permettent de stabiliser la taille des sphéroïdes mais ne les détruisent pas.

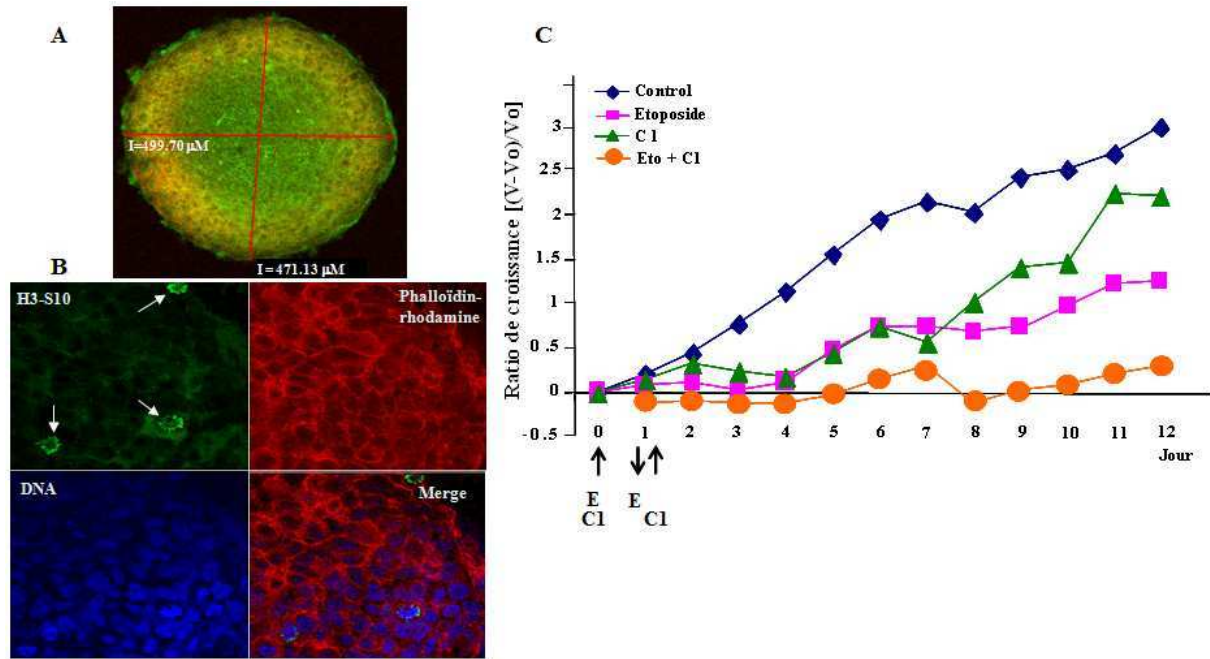


Figure 25 : Efficacité du traitement combiné sur les sphéroïdes H358

A et B : Les sphéroïdes sont créés avec les cellules H358 et sont maintenus en croissance pendant 12 jours. Leur croissance est exprimée par le rapport de croissance $[(V-V_0)/V_0]$ où V_0 est le volume de départ. Les cellules proliférant sont détectées par immunofluorescence avec un marqueur mitotique (H3S10). L'actine est détectée par la phalloïdine marquée rhodamine et le noyau avec le Hoescht 33342.

C : Les sphéroïdes sont traités par Etoposide au jour 0 (5 μ M) pendant 24 h soit en présence soit en absence de C1 (1 μ M). Dans le contrôle, Etoposide et C1 sont absents. Les flèches indiquent l'addition ou l'enlèvement des drogues. L'Etoposide (carrés roses) et C1 (triangles verts) diminuent la croissance des sphéroïdes mais la combinaison (points orange) empêche plus efficacement le développement des sphéroïdes. Le contrôle est représenté par des losanges bleus.

3. Chez les souris « nudes »

Nous avons évalué le traitement combiné sur les xénogreffes cellulaires. Les souris « nudes » portant des tumeurs H358 établies depuis deux semaines sont traitées par C1 ou Etoposide ou Etoposide plus C1 ou véhicule et injectées par voie intrapéritonéale. La croissance tumorale au jour 56 est représentée pour chaque animal dans la **Figure 26**. Dans les conditions de l'expérience, C1 est efficace sur une seule tumeur tandis qu'une tumeur se développe plus rapidement que le contrôle, suggérant l'apparition possible de résistances. Le rapport moyen de croissance tumorale est de 6,7 pour les souris traitées par C1 à comparer à 4,8 pour le contrôle. L'Etoposide a un effet modéré, puisque nous mesurons un rapport moyen

de croissance de 3,6 et les meilleurs résultats sont notés pour le traitement combiné. Le rapport de croissance tumorale est réduit à 2,1 pour les souris ayant reçu Etoposide et C1.

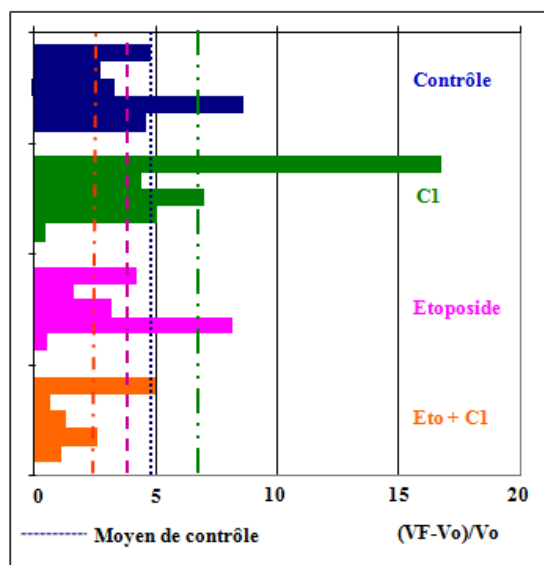


Figure 26: Efficacité du traitement combiné sur les xénogreffes de cellules H358 chez les souris « nues ».

Le traitement combiné est testé chez la souris « nude » portant des tumeurs H358 agressives. 14 jours après l'établissement des tumeurs, les souris sont injectées avec C1 (vert) ou avec Etoposide (rose) ou avec les deux drogues (orange) ou avec le véhicule (bleu). Les souris reçoivent 24 injections de C1 (160 µg pour 20 g de souris dans le véhicule PEG300/DMSO 16 %) quatre fois par semaine par voie intrapéritonéale ou le véhicule seulement. La moitié des souris a reçu 7 injections d'Etoposide (1 mg/souris/injection). Le volume des tumeurs est mesuré une fois par semaine et le ratio de croissance est montré pour chaque tumeur individuelle au jour 56. Vo est le volume au jour 14. Les valeurs moyennes sont indiquées par les lignes pointillées.

Les résultats indiquent un bénéfice de la combinaison. L'apparition probable de résistance chez une souris traitée par C1 pourrait indiquer que le traitement ne doit pas être aussi répétitif. Toutefois, les traitements ont commencé quand les tumeurs étaient bien établies (30 mm³ en moyenne) et très rapidement nous avons constaté le recrutement de vaisseaux sanguins par la tumeur. Le point très positif est que les traitements répétitifs par C1 n'ont pas induits d'effet adverse. Nous pouvons conclure que C1 est peu ou pas toxique pour l'animal. D'autres évaluations *in vivo* sont nécessaires pour évaluer l'intérêt de la combinaison.

Les résultats obtenus ont montré que la combinaison de l'Etoposide et C1 donne une meilleure efficacité que l'utilisation des composés individuellement dans le traitement. Cette application est efficace sur les trois modèles de cellules H358 étudiés, même si les effets *in vivo* semblent modérés dans ce système de xénogreffes.

IV. Comparaison de l'efficacité du traitement combiné sur différentes lignées cellulaires

Nous avons comparé les effets du traitement par Etoposide et C1 sur trois lignées cellulaires différentes (Figure 27A). Les cellules sont traitées comme précédemment. La

concentration d'Etoposide est adaptée à chaque lignée pour obtenir approximativement 20 % de mort cellulaire au jour 3. Dans le cas de HL60, nous avons observé un pourcentage élevé de cellules vivantes suite à chaque traitement individuel : 91 % pour C1 et 88 % pour Etoposide. En conséquence, nous attendions 80 % de cellules vivantes suite au traitement combiné et nous n'avons observé que 51 %. L'impact réel observé est donc plus efficace qu'attendu. Des résultats similaires ont été observés avec la lignée U2OS (**Figure 27A**). Nous observons un effet synergique dans les lignées U2OS et HL60 et un effet additif pour les cellules H358 (**Figure 27A**). Les effets additifs pour H358 et synergiques pour U2OS sont retrouvés à toutes les concentrations d'Etoposide testées en combinaison avec C1 (**Figure 28**).

En présence d'Etoposide et C1, nous constatons que les dommages à l'ADN, au jour 1, sont plus importants dans les cellules H358 et HL60 que dans les cellules U2OS (**Figure 27B**). Les signaux H2AX-S139 phosphorylée sont très forts dans les cellules H358 et HL60 traitées. Ceci montre que les dommages sont encore fortement présents, au jour 1, dans ces deux lignées. Inversement, cette phosphorylation revient au niveau basal dans les cellules U2OS après 1 jour du traitement. En fait, suite à des dommages à l'ADN, les cellules exprimant p53 comme U2OS réparent l'ADN ou meurent.

Pour comprendre les différences d'efficacité, nous avons observé la répartition dans le cycle cellulaire des cellules résistantes suite à 24 h de traitement et 48 h de récupération (**Figure 27C**). Les populations cellulaires H358 traitées par C1, semblent être insensibles à C1 (comparer C1 avec le contrôle et Etoposide, avec Etoposide plus C1 dans la **Figure 27C**). Nous n'avons pas obtenu une population de cellules en polyploïde comme dans les cas de cellules U2OS et HL60. Néanmoins, nous avons trouvé la plupart de cellules H358 traitées par Etoposide (66 %) ou Etoposide et C1 (62 %) en G2/M. Ceci montre que l'Etoposide cause des dommages notables et ensuite induit un fort arrêt en G2/M dans les cellules H358.

Inversement, dans le cas des cellules U2OS, C1 induit une augmentation importante de la polyploïdie (31 %) tandis que 39 % des cellules sont détectées en Go/G1 et S. Nous avons noté que l'Etoposide induit la mort cellulaire dans les cellules U2OS et le traitement combiné augmente considérablement cette population sub-G0 et prévient la progression dans le cycle.

La situation observée dans les cellules HL60 est intéressante. C1 induit une augmentation importante de la population > 4N tandis que la population 2N est limitée. Néanmoins, la polyploïdisation n'induit pas la mort cellulaire car 91 % des cellules sont encore vivantes au jour 3 (**Figure 27A**). Le point de contrôle G2/M est activé par le traitement Etoposide et une augmentation de la population apoptotique est observée. Nous avons observé la claire contribution de chaque composé dans le cas Etoposide et C1 combiné. Les cellules entrent en

mitose avec des dommages et puis sous l'effet de C1, ces cellules deviennent polyploïdes (**Figure 27C**). A terme, 49 % de ces cellules polyploïdes avec des dommages à l'ADN sont mortes au jour 3 (**Figure 27A**) et seulement 10 % des cellules sont en G0/G1 et S.

Pour identifier les meilleures applications de ces traitements combinés, nous avons testé différentes lignées cellulaires. Finalement, nous avons trouvé que la combinaison est additive dans les cellules H358 et synergique dans les cellules U2OS et HL60. Nous notons que dans la lignée HL60 très peu de cellules cyclent après le traitement combiné.

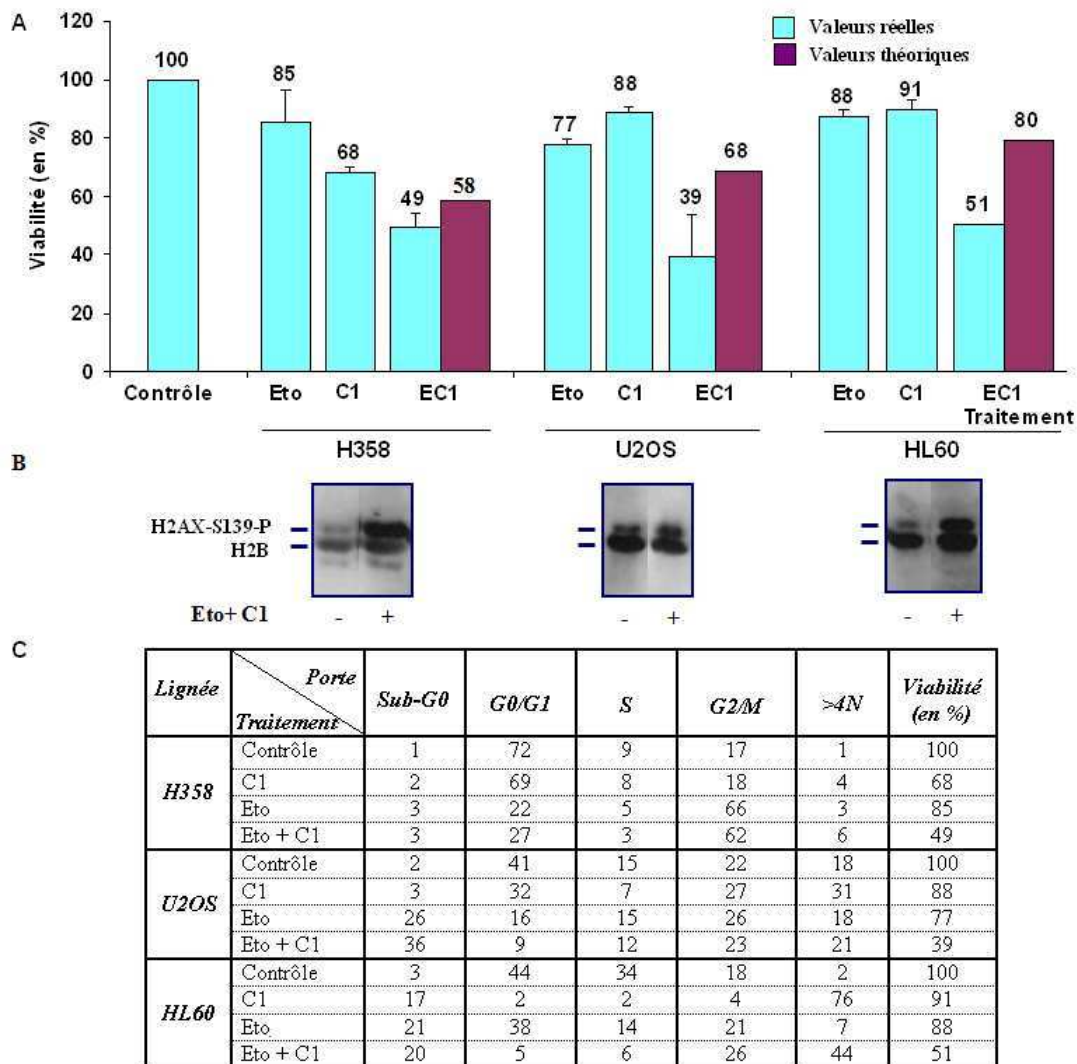


Figure 27 : Efficacité du traitement combiné sur les différentes lignées cellulaires

Nous avons comparé les devenir des trois lignées cellulaires suite aux traitements par Etoposide et C1.

A : Pourcentage de viabilité cellulaire suite aux différents traitements. Un effet additif est obtenu avec les cellules H358 et un effet synergique avec les cellules U2OS et HL60. Les valeurs théoriques sont calculées comme suit : % C1 * % Etoposide/100. Les concentrations d'Etoposide utilisées sont : 5 μ M pour H358, 10 μ M pour U2OS et 500 nM pour HL60.

B : Le niveau des dommages de l'ADN au jour 1 est visualisé par le niveau de γ H2AX. H2B est utilisée comme contrôle interne. H2AX est fortement phosphorylée dans les cellules H358 et HL60 alors qu'il est revenu au niveau basal dans les cellules U2OS.

C : La répartition dans le cycle cellulaire des populations résistantes est représentée après 24 h de traitement et 48 h de récupération. Le pourcentage des événements dans chaque phase est indiqué pour chaque traitement et chaque lignée cellulaire.

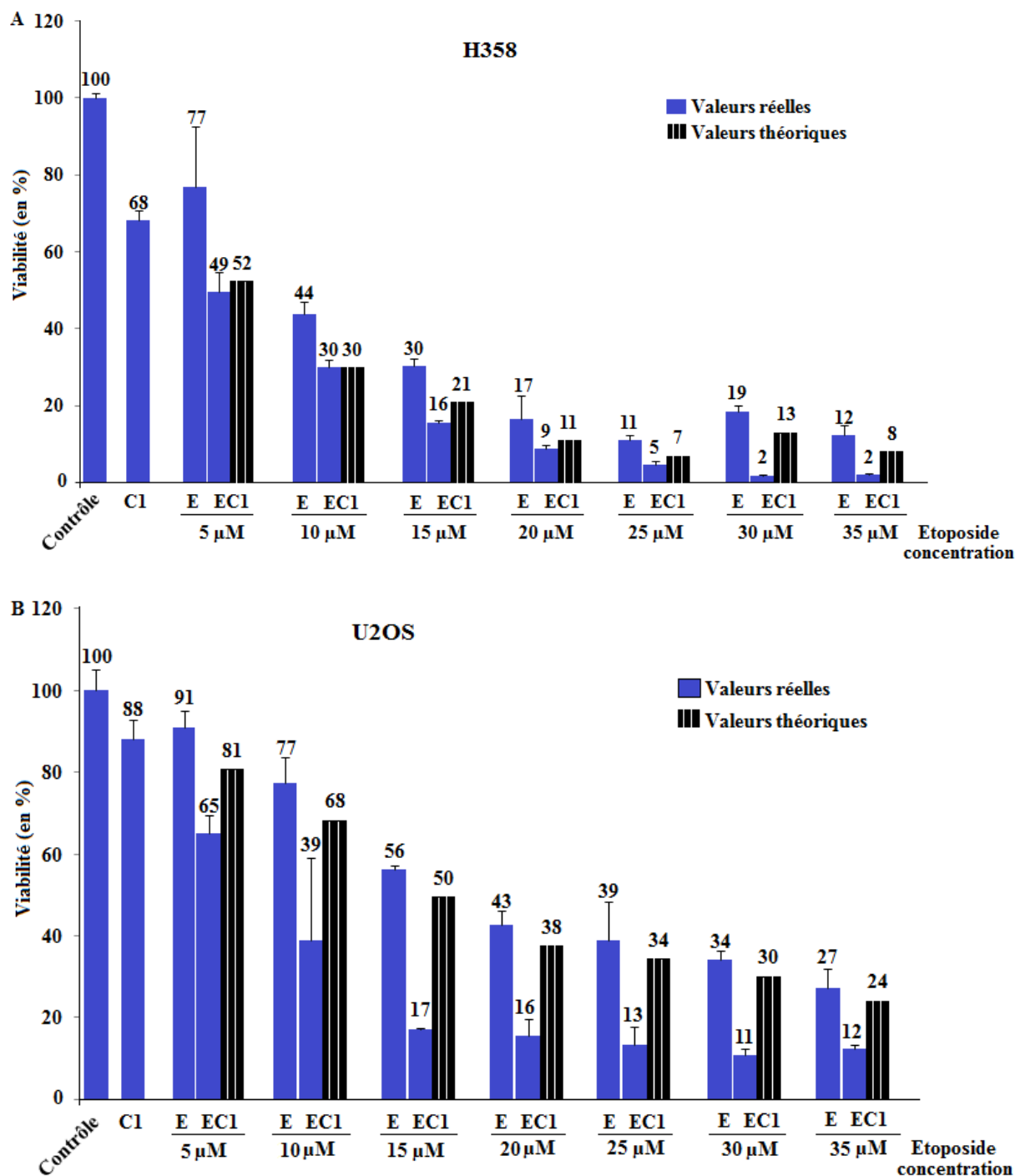


Figure 28: L'efficacité du traitement combiné sur les lignées H358 et U2OS

Pourcentage de viabilité cellulaire suite aux différents traitements. Les cellules H358 (A) et U2OS (B) sont traitées par Etoposide (5-35 µM, E) ou C1 (1 µM) ou Etoposide plus C1 (EC1) ou DMSO (Contrôle). Un effet additif est obtenu avec les cellules H358 et un effet synergique avec les cellules U2OS et HL60. Les valeurs théoriques sont calculées comme suit : % C1 * % Etoposide/100.

V. Réponse des cellules HL60 au traitement combiné

Au vu des premiers résultats obtenus avec les cellules HL60, nous avons essayé de décrire les conséquences cellulaires de la combinaison dans ce contexte cellulaire.

1. Sensibilité des cellules HL60 à l'Etoposide

Afin de déterminer la meilleure concentration d'Etoposide sur les cellules HL60, nous avons caractérisé l'évolution des populations cellulaires durant la récupération (**Figure 29**). L'étude des conséquences sur le cycle cellulaire indique que les concentrations de 1 et 2 μM activent les points de contrôle G0/G1 et G2/M et induisent une apoptose significative. Notre but est de travailler à la dose minimale efficace d'Etoposide, nous choisissons le traitement à 1 μM d'Etoposide en combinaison avec C1 pour analyser la réponse des cellules HL60.

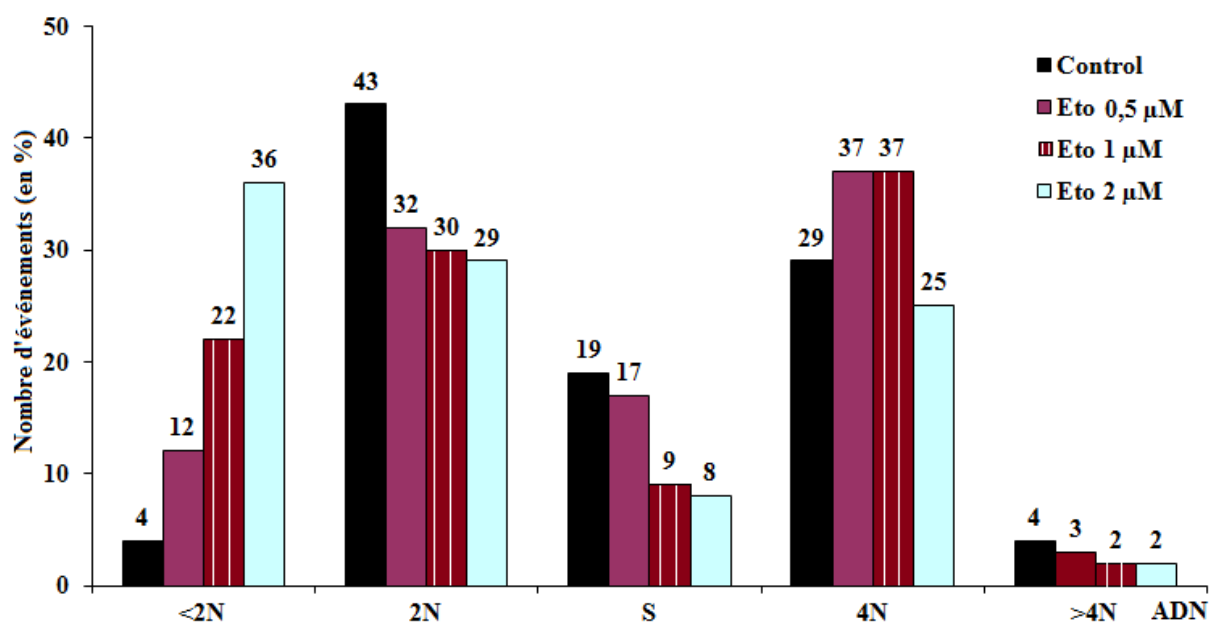


Figure 29 : L'effet de différentes concentrations d'Etoposide sur les cellules HL60

Les cellules HL60 synchronisées en G0/G1 sont traitées par Etoposide (0,5, 1 et 2 μM) pendant 24 h et mises en récupération pendant 24 h avant d'analyser le cycle cellulaire par Facs. Le pourcentage de chaque phase du cycle est indiqué : < 2N représentant les cellules en apoptose, 2N pour les cellules en G0/G1, S pour les cellules en phase S, 4N étant des cellules en G2/M et >4N pour les cellules polyploïdes.

2. In cellulo

Nous avons étudié la répartition des populations cellulaires HL60 au cours du cycle cellulaire à deux temps différents. Les cellules sont synchronisées et traitées par Etoposide (1 μM , 24 h) ou C1 (1 μM) ou Etoposide plus C1 (24 h) puis mises en récupération pendant 24 h ou 48 h avec ou sans C1. L'évolution des populations après 48 h et 72 h de traitement est représentée dans la **Figure 30**. Nous avons observé que l'Etoposide induit l'arrêt G2/M et que ces cellules entrent progressivement en apoptose. Les cellules traitées par C1 sont fortement polyploïdes après 48 h de traitement et une légère augmentation de cette population est observée après 72 h. Les fractions en G0/G1, S et G2/M sont presque inexistantes après 72 h de traitement par C1. Il y a une petite proportion de cellules apoptotiques. Dans le traitement combiné (Etoposide + C1), les cellules sont arrêtées en G2/M et progressent soit vers

l'apoptose soit vers la polyploïdisation. Il n'y a que 15 % des cellules qui sont en phase G0/G1 et S alors que 30 % des cellules sont mortes.

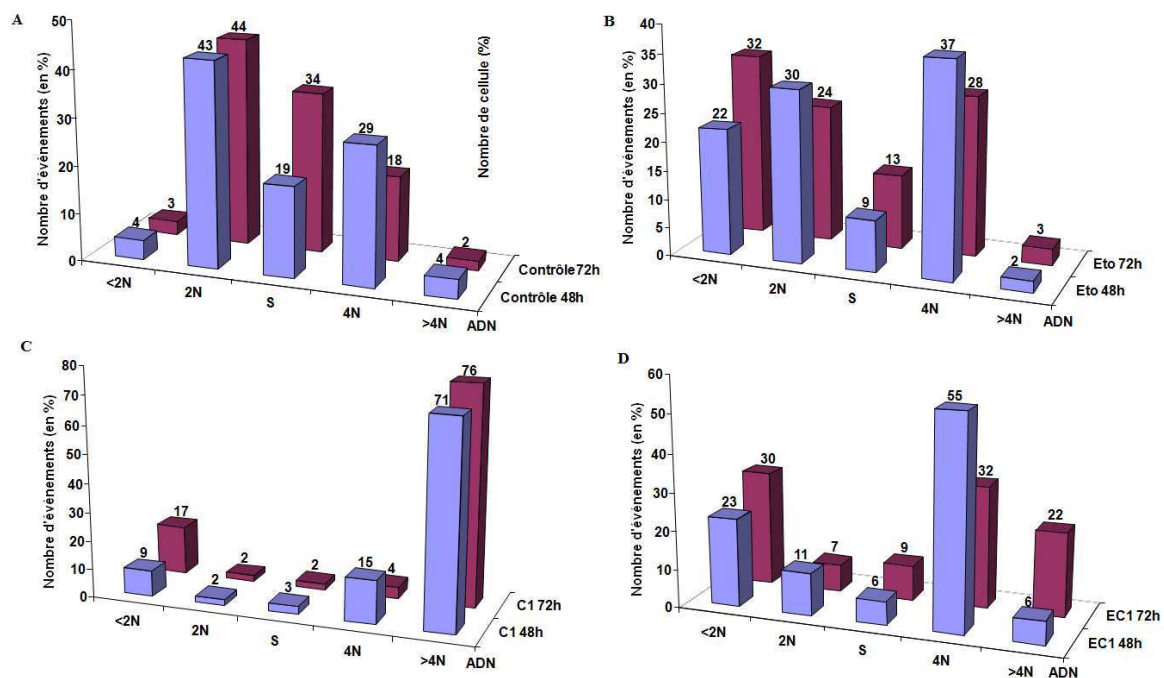


Figure 30 : Analyse des réponses des cellules HL60 au traitement combiné *in cellulo* au cours du cycle cellulaire

Les cellules HL60 synchronisées en G0/G1 sont traitées par Etoposide (1 μ M) et/ou avec C1 (1 μ M) et mises en récupération en présence ou en absence de C1. L'évolution du cycle cellulaire (48 h et 72 h) est analysée par FACS et représentée par des histogrammes. Chaque panneau illustre le cycle cellulaire suite à différents traitements à 48 h et 72 h et le pourcentage de chaque phase du cycle est indiqué : < 2N représentant les cellules en apoptose, 2N pour les cellules en G0/G1, S pour les cellules en phase S, 4N étant des cellules en G2/M et >4N pour les cellules polyploïdes.

3. *In vivo*

En prenant en compte le fait que les cellules HL60 sont très sensibles à l'Etoposide et que toute la population répond au traitement, nous avons décidé de tester cette combinaison chez la souris portant des xénogreffes. Les souris sont randomisées, dans les différents bras sur la base de la taille des tumeurs et ce, 5 jours après son établissement. Elles sont traitées chaque jour par C1 ou le véhicule et la moitié d'entre elles reçoivent trois injections d'Etoposide. Les tumeurs se développent de manière exponentielle chez les souris contrôle (**Figure 31**). Les traitements Etoposide et C1 séparément diminuent par 2 l'expansion tumorale alors que les tumeurs n'évoluent pratiquement pas chez les souris traitées par l'Etoposide plus C1. Les différences trouvées sont significatives (test de student $p < 0,001$) aux jours 38 et 42. Des effets à long-terme sont notés car les dernières mesures sont faites 21 jours après la dernière injection. Aucun effet défavorable n'est observé avec ces concentrations d'Etoposide réduite.

Toutes les souris ont été autopsiées et pesées. Nous n'avons noté aucun signe apparent de toxicité du produit ou de la combinaison, à l'exception d'une inflammation de l'intestin chez deux animaux. Comme le suggérait les données *in cellulo*, le traitement combiné est très efficace pour empêcher le développement des xénogreffes HL60.

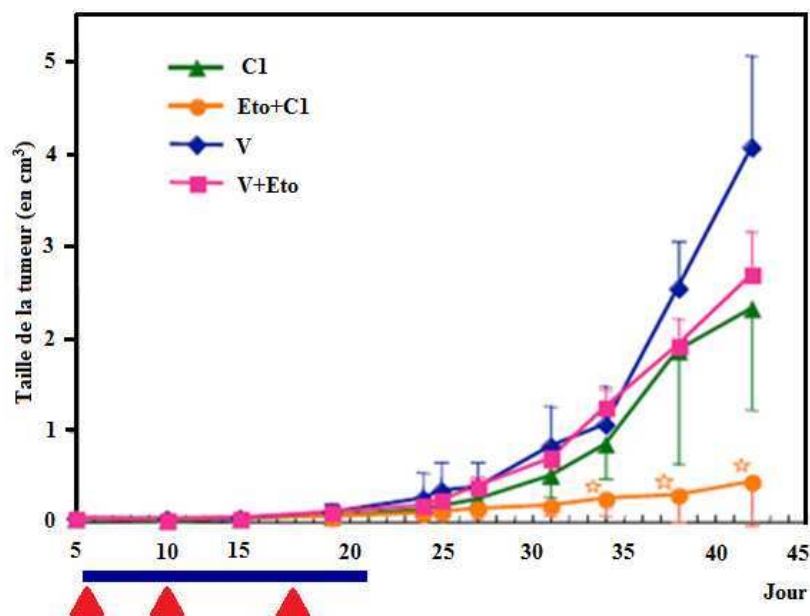


Figure 31 : Efficacité de la combinaison *in vivo*

Les souris sont traitées chaque jour par C1 (17 jours consécutifs par 160 µg de C1 pour 20 g de souris dans le véhicule PEG 300/DMSO 16 %) par voie intra-péritonéale. La barre en bleu en bas représente la durée des traitements. Le traitement commence cinq jours après l'établissement des tumeurs. Trois injections d'Etoposide (100 µg/souris/injection) sont réalisées aux jours 5, 10 et 17 (flèche rouge en bas). Les souris contrôle reçoivent soit le véhicule (V, losanges bleus), soit Etoposide (V+Eto, carrés roses) soit C1 (C1, triangles verts). Le traitement combiné est représenté par les points orange. Les étoiles orange indiquent les données statistiquement significatives déterminées par un test de student ($p < 0,001$ pour deux les derniers points).

VI. Devenir des cellules H358 suite au traitement combiné

Afin de comprendre pourquoi les effets de la combinaison sont soit synergiques soit additifs, nous avons suivi dans le temps des cellules fluorescentes en conditions normales de culture. Nous concentrons sur les cellules entrant en mitose après 72 h de traitement car C1 influence surtout la mitose. Nous nous situons dans les mêmes temps que le Facs donc nous suivons le devenir des populations 4N (du Facs) quand elles échappent au point de contrôle G2.

Les cellules H358 exprimant H2B-GFP sont représentatives de l'effet additif et les cellules HeLa exprimant Survivine-GFP sont un exemple de réponse synergique (données non présentées). Les cellules sont traitées dans les mêmes conditions que les tests de viabilité et reçoivent alternativement C1 ou l'Etoposide ou la combinaison.

- Quarante-huit heures après le traitement, l'Etoposide ne perturbe pas la mitose des cellules H358 et HeLa (**Figure 32, B et E**). Nous constatons la présence de deux cellules filles comme le contrôle pour toutes les cellules suivies (20 pour chaque essai, **Figure 32**, comparer **A** avec **B** et **E**).

- Les effets de C1 sont différents dans les deux lignées. Comme nous l'avons rapporté précédemment (Hoang, Favier et al. 2009), les cellules HeLa ne se séparent pas en présence de C1 et les cellules mère contiennent de nombreux micronoyaux. A l'opposé, les cellules H358 semblent passer le point de contrôle du fuseau, l'anaphase n'est pas complète ; on note un filament d'ADN entre les deux cellules filles et in fine, on observe des cellules polyploïdes avec deux noyaux identiques (**Figure 32C**).

- La combinaison Eto et C1 conduit dans 10 % à ce mêmes phénotype tandis que 90 % des cellules H358 présenteront des micronoyaux. Toutefois, ces cellules binucléées quand elles rentrent en mitose, elles ne peuvent pas accomplir cette phase et elles entrent en apoptose (**Figure 32D**). La situation est différente pour les cellules HeLa. En effet, dans les cellules HeLa, 100 % des cellules mitotiques repérée par la fluorescence de la Survivine-GFP, sont entrées en apoptose suite au traitement combiné (**Figure 32F**).

La différence d'action de C1 sur les deux types cellulaires pourrait expliquer l'efficacité différente de la combinaison. Ces données corroborent les résultats d'analyse de cycle cellulaire (**Figure 30**). Reste à comprendre à l'avenir pourquoi le mode d'action de C1 dans ces deux types cellulaires est différent et quels sont les marqueurs prédictifs de ces réponses.

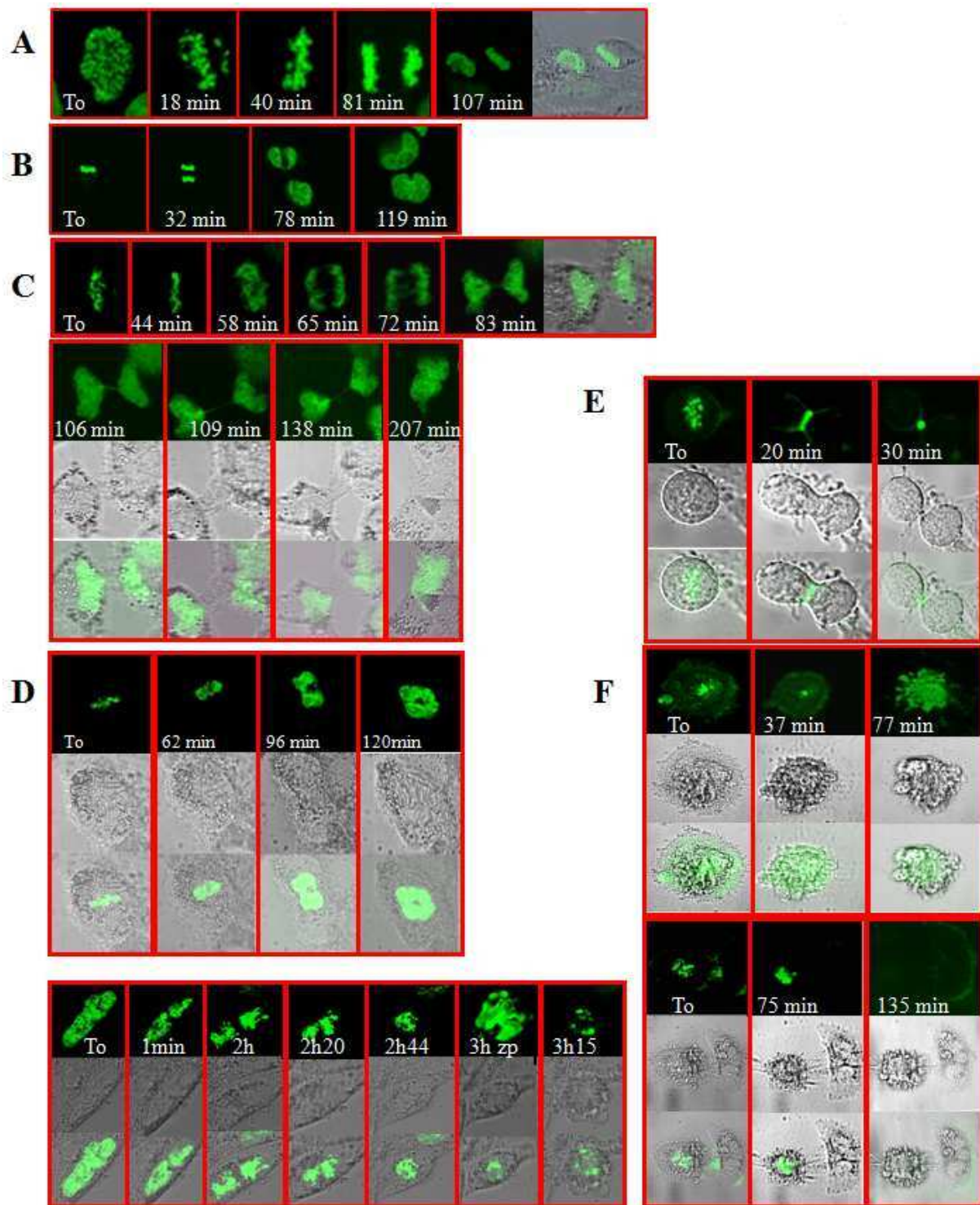


Figure 32 : Devenir des cellules H358 et HeLa suite au traitement combiné

Les cellules H358 et HeLa exprimant de manière stable H2B-GFP et Survivine-GFP respectivement sont traitées par DMSO (Contrôle, A), Etoposide 5 μM (B et E), C1 1 μM (C) et Etoposide plus C1 (D et F). La progression mitotique de ces cellules est analysée par microscopie confocale (Zeiss LMS510) et par une acquisition d'image en continu. Quelques cellules sont visualisées en transmission et les temps sont indiqués sur chaque photo. A, B, C, et D représentent les cellules H358 cependant les cellules HeLa sont dans les panneaux E et F.

VII. Autres combinaisons envisageables

Afin de commencer à décrire le champ d'application des traitements combinés avec C1, nous en avons testé deux autres agents de dommages à l'ADN: l'Intoplicine, un inhibiteur des topoisomérasés I et II sur les cellules HL60 et le Cisplatine sur les cellules HCC70 (**Figure 33**). Les traitements sont similaires à ceux réalisés avec l'Etoposide sur les cellules HL60. Nous avons obtenu un effet synergique dans le traitement combiné C1 et Intoplicine sur les cellules HL60 et additif sur les cellules HCC70 dans le traitement combiné C1 et Cisplatine.

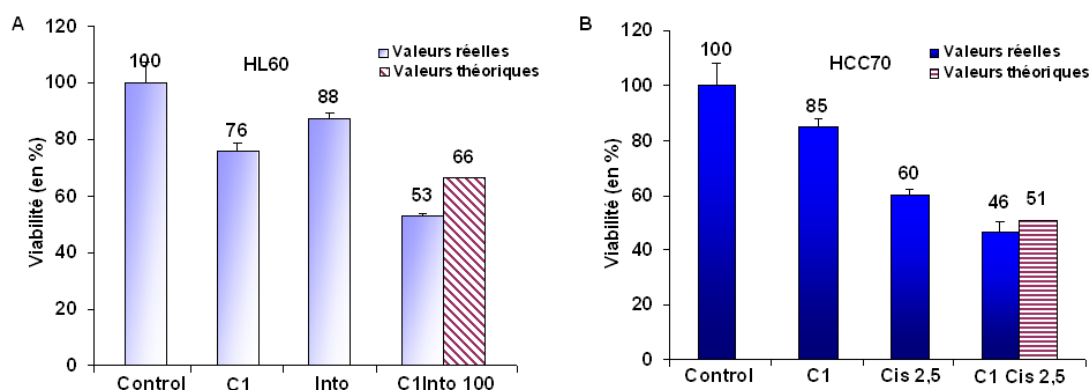


Figure 33 : Efficacité du traitement en combinaison de C1 avec l'Intoplicine ou le Cisplatine

Nous avons testé la combinaison de C1 (1 μM) avec l'Intoplicine (100 nM) ou avec le Cisplatine (2,5 μM) sur les cellules HL60 (A) et HCC70 (B), respectivement. La valeur théorique est calculée comme suit : % C1 * % Intoplicine (ou % Cisplatine)/100. Le traitement combiné donne un effet synergique sur les cellules HL60 et un effet additif sur HCC70.

VIII. Efficacité et intérêt du traitement combiné

L'ensemble des résultats de viabilité suite au traitement combiné de C1 avec des agents de dommage montre que la dose utilisée d'Etoposide, d'Intoplicine ou de Cisplatine peut être diminuée en conservant l'efficacité de l'agent de dommage à l'ADN. En combinaison avec C1, la dose d'Etoposide nécessaire pour réduire de moitié la population cellulaire est 1,2 fois plus faible pour les cellules H358 et 2,2 fois pour les cellules U20S et HL60. De même manière, la dose d'Intoplicine est réduite par 2,3 pour les cellules HL60 et la dose de Cisplatine est diminuée par 1,4 pour les cellules HCC70 (**Tableau 12**). Compte tenu de la toxicité de ces agents de dommage à l'ADN, ces résultats sont extrêmement prometteurs.

Tableau 12 : IC50 de viabilité des cellules en présence d'un agent de dommage à l'ADN (IC50 : la concentration inhibant 50 % de prolifération cellulaire)

Lignée	Agents de dommage	IC50 des agents	IC50 de combinaison	Diminution par
H358	Etoposide	10 µM	8,6 µM	1,2
U20S	Etoposide	16,2 µM	7,3 µM	2,2
HL60	Etoposide	1,1 µM	0,5 µM	2,2
HL60	Intoplicine	275 nM	120 nM	2,3
HCC70	Cisplatine	3,14 µM	2,27 µM	1,4
HL60	Cisplatine	1,75 µM	1,5 µM	1,2

IX. Conclusion

La molécule, C1 à des concentrations nanomolaires, inhibe *in vitro* à la fois les kinases Aurora et la kinase du point de contrôle de dommages à l'ADN, CHK2. Après avoir montré l'action inhibitrice de C1 sur CHK2 dans les cellules, nous avons étudié l'efficacité de cette molécule dans le traitement combiné sur différentes lignées cellulaires. Nous avons montré que C1 inhibe l'activité kinase de CHK2 dans deux lignées cellulaires testée U2OS et H358. La combinaison de C1 avec les agents de dommages à l'ADN (Etoposide, Intoplicine, Cisplatine) est plus efficace que le traitement avec des drogues individuelles. Nous avons observé que l'effet est additif sur les cellules H358 et HCC70, et synergique sur les deux autres lignées en culture. Le traitement combiné (Etoposide + C1) empêche efficacement la croissance des sphéroïdes établis à partir de cellules H358 mais aussi de xénogreffes de cellules H358 et HL60. Des injections répétées de C1 n'ont pas induit d'effets adverses sur les animaux suggérant une faible toxicité de cette molécule. D'où l'intérêt de la combinaison qui permet de diminuer les doses utiles d'agent de dommage à l'ADN.

D'autre part, ce traitement a été validé sur des glioblastomes de patients en combinaison avec les radiations (Nakano.I, communication personnelle). Ces combinaisons : agents de dommage à l'ADN et benzol[e]pyridoindoles type C1 sont protégés par un brevet Molla, Nakano, Nguyen, Vu (Référence : 10305403.7-2112, « Combined treatment of cancer with benzo[e]pyridoindoles and DNA-damaging agents »), brevet européen déposé le 19/4/2010 et étendu à l'international le 19/4/2011. Ces résultats sont réunis dans un article en cours de finalisation.

“The aurora kinase inhibitor benzo[e]pyridoindole targets checkpoint 2: combined cancer chemotherapy by simultaneous alteration of mitosis onset and DNA damage defences”

Vu H-L., Nguyen C-H., Favier B., Le T-T., & Molla A.

Partie II

ETUDE STRUCTURE /FONCTION DES MOLECULES DE LA FAMILLE DES BENZO[E]PYRIDOINDOLES

I. Etude structure /fonction des molécules de la famille des benzo[e]pyridoindoles

1. Introduction

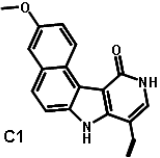
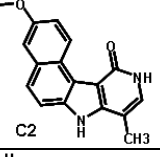
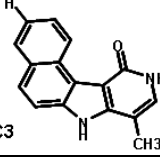
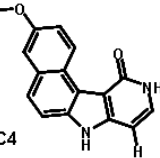
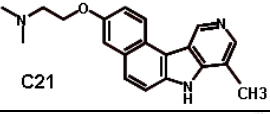
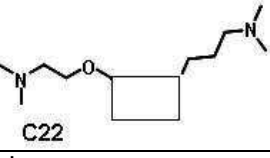
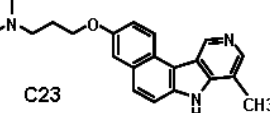
Le criblage à haut débit a mis en évidence que plusieurs membres de cette famille étaient des inhibiteurs potentiels du domaine kinase des Aurora (Hoang, Favier et al. 2009). Les molécules les plus actives C1 à C4 sont notées dans le **Tableau 13** et leur activité est indiquée à deux concentrations (15 μ M et 1,5 μ M). Par la suite de nouvelles molécules non présentes dans la chimiothèque lors du criblage ont été testées dans le même test *in vitro* (voir **Tableau 13**). Il s'agit de la série 21 à 23.

La famille des benzo[e]pyridoindoles a une structure tetra-hétérocyclique avec trois chaînes latérales différentes (Figure 34). Les molécules étudiées varient sur les groupements R1 à R3.

Les résultats obtenus *in vitro* sur le domaine kinase avec les molécules 21 à 23 confirment l'intérêt de la chaîne en position 1 (perte significative d'activité si on compare C3 et C1 et forte activité de C21). Les composés C21 et C23 sont plus actifs que la molécule apparentée dans la première série, C2. L'extension simultanée de R1 et R3 par une longue chaîne alkyle n'est pas bénéfique pour l'activité d'Aurora kinase. Ces molécules sont potentiellement des inhibiteurs des Aurora kinases, mais elles n'ont un intérêt que si des effets cellulaires sont observés comme dans le cas de C1. C'est pourquoi nous avons réalisé un crible cellulaire d'inhibition d'Aurora B. La série de molécules a été étendue à toutes les molécules de la famille synthétisée par Chi-Hung Nguyen.

Dans cette partie, nous étudions différentes molécules de la famille Benzo[e]pyridoles pour mettre en relation la structure de la molécule et les effets cellulaires. Ceci guidera le travail des chimistes en identifiant le ou les groupements d'intérêt.

Tableau 13 : Test *in vitro* avec des composés benzo[e]pyridoindoles

Nom de la molécule	Molécule	Inhibition du domaine kinase d'Aurora A à la concentration de (en %)	
		15 μ M	1,5 μ M
C1		94	70
C2		90	57
C3		88	53
C4		81	45
C21		100	70
C22		79	51
C23		100	68

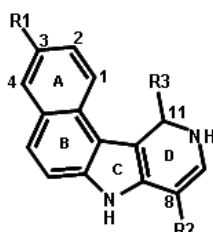


Figure 34 : Forme générale de la famille benzo[e]pyridoindole portant trois chaînes latérales (R1, R2 et R3)

2. Efficacité des molécules *in cellulo*

Afin d'identifier une potentielle activité antimittotique parmi les 15 molécules de cette famille, nous avons déterminé leur efficacité sur la kinase Aurora B. L'activité kinase d'Aurora B est évaluée par le niveau de phosphorylation en western blot et immunofluorescence de l'histone H3 sur la sérine 10, un substrat connu d'Aurora B. L'effet des composés est présenté en 2 groupes selon le niveau d'inhibition de l'activité d'Aurora B (**Figure 35 et 36**).

Nous avons trouvé 6 molécules qui ont un effet inhibiteur sur l'activité kinase d'Aurora B (**Figure 35**). Ces composés ont des capacités d'inhibition différentes. Nous avons observé que C1 et C14 inhibent fortement la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 car les signaux de H3S10-P ne sont détectés ni en western blot ni en immunofluorescence. Les composés C2, C3, C4 et C12 sont efficaces, mais à un niveau moindre comparé à C1 et C14.

Les autres composés (**Figure 36**) n'ont pas d'action inhibitrice sur l'activité kinase d'Aurora B. En leur présence la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 est détectée avec la même intensité que dans le contrôle.

En corrélant l'efficacité des composés avec leur structure, nous avons remarqué que le groupe Oxo (= O) ou éther (-O-) en position 11 est très important pour inhiber l'activité d'Aurora B puisque toutes les molécules inhibitrices portent un oxygène en R3. En effet, l'activité est abolie dans la molécule C21, alors qu'elle est très forte pour C14. La seule différence entre ces deux composés est la présence du groupe Oxo en position 11. De façon étonnante, C21 qui inhibait très fortement le domaine kinase d'Aurora (Tableau 13), n'est pas efficace sur la kinase complète. Les molécules C22 et C23 sont elles aussi inefficaces sur la kinase Aurora B complète. Ces données mettent en évidence la limite des tests et des structures réalisés en restreignant les kinases à leur domaine catalytique. Par contre cela indique que C1 et C14 reconnaissent la kinase Aurora B dans sa conformation native. C22 donne un signal d'histone H3 phosphorylée réduit, mais nous avons noté une forte diminution du nombre de mitoses suite au traitement par cette molécule. C22 a très probablement une activité cellulaire mais distincte de la voie des kinases Aurora.

L'analyse de ces résultats semble indiquer que le groupe d'éther en position 3 est impliqué dans l'inhibition d'Aurora B; par exemple, C5 diffère de C2 par la position du groupe éther (position 4 versus 3) et il en résulte une perte d'activité. L'agencement des cycles modifie l'effet des composés de cette famille car C11 et C15 perdent leur efficacité suite à une modification sur les cycles A ou D (**Figure 34 et 36**), même en présence des groupes Oxo et

éther en position 11 et 3, respectivement. La forme en croissant de lune décrite pour C1 est donc essentielle pour l'activité (Hoang, Favier et al. 2009).

La comparaison des molécules C14 et C2 permet de conclure que l'extension de la chaîne R1 favorise l'inhibition d'Aurora B.

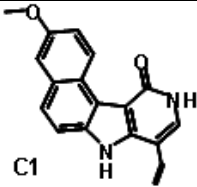
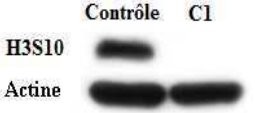
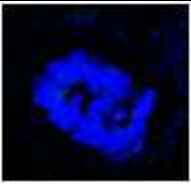
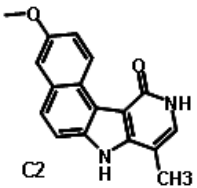
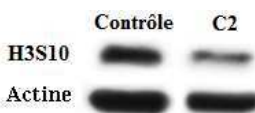
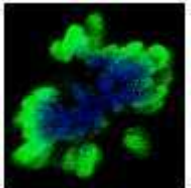
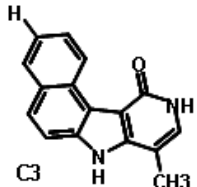
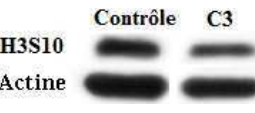
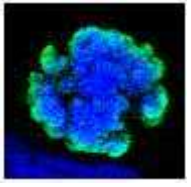
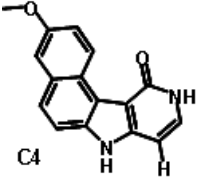
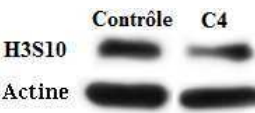
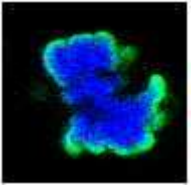
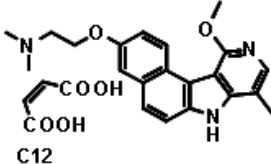
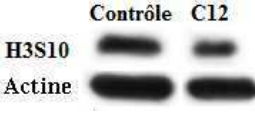
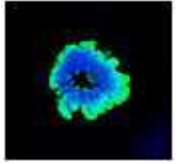
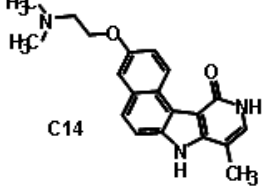
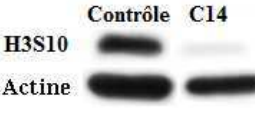
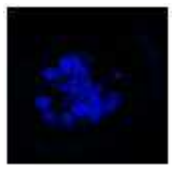
Nom	Molécule	Western blot	Cellule mitotique	Niveau d'inhibition de l'activité d'Aurora B
C1				+++
C2				++
C3				+/-
C4				+/-
C12				+
C14				+++

Figure 35 : Composés inhibant l'activité d'Aurora B in cellulo

Un western blot est réalisé à partir des extraits des cellules U2OS traitées par chaque composé (1 μ M). La phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 est détectée à l'aide d'un anticorps spécifique. La détection de l'actine permet de contrôler la charge protéine. Aurora B est responsable de la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 donc les changements de celle-ci reflètent l'activité kinase d'Aurora B. (+) représente l'inhibition de l'activité d'Aurora B et (-) pour une absence d'efficacité. La phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 (en vert) et l'ADN (Hoescht 33342, en bleu) sont visualisés par immunofluorescence. Les faibles activités ne sont pas mises en évidence en immunofluorescence car nous sommes en conditions saturantes d'anticorps primaire.

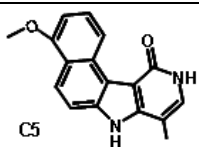
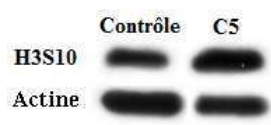
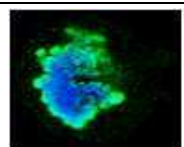
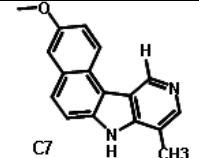
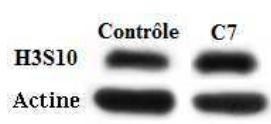
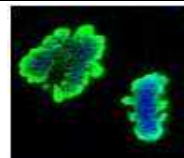
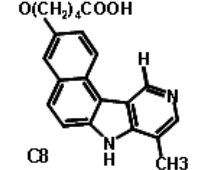
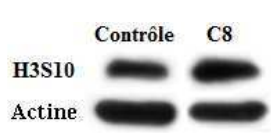
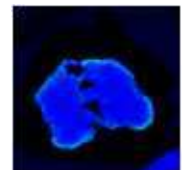
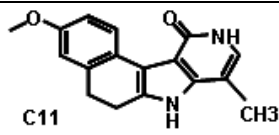
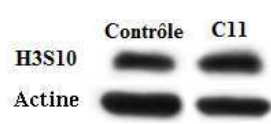
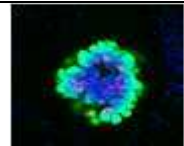
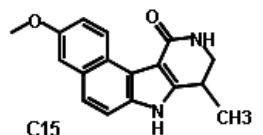
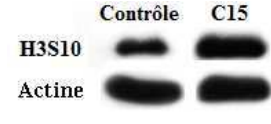
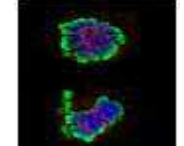
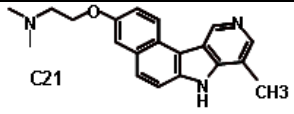
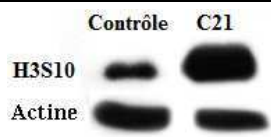
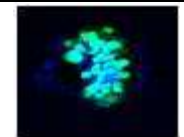
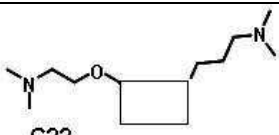
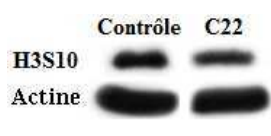
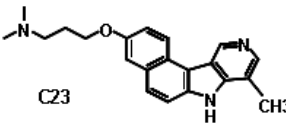
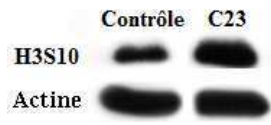

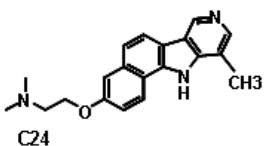
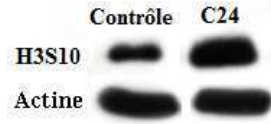
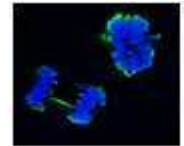
Nom	Molécule	Western blot	Cellule mitotique	Niveau d'inhibition de l'activité d'Aurora B
C5				-
C7				-
C8				-
C11				-
C15				-
C21				-
C22			Absence de mitose	
C23				-
C24				-

Figure 36 : Composé n'inhibant pas l'activité kinase d'Aurora B *in cellulo*

Un western blot est réalisé à partir des extraits des cellules U2OS traitées par chaque composé (1 μ M). La phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 est détectée à l'aide d'un anticorps spécifique. La détection de l'actine permet de contrôler la charge protéine. Aurora B est responsable de la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 donc les changements de celle-ci reflètent l'activité kinase d'Aurora B. (+) représente l'inhibition de l'activité d'Aurora B et (-) pas d'inhibition. La phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 (en vert) et l'ADN (Hoescht 33342, en bleu) sont visualisés par immunofluorescence.

Par la suite, la série sera limitée aux molécules C1 à C4, C12 et C14 tandis que C21 sera utilisée comme contrôle négatif.

3. Spécificité *in cellulo* de ces composés actifs vis-à-vis des kinases Aurora

Nous avons estimé la spécificité *in cellulo* de ces composés au sein de la famille des kinases Aurora. L'autophosphorylation d'Aurora A sur la thréonine 288 reflète son activité tandis que la phosphorylation de l'histone H3 signe une activité Aurora B kinase. Nous avons examiné l'impact des composés sur ces phosphorylations (**Figure 37A**). L'efficacité est évaluée en tenant compte de nombre de cellules en mitose révélé par la détection de la protéine d'Aurora B. Nous avons remarqué que C1 et C2 inhibent fortement l'activité kinase d'Aurora A (**Figure 37A**, C1, C2), mais la molécule C14 est beaucoup moins efficace que C1. C14 semble plus spécifique d'Aurora B comme en témoigne l'extinction du signal de phosphorylation de l'Histone H3 et il a une activité modérée vis-à-vis d'Aurora A. Les expériences d'immunofluorescence confirment que C1, C2 et C14 inhibent la phosphorylation de l'histone H3 en prophase et métaphase et semblent perturber le devenir des cellules puisque in fine la majorité de la population est polyploïde (**Figure 37B**, C1, C2 et C14).

Au vu du blot, C3 et C4 n'inhibe pas Aurora A car les signaux d'Aurora A-T288 phosphorylée sont aussi intenses que le contrôle (**Figure 37A**, contrôle, C3 et C4). Toutefois, la situation est surprenante pour ces molécules. Nous notons une faible efficacité en blot vis-à-vis de l'histone H3 phosphorylée (**Figure 37A**, C3 et C4), mais ce résultat reflète une hétérogénéité. En effet, les cellules en prophase ne sont pas marquées en présence de C3 et C4 alors que le niveau de phosphorylation de l'histone H3 est normal sur les cellules en métaphase (**Figure 37B**, C3 et C4). Cet aspect sera développé par la suite au cours de l'étude de la molécule C4.

Nous avons trouvé que la molécule 12 a un très faible effet sur Aurora B et n'a pas d'activité sur Aurora A (**Figure 37A**, C12). La longue chaîne en position 3 induit une spécificité au sein de la famille Aurora en faveur de la kinase B et le groupe oxo est plus avantageux qu'un éther en position 11. Le composé C21 portant un hydrogène en position 11 qui était actif sur le domaine kinase d'Aurora A n'a pas la capacité d'inhiber les kinases Aurora A et B *in cellulo* (**Figure 37A** et **37B**, C21).

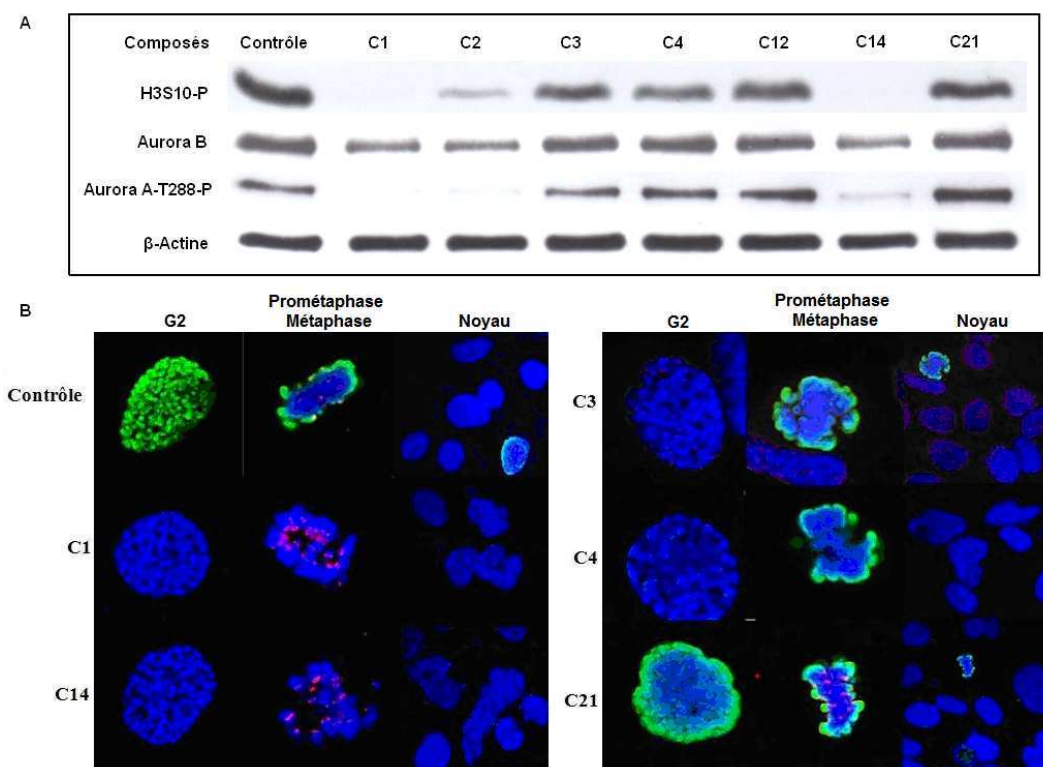


Figure 37: Test de l'efficacité des molécules sur des cellules U2OS

A : Les cellules U2OS ont été traitées par les composés à la concentration de 1 μ M. Un western blot est réalisé avec des anticorps anti-Aurora B, H3S10 phosphorylé (H3S10-P) et Aurora A T288 phosphorylée (Aurora A-T288-P) successivement et permet d'évaluer l'activité des kinases Aurora en présence des composés. La détection de la β -Actine sert de contrôle de charge.

B : Effets des composés sur les cellules U2OS. La phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10, le noyau et le centromère sont visualisés par la marque H3S10-P (en vert), Hoescht 33342 (en bleu) et CREST (en rouge), respectivement.

4. Conclusion

Dans cette partie, nous avons évalué l'efficacité cellulaire des composés de la famille benzo[e]pyridole ainsi qu'étudié la relation structure/fonctions de ces molécules. A l'aide des expériences en western blot et immunofluorescence, l'activité antimittotique de 15 molécules est analysées. Six molécules actives parmi 15 molécules testées inhibent la phosphorylation de l'histone H3 et donc probablement la kinase Aurora B. Ce sont les molécules C1 à C4, C12 et C14. Les composés C21, C22 et C23 n'ont pas effet sur les kinases "complètes" bien qu'ils soient très actifs sur le domaine kinase d'Aurora A isolé (**Tableau 13**). Parmi ces composés, C1 et C14 sont les molécules qui inhibent le plus efficacement les kinases Aurora. C14 (3-(Amino-substituted)-alkyloxy-7H,10H-benzo[e]pyrido[4,3-b]indol-11-ones) semble avoir une spécificité différente de C1 qui cible l'ensemble de la famille. Nous avons remarqué la perturbation de la phosphorylation de l'histone H3 au début de mitose en présence de C3 et C4; ces molécules ne sont pas des inhibiteurs d'Aurora A.

En corrélant les structures et l'efficacité des composés, nous avons remarqué que le groupe Oxo (=O) ou éther (-O-) en position 11 ainsi que l'organisation des cycles sont très importants et essentiels pour activité inhibitrice. Le groupe éther en position 3 renforce l'activité et, l'extension de chaîne latérale en cette position concomitamment avec la présence du groupe Oxo en position 11 favorise l'activité inhibitrice sur Aurora B.

Nous avons observé une perturbation de la phosphorylation de l'histone H3 en transition G2/M. Nous focaliserons la suite de l'étude sur C4 (3-methoxy-7H-benzo[e]pyrido[4,3-b]indol-11(10H)-one) et analyserons ce profil atypique d'inhibition de la phosphorylation de l'histone H3.

C21 (3-(Amino-substituted)-alkyloxy-7H-benzo[e]pyrido[4,3-b]indole) est un des molécules inhibant efficacement le domaine kinase d'Aurora A (**Tableau 13**). C'est potentiellement un inhibiteur de kinase. Dans la mesure où c'est le meilleur inhibiteur du domaine kinase, nous étudierons ses potentialités antiprolifératives.

II. Caractérisation de la molécule C4 un inhibiteur de la phosphorylation de l'histone H3 en entrée de mitose

La molécule C4 inhibe la phosphorylation de l'histone H3, mais son effet est limité à l'entrée en mitose et le signal est normal par la suite. Nous avons souhaité confirmer ces résultats et décrire les conséquences de cette absence de phosphorylation en G2/M, prophase.

1. Confirmation du retard de phosphorylation de l'histone H3 en mitose

Les phosphorylations sur sérine 10 et 28 de l'Histone H3 sont décrites comme déposée par la kinase Aurora B. Nous avons recherché si elles étaient inhibées conjointement. Nous avons synchronisé les cellules HeLa en phase S et récupéré les cellules mitotiques traitées par C4 au cours du temps. Nous avons observé la cinétique de la phosphorylation de l'histone H3 (**Figure 38**). A 3 h et 4 h, le niveau de H3-S10-P et H3-S28-P sont très faible reflétant une faible proportion de cellules mitotiques. Comme attendu ces signaux sont plus forts à 8 h (**Figure 38**, 8 h).

La détection de la protéine Aurora B permet d'estimer le nombre de cellules en mitose. A 3 et 4 h, nous avons noté que les signaux d'H3-S10-P et H3-S28-P sont moins intenses en présence de C4 que dans le contrôle pour une détection d'Aurora B équivalente voire même plus intense à 3 h de culture. Ensuite, ces signaux sont retrouvés à des niveaux équivalents quand la mitose progresse (**Figure 38**, 8 h) Ceci suggère que la phosphorylation de l'histone H3 sur les deux sérines 10 et 28 est retardée en présence de C4 alors que les cellules progressent en mitose.

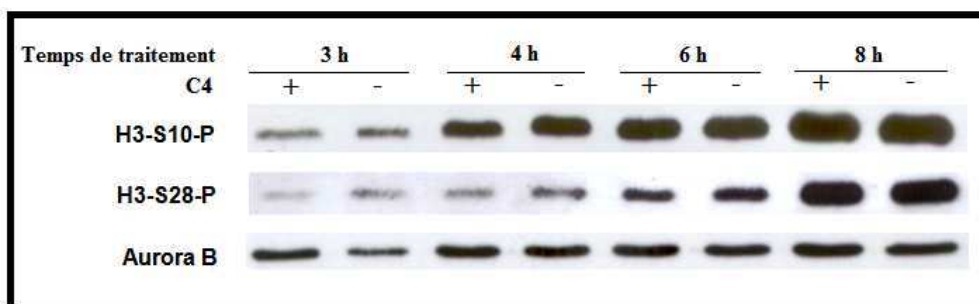


Figure 38 : C4 perturbe la phosphorylation de l'histone H3

Les cellules HeLa synchronisées en phase S par un traitement thymidine sont cultivées en présence de C4 3 μ M (+) ou en son absence (-) pendant 3 h, 4 h, 6 h et 8 h. Un western blot est réalisé à partir des extraits cellulaires. La phosphorylation de l'histone H3 sur les sérines 10 (H3-S10-P) et 28 (H3-S28-P) est suivie à l'aide des anticorps spécifiques. Aurora B permet de contrôler la quantité de cellules mitotiques.

2. C4 n'inhibe pas les kinases Aurora A et B

L'autophosphorylation d'Aurora B sur la thréonine 322 est indispensable pour son activité kinase. La cinétique de l'autophosphorylation d'Aurora B est détectée (**Figure 39**). Les signaux de cette marque augmentent au cours du temps correspondant au nombre de cellules

entrant en mitose. Néanmoins, nous n'avons noté aucune différence de cette autophosphorylation en présence de C4. Aurora B phosphoryle l'histone H3 en mitose et elle est aussi responsable de phosphorylation de CenP-A, un variant de l'histone H3, sur la sérine 7. De la même façon que nous n'observons pas d'inhibition de l'autophosphorylation d'Aurora B nous n'avons pas de différence de niveau de la phosphorylation de CenP-A-(Ser7) en présence de C4.

L'autophosphorylation d'Aurora A sur la thréonine reflète son activité kinase. Nous avons déterminé l'effet de C4 sur l'activité kinase d'Aurora A au cours du déroulement de la mitose (**Figure 39**, Aurora A-T288-P). Nous n'avons pas trouvé de différence de signaux d'Aurora A-T288 phosphorylée en présence ou en absence de C4. Ce résultat confirme les observations précédentes (**Figure 37A**) et montre que C4 n'inhibe pas l'activité d'Aurora A même en entrée de mitose (4 et 6h).

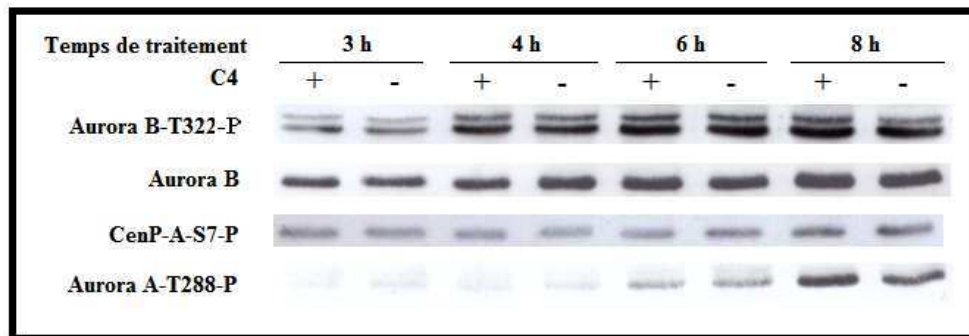


Figure 39 : C4 n'a pas d'effet sur l'activité kinase des Aurora A et B

Les cellules HeLa synchronisées en phase S par un traitement Thymidine sont cultivées en présence de C4 3 μ M (+) ou en son absence (-) pendant 3 h, 4 h, 6 h et 8 h. Un western blot est réalisé à partir des extraits cellulaires. Les activités kinase d'Aurora A et Aurora B sont déterminées par leur autophosphorylation sur les thréonines 288 (Aurora A-T288-P) et 322 (Aurora B-T322-P), respectivement. Aurora B permet l'estimation de la quantité de cellules mitotiques.

3. Localisation de différents marqueurs de la mitose en présence de C4

a. La perturbation de la phosphorylation de l'histone H3

Afin de savoir si l'inhibition de phosphorylation observée lors du traitement par C4 est spécifique de l'histone H3, nous détectons le signal MPM2 en entrée de mitose (Figure 40) et observons la phosphorylation de l'histone H3 sur les sérines 10 (Figure 40A) et 28 (Figure 40B) dans les cellules mitotiques. Nous utilisons l'anticorps MPM2 pour détecter les cellules mitotiques puisque MPM2 est un anticorps reconnaissant un épitope phosphorylé spécifique de la mitose présent en autres sur les protéines Topoisomérase II α , MAP, NimA et deux inhibiteurs de Cdc2.

Les signaux MPM2-P sont présents en présence ou en absence de C4 permettant de détecter les cellules mitotiques. Aucune différence du signal MPM2-P n'est observée

indiquant qu'il n'y a pas d'inhibition massive de la phosphorylation en entrée de mitose. L'histone H3 est phosphorylée en fin de G2 et cette phosphorylation est augmentée dans les cellules en mitose puis elle décroît en fin de mitose. Les signaux de H3S10 et H3S28 phosphorylée sont très forts dans les cellules en prophase en absence de C4 (**Figure 40**, Contrôle). Inversement, ces phosphorylations sont fortement inhibées en présence de C4 (**Figure 40**, C4). Néanmoins, la phosphorylation de l'histone H3 sur les sérines 10 et 28 est retrouvée normalement dans les cellules en prométaphase en présence de C4 et les signaux correspondants sont aussi intenses que les contrôles (**Figure 40**). Suite au traitement par C4, nous ne détectons que 19 % d'histone H3 phosphorylée en transition G2/M par rapport à 100 % dans le contrôle. Ceci montre que C4 perturbe la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 en entrée de mitose.

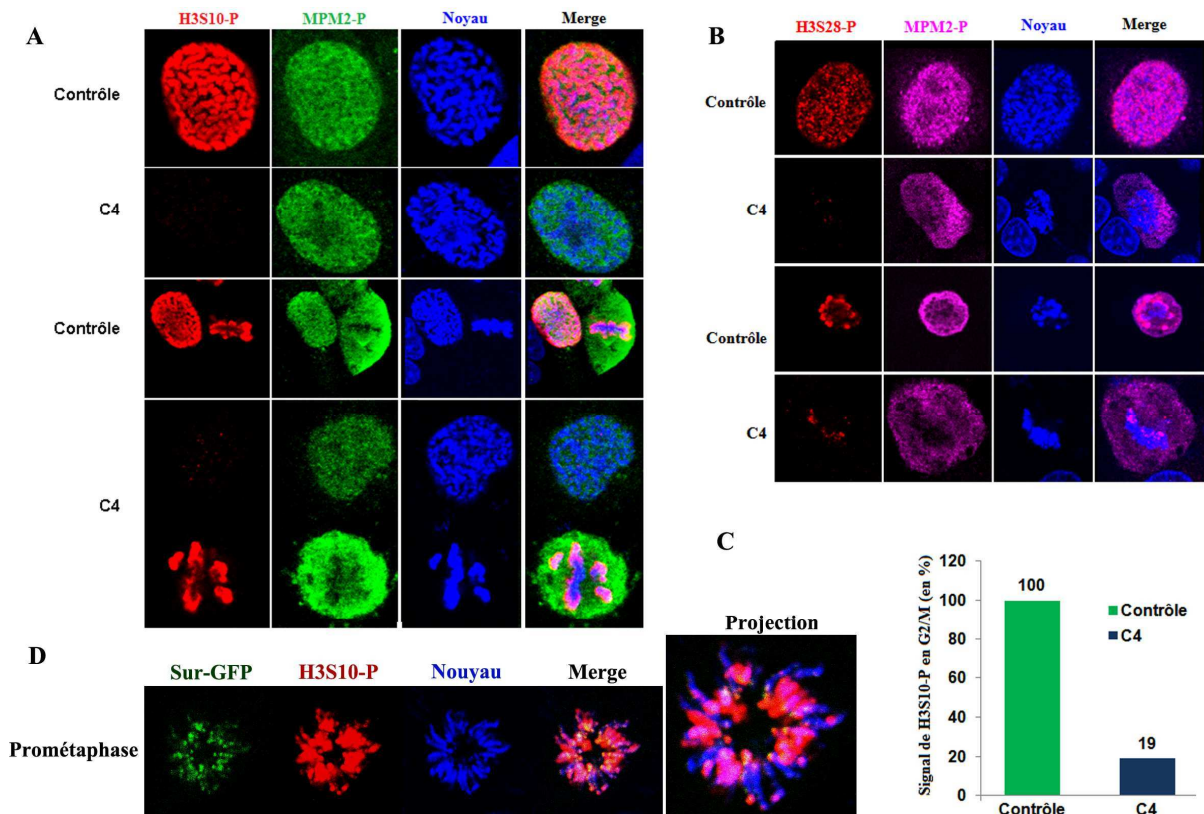


Figure 40: L'absence de phosphorylation de l'histone H3 en entrée de mitose

Les cellules HeLa exprimant de manière stable GFP (Sur-GFP, en vert) traitées par C4 (3 μ M) sont fixées. Ensuite, des immunofluorescences sont réalisées avec les marqueurs spécifiques de la phosphorylation de l'histone H3 (en rouge) sur les sérines 10 (A) et 28 (B). Les cellules mitotiques sont détectées à l'aide d'anticorps MPM2 (en vert (A) ou en rose (B)). Le noyau est marqué par le Hoescht 33342 (en bleu). L'histogramme illustre le pourcentage de la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 en transition G2/M (C). L'apparition de la phosphorylation en prométaphase (D).

Nous avons noté l'apparition de la phosphorylation en prométaphase. Les premiers signaux de phosphorylation de H3S10 sont retrouvés au voisinage des centromères, colocalisés avec la Survivine (**Figure 40D**). Les variations d'intensité suggèrent une propagation des centromères vers les bras des chromosomes (**Figure 40D**, à droite) et finalement, cette phosphorylation sera présente sur tout le chromosome. Le recrutement de la protéine Survivine dans l'hétérochromatine péri-centromérique n'est pas perturbé par l'action de C4. (**Figure 41**, lignes 1 et 2). La présence de Survivine repérée par son étiquette GFP est notée, comme attendu, sur les centromères puis sur les microtubules (**Figure 41**, lignes 3 et 5). Les deux figures d'anaphase suggèrent une ségrégation des chromosomes perturbée ou ralentie par une condensation moins efficace (**Figure 41**, lignes 4 et 5). Des données statistiques devront être acquises pour renforcer cette observation.

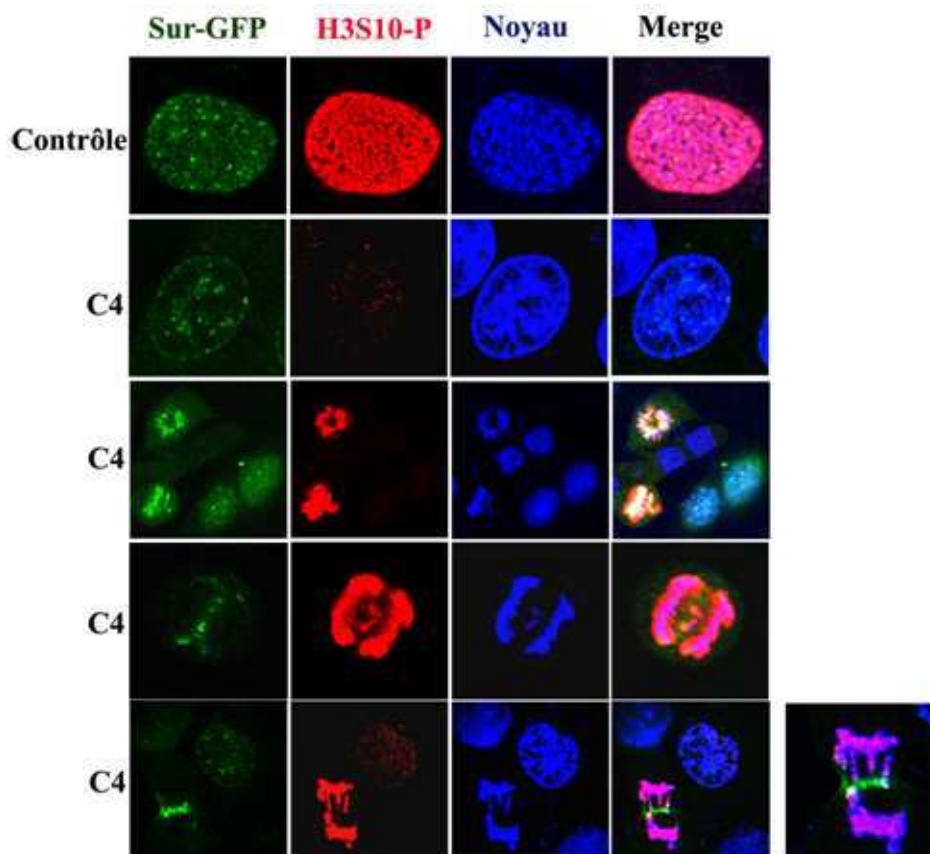


Figure 41: Localisation de la protéine Survivine suite à l'action de C4

Les cellules HeLa exprimant de manière stable Survivine-GFP (en vert) sont traitées par C4 (3 μ M) puis fixées. Ensuite, une immunofluorescence est réalisée avec un marqueur spécifique de la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10. L'ADN est marqué par le Hoescht 33342 (en bleu).

b. Localisation des partenaires du complexe passager

Les expériences de western blot et d'immunofluorescence ont confirmé que C4 perturbe la phosphorylation de l'histone H3 sur les sérines 10 et 28 en début de la mitose et il ne s'agit pas d'une inhibition massive de la phosphorylation en entrée de mitose. Aurora B est décrit

comme étant responsable de cette phosphorylation donc nous avons recherché la localisation d'Aurora B et de ses partenaires dans les cellules traitées par C4 (**Figure 42**). Les expériences sont réalisées dans les cellules HeLa exprimant de manière stable la protéine passagère Survivine-GFP.

En mitose, le complexe passager, qui comprend entre autres Survivine et Aurora B, est recruté aux centromères. Nous visualisons les centromères à l'aide d'un anticorps spécifique ; la co-détection de Survivine permet de préciser sa présence sur le centromère interne même suite au traitement par C4 (**Figure 42A**). En métaphase, les chromosomes s'alignent correctement sur la plaque métaphasique et les signaux d'Aurora B et de Survivine sont détectés sur les centromères. Ensuite, en fin de mitose, les deux protéines sont retrouvées dans le corps intermédiaire. Nous avons observé qu'Aurora B et Survivine co-localisent tout au long de leur expression même suite au traitement par C4 (**Figure 42B**). Néanmoins, nous notons que même si la majorité des protéines Aurora B et Survivine se concentrent dans le corps intermédiaire en présence de C4, on retrouve quelques protéines passagères délocalisées hors de cette zone (**Figure 42B**, télophase/cytodiérèse). De même façon, même si MKLP1 (mitotic kinesin-like protein) se localise correctement dans le corps intermédiaire en télophase/cytodiérèse en présence de C4 (**Figure 42C**) nous avons aussi noté la présence d'un signal au voisinage de la protéine Survivine (**Figure 42C**, en bas). Ces défauts ne sont pas majeurs et n'impactent pas la cytotiérèse puisque nous ne trouvons pas d'anomalies dans les cellules filles.

L'absence de phosphorylation de l'histone H3 (Ser 10 et 28) en début de mitose n'est donc pas due à une mauvaise localisation de la kinase Aurora B ni à l'absence de son co-activateur Survivine.

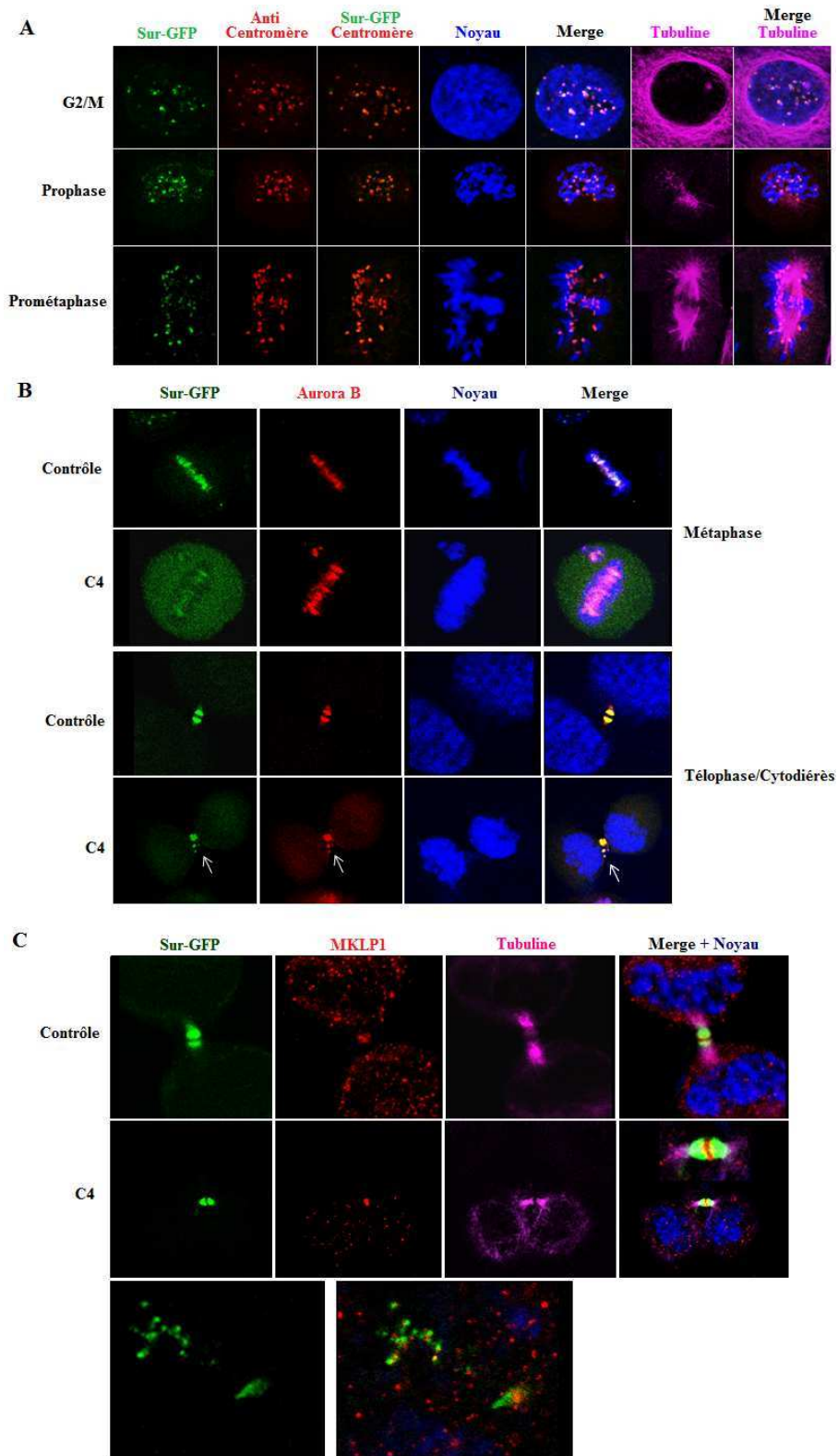


Figure 42: Impact de C4 sur la localisation de partenaires du complexe passager

Les cellules HeLa exprimant de manière stable Survivine-GFP (en vert) sont traitées par C4 (3 μ M) puis, fixées. Des expériences immunofluorescences sont réalisées pour vérifier la localisation de la Survivine et d'Aurora B en présence de C4. Les noyaux sont marqués par Hoescht 33342 (en bleu). Les centromères sont marqués par un auto-anticorps spécifique (hct101, en rouge) et la tubuline est repérée par le fluorochrome rouge lointain.

A : Localisation de Survivine (vert) aux centromères en début de mitose sur des cellules traitées par C4 (3 μ M).

B : Impact de C4 sur la localisation d'Aurora B (rouge) et Survivine (vert) en métaphase et télophase.

C : La délocalisation partielle de la Survivine (vert) et détection de MLKP1 (rouge) en fin de la mitose.

c. Suivi *ex vivo* d'effet de C4 sur la progression mitotique

Nous avons réalisé un suivi *ex vivo* sur les cellules HeLa exprimant de manière stable Survivine-GFP afin de visualiser les effets de C4 sur les cellules mitotiques. En métaphase, Survivine se trouve sur les chromosomes et décore les centromères et ensuite, elle se concentre sur les microtubules centraux dans le corps intermédiaire en fin de la mitose (**Figure 43A**, contrôle).

En présence de C4, les chromosomes s'alignent correctement sur la plaque métaphasique et en métaphase, Survivine est concentrée sur les centromères des chromosomes dans le contrôle (**Figure 43A**, 23 min). En anaphase, Survivine migre vers le fuseau mitotique et y reste jusqu'à la fin mitose (**Figure 43A**, 21 min pour contrôle et 80 min pour C4). En fin de mitose, nous avons observé qu'une petite fraction des protéines Survivine est délocalisée en présence C4 (**Figure 43A**, 91min, 120 min et 128 min). L'expérience d'immunofluorescence confirme cette délocalisation partielle de Survivine en fin de la mitose (**Figure 43B**). Nous constatons que les cellules traitées par C4 mettent plus de temps pour compléter leur division.

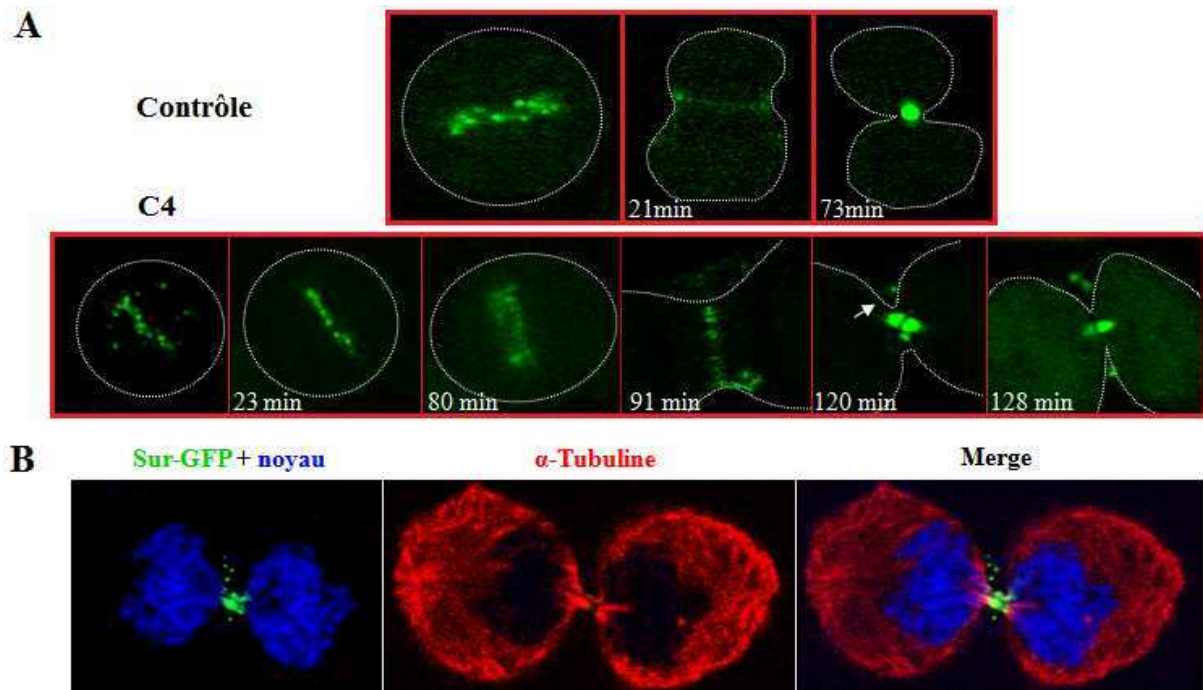


Figure 43: La délocalisation de la Survivine dans les cellules en mitose

- A : Des cellules HeLa exprimant de manière stable survivine-GFP (Sur-GFP en vert) sont traitées par C4 (3 μ M). La progression mitotique de ces cellules est suivie par microscopie confocale. Le contrôle représente la localisation en absence de traitement. Les temps d'imagerie sont indiqués en minute (min) et la forme des cellules appelée par des lignes discontinues.
- B : Des cellules HeLa exprimant de manière stable la Survivine-GFP (en vert) sont traitées par C4 (3 μ M) puis fixées. Ensuite, une immunofluorescence est réalisée à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre l' α -tubuline (en rouge). Le noyau est marqué par l'Hoescht 33342 (en bleu).

4. C4 accélère l'entrée en mitose et prolonge sa durée

Afin d'analyser l'influence de C4 sur le cycle cellulaire, nous avons suivi le cycle des cellules HeLa en présence ou en absence de C4 au cours du temps (**Figure 44**). Quatre heures après l'ajout de sérum, nous avons noté que 50 % des cellules HeLa synchronisées en G0/G1 entrent en phase S (**Figure 44**, 4 h contrôle). Néanmoins, en présence de C4, il n'y a que 40 % des cellules en phase S et 32 % des cellules se trouvent en G2/M en comparaison des 24 % pour le contrôle (**Figure 44**, 4 h). Ceci suggère que les cellules traitées par C4 entrent en mitose plus rapidement et confirme les observations faites précédemment (**Figure 38**). A 8 h, en présence ou en absence de C4, approximativement 60 % des cellules sont en mitose (**Figure 44**, 8 h). De plus, concernant les autres phases, aucune différence n'est observée entre les deux conditions. Ceci montre qu'en présence de C4, les cellules restent en mitose plus longtemps. 28 h après le traitement, la plupart des cellules ont progressé dans le cycle cellulaire avec plus de 60 % des cellules en phase G0/G1 en présence ou en absence de C4 (**Figure 44**, 28 h) toutefois un léger retard est noté pour les cellules traitées par C4. L'analyse du cycle des cellules HeLa a montré que C4 accélère l'entrée en mitose et prolonge cette phase.

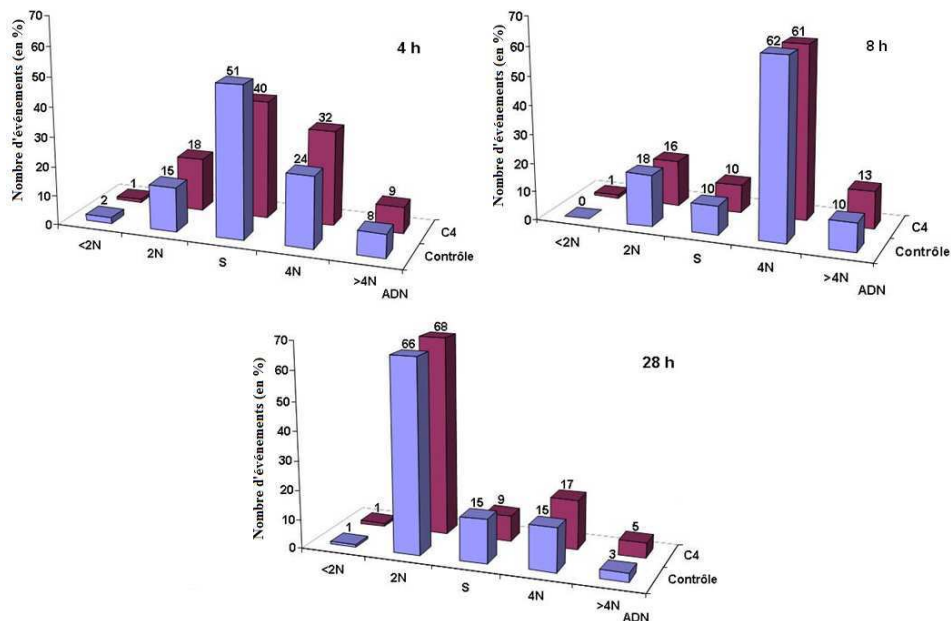


Figure 44 : Influence de C4 sur le cycle cellulaire au cours du temps

Les cellules HeLa sont synchronisées en G0/G1 et mises en culture en présence de C4 (3 μ M) ou en absence de C4 (contrôle). L'évolution du cycle cellulaire est analysée par FACS : 4 h, 8 h et 28 h et représentée par des histogrammes. Chaque panneau représente le cycle cellulaire à un temps de traitement différent et le pourcentage de chaque phase du cycle : <math><2N</math> représentant cellules en apoptose, 2N pour les cellules en G0/G1, S pour les cellules en synthèse, 4N étant des cellules en G2/M et >4N pour les cellules polyploïdes.

5. Effet de C4 sur la prolifération cellulaire

Nous avons estimé l'efficacité de C4 sur la prolifération des différentes lignées cellulaires. Les cellules sont traitées par C4 et la viabilité cellulaire est déterminée après 96 h par comptage des cellules. L'effet de C4 à 1,5 μM sur les différentes lignées est présenté dans le **Tableau 14**. Après 96 h de traitement, nous remarquons que le composé n'agit pas sur la lignée H1299. C4 inhibe très faiblement les lignées HeLa et HepG2. Un effet modéré est obtenu sur les lignées H358 et H322. Le composé C4 a peu d'effet sur la prolifération cellulaire.

Tableau 14: Viabilité des différentes lignées cellulaires en présence de C4 (1,5 μM)

<i>Origine</i>	<i>Lignée cellulaire</i>	<i>Viabilité à 1,5 μM (en %)</i>	<i>Viabilité à 3 μM (en %)</i>
Poumon	H358	74	
Poumon	H1299	97	
Poumon	H322	74	
Col de l'utérus	HeLa	82	50
Foie	HepG2	83	

6. Conclusion

Dans cette partie, nous avons cherché à comprendre le rôle de la molécule C4 (3-methoxy-7H-benzo[e]pyrido[4,3-b]indol-11(10H)-one) en mitose. C4 accélère l'entrée en mitose. On note une absence de la phosphorylation de l'histone H3 sur les sérines 10 et 28 au début de la mitose. C'est n'est pas une inhibition générale de la phosphorylation à l'entrée de mitose. De façon intéressante ce résultat indique que les chromosomes peuvent se condenser en absence de phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10. Communément cette marque est décrite comme étant nécessaire à la formation des chromosomes (Hans and Dimitrov 2001) et cela confirme des résultats antérieurs de l'équipe qui avaient été obtenus *in vitro* chez *Xenope* (de la Barre, Angelov et al. 2001). Par contre, il semble que la ségrégation des chromosomes soit moins efficace en présence de C4, ceci pourrait être dû à un manque d'efficacité de condensation et pourrait être la cause de la délocalisation partielle des protéines passagères que nous avons observée. Ces données sont préliminaires et demandent confirmation. L'analyse du cycle cellulaire ainsi que le suivi *ex vivo* indiquent que C4 accélère l'entrée en mitose et prolonge la durée de la celle-ci. C4 a peu d'effet à long terme sur la prolifération cellulaire de différentes lignées et nous observons un ralentissement de la croissance.

L'absence de phosphorylation de l'histone H3 en début de mitose suite à l'action de C4 est confirmée. Nous avons montré que les kinases Aurora sont actives et correctement localisées en présence de C4. En conséquence soit Aurora B n'est pas la kinase responsable de cette phosphorylation en entrée de mitose soit C4, en inhibant une kinase qui reste à identifier active une phosphatase qui déphosphoryle l'histone H3. Dans cette dernière hypothèse, l'absence de phosphorylation serait une conséquence indirecte de l'action de C4.

III. Caractérisation du composé C21

C21 (3-(Amino-substituted)-alkyloxy-7H-benzo[e]pyrido[4,3-b]indole) est la molécule la plus active sur le domaine kinase d'Aurora A (**Tableau 13**). Même si *in cellulo* C21 ne cible pas les kinases Aurora, ces données *in vitro* suggéraient une fonction inhibiteur de kinase. Dans le cadre d'une recherche de molécules antiprolifératives, nous avons évalué l'efficacité de C21 et recherché ses spécificités en le comparant à la molécule C23.

1. Effet comparé vis-à-vis de la croissance de sphéroïdes

Nous avons dans le Chapitre I décrit et validé le modèle des sphéroïdes pour estimer l'efficacité d'une molécule. Nous avons suivi l'effet sur la croissance des sphéroïdes de cellules H358 des composés C21 et C23 en comparaison des molécules initiales C1 et C2, (**Figure 45**). Pour rappel, C1 et C2 sont des molécules inhibant l'activité kinase d'Aurora *in cellulo* tandis que C21 et C23 n'ont pas cet effet inhibiteur.

La croissance des sphéroïdes est empêchée, pendant 4 jours et ensuite, les sphéroïdes commencent à se développer (**Figure 45**) et ce quelle que soit la molécule testée. Ceci est probablement une indication de la durée de vie de la molécule en présence des cellules. Nous notons que le composé C1 a un effet plus durable que C2 mais in fine, les sphéroïdes traités ont une taille semblable aux contrôles (**Figure 45 A et B**). La nouvelle série de molécules (21 et 23) produit une inhibition plus durable dans le temps. Aux termes de l'expérience, les sphéroïdes traités par C23 sont un tiers plus petits que les contrôles (**Figure 45D**). C21 a réduit significativement la croissance des sphéroïdes (rapport de croissance de 1 à comparer à 3 pour les sphéroïdes contrôles) et leur taille n'évolue plus à partir du 5^e jour et ce, pendant les 10 jours de l'expérience (**Figure 45C**).

L'ensemble des résultats montre que bien que C21 et C23 n'inhibent pas des kinases Aurora *in cellulo*, toutefois ils ont une efficacité antiproliférative très intéressante. Ces données nous ont conduit à caractériser les effets de C21.

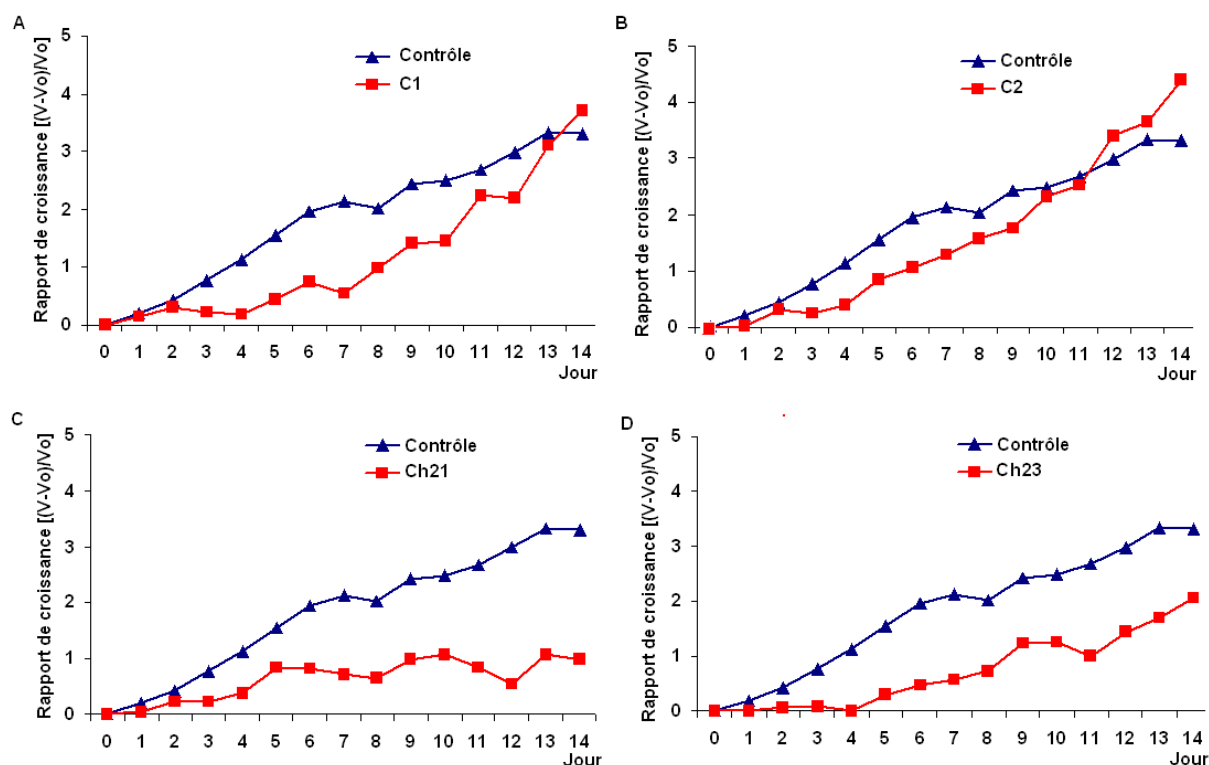


Figure 45 : Effet des composés sur les sphéroïdes H358

Les sphéroïdes créés ont approximativement la même taille et sont traités par des composés (1 μM) au jour 0. La croissance des sphéroïdes est observée pendant 15 jours. L'impact de C21 sur les sphéroïdes H358 est comparé avec celui des autres composés C1, C2 et C23. C21 est plus efficace que les autres composés testés et a un effet à long terme.

2. Efficacité de C21 sur les cellules

Afin d'évaluer les potentialités antiprolifératives de C21, nous avons réalisé un test de viabilité sur différentes lignées cellulaires (**Tableau 15**). Les valeurs d'IC₅₀ obtenues suite au traitement par C21 sur différentes lignées cellulaires ont montré que C21 est efficace sur des lignées cellulaires d'origines différentes. Les cellules BT20 provenant d'un cancer du sein sont, parmi les cellules testées, les plus sensibles à l'action de C21 avec un IC₅₀ d'inhibition de prolifération de 180 nM. C21 montre aussi une bonne efficacité d'inhibition de prolifération sur la lignée U373 (glioblastome) avec un IC₅₀ à 360 nM; Comparativement l'IC₅₀ d'inhibition de prolifération est de 600 nM en présence de C23 dans les cellules U373.

Nous avons aussi obtenu des résultats intéressants sur des lignées cellulaires hépatiques. Les résultats montrent que les IC₅₀ de viabilité en présence de C21 sur ces lignées dépendent à la fois de la concentration en glucose dans le milieu et du stade de différenciation (**Tableau 15** et **Figure 46**). C21 est plus efficace sur les deux lignées faiblement différenciées, Mahlavu (IC₅₀ = 510 nM) et SK-HepG1 (IC₅₀ = 450 nM), que sur HepG2. Les meilleurs IC₅₀ de C21 sont obtenus sur Mahlavu et SK-HepG1 en culture à la concentration la plus élevée de glucose (4,5 g/l) et dans les conditions où la prolifération cellulaire est maximale. L'IC₅₀ est multiplié

par 3 quand la prolifération diminue de 35% (IC50 de 1.4 μ M et 1.2 μ M respectivement pour Mahlavu et SK-HepG1). Ceci suggère que probablement C21 inhibe une voie métabolique et laisse présager qu'il soit peu toxique pour les cellules quiescentes.

Tableau 15 : Effet antiprolifératif de C21 sur différentes lignées cellulaires

<i>Origine</i>	<i>Lignée cellulaire</i>	<i>IC50 pour C21 (nM)</i>	<i>IC50 pour C23 (nM)</i>
Sein	BT20	180	
	HCC70	900	
Poumon	H358	450	
	H1299	550	
	A549	700	
	H322	800	
Leucémie	HL60	Sup 2 μ M	Sup 2 μ M
Col de l'utérus	HeLa	350	
Cellules du foie faiblement différenciées	SK-HepG1 (GE)	450	
	SK-HepG1 (GB)	1200	
	Mahlavu (GE)	510	
	Mahlavu (GM)	520	
	Mahlavu (GB)	1400	
Cellules du foie différenciées	HepG2	Sup 2 μ M	
Ostéosarcome	U2OS	1100	
Glioblastome	U373	360	600

(IC50, concentration inhibant 50 % de prolifération cellulaire après 96 h de traitement. Des meilleures valeurs d'IC50 sont en gras. GE : Glucose élevé : 4,5 g/L ; GM : glucose moyen : 3,85 g/L ; GB : glucose bas : 3,15 g/L)

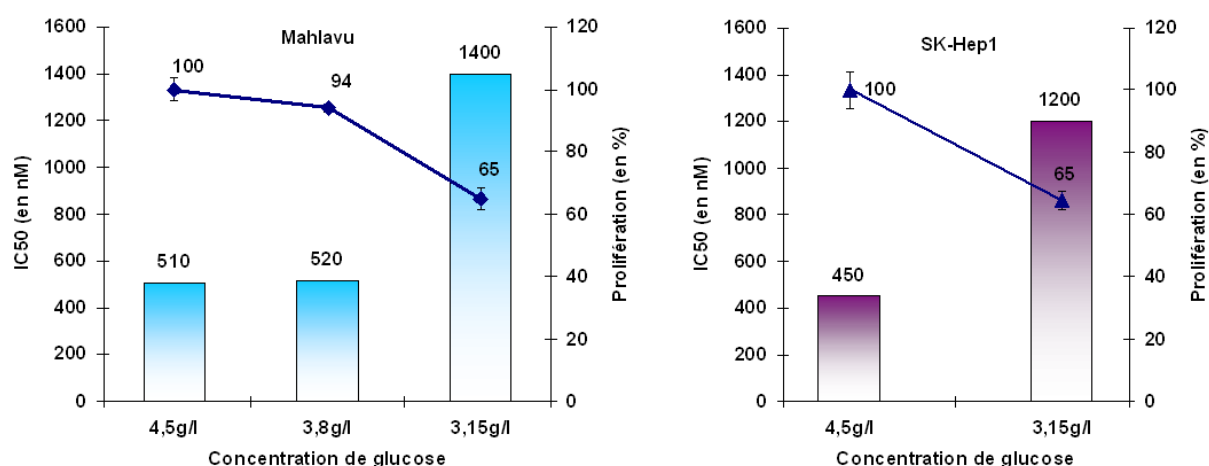


Figure 46 : Variation de l'efficacité de C21 sur les cellules Mahlavu et SK-HepG1

Les histogrammes et les courbes représentent respectivement l'IC50 de C21 et la prolifération cellulaire. Les meilleures valeurs d'IC50 sur les deux lignées sont obtenues en culture à la concentration de glucose la plus élevée.

3. C21 n'est pas toxique sur les cellules quiescentes

Afin d'estimer la toxicité de C21 sur les cellules non-proliférantes, des cellules H358 sont mises en quiescence et ensuite traitées par les composés (**Figure 47**). Après 96 h, nous avons noté que C21 et C23 ne sont pas toxiques sur les cellules H358 quiescentes alors qu'une légère inhibition est observée avec VX-680, inhibiteur des kinases Aurora qui a fait l'objet de tests cliniques.

C21 prévient l'expansion des cellules proliférantes avec peu de toxicité sur les cellules quiescentes.

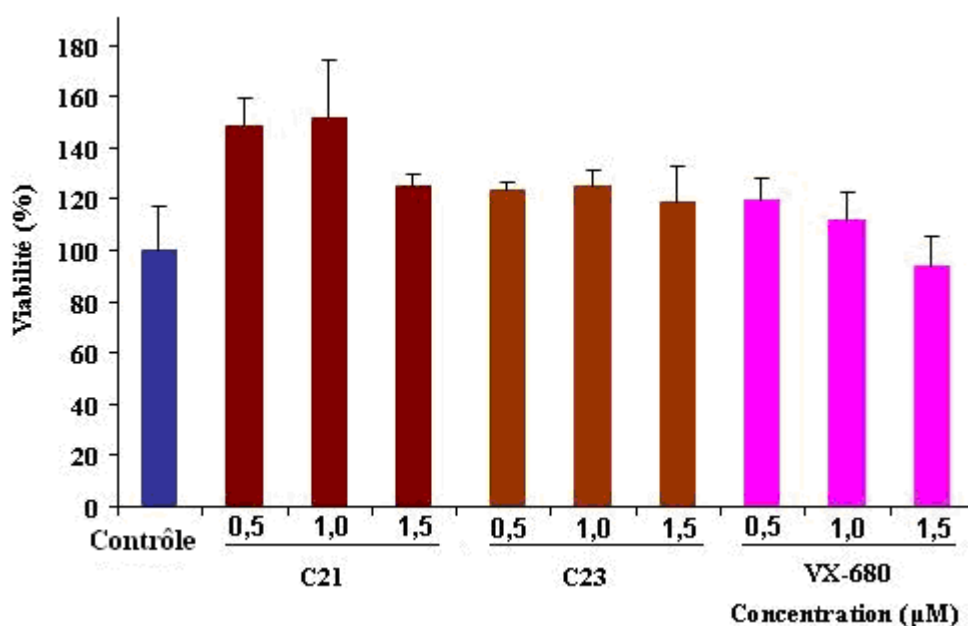


Figure 47: Efficacité des composés sur les cellules H358 quiescentes

Les cellules H358 quiescentes sont incubées avec les composés, pendant 96 h, sans sérum. Les cellules vivantes sont déterminées par ajout de MTS. L'augmentation de signal par rapport au contrôle reflète la modification de la concentration de NAD/NADH.

4. C21 n'induit pas des dommages à l'ADN

C21 est un intermédiaire de synthèse de l'Intoplicine, un inhibiteur des Topoisomères I et II, il était important de vérifier l'induction potentielle de dommage à l'ADN. Nous avons fait une comparaison d'effet de l'Etoposide et de C21 sur les cellules U2OS (**Figure 49**). La révélation en western blot indique que les signaux de phosphorylation d'H2AX-S139-P suivent la concentration d'Etoposide. Inversement, cette phosphorylation est au niveau basal dans le traitement par C21. Ceci montre que C21 ne crée pas de dommages à l'ADN.

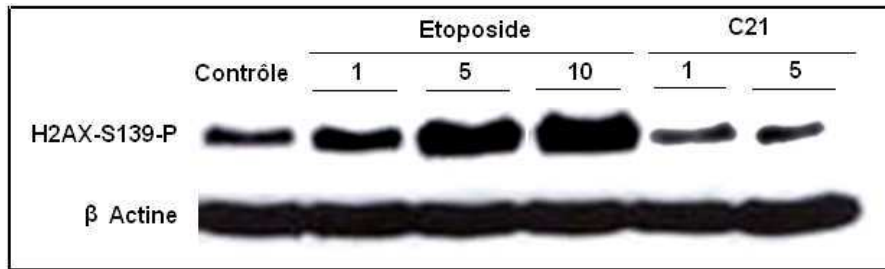


Figure 48: Comparaison de la capacité de l'Etoposide et C21 à induire des dommages à l'ADN

Les cellules U2OS sont traitées par Etoposide (1, 5 et 10 μM) et C21 (1, 5 μM) pendant 24 h. Un western blot est réalisé sur des extraits cellulaires obtenus sans temps de récupération. Le niveau des dommages à l'ADN est mesuré par l'intensité de la phosphorylation de l'histone H2AX sur la sérine 139 (H2AX-S139-P). L'actine est utilisée comme contrôle de charge. C21 n'induit pas des cassures comme l'Etoposide. Un niveau basal est toujours présent dans cette lignée.

5. C21 est un inhibiteur de protéines kinases à spécificité restreinte

Nous savons que C21 n'inhibe pas les kinases Aurora mais cette molécule est un potentiel inhibiteur de kinase puisqu'actif *in vitro* sur le domaine kinase d'Aurora A isolé. Afin de confirmer cette hypothèse et identifier les cibles potentielles de C21, nous avons fait effectuer un profil d'inhibition sur 106 kinases représentatives de la plupart des classes de kinases (**Figure 49** et **Tableaux 16** et **17**). Les kinases dont l'activité résiduelle est inférieure à 60 % sont indiquées dans le **Tableau 16** et l'ensemble des données dans le **Tableau 17**. De façon intéressante, très peu de kinases sont inhibées par C21. Le profil d'inhibition suggère que la cible puisse être GCK et (ou) TrkA ou des kinases de la même famille puisque ces sont les seules kinases inhibées à plus de 50 %.

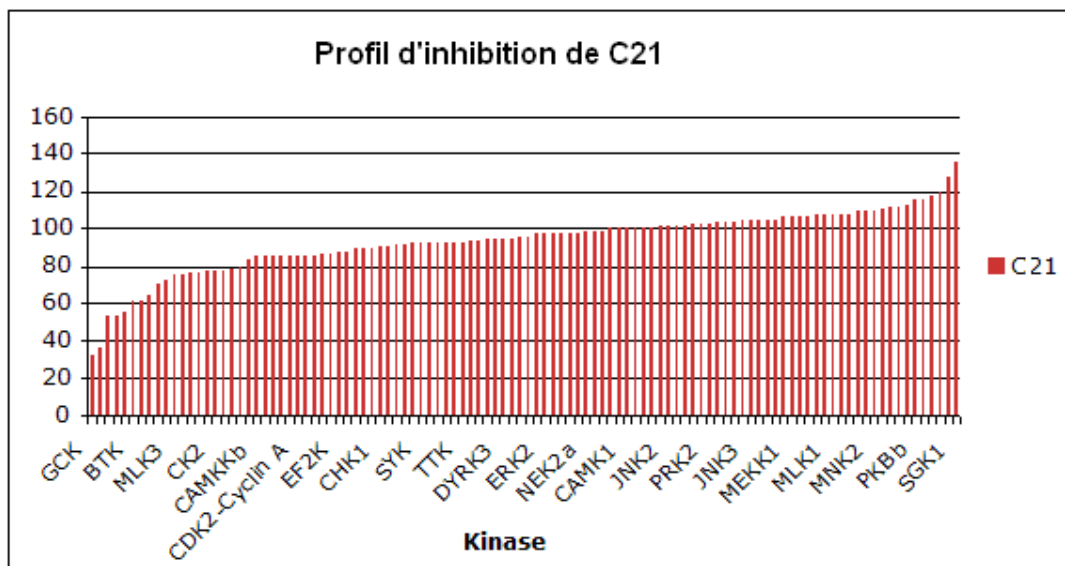


Figure 49 : Profil d'inhibition de C21 à la concentration de 1 μM . Le profil est réalisé par le MRC (Dundee University) sur 106 kinases en duplicat. Chaque barre correspond une kinase. Seule une kinase sur 5 est indiquée. L'activité résiduelle est indiquée en pour cent du contrôle.

Tableau 16 : Cibles trouvées parmi 106 kinases

<i>Kinase</i>	<i>Numéro d'accension</i>	<i>Activité (en %)</i>
GCK "Germinal center kinase "	BC047865	32
TrkA "Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1" "Tropomyosin related kinase A"	NM_001007792.1	36
NUAK1 "SnF1-like kinase"	NM_014840	53
PHK " Phosphorylase kinase"		53
TAK1 "Transforming growth factor beta activated kinase"	NM_003188	55

Kinases inhibées significativement par C21 *in vitro* à la concentration de 1 μ M.

Tableau 17: Profil d'inhibition de C21 à concentration 1 μ M

Kinase	% activité kinase	Kinase	% activité kinase	Kinase	% activité kinase	Kinase	% activité kinase
GCK	32	CDK2-Cyclin A	86	Aurora A	96	JNK3	105
TrkA	36	ERK1	86	DYRK2	96	PAK4	105
NUAK1	53	PIM1	87	IRAK4	97	MNK1	105
PHK	53	PKCz	87	PKD1	97	CSK	105
TAK1	55	EPH-B3	88	EPH-A2	97	RSK1	106
BTK	61	EF2K	88	LKB1	97	PDK1	106
RIPK2	62	CHK2	89	ERK8	98	MEKK1	106
Src	64	PKBb	89	NEK2a	98	ROCK2	106
PIM3	71	IKKe	89	MSK1	100	PAK5	107
IGF-1R	72	CHK1	90	MARK1	101	PAK6	107
VEG-FR	75	MINK1	90	CAMK1	101	PAK2	107
DAPK1	76	IKKb	91	MAPKAP-K2	101	PLK1	107
HIPK1	76	PKCa	91	RSK2	101	MKK2	110
HIPK2	76	SYK	92	MARK3	102	MNK2	110
JAK2	78	HIPK3	92	JNK2	102	NEK6	110
Lck	78	BRSK2	93	EPH-B2	102	PKA	111
CK2	78	MST2	93	PRAK	102	EPH-B4	112
MELK	79	S6K1	93	MARK4	102	EPH-A4	112
FGF-R1	80	CK1	93	PRK2	103	CLK2	113
p38dMAPK	83	TTK	93	MST4	103	MAPKAP-K3	115
IR	85	IRR	94	JNK1	103	PKBa	115
CAMKKb	85	GSK3b	94	SmMLCK	104	TBK1	118
p38gMAPK	85	BRSK1	95	p38aMAPK	104	MARK2	120
HER4	85	SRPK1	95	PIM2	104	AMPK	128
Aurora B	86	DYRK1A	95	MLK1	105	SGK1	136
YES1	86	DYRK3	95	MKK1	105		

Les quelques IC50 d'inhibition de C21 *in vitro* réalisés confirment que C21 est un puissant inhibiteur de kinase (**Tableau 18**). Il inhibe l'activité de la kinase recombinante GCK, une kinase de la voie MAPK avec un IC50 de 21 nM. Cette kinase est activée par plusieurs

facteurs tels les stress cellulaires et les cytokines inflammatoires, ... Ces tests confirment aussi que C21 a une spécificité différente de C1 puis qu'il n'inhibe pas les kinases Aurora et a une activité faible sur CHK2 (IC50 de 649 nM à comparer à 29 nM pour C1). C21 inhibe *in vitro* FLT3, un tyrosine kinase récepteur important dans la prolifération et la survie des cellules souches hématopoïétiques avec un IC50 intéressant de 12 nM. Toutefois, dans la série des benzo[e]pyridoles des molécules comme C1 sont beaucoup plus efficaces *in vitro* vis-à-vis FLT3 ; C1 a un IC50 d'inhibition de FLT3 de 1 nM. Malgré cette différence C21 pourrait rester intéressant comme inhibiteur de FLT3 car c'est, contrairement à C1, une molécule soluble dans l'eau.

Tableau 18 : IC50 d'inhibition *in vitro* de C21 vis-à-vis de quelques kinases

<i>Kinase</i>	<i>IC50 d'inhibition C21</i>	<i>IC50 d'inhibition C1</i>
Aurora B	Sup 1 000 nM	31 nM
CHK1 Checkpoint kinase 1	Sup 1 000 nM	224 nM
CHK2 Checkpoint kinase 2	649 nM	29 nM
FLT3 <i>FMS-like tyrosine kinase</i>	12 nM	1 nM
GCK <i>Germinal central kinase</i>	21 nM	ND

IC50, concentration inhibant 50 % de l'activité de la kinase recombinante. L'IC50 n'est pas déterminé pour TrkA. ND-non déterminé

6. C21 empêche l'expansion des xénogreffes de cellules HL60 chez les souris

Nous avons réalisé un test chez les souris afin d'estimer l'efficacité de ce composé *in vivo*. Les xénogreffes cellulaires de HL60 sont implantées en sous-cutané sur des souris « nude ». Ces rongeurs sont randomisés cinq jours après l'établissement des tumeurs. Les souris reçoivent soit le véhicule (PBS), soit C21 solubilisé dans du PBS, chaque jour pendant 17 jours. Les tumeurs croissent de manière exponentielle chez les souris contrôle. Comme nous l'avons observé avec les sphéroïdes de cellules H358, C21 a un effet antiprolifératif sur ces xénogreffes (**Figure 50** et **Figure 45**). Les tumeurs ont une croissance modérée en présence de C21. Nous avons noté une efficacité à long terme chez la souris. Au jour 38, le volume des tumeurs traitées par C21 est quatre fois plus petit que le contrôle. Nous n'avons observé aucune perte de poids. L'autopsie montre peu d'effets indésirables.

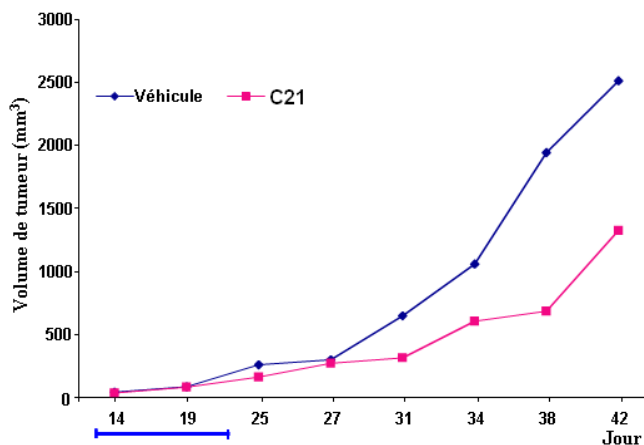


Figure 50 : L'impact de C21 sur l'évolution du volume des tumeurs chez les souris « nude »

Les souris portant des xénogreffes d'HL60 sont traitées par voie intrapéritonéale quotidiennement. Le traitement commence cinq jours après l'établissement des tumeurs. La barre bleue indique la durée du traitement. Les souris reçoivent 17 injections, soit le véhicule PBS (le contrôle, losanges bleus) soit C21 (5 µg pour 20 g de souris dans PBS, carrés roses). L'évolution du volume des tumeurs est déterminée au cours du temps (en jour).

7. Conclusion

C21 (3-(Amino-substituted)-alkyloxy-7H-benzo[e]pyrido[4,3-b]indole) est une des molécules les plus actives sur le domaine kinase d'Aurora A *in vitro* mais elle n'inhibe pas les kinases Aurora *in cellulo*. L'ensemble des résultats montre que C21 a une efficacité antiproliférative sur diverses lignées cellulaires. De plus, cet effet dépend de la concentration en glucose et donc de la croissance cellulaire. Bien que cette molécule soit un intermédiaire de synthèse de l'intoplicine, il n'induit pas de cassures de l'ADN. Par conséquent, C21 n'est pas toxique sur les cellules quiescentes. A l'aide du modèle sphéroïde, nous avons observé l'efficacité à long terme de C21 sur la croissance des cellules H358. De plus, C21 a un effet significatif sur des xénogreffes de cellules HL60. Des injections répétées de C21 n'ont pas causé des effets indésirables sur les animaux suggérant une faible toxicité de cette molécule. Le profil d'inhibition réalisé sur 106 kinases *in vitro* et les déterminations d'IC50 indiquent que C21 inhibe TrkA, GCK et FLT3. C21 est donc une nouvelle molécule antiproliférative. Ses deux intérêts majeurs sont d'une part sa solubilité en milieu aqueux qui ouvre la possibilité de traitements oraux et d'autre part sa spécificité restreinte à quelques kinases. La kinase Gck, meilleure touche du profil, agit dans la signalisation de la voie MAP Kinase. Cette kinase est très en amont dans cette voie de signalisation puisque GCK est une MAP4K. L'autre famille des kinases identifiée est TrKA, récepteurs des neutrophines. Compte tenu de l'homologie du site actif dans cette famille, on peut pronostiquer une inhibition des trois membres TrkA, B and C. Toutefois des expériences *in cellulo* sont nécessaires pour confirmer la voie ciblée par C21 dans les cellules et celle impliquée dans les effets antiprolifératifs.

DISCUSSION

Les kinases Aurora jouent un rôle clé en mitose et sont surexprimées dans de nombreuses tumeurs. En conséquence, elles sont identifiées comme une cible thérapeutique dans la thérapie anticancéreuse. De nombreux inhibiteurs des kinases Aurora ont été décrits et certains sont en essais cliniques.

Notre laboratoire a découvert dans la chimiothèque de l'Institut Curie un nouveau motif chimique inhibiteur des kinases Aurora et montré ses potentialités cellulaires et *in vivo*. Il s'agit des benzo[e]pyridoindoles. Plusieurs molécules de la famille ont été identifiées au cours du crible à haut débit, suggérant l'intérêt de cette famille de molécule. Nous avons étendu l'analyse structure/fonction à l'ensemble des molécules disponibles afin de définir des stratégies pour synthétiser des molécules à spécificités particulières.

Les benzo[e]pyridoindoles sont des molécules tétracycliques sur lesquelles peuvent se greffer de nombreuses chaînes alkyles. Notre étude est focalisée sur les trois positions suivantes : R1 sur le cycle A et R8, R11 sur le cycle E. Les essais *in vitro* sur un domaine kinase isolé révèlent que ce motif tétracyclique en croissant de lune s'adapte parfaitement au site catalytique liant l'ATP (Hoang, Favier et al. 2009). La plupart des composés testés inhibent le domaine kinase d'Aurora A mais n'ont pas toujours la capacité d'inhiber la liaison de l'ATP dans la conformation native. Nous avons montré que pour ce faire la position 11 (cycle D) devait être occupée par un oxygène. Cet ajout quelle que soit la fonction introduite (cétone ou éther) confère une activité inhibitrice vis-à-vis des kinases Aurora mais simultanément induit une perte de sélectivité. Celle-ci pourra être modulée par l'accroissement de la taille de la chaîne en position 8 sur le cycle E. Par extension de la chaîne latérale nous avons obtenu une nouvelle série de molécules inhibitrices qui existent sous forme de sels solubles dans l'eau ce qui ouvre des perspectives intéressantes en termes de voie d'administration des traitements.

Cette étude structure/fonction a fait émerger trois molécules intéressantes nommée C4, C14, C21. La molécule C4 est utile pour adresser des questions de la biologie cellulaire tandis que les composés C14 et C21 ont des propriétés anti-prolifératives intéressantes. Ces deux molécules qui permettent de s'affranchir des problèmes de solubilité rencontrés avec la touche du criblage, C1 sont protégées par deux brevets.

Nous avons constaté que C4 empêche la phosphorylation de l'Histone H3 en entrée et début de mitose et pourtant les chromosomes se forment correctement. Nous apportons donc la preuve que, chez les mammifères, cette marque épigénétique n'est pas nécessaire à la

condensation de l'ADN. Ces données complètent les résultats que nous avons établis *in vitro* avec des extraits mitotiques de *Xénope* (de la Barre, Angelov et al. 2001). C4 a une activité kinase *in vitro*, mais nous montrons qu'il n'inhibe pas les kinases Aurora A et B. Il induit une entrée précoce des cellules en mitose. Plusieurs kinases contrôlent l'entrée en mitose telles NIMA (NEK1), BUBR1 ou MELK et leur inhibition induit une entrée prématurée (Osmani, McGuire et al. 1991; Davezac, Baldin et al. 2002). Toutefois, il n'a jamais été reporté qu'elles acceptent l'Histone H3 comme substrat. Les kinases qui phosphorylent l'Histone H3 sont nombreuses mais seule Aurora B est décrite pour avoir un rôle en mitose et phosphoryler simultanément les sérines 10 et 28 (Baek 2011). Les invalidations chimiques et génétiques suggèrent fortement qu'Aurora B est la kinase responsable de cette marque épigénétique majeure de la mitose. Mais un paradoxe subsiste d'une part la localisation d'Aurora B est essentielle pour le choix de ses substrats (Delacour-Larose, Vu et al. 2009) et d'autre part la présence d'Aurora B sur les chromosomes est très labile puisque jamais détectée en immunofluorescence. L'effet de C4 est soit direct et il cible une kinase intervenant en amont d'Aurora B soit il modifie la balance kinase/phosphatase via par exemple CDC25B, un acteur clé de la transition G2/M. L'entrée en mitose étant prématurée on peut aussi envisager que l'activation d'Aurora B intervienne plus tardivement.

La molécule C4 est un nouvel outil qui permettra de décrypter ces modifications post-traductionnelles en entrée de mitose et le rôle de la phosphorylation de l'Histone H3 sur la ségrégation des chromatides sœurs et l'enlèvement des cohésines.

Les molécules C14 et C21 sont intéressantes par leurs propriétés antiprolifératives. La molécule C14 est un nouvel inhibiteur des kinases Aurora plus efficace et plus soluble que la molécule initial C1. La découverte de cette molécule dont la caractérisation est en cours est une retombée importante de l'étude structure/fonction. Nous avons choisi de caractériser la molécule C21 car elle est singulière dans la série : inhibiteur de kinase à activité anti-proliférative ne ciblant pas les kinases Aurora.

L'effet antiprolifératif est apprécié directement sur des cellules adhérentes en croissance, mais systématiquement des tests complémentaires sur cellules quiescentes sont réalisés. En effet, l'intérêt en chimiothérapie est de cibler les cellules en division sans dommage sur les cellules quiescentes au voisinage. Afin d'évaluer l'activité dans un système plus complexe mais simple d'utilisation, nous avons adapté la technique de croissance en sphéroïdes à des lignées de cellules de poumon. Ce mode de croissance est possible avec les cellules qui ont des contacts intercellulaires forts. L'avantage est que ce sont des cultures à long terme qui permettent de connaître le temps de demi-vie d'une molécule, l'efficacité du composé ou

d'une combinaison dans un système organisé. Ces essais ainsi qu'un test *in vivo* de traitement de xéno greffes confirment l'intérêt potentiel de C21. Le profil d'inhibition de kinase très restreint suggère que C21 agit soit très en amont dans la voie des MAP kinase puisqu'il ciblerait GCK, une MAP4K2 soit sur les neurotrophines récepteurs que l'on trouve présents sur des cellules tumorales (Albanese, Alzani et al. 2010). L'activation des récepteurs tyrosine kinase Trk est connue pour induire les voies de survie cellulaire Pi3K et AKT par contre GCK n'est pas décrite dans ces signalisations. Si nous confirmions, *in cellulo*, cette donnée *in vitro*, GCK deviendrait une nouvelle cible thérapeutique. Si l'effet anti-prolifératif de C21 est dû à une inhibition de GCK ou de Trk, cette molécule aura des applications intéressantes. En effet, les récepteurs Trk sont impliqués dans la perception de la douleur et leurs inhibiteurs sont utilisés pour prévenir la prolifération cellulaire tout en réduisant la douleur causée par l'invasion métastatique osseuse. Les inhibiteurs de GCK sont espérés pour des activités anti-inflammatoires (Zhong, Gavrilescu et al. 2009).

La famille des benzo[e]pyridoindoles offre des possibilités multiples d'inhibition de kinase et en jouant sur les groupements latéraux des spécificités différentes sont obtenus. Ces molécules sont actives dans les cellules et traversent rapidement les membranes cellulaires tout en étant peu ou pas toxiques sur les cellules quiescentes. De plus, nous n'avons pas noté d'effet adverse chez la souris. Leur développement est donc intéressant et ce d'autant plus qu'il s'agit d'une petite molécule dont la synthèse réalisée en trois étapes est validée à l'échelle du gramme.

La question de la spécificité des inhibiteurs de kinase est toujours en débat : monospécificité versus activités multiples. Nous avons développé un exemple d'exploitation d'un multiciblage ; En effet C1 cible avec la même efficacité CHK2 et Aurora B. Nous avons montré l'intérêt de ce double ciblage pour diminuer les concentrations utiles des agents de dommage à l'ADN et réduire leur toxicité. Nous avons aussi mis en évidence la variabilité de réponse dans le cas d'un composé comme C1 même si son action est toujours bénéfique. Il est donc essentiel de décrire l'action de ses inhibiteurs dans divers types cellulaires et d'identifier les cibles secondaires. Les excellents résultats obtenus par notre collaborateur Ichiro Nakano (USA) en ciblant par C1 simultanément Aurora B, MELK et CHK2 sur des glioblastomes illustrent l'importance des cibles secondaires. Cette connaissance doit guider la définition du champ des applications possibles d'une drogue.

Ce travail décrit la possibilité de cibler plusieurs sérine/thréonine kinases simultanément et est un nouvel exemple de la validation de la polypharmacologie.

PERSPECTIVES

Cette étude est réalisée en étroite collaboration avec l'équipe de chimistes de l'Institut Curie qui synthétise ces benzo[e]pyridoindoles. L'analyse structure fonction a été réalisée sur des molécules portant un méthyle en position 8 mais nous savons que l'allongement de cette chaîne peut être bénéfique pour l'activité et améliorer la spécificité. Nous espérons disposer de molécules C14 variantes qui conservent la structure de C14 mais portent un éthyl ou un propyl ou un phényl sur le carbone 8. L'efficacité d'inhibition d'Aurora B sera mesurée avec cette 3^{ème} génération de molécules.

Ces benzo[e]pyridoindoles sont à la fois des outils pour la recherche fondamentales et de potentiels drogues anti-cancéreuses. Ces deux aspects seront abordés ainsi :

- Nous savons que C1 est le premier inhibiteur décrit pour la kinase MELK, une kinase présente sur les cellules souches cancéreuses. Nous essayerons de développer un test kinase adapté pour trouver parmi les benzo[e]pyridoindoles le meilleur inhibiteur de MELK.
- La molécule C4 représente un outil intéressant pour décrypter les mécanismes mis en jeu en entrée de mitose. Nous essayerons de trouver sa cible et de préciser les modifications induites à la transition G2/M en suivant divers marqueurs. La possibilité que C4 agisse sur la kinase MELK sera envisagée.

Notre objectif est d'évaluer l'intérêt thérapeutique des composés benzo[e]pyridoindoles. Nous essayerons de comprendre le mécanisme d'action de C21. Inhibe-t-il la voie des MAP kinase activée en réponse à un stress ou à des facteurs de croissance ou plutôt la voie AKT ?

Un aspect que nous n'avons pas exploité est la capacité qu'ont certains benzo[e]pyridoindoles à inhiber très efficacement la kinase FLT3 dont l'activité est impliquées dans les leucémies, c'est un volet intéressant à explorer.

Pour chaque nouvelle série de molécules comme pour C14 nous ferons réaliser des profils d'inhibitions pour connaître les cibles potentielles. Ceci nous permettra de définir les applications possibles de ces composés, applications que nous validerons sur des xéno-grafts adéquates. Vu les résultats encourageants que nous avons obtenus avec les ciblage multiples cette stratégie sera envisagée avec les nouveaux composés.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

* **Propriété intellectuelle**

Ces travaux ont donné lieu à un dépôt de brevet et une nouvelle protection est en cours :

* Molla A., Nakano I., Nguyen, C-H. & **VU H-L.**

Combined treatment of cancer with benzo[e]pyridoindoles and DNA-damaging agents.

Brevet européen B1025EP00 du 9 avril 2010, étendu à l'international en avril 2011.

* Une molécule identifiée au cours de ce travail est en cours de protection (dépôt prévu fin mai 2011).

* **Article en cours de finalisation :**

Vu H-L., Nguyen C-H., Favier B., Le T-T., & Molla A.

The aurora kinase inhibitor benzo[e]pyridoindole targets checkpoint kinase 2: Combined cancer chemotherapy by simultaneous alterations of mitosis onset and DNA damage defences.

* **Participation à des revues ou commentaires avec comités de lecture:**

2011 Vu Hong-Lien & Molla A

Survivine, interprète du code histone mitotique

Médecine et Sciences, 2011, 27(3) 241-243

2010 Vu H-L, Hoang T-M-N, Favier B & Molla A

Aurora kinases and passenger proteins as targets for cancer therapy: An up-date.

Current Enzyme Inhibition 2010, 6 (1)19-25

2009 Delacour-Larose, M, Vu H-L & Molla A

Aurora B, an immobile passenger !

Cell cycle 2009, 8 (21), 3600-1

BIBLIOGRAPHIE

- Ahn, J. and C. Prives (2002). "Checkpoint kinase 2 (Chk2) monomers or dimers phosphorylate Cdc25C after DNA damage regardless of threonine 68 phosphorylation." *J Biol Chem* **277**(50): 48418-48426.
- Ahn, J., M. Urist, et al. (2004). "The Chk2 protein kinase." *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 1039-1047.
- Albanese, C., R. Alzani, et al. (2010). "Dual targeting of CDK and tropomyosin receptor kinase families by the oral inhibitor PHA-848125, an agent with broad-spectrum antitumor efficacy." *Mol Cancer Ther* **9**(8): 2243-2254.
- Alberts, S. R., M. Schroeder, et al. (2004). "Gemcitabine and ISIS-2503 for patients with locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma: a North Central Cancer Treatment Group phase II trial." *J Clin Oncol* **22**(24): 4944-4950.
- Anand, S., S. Penrhyn-Lowe, et al. (2003). "AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol." *Cancer Cell* **3**(1): 51-62.
- Andrews, P. D., Y. Ovechkina, et al. (2004). "Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere." *Dev Cell* **6**(2): 253-268.
- Andrysik, Z., W. Z. Bernstein, et al. (2010). "The novel mouse Polo-like kinase 5 responds to DNA damage and localizes in the nucleolus." *Nucleic Acids Res* **38**(9): 2931-2943.
- Ang, X. L., D. P. Seeburg, et al. (2008). "Regulation of postsynaptic RapGAP SPAR by Polo-like kinase 2 and the SCFbeta-TRCP ubiquitin ligase in hippocampal neurons." *J Biol Chem* **283**(43): 29424-29432.
- Antoni, L., N. Sodha, et al. (2007). "CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin?" *Nat Rev Cancer* **7**(12): 925-936.
- Babu, J. R., K. B. Jeganathan, et al. (2003). "Rae1 is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation." *J Cell Biol* **160**(3): 341-353.
- Baek, S. H. (2011). "When signaling kinases meet histones and histone modifiers in the nucleus." *Mol Cell* **42**(3): 274-284.
- Bahassi el, M., C. W. Conn, et al. (2002). "Mammalian Polo-like kinase 3 (Plk3) is a multifunctional protein involved in stress response pathways." *Oncogene* **21**(43): 6633-6640.
- Bao, S., Q. Wu, et al. (2006). "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response." *Nature* **444**(7120): 756-760.
- Barr, A. R. and F. Gergely (2007). "Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles." *J Cell Sci* **120**(Pt 17): 2987-2996.
- Barr, F. A., H. H. Sillje, et al. (2004). "Polo-like kinases and the orchestration of cell division." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(6): 429-440.
- Bartek, J. and J. Lukas (2003). "Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer." *Cancer Cell* **3**(5): 421-429.
- Bartek, J. and J. Lukas (2007). "DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation." *Curr Opin Cell Biol* **19**(2): 238-245.
- Beckerman, R., A. J. Donner, et al. (2009). "A role for Chk1 in blocking transcriptional elongation of p21 RNA during the S-phase checkpoint." *Genes Dev* **23**(11): 1364-1377.
- Berdnik, D. and J. A. Knoblich (2002). "Drosophila Aurora-A is required for centrosome maturation and actin-dependent asymmetric protein localization during mitosis." *Curr Biol* **12**(8): 640-647.
- Bernard, P., J. F. Maure, et al. (2001). "Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres." *Science* **294**(5551): 2539-2542.
- Bird, A. W. and A. A. Hyman (2008). "Building a spindle of the correct length in human cells requires the interaction between TPX2 and Aurora A." *J Cell Biol* **182**(2): 289-300.
- Blagden, S. P., L. R. Molife, et al. (2008). "A phase I trial of ispinesib, a kinesin spindle protein inhibitor, with docetaxel in patients with advanced solid tumours." *Br J Cancer* **98**(5): 894-899.
- Blangy, A., H. A. Lane, et al. (1995). "Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo." *Cell* **83**(7): 1159-1169.
- Blumenschein, G. R., Jr., F. R. Khuri, et al. (2008). "Phase III trial comparing carboplatin, paclitaxel, and bexarotene with carboplatin and paclitaxel in chemotherapy-naive patients with advanced or metastatic non-small-cell lung cancer: SPIRIT II." *J Clin Oncol* **26**(11): 1879-1885.
- Bolton, M. A., W. Lan, et al. (2002). "Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation." *Mol Biol Cell* **13**(9): 3064-3077.
- Bourhis, E., A. Lingel, et al. (2009). "Phosphorylation of a borealin dimerization domain is required for proper chromosome segregation." *Biochemistry* **48**(29): 6783-6793.
- Burns, T. F., P. Fei, et al. (2003). "Silencing of the novel p53 target gene Snk/Plk2 leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed cells." *Mol Cell Biol* **23**(16): 5556-5571.

- Buschmann, T., O. Potapova, et al. (2001). "Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress." *Mol Cell Biol* **21**(8): 2743-2754.
- Cardoso, M. C., H. Leonhardt, et al. (1993). "Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication." *Cell* **74**(6): 979-992.
- Carlessi, L., G. Buscemi, et al. (2007). "Biochemical and cellular characterization of VRX0466617, a novel and selective inhibitor for the checkpoint kinase Chk2." *Mol Cancer Ther* **6**(3): 935-944.
- Carmena, M. and W. C. Earnshaw (2003). "The cellular geography of aurora kinases." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(11): 842-854.
- Carpinelli, P. and J. Moll (2008). "Aurora kinase inhibitors: identification and preclinical validation of their biomarkers." *Expert Opin Ther Targets* **12**(1): 69-80.
- Carter, S. L., A. C. Eklund, et al. (2006). "A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers." *Nat Genet* **38**(9): 1043-1048.
- Casenghi, M., P. Meraldi, et al. (2003). "Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation." *Dev Cell* **5**(1): 113-125.
- Castro, A., Y. Arlot-Bonnemains, et al. (2002). "APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis." *EMBO Rep* **3**(5): 457-462.
- Celeste, A., O. Fernandez-Capetillo, et al. (2003). "Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks." *Nat Cell Biol* **5**(7): 675-679.
- Chang, J. L., T. H. Chen, et al. (2006). "Borealin/Dasra B is a cell cycle-regulated chromosomal passenger protein and its nuclear accumulation is linked to poor prognosis for human gastric cancer." *Exp Cell Res* **312**(7): 962-973.
- Chehab, N. H., A. Malikzay, et al. (2000). "Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53." *Genes Dev* **14**(3): 278-288.
- Chen, H. L., C. J. Tang, et al. (2005). "Overexpression of an Aurora-C kinase-deficient mutant disrupts the Aurora-B/INCENP complex and induces polyploidy." *J Biomed Sci* **12**(2): 297-310.
- Cheung, C. H., M. S. Coumar, et al. (2009). "Aurora kinase inhibitors in preclinical and clinical testing." *Expert Opin Investig Drugs* **18**(4): 379-398.
- Chung, E. and R. H. Chen (2003). "Phosphorylation of Cdc20 is required for its inhibition by the spindle checkpoint." *Nat Cell Biol* **5**(8): 748-753.
- Ciccarelli, C., F. Marampon, et al. (2005). "p21WAF1 expression induced by MEK/ERK pathway activation or inhibition correlates with growth arrest, myogenic differentiation and onco-phenotype reversal in rhabdomyosarcoma cells." *Mol Cancer* **4**: 41.
- Cimini, D. (2007). "Detection and correction of merotelic kinetochore orientation by Aurora B and its partners." *Cell Cycle* **6**(13): 1558-1564.
- Cimini, D. and F. Degrossi (2005). "Aneuploidy: a matter of bad connections." *Trends Cell Biol* **15**(8): 442-451.
- Collins, A. T., P. A. Berry, et al. (2005). "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." *Cancer Res* **65**(23): 10946-10951.
- Colombo, R., M. Caldarelli, et al. (2010). "Targeting the mitotic checkpoint for cancer therapy with NMS-P715, an inhibitor of MPS1 kinase." *Cancer Res* **70**(24): 10255-10264.
- Conte, N., B. Delaval, et al. (2003). "TACC1-chTOG-Aurora A protein complex in breast cancer." *Oncogene* **22**(50): 8102-8116.
- Cooke, C. A., M. M. Heck, et al. (1987). "The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis." *J Cell Biol* **105**(5): 2053-2067.
- Crane, R., A. Kloepper, et al. (2004). "Requirements for the destruction of human Aurora-A." *J Cell Sci* **117**(Pt 25): 5975-5983.
- Curley, M. D., V. A. Therrien, et al. (2009). "CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer." *Stem Cells* **27**(12): 2875-2883.
- D'Avino, P. P., M. S. Savoian, et al. (2005). "Cleavage furrow formation and ingression during animal cytokinesis: a microtubule legacy." *J Cell Sci* **118**(Pt 8): 1549-1558.
- Dai, J. and J. M. Higgins (2005). "Haspin: a mitotic histone kinase required for metaphase chromosome alignment." *Cell Cycle* **4**(5): 665-668.
- Dai, J., B. A. Sullivan, et al. (2006). "Regulation of mitotic chromosome cohesion by Haspin and Aurora B." *Dev Cell* **11**(5): 741-750.
- Dai, W., Y. Li, et al. (2000). "PRK, a cell cycle gene localized to 8p21, is downregulated in head and neck cancer." *Genes Chromosomes Cancer* **27**(3): 332-336.
- Dai, W., Q. Wang, et al. (2004). "Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency." *Cancer Res* **64**(2): 440-445.
- Dalerba, P., R. W. Cho, et al. (2007). "Cancer stem cells: models and concepts." *Annu Rev Med* **58**: 267-284.

- Dalerba, P. and M. F. Clarke (2007). "Cancer stem cells and tumor metastasis: first steps into uncharted territory." *Cell Stem Cell* **1**(3): 241-242.
- Dalerba, P., S. J. Dylla, et al. (2007). "Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(24): 10158-10163.
- Date, D. A., C. J. Jacob, et al. (2007). "Borealin is repressed in response to p53/Rb signaling." *Cell Biol Int* **31**(12): 1470-1481.
- Davezac, N., V. Baldin, et al. (2002). "Human pEg3 kinase associates with and phosphorylates CDC25B phosphatase: a potential role for pEg3 in cell cycle regulation." *Oncogene* **21**(50): 7630-7641.
- de Bruin, R. A. and C. Wittenberg (2009). "All eukaryotes: before turning off G1-S transcription, please check your DNA." *Cell Cycle* **8**(2): 214-217.
- de la Barre, A. E., D. Angelov, et al. (2001). "The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensatio. *Embo J* **20**(22): 6383-93.
- De Souza, C. P., K. A. Ellem, et al. (2000). "Centrosomal and cytoplasmic Cdc2/cyclin B1 activation precedes nuclear mitotic events." *Exp Cell Res* **257**(1): 11-21.
- Delacour-Larose, M., A. Molla, et al. (2004). "Distinct dynamics of Aurora B and Survivin during mitosis." *Cell Cycle* **3**(11): 1418-1426.
- Delacour-Larose, M., M. N. Thi, et al. (2007). "Role of survivin phosphorylation by aurora B in mitosis." *Cell Cycle* **6**(15): 1878-1885.
- Delacour-Larose, M., H. L. Vu, et al. (2009). "Aurora B kinase, an immobile passenger!" *Cell Cycle* **8**(21): 3600-3601.
- Dent, R., M. Trudeau, et al. (2007). "Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence." *Clin Cancer Res* **13**(15 Pt 1): 4429-4434.
- Dessev, G., C. Iovcheva-Dessev, et al. (1991). "A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro." *J Cell Biol* **112**(4): 523-533.
- Dhanalakshmi, S., P. Agarwal, et al. (2003). "Silibinin sensitizes human prostate carcinoma DU145 cells to cisplatin- and carboplatin-induced growth inhibition and apoptotic death." *Int J Cancer* **106**(5): 699-705.
- Dieterich, K., R. Soto Rifo, et al. (2007). "Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility." *Nat Genet* **39**(5): 661-665.
- Ditchfield, C., V. L. Johnson, et al. (2003). "Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores." *J Cell Biol* **161**(2): 267-280.
- Dobles, M., V. Liberal, et al. (2000). "Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2." *Cell* **101**(6): 635-645.
- Dorer, R. K., S. Zhong, et al. (2005). "A small-molecule inhibitor of Mps1 blocks the spindle-checkpoint response to a lack of tension on mitotic chromosomes." *Curr Biol* **15**(11): 1070-1076.
- Draviam, V. M., S. Xie, et al. (2004). "Chromosome segregation and genomic stability." *Curr Opin Genet Dev* **14**(2): 120-125.
- Durocher, D. and S. P. Jackson (2002). "The FHA domain." *FEBS Lett* **513**(1): 58-66.
- Dutertre, S., M. Cazales, et al. (2004). "Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition." *J Cell Sci* **117**(Pt 12): 2523-2531.
- Eastman, A. (2004). "Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies." *J Cell Biochem* **91**(2): 223-231.
- Eckerdt, F., J. Yuan, et al. (2005). "Polo-like kinases and oncogenesis." *Oncogene* **24**(2): 267-276.
- Edelman, M. J., K. S. Bauer, Jr., et al. (2007). "Phase I and pharmacokinetic study of 7-hydroxystaurosporine and carboplatin in advanced solid tumors." *Clin Cancer Res* **13**(9): 2667-2674.
- Eramo, A., F. Lotti, et al. (2008). "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population." *Cell Death Differ* **15**(3): 504-514.
- Espeut, J., A. Gaussen, et al. (2008). "Phosphorylation relieves autoinhibition of the kinetochore motor Cenp-E." *Mol Cell* **29**(5): 637-643.
- Eves, E. M., P. Shapiro, et al. (2006). "Raf kinase inhibitory protein regulates aurora B kinase and the spindle checkpoint." *Mol Cell* **23**(4): 561-574.
- Feng, Y., J. H. Yuan, et al. (2006). "Polo-like kinase 1-mediated phosphorylation of the GTP-binding protein Ran is important for bipolar spindle formation." *Biochem Biophys Res Commun* **349**(1): 144-152.
- Fesquet, D., J. C. Labbe, et al. (1993). "The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues." *Embo J* **12**(8): 3111-3121.
- Finetti, P., N. Cervera, et al. (2008). "Sixteen-kinase gene expression identifies luminal breast cancers with poor prognosis." *Cancer Res* **68**(3): 767-776.
- Fischle, W., B. S. Tseng, et al. (2005). "Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation." *Nature* **438**(7071): 1116-1122.

- Flaig, T. W., L. J. Su, et al. (2007). "Silibinin synergizes with mitoxantrone to inhibit cell growth and induce apoptosis in human prostate cancer cells." *Int J Cancer* **120**(9): 2028-2033.
- Fracasso, P. M., K. J. Williams, et al. (2010). "A Phase 1 study of UCN-01 in combination with irinotecan in patients with resistant solid tumor malignancies." *Cancer Chemother Pharmacol*.
- Fukuda, S. and L. M. Pelus (2006). "Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues." *Mol Cancer Ther* **5**(5): 1087-1098.
- Gadea, B. B. and J. V. Ruderman (2006). "Aurora B is required for mitotic chromatin-induced phosphorylation of Op18/Stathmin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(12): 4493-4498.
- Gandhi, R., P. J. Gillespie, et al. (2006). "Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase." *Curr Biol* **16**(24): 2406-2417.
- Ganesh, S. K., K. Babu, et al. (2003). "Ocular filariasis due to Wuchereria bancrofti presenting as panuveitis: a case report." *Ocul Immunol Inflamm* **11**(2): 145-148.
- Garcia-Higuera, I., E. Manchado, et al. (2008). "Genomic stability and tumour suppression by the APC/C cofactor Cdh1." *Nat Cell Biol* **10**(7): 802-811.
- Garvalov, B. K. and T. Acker "Cancer stem cells: a new framework for the design of tumor therapies." *J Mol Med* **89**(2): 95-107.
- Gerullis, H., L. Bergmann, et al. (2009). "Experiences and practical conclusions concerning temsirolimus use and adverse event management in advanced renal cell carcinoma within a compassionate use program in Germany." *Cancer Chemother Pharmacol* **63**(6): 1097-1102.
- Giet, R., C. Petretti, et al. (2005). "Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link?" *Trends Cell Biol* **15**(5): 241-250.
- Gimenez-Abian, J. F., I. Sumara, et al. (2004). "Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms." *Curr Biol* **14**(13): 1187-1193.
- Giono, L. E. and J. J. Manfredi (2006). "The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints." *J Cell Physiol* **209**(1): 13-20.
- Goloudina, A., H. Yamaguchi, et al. (2003). "Regulation of human Cdc25A stability by Serine 75 phosphorylation is not sufficient to activate a S phase checkpoint." *Cell Cycle* **2**(5): 473-478.
- Gontarewicz, A., S. Balabanov, et al. (2008). "Simultaneous targeting of Aurora kinases and Bcr-Abl kinase by the small molecule inhibitor PHA-739358 is effective against imatinib-resistant BCR-ABL mutations including T315I." *Blood* **111**(8): 4355-4364.
- Goto, H., T. Kiyono, et al. (2006). "Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase transition." *Nat Cell Biol* **8**(2): 180-187.
- Goto, H., Y. Yasui, et al. (2003). "Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process." *J Biol Chem* **278**(10): 8526-8530.
- Goto, H., Y. Yasui, et al. (2002). "Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation." *Genes Cells* **7**(1): 11-17.
- Gray, P. J., Jr., D. J. Bearss, et al. (2004). "Identification of human polo-like kinase 1 as a potential therapeutic target in pancreatic cancer." *Mol Cancer Ther* **3**(5): 641-646.
- Gruss, O. J., M. Wittmann, et al. (2002). "Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells." *Nat Cell Biol* **4**(11): 871-879.
- Guan, R., P. Tapang, et al. (2005). "Small interfering RNA-mediated Polo-like kinase 1 depletion preferentially reduces the survival of p53-defective, oncogenic transformed cells and inhibits tumor growth in animals." *Cancer Res* **65**(7): 2698-2704.
- Gumireddy, K., M. V. Reddy, et al. (2005). "ON01910, a non-ATP-competitive small molecule inhibitor of Plk1, is a potent anticancer agent." *Cancer Cell* **7**(3): 275-286.
- Gunawardena, R. W., H. Siddiqui, et al. (2004). "Hierarchical requirement of SWI/SNF in retinoblastoma tumor suppressor-mediated repression of Plk1." *J Biol Chem* **279**(28): 29278-29285.
- Gutierrez, G. J., T. Tsuji, et al. (2010). "JNK-mediated phosphorylation of Cdc25C regulates cell cycle entry and G(2)/M DNA damage checkpoint." *J Biol Chem* **285**(19): 14217-14228.
- Hans, F. and S. Dimitrov (2001). "Histone H3 phosphorylation and cell division." *Oncogene* **20**(24): 3021-3027.
- Harris, M. A., H. Yang, et al. (2008). "Cancer stem cells are enriched in the side population cells in a mouse model of glioma." *Cancer Res* **68**(24): 10051-10059.
- Hata, T., T. Furukawa, et al. (2005). "RNA interference targeting aurora kinase suppresses tumor growth and enhances the taxane chemosensitivity in human pancreatic cancer cells." *Cancer Res* **65**(7): 2899-2905.
- Hauf, S., R. W. Cole, et al. (2003). "The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint." *J Cell Biol* **161**(2): 281-294.
- Hauf, S., E. Roitinger, et al. (2005). "Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2." *PLoS Biol* **3**(3): e69.

- Hayward, D. G. and A. M. Fry (2006). "Nek2 kinase in chromosome instability and cancer." *Cancer Lett* **237**(2): 155-166.
- Hickson, I., Y. Zhao, et al. (2004). "Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM." *Cancer Res* **64**(24): 9152-9159.
- Hirota, T., J. J. Lipp, et al. (2005). "Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin." *Nature* **438**(7071): 1176-1180.
- Hoang, T. M., B. Favier, et al. (2009). "Benzo[e]pyridoindoles, novel inhibitors of the aurora kinases." *Cell Cycle* **8**(5): 765-772.
- Hong-Lien VU, T. M. N. H., Bertrand FAVIER, Annie MOLLA (2010). "Aurora kinases and passenger proteins as targets for cancer therapy: an up-date." *Curr Enzyme Inhibition Volume 6* (Number 1): 19-25.
- Hotte, S. J., A. Oza, et al. (2006). "Phase I trial of UCN-01 in combination with topotecan in patients with advanced solid cancers: a Princess Margaret Hospital Phase II Consortium study." *Ann Oncol* **17**(2): 334-340.
- Hu, H. M., C. K. Chuang, et al. (2000). "Genomic organization, expression, and chromosome localization of a third aurora-related kinase gene, Aie1." *DNA Cell Biol* **19**(11): 679-688.
- Huck, J. J., M. Zhang, et al. (2010). "MLN8054, an inhibitor of Aurora A kinase, induces senescence in human tumor cells both in vitro and in vivo." *Mol Cancer Res* **8**(3): 373-384.
- Hummer, S. and T. U. Mayer (2009). "Cdk1 negatively regulates midzone localization of the mitotic kinesin Mklp2 and the chromosomal passenger complex." *Curr Biol* **19**(7): 607-612.
- Ignacio Pérez de Castro, G. d. C., Guillermo Montoya and Marcos Malumbres (2008). "Emerging cancer therapeutic opportunities by inhibiting mitotic kinases." *Curr Opin Pharmacology* **8**(4): 375-383.
- Ikezoe, T., J. Yang, et al. (2007). "A novel treatment strategy targeting Aurora kinases in acute myelogenous leukemia." *Mol Cancer Ther* **6**(6): 1851-1857.
- Inglis, K. J., D. Chereau, et al. (2009). "Polo-like kinase 2 (PLK2) phosphorylates alpha-synuclein at serine 129 in central nervous system." *J Biol Chem* **284**(5): 2598-2602.
- Jack, M. T., R. A. Woo, et al. (2002). "Chk2 is dispensable for p53-mediated G1 arrest but is required for a latent p53-mediated apoptotic response." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(15): 9825-9829.
- Jackson, J. R., D. R. Patrick, et al. (2007). "Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents?" *Nat Rev Cancer* **7**(2): 107-117.
- Jang, Y. J., C. Y. Lin, et al. (2002). "Functional studies on the role of the C-terminal domain of mammalian polo-like kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4): 1984-1989.
- Jazayeri, A., J. Falck, et al. (2006). "ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks." *Nat Cell Biol* **8**(1): 37-45.
- Jelluma, N., A. B. Brenkman, et al. (2008). "Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment." *Cell* **132**(2): 233-246.
- Jeyaprasath, A. A., U. R. Klein, et al. (2007). "Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together." *Cell* **131**(2): 271-285.
- Jiang, N., X. Wang, et al. (2006). "Advances in mitotic inhibitors for cancer treatment." *Mini Rev Med Chem* **6**(8): 885-895.
- Jimeno, A., M. A. Rudek, et al. (2008). "Phase I and pharmacokinetic study of UCN-01 in combination with irinotecan in patients with solid tumors." *Cancer Chemother Pharmacol* **61**(3): 423-433.
- Jobson, A. G., J. H. Cardellina, 2nd, et al. (2007). "Identification of a Bis-guanylhydrazone [4,4'-Diacetyldiphenylurea-bis(guanylhydrazone); NSC 109555] as a novel chemotype for inhibition of Chk2 kinase." *Mol Pharmacol* **72**(4): 876-884.
- Johnson, N., D. Cai, et al. (2009). "Cdk1 participates in BRCA1-dependent S phase checkpoint control in response to DNA damage." *Mol Cell* **35**(3): 327-339.
- Jones, S., F. A. Holmes, et al. (2009). "Docetaxel With Cyclophosphamide Is Associated With an Overall Survival Benefit Compared With Doxorubicin and Cyclophosphamide: 7-Year Follow-Up of US Oncology Research Trial 9735." *J Clin Oncol* **27**(8): 1177-1183.
- Jordan, M. A. and L. Wilson (2004). "Microtubules as a target for anticancer drugs." *Nat Rev Cancer* **4**(4): 253-265.
- Joshi, K. S., M. J. Rathos, et al. (2007). "In vitro antitumor properties of a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00." *Mol Cancer Ther* **6**(3): 918-925.
- Joshi, K. S., M. J. Rathos, et al. (2007). "P276-00, a novel cyclin-dependent inhibitor induces G1-G2 arrest, shows antitumor activity on cisplatin-resistant cells and significant in vivo efficacy in tumor models." *Mol Cancer Ther* **6**(3): 926-934.
- Kalitsis, P., E. Earle, et al. (2000). "Bub3 gene disruption in mice reveals essential mitotic spindle checkpoint function during early embryogenesis." *Genes Dev* **14**(18): 2277-2282.

- Kallio, M. J., M. L. McClelland, et al. (2002). "Inhibition of aurora B kinase blocks chromosome segregation, overrides the spindle checkpoint, and perturbs microtubule dynamics in mitosis." *Curr Biol* **12**(11): 900-905.
- Kanda, A., H. Kawai, et al. (2005). "Aurora-B/AIM-1 kinase activity is involved in Ras-mediated cell transformation." *Oncogene* **24**(49): 7266-7272.
- Kardassis, D., P. Papakosta, et al. (1999). "c-Jun transactivates the promoter of the human p21(WAF1/Cip1) gene by acting as a superactivator of the ubiquitous transcription factor Sp1." *J Biol Chem* **274**(41): 29572-29581.
- Katayama, H., W. R. Brinkley, et al. (2003). "The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis." *Cancer Metastasis Rev* **22**(4): 451-464.
- Katayama, H., K. Sasai, et al. (2004). "Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53." *Nat Genet* **36**(1): 55-62.
- Katayama, H., H. Zhou, et al. (2001). "Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle." *J Biol Chem* **276**(49): 46219-46224.
- Kawashima, S. A., Y. Yamagishi, et al. (2010). "Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin." *Science* **327**(5962): 172-177.
- Keen, N. and S. Taylor (2004). "Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents." *Nat Rev Cancer* **4**(12): 927-936.
- Kelly, A. E., C. Ghenoiu, et al. (2010). "Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B." *Science* **330**(6001): 235-239.
- Kienitz, A., C. Vogel, et al. (2005). "Partial downregulation of MAD1 causes spindle checkpoint inactivation and aneuploidy, but does not confer resistance towards taxol." *Oncogene* **24**(26): 4301-4310.
- Kim, G. Y., S. E. Mercer, et al. (2002). "The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21(Cip1) by phosphorylation." *J Biol Chem* **277**(33): 29792-29802.
- Kimmins, S., C. Crosio, et al. (2007). "Differential functions of the Aurora-B and Aurora-C kinases in mammalian spermatogenesis." *Mol Endocrinol* **21**(3): 726-739.
- Kinoshita, K., T. L. Noetzel, et al. (2005). "Aurora A phosphorylation of TACC3/maskin is required for centrosome-dependent microtubule assembly in mitosis." *J Cell Biol* **170**(7): 1047-1055.
- Kneisel, L., K. Strebhardt, et al. (2002). "Expression of polo-like kinase (PLK1) in thin melanomas: a novel marker of metastatic disease." *J Cutan Pathol* **29**(6): 354-358.
- Koff, A., F. Cross, et al. (1991). "Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family." *Cell* **66**(6): 1217-1228.
- Kojima, K., M. Shimanuki, et al. (2009). "Cyclin-dependent kinase 1 inhibitor RO-3306 enhances p53-mediated Bax activation and mitochondrial apoptosis in AML." *Cancer Sci* **100**(6): 1128-1136.
- Kops, G. J., D. R. Foltz, et al. (2004). "Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(23): 8699-8704.
- Kops, G. J., B. A. Weaver, et al. (2005). "On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint." *Nat Rev Cancer* **5**(10): 773-785.
- Kortmanský, J., M. A. Shah, et al. (2005). "Phase I trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor and protein kinase C inhibitor 7-hydroxystaurosporine in combination with Fluorouracil in patients with advanced solid tumors." *J Clin Oncol* **23**(9): 1875-1884.
- Kouranti, I., M. Sachse, et al. (2006). "Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis." *Curr Biol* **16**(17): 1719-1725.
- Kueng, S., B. Hegemann, et al. (2006). "Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin." *Cell* **127**(5): 955-967.
- Kuntz, K. and M. J. O'Connell (2009). "The G(2) DNA damage checkpoint: could this ancient regulator be the Achilles heel of cancer?" *Cancer Biol Ther* **8**(15): 1433-1439.
- Kurai, M., T. Shiozawa, et al. (2005). "Expression of Aurora kinases A and B in normal, hyperplastic, and malignant human endometrium: Aurora B as a predictor for poor prognosis in endometrial carcinoma." *Hum Pathol* **36**(12): 1281-1288.
- Kwiatkowski, N., N. Jelluma, et al. (2010). "Small-molecule kinase inhibitors provide insight into Mps1 cell cycle function." *Nat Chem Biol* **6**(5): 359-368.
- Lamb, N. J., A. Fernandez, et al. (1990). "Microinjection of p34cdc2 kinase induces marked changes in cell shape, cytoskeletal organization, and chromatin structure in mammalian fibroblasts." *Cell* **60**(1): 151-165.
- Lampson, M. A., K. Renduchitala, et al. (2004). "Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division." *Nat Cell Biol* **6**(3): 232-237.
- Landi, M. T., T. Dracheva, et al. (2008). "Gene expression signature of cigarette smoking and its role in lung adenocarcinoma development and survival." *PLoS One* **3**(2): e1651.

- Lapenna, S. and A. Giordano (2009). "Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer." *Nat Rev Drug Discov* **8**(7): 547-566.
- Lara, P. N., Jr., P. C. Mack, et al. (2005). "The cyclin-dependent kinase inhibitor UCN-01 plus cisplatin in advanced solid tumors: a California cancer consortium phase I pharmacokinetic and molecular correlative trial." *Clin Cancer Res* **11**(12): 4444-4450.
- Lee, H. J., H. I. Hwang, et al. (2010). "Mitotic DNA damage response: Polo-like Kinase-1 is dephosphorylated through ATM-Chk1 pathway." *Cell Cycle* **9**(12): 2389-2398.
- Lenart, P., M. Petronczki, et al. (2007). "The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1." *Curr Biol* **17**(4): 304-315.
- Lens, S. M., E. E. Voest, et al. (2010). "Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer." *Nat Rev Cancer* **10**(12): 825-841.
- Li, B., B. Ouyang, et al. (1996). "Prk, a cytokine-inducible human protein serine/threonine kinase whose expression appears to be down-regulated in lung carcinomas." *J Biol Chem* **271**(32): 19402-19408.
- Li, F. and X. Ling (2006). "Survivin study: an update of "what is the next wave"?" *J Cell Physiol* **208**(3): 476-486.
- Liedtke, C., C. Mazouni, et al. (2008). "Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer." *J Clin Oncol* **26**(8): 1275-1281.
- Lipp, J. J., T. Hirota, et al. (2007). "Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes." *J Cell Sci* **120**(Pt 7): 1245-1255.
- Littlepage, L. E. and J. V. Ruderman (2002). "Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit." *Genes Dev* **16**(17): 2274-2285.
- Liu, D., G. Vader, et al. (2009). "Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates." *Science* **323**(5919): 1350-1353.
- Liu, D., M. Vleugel, et al. (2010). "Regulated targeting of protein phosphatase 1 to the outer kinetochore by KNL1 opposes Aurora B kinase." *J Cell Biol* **188**(6): 809-820.
- Liu, P., L. R. Barkley, et al. (2006). "The Chk1-mediated S-phase checkpoint targets initiation factor Cdc45 via a Cdc25A/Cdk2-independent mechanism." *J Biol Chem* **281**(41): 30631-30644.
- Liu, X., M. Lei, et al. (2006). "Normal cells, but not cancer cells, survive severe Plk1 depletion." *Mol Cell Biol* **26**(6): 2093-2108.
- Lord, R. V., J. Brabender, et al. (2002). "Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer." *Clin Cancer Res* **8**(7): 2286-2291.
- Losada, A., M. Hirano, et al. (2002). "Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis." *Genes Dev* **16**(23): 3004-3016.
- Lu, Y. Y., T. S. Chen, et al. (2010). "The JNK inhibitor SP600125 enhances dihydroartemisinin-induced apoptosis by accelerating Bax translocation into mitochondria in human lung adenocarcinoma cells." *FEBS Lett* **584**(18): 4019-4026.
- Maciejowski, J., K. A. George, et al. (2010). "Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling." *J Cell Biol* **190**(1): 89-100.
- Macmillan, J. C., J. W. Hudson, et al. (2001). "Comparative expression of the mitotic regulators SAK and PLK in colorectal cancer." *Ann Surg Oncol* **8**(9): 729-740.
- Macurek, L., A. Lindqvist, et al. (2008). "Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery." *Nature* **455**(7209): 119-123.
- Malumbres, M. and M. Barbacid (2009). "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm." *Nat Rev Cancer* **9**(3): 153-166.
- Manfredi, M. G., J. A. Ecsedy, et al. (2007). "Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(10): 4106-4111.
- Maroto, B., M. B. Ye, et al. (2008). "P21-activated kinase is required for mitotic progression and regulates Plk1." *Oncogene* **27**(36): 4900-4908.
- Martin, B. T. and K. Strebhardt (2006). "Polo-like kinase 1: target and regulator of transcriptional control." *Cell Cycle* **5**(24): 2881-2885.
- Marumoto, T., S. Honda, et al. (2003). "Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells." *J Biol Chem* **278**(51): 51786-51795.
- Matthew, E. M., T. J. Yen, et al. (2007). "Replication stress, defective S-phase checkpoint and increased death in Plk2-deficient human cancer cells." *Cell Cycle* **6**(20): 2571-2578.
- McDermott, U. and J. Settleman (2009). "Personalized cancer therapy with selective kinase inhibitors: an emerging paradigm in medical oncology." *J Clin Oncol* **27**(33): 5650-5659.

- McGarry, T. J. and M. W. Kirschner (1998). "Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis." *Cell* **93**(6): 1043-1053.
- Mendoza, M., C. Norden, et al. (2009). "A mechanism for chromosome segregation sensing by the NoCut checkpoint." *Nat Cell Biol* **11**(4): 477-483.
- Meraldi, P., R. Honda, et al. (2004). "Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility." *Curr Opin Genet Dev* **14**(1): 29-36.
- Michel, L., E. Diaz-Rodriguez, et al. (2004). "Complete loss of the tumor suppressor MAD2 causes premature cyclin B degradation and mitotic failure in human somatic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(13): 4459-4464.
- Michel, L. S., V. Liberal, et al. (2001). "MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells." *Nature* **409**(6818): 355-359.
- Millikan, R. C., B. Newman, et al. (2008). "Epidemiology of basal-like breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* **109**(1): 123-139.
- Minoshima, Y., T. Kawashima, et al. (2003). "Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis." *Dev Cell* **4**(4): 549-560.
- Mizukami, Y., K. Kono, et al. (2008). "Detection of novel cancer-testis antigen-specific T-cell responses in TIL, regional lymph nodes, and PBL in patients with esophageal squamous cell carcinoma." *Cancer Sci* **99**(7): 1448-1454.
- Mross, K., A. Frost, et al. (2008). "Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of BI 2536, a novel Polo-like kinase 1 inhibitor, in patients with advanced solid tumors." *J Clin Oncol* **26**(34): 5511-5517.
- Murray, A. W. (2004). "Recycling the cell cycle: cyclins revisited." *Cell* **116**(2): 221-234.
- Myer, D. L., M. Bahassi el, et al. (2005). "The Plk3-Cdc25 circuit." *Oncogene* **24**(2): 299-305.
- Nadler, Y., R. L. Camp, et al. (2008). "Expression of Aurora A (but not Aurora B) is predictive of survival in breast cancer." *Clin Cancer Res* **14**(14): 4455-4462.
- Nakano, I., M. Masterman-Smith, et al. (2008). "Maternal embryonic leucine zipper kinase is a key regulator of the proliferation of malignant brain tumors, including brain tumor stem cells." *J Neurosci Res* **86**(1): 48-60.
- Neef, R., U. Gruneberg, et al. (2007). "Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1." *Nat Cell Biol* **9**(4): 436-444.
- Nguyen, C. H., E. Bisagni, et al. (1992). "Synthesis and antitumor properties of new 4-methyl-substituted-pyrido[4,3-b]indoles (gamma-carbolines)." *Anticancer Drug Des* **7**(3): 219-233.
- Nguyen, C. H., F. Lavelle, et al. (1992). "Further SAR in the new antitumor 1-amino-substituted gamma-carbolines and 5H-benzo[e]pyrido[4,3-b]indoles series." *Anticancer Drug Des* **7**(3): 235-251.
- Nigg, E. A. (2001). "Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(1): 21-32.
- Nigg, E. A. (2007). "Centrosome duplication: of rules and licenses." *Trends Cell Biol* **17**(5): 215-221.
- Nishida, N., T. Nagasaka, et al. (2007). "High copy amplification of the Aurora-A gene is associated with chromosomal instability phenotype in human colorectal cancers." *Cancer Biol Ther* **6**(4): 525-533.
- Nonaka, N., T. Kitajima, et al. (2002). "Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast." *Nat Cell Biol* **4**(1): 89-93.
- Nurse, P. (2002). "Cyclin dependent kinases and cell cycle control (nobel lecture)." *ChemBiochem* **3**(7): 596-603.
- Ohashi, S., G. Sakashita, et al. (2006). "Phospho-regulation of human protein kinase Aurora-A: analysis using anti-phospho-Thr288 monoclonal antibodies." *Oncogene* **25**(59): 7691-7702.
- Ohi, R., M. L. Coughlin, et al. (2003). "An inner centromere protein that stimulates the microtubule depolymerizing activity of a KinI kinesin." *Dev Cell* **5**(2): 309-321.
- Ohtsubo, M., A. M. Theodoras, et al. (1995). "Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2612-2624.
- Oshimori, N., M. Ohsugi, et al. (2006). "The Plk1 target Kizuna stabilizes mitotic centrosomes to ensure spindle bipolarity." *Nat Cell Biol* **8**(10): 1095-1101.
- Osmani, A. H., S. L. McGuire, et al. (1991). "Parallel activation of the NIMA and p34cdc2 cell cycle-regulated protein kinases is required to initiate mitosis in *A. nidulans*." *Cell* **67**(2): 283-291.
- Osmani, S. A., R. T. Pu, et al. (1988). "Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase." *Cell* **53**(2): 237-244.
- Ouyang, B., W. Li, et al. (1999). "The physical association and phosphorylation of Cdc25C protein phosphatase by Prk." *Oncogene* **18**(44): 6029-6036.
- Pagano, M., R. Pepperkok, et al. (1992). "Cyclin A is required at two points in the human cell cycle." *Embo J* **11**(3): 961-971.
- Pal, S. K. and J. Mortimer (2009). "Triple-negative breast cancer: novel therapies and new directions." *Maturitas* **63**(4): 269-274.

- Pandha, H. (2008). An open label phase II trial of BI 2536, a novel Plk1 inhibitor, in patients with metastatic hormone refractory prostate cancer (HRPC). 2008 ASCO Annual Meeting, J Clin Oncol. **26**.
- Pasquier, E., S. Honore, et al. (2006). "Microtubule-targeting agents in angiogenesis: where do we stand?" Drug Resist Updat **9**(1-2): 74-86.
- Peddibhotla, S., M. H. Lam, et al. (2009). "The DNA-damage effector checkpoint kinase 1 is essential for chromosome segregation and cytokinesis." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(13): 5159-5164.
- Peddibhotla, S. and J. M. Rosen (2009). "Chk1 and executing cell division to prevent genomic instability." Cell Cycle **8**(15): 2339-2342.
- Perez de Castro, I., G. de Carcer, et al. (2007). "A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy." Carcinogenesis **28**(5): 899-912.
- Perez, R. P., L. D. Lewis, et al. (2006). "Modulation of cell cycle progression in human tumors: a pharmacokinetic and tumor molecular pharmacodynamic study of cisplatin plus the Chk1 inhibitor UCN-01 (NSC 638850)." Clin Cancer Res **12**(23): 7079-7085.
- Peter, M., J. Nakagawa, et al. (1990). "In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase." Cell **61**(4): 591-602.
- Pilch, D. R., O. A. Sedelnikova, et al. (2003). "Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites." Biochem Cell Biol **81**(3): 123-129.
- Pines, J. and C. L. Rieder (2001). "Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression." Nat Cell Biol **3**(1): E3-6.
- Porter, L. A. and D. J. Donoghue (2003). "Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators." Prog Cell Cycle Res **5**: 335-347.
- Qi, W., Z. Tang, et al. (2006). "Phosphorylation- and polo-box-dependent binding of Plk1 to Bub1 is required for the kinetochore localization of Plk1." Mol Biol Cell **17**(8): 3705-3716.
- Raman, M., S. Earnest, et al. (2007). "TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage." Embo J **26**(8): 2005-2014.
- Reiter, R., P. Gais, et al. (2006). "Aurora kinase A messenger RNA overexpression is correlated with tumor progression and shortened survival in head and neck squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **12**(17): 5136-5141.
- Ren, B., H. Cam, et al. (2002). "E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints." Genes Dev **16**(2): 245-256.
- Resnick, T. D., D. L. Satinover, et al. (2006). "INCENP and Aurora B promote meiotic sister chromatid cohesion through localization of the Shugoshin MEI-S332 in Drosophila." Dev Cell **11**(1): 57-68.
- Resnitzky, D., M. Gossen, et al. (1994). "Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system." Mol Cell Biol **14**(3): 1669-1679.
- Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, et al. (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." Nature **445**(7123): 111-115.
- Roesch, A., M. Fukunaga-Kalabis, et al. (2010). "A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth." Cell **141**(4): 583-594.
- Roshak, A. K., E. A. Capper, et al. (2000). "The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase." Cell Signal **12**(6): 405-411.
- Ruchaud, S., M. Carmena, et al. (2007). "Chromosomal passengers: conducting cell division." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(10): 798-812.
- Sakakura, C., A. Hagiwara, et al. (2001). "Tumour-amplified kinase BTAK is amplified and overexpressed in gastric cancers with possible involvement in aneuploid formation." Br J Cancer **84**(6): 824-831.
- Salvatore, G., T. C. Nappi, et al. (2007). "A cell proliferation and chromosomal instability signature in anaplastic thyroid carcinoma." Cancer Res **67**(21): 10148-10158.
- Santaguida, S., A. Tighe, et al. (2010). "Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine." J Cell Biol **190**(1): 73-87.
- Sardon, T., I. Peset, et al. (2008). "Dissecting the role of Aurora A during spindle assembly." Embo J **27**(19): 2567-2579.
- Schmidt, M. and H. Bastians (2007). "Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs." Drug Resist Updat **10**(4-5): 162-181.
- Schmidt, M., Y. Budirahardja, et al. (2005). "Ablation of the spindle assembly checkpoint by a compound targeting Mps1." EMBO Rep **6**(9): 866-872.
- Schoffski, P. (2009). "Polo-like kinase (PLK) inhibitors in preclinical and early clinical development in oncology." Oncologist **14**(6): 559-570.
- Seeburg, D. P., M. Feliu-Mojer, et al. (2008). "Critical role of CDK5 and Polo-like kinase 2 in homeostatic synaptic plasticity during elevated activity." Neuron **58**(4): 571-583.
- Seeburg, D. P. and M. Sheng (2008). "Activity-induced Polo-like kinase 2 is required for homeostatic plasticity of hippocampal neurons during epileptiform activity." J Neurosci **28**(26): 6583-6591.

- Seki, A., J. A. Coppinger, et al. (2008). "Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry." *Science* **320**(5883): 1655-1658.
- Seomun, Y., J. T. Kim, et al. (2005). "Induction of p21Cip1-mediated G2/M arrest in H2O2-treated lens epithelial cells." *Mol Vis* **11**: 764-774.
- Sessa, F., M. Mapelli, et al. (2005). "Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin." *Mol Cell* **18**(3): 379-391.
- Shieh, S. Y., J. Ahn, et al. (2000). "The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites." *Genes Dev* **14**(3): 289-300.
- Shiloh, Y. (2003). "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity." *Nat Rev Cancer* **3**(3): 155-168.
- Simizu, S. and H. Osada (2000). "Mutations in the Plk gene lead to instability of Plk protein in human tumour cell lines." *Nat Cell Biol* **2**(11): 852-854.
- Singh, R. P., G. U. Mallikarjuna, et al. (2004). "Oral silibinin inhibits lung tumor growth in athymic nude mice and forms a novel chemocombination with doxorubicin targeting nuclear factor kappaB-mediated inducible chemoresistance." *Clin Cancer Res* **10**(24): 8641-8647.
- Sliedrecht, T., C. Zhang, et al. (2010). "Chemical genetic inhibition of Mps1 in stable human cell lines reveals novel aspects of Mps1 function in mitosis." *PLoS One* **5**(4): e10251.
- Sorrentino, R., S. Libertini, et al. (2005). "Aurora B overexpression associates with the thyroid carcinoma undifferentiated phenotype and is required for thyroid carcinoma cell proliferation." *J Clin Endocrinol Metab* **90**(2): 928-935.
- Soverini, S., S. Colarossi, et al. (2006). "Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia." *Clin Cancer Res* **12**(24): 7374-7379.
- Steegmaier, M., M. Hoffmann, et al. (2007). "BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo." *Curr Biol* **17**(4): 316-322.
- Steigemann, P., C. Wurzenberger, et al. (2009). "Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization." *Cell* **136**(3): 473-484.
- Stenoien, D. L., S. Sen, et al. (2003). "Dynamic association of a tumor amplified kinase, Aurora-A, with the centrosome and mitotic spindle." *Cell Motil Cytoskeleton* **55**(2): 134-146.
- Stevens, C., L. Smith, et al. (2003). "Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage." *Nat Cell Biol* **5**(5): 401-409.
- Stewart, S. and G. Fang (2005). "Destruction box-dependent degradation of aurora B is mediated by the anaphase-promoting complex/cyclosome and Cdh1." *Cancer Res* **65**(19): 8730-8735.
- Stolz, A., N. Ertych, et al. (2010). "The CHK2-BRCA1 tumour suppressor pathway ensures chromosomal stability in human somatic cells." *Nat Cell Biol* **12**(5): 492-499.
- Straight, A. F., A. Cheung, et al. (2003). "Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor." *Science* **299**(5613): 1743-1747.
- Strebhardt, K. (2010). "Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy." *Nat Rev Drug Discov* **9**(8): 643-660.
- Strebhardt, K. and A. Ullrich (2006). "Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **6**(4): 321-330.
- Sugimoto, K., T. Urano, et al. (2002). "Molecular dynamics of Aurora-A kinase in living mitotic cells simultaneously visualized with histone H3 and nuclear membrane protein importin alpha." *Cell Struct Funct* **27**(6): 457-467.
- Sugiyama, K., K. Sugiura, et al. (2002). "Aurora-B associated protein phosphatases as negative regulators of kinase activation." *Oncogene* **21**(20): 3103-3111.
- Sumara, I., J. F. Gimenez-Abian, et al. (2004). "Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles." *Curr Biol* **14**(19): 1712-1722.
- Sumara, I., E. Vorlaufer, et al. (2002). "The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase." *Mol Cell* **9**(3): 515-525.
- Syed, N., P. Smith, et al. (2006). "Transcriptional silencing of Polo-like kinase 2 (SNK/PLK2) is a frequent event in B-cell malignancies." *Blood* **107**(1): 250-256.
- Takahashi, T., B. Sano, et al. (2003). "Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers." *Cancer Sci* **94**(2): 148-152.
- Takai, H., K. Naka, et al. (2002). "Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription." *Embo J* **21**(19): 5195-5205.
- Takai, N., R. Hamanaka, et al. (2005). "Polo-like kinases (Plks) and cancer." *Oncogene* **24**(2): 287-291.
- Tanaka, T., M. Kimura, et al. (1999). "Centrosomal kinase AIK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast." *Cancer Res* **59**(9): 2041-2044.

- Tanaka, T. U., N. Rachidi, et al. (2002). "Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections." *Cell* **108**(3): 317-329.
- Thornton, T. M. and M. Rincon (2009). "Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival." *Int J Biol Sci* **5**(1): 44-51.
- Toji, S., N. Yabuta, et al. (2004). "The centrosomal protein Lats2 is a phosphorylation target of Aurora-A kinase." *Genes Cells* **9**(5): 383-397.
- Tokumitsu, Y., M. Mori, et al. (1999). "Prognostic significance of polo-like kinase expression in esophageal carcinoma." *Int J Oncol* **15**(4): 687-692.
- Toyoshima-Morimoto, F., E. Taniguchi, et al. (2002). "Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase." *EMBO Rep* **3**(4): 341-348.
- Toyoshima-Morimoto, F., E. Taniguchi, et al. (2001). "Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase." *Nature* **410**(6825): 215-220.
- Trinkle-Mulcahy, L., P. D. Andrews, et al. (2003). "Time-lapse imaging reveals dynamic relocalization of PP1gamma throughout the mammalian cell cycle." *Mol Biol Cell* **14**(1): 107-117.
- Tseng, T. C., S. H. Chen, et al. (1998). "Protein kinase profile of sperm and eggs: cloning and characterization of two novel testis-specific protein kinases (AIE1, AIE2) related to yeast and fly chromosome segregation regulators." *DNA Cell Biol* **17**(10): 823-833.
- Tsukahara, T., Y. Tanno, et al. (2010). "Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation." *Nature* **467**(7316): 719-723.
- Tsvetkov, L., X. Xu, et al. (2003). "Polo-like kinase 1 and Chk2 interact and co-localize to centrosomes and the midbody." *J Biol Chem* **278**(10): 8468-8475.
- Tyagi, A. K., R. P. Singh, et al. (2002). "Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G2-M arrest, and apoptosis." *Clin Cancer Res* **8**(11): 3512-3519.
- Uchiumi, T., D. L. Longo, et al. (1997). "Cell cycle regulation of the human polo-like kinase (PLK) promoter." *J Biol Chem* **272**(14): 9166-9174.
- Vagnarelli, P. and W. C. Earnshaw (2004). "Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events." *Chromosoma* **113**(5): 211-222.
- Vahdat, L. T., B. Pruitt, et al. (2009). "Phase II study of eribulin mesylate, a halichondrin B analog, in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane." *J Clin Oncol* **27**(18): 2954-2961.
- van de Weerd, B. C., M. A. van Vugt, et al. (2005). "Uncoupling anaphase-promoting complex/cyclosome activity from spindle assembly checkpoint control by deregulating polo-like kinase 1." *Mol Cell Biol* **25**(5): 2031-2044.
- van Vugt, M. A., A. K. Gardino, et al. (2010). "A mitotic phosphorylation feedback network connects Cdk1, Plk1, 53BP1, and Chk2 to inactivate the G(2)/M DNA damage checkpoint." *PLoS Biol* **8**(1): e1000287.
- van Vugt, M. A. and R. H. Medema (2005). "Getting in and out of mitosis with Polo-like kinase-1." *Oncogene* **24**(17): 2844-2859.
- van Vugt, M. A., B. C. van de Weerd, et al. (2004). "Polo-like kinase-1 is required for bipolar spindle formation but is dispensable for anaphase promoting complex/Cdc20 activation and initiation of cytokinesis." *J Biol Chem* **279**(35): 36841-36854.
- Vigneron, S., S. Prieto, et al. (2004). "Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom?" *Mol Biol Cell* **15**(10): 4584-4596.
- Vilmar, A. and J. B. Sorensen (2009). "Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) in platinum-based treatment of non-small cell lung cancer with special emphasis on carboplatin: a review of current literature." *Lung Cancer* **64**(2): 131-139.
- Vogel, C., C. Hager, et al. (2007). "Mechanisms of mitotic cell death induced by chemotherapy-mediated G2 checkpoint abrogation." *Cancer Res* **67**(1): 339-345.
- Wang, F., J. Dai, et al. (2010). "Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis." *Science* **330**(6001): 231-235.
- Wang, Q., S. Fan, et al. (1996). "UCN-01: a potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53." *J Natl Cancer Inst* **88**(14): 956-965.
- Wang, R., G. He, et al. (2007). "Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition." *Cell* **128**(6): 1119-1132.
- Warnke, S., S. Kemmler, et al. (2004). "Polo-like kinase-2 is required for centriole duplication in mammalian cells." *Curr Biol* **14**(13): 1200-1207.
- Weaver, B. A., A. D. Silk, et al. (2008). "Low rates of aneuploidy promote tumorigenesis while high rates of aneuploidy cause cell death and tumor suppression." *Cell Oncol* **30**(5): 453.

- Welch, S., H. W. Hirte, et al. (2007). "UCN-01 in combination with topotecan in patients with advanced recurrent ovarian cancer: a study of the Princess Margaret Hospital Phase II consortium." Gynecol Oncol **106**(2): 305-310.
- Wittmann, T., M. Wilm, et al. (2000). "TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization." J Cell Biol **149**(7): 1405-1418.
- Wolf, G., R. Hildenbrand, et al. (2000). "Polo-like kinase: a novel marker of proliferation: correlation with estrogen-receptor expression in human breast cancer." Pathol Res Pract **196**(11): 753-759.
- Wong, O. K. and G. Fang (2007). "Cdk1 phosphorylation of BubR1 controls spindle checkpoint arrest and Plk1-mediated formation of the 3F3/2 epitope." J Cell Biol **179**(4): 611-617.
- Wu, X. and J. Chen (2003). "Autophosphorylation of checkpoint kinase 2 at serine 516 is required for radiation-induced apoptosis." J Biol Chem **278**(38): 36163-36168.
- Wu, Z. H., Y. Shi, et al. (2006). "Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli." Science **311**(5764): 1141-1146.
- Xie, S., H. Wu, et al. (2001). "Plk3 functionally links DNA damage to cell cycle arrest and apoptosis at least in part via the p53 pathway." J Biol Chem **276**(46): 43305-43312.
- Xu, H. T., L. Ma, et al. (2006). "Expression of serine threonine kinase 15 is associated with poor differentiation in lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma." Pathol Int **56**(7): 375-380.
- Xu, X., L. M. Tsvetkov, et al. (2002). "Chk2 activation and phosphorylation-dependent oligomerization." Mol Cell Biol **22**(12): 4419-4432.
- Yamagishi, Y., T. Honda, et al. (2010). "Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation." Science **330**(6001): 239-243.
- Yamashiro, S., Y. Yamakita, et al. (2008). "Myosin phosphatase-targeting subunit 1 regulates mitosis by antagonizing polo-like kinase 1." Dev Cell **14**(5): 787-797.
- Yang, Z. F., D. W. Ho, et al. (2008). "Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer." Cancer Cell **13**(2): 153-166.
- Young, M. A., N. P. Shah, et al. (2006). "Structure of the kinase domain of an imatinib-resistant Abl mutant in complex with the Aurora kinase inhibitor VX-680." Cancer Res **66**(2): 1007-1014.
- Yu, H. (2006). "Structural activation of Mad2 in the mitotic spindle checkpoint: the two-state Mad2 model versus the Mad2 template model." J Cell Biol **173**(2): 153-157.
- Yuan, J., H. Lv, et al. (2009). "Role of BCRP as a biomarker for predicting resistance to 5-fluorouracil in breast cancer." Cancer Chemother Pharmacol **63**(6): 1103-1110.
- Zachos, G., E. J. Black, et al. (2007). "Chk1 is required for spindle checkpoint function." Dev Cell **12**(2): 247-260.
- Zhang, D., T. Hirota, et al. (2004). "Cre-loxP-controlled periodic Aurora-A overexpression induces mitotic abnormalities and hyperplasia in mammary glands of mouse models." Oncogene **23**(54): 8720-8730.
- Zhang, W., X. Wang, et al. (2009). "[Efficacy of rituximab therapy on diffuse large B-cell lymphoma with different Fcgamma RIIIA gene polymorphisms: a prospective study]." Zhonghua Yi Xue Za Zhi **89**(6): 400-402.
- Zhang, X., S. C. Ems-McClung, et al. (2008). "Aurora A phosphorylates MCAK to control ran-dependent spindle bipolarity." Mol Biol Cell **19**(7): 2752-2765.
- Zhong, J., L. C. Gavrilescu, et al. (2009). "GCK is essential to systemic inflammation and pattern recognition receptor signaling to JNK and p38." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(11): 4372-4377.
- Zimmerman, W. C. and R. L. Erikson (2007). "Polo-like kinase 3 is required for entry into S phase." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(6): 1847-1852.