



HAL
open science

Caractérisation d'un nouveau composé pharmacologique qui potentialise la réponse des cellules au paclitaxel (Taxol®)

Lauralie Peronne

► **To cite this version:**

Lauralie Peronne. Caractérisation d'un nouveau composé pharmacologique qui potentialise la réponse des cellules au paclitaxel (Taxol®). Biologie du développement. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAV003 . tel-02628502

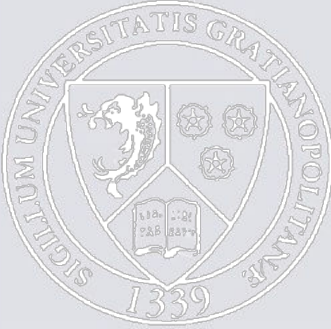
HAL Id: tel-02628502

<https://theses.hal.science/tel-02628502v1>

Submitted on 26 May 2020

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

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



THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie du développement - Oncogénèse**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Lauralie PERONNE

Thèse dirigée par **Laurence LAFANECHERE**

préparée au sein de l'équipe **Régulation et Pharmacologie du cytosquelette** de l'Institut pour l'Avancée des Biosciences dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Caractérisation d'un nouveau composé pharmacologique qui potentialise la réponse des cellules au paclitaxel

Thèse soutenue publiquement le **31 janvier 2019**,
devant le jury composé de :

Madame Clara Nahmias

Directrice de Recherche, Institut Gustave Roussy,
Rapporteur

Monsieur Ali Badache

Directeur de Recherche, Centre de recherche en Cancérologie de
Marseille, Rapporteur

Monsieur Patrick Dallemagne

Professeur des Universités, Université de Caen Normandie,
Examineur

Madame Sylvie Gazzeri

Directrice de Recherche, Institut pour l'Avancée des Biosciences,
Présidente du jury

Madame Laurence Lafanechère

Directeur de Recherche, Institut pour l'Avancée des Biosciences,
Directrice de thèse

L. PERONNE, 2019

Les expériences conduites au cours de ma thèse ont été réalisées à l'Institut pour l'Avancée des Biosciences, Grenoble, France.

Mon financement de thèse a été assuré par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche français.

Remerciements

Les travaux qui sont présentés ici ont été réalisés au sein de l'équipe « Régulation et pharmacologie du cytosquelette », dirigée par Laurence Lafanechère.

Je tiens dans un premier temps à remercier les membres de mon jury de thèse :

Merci à Ali Badache et Clara Nahmias d'avoir accepté d'évaluer et de critiquer mes travaux de thèse.

Merci à Patrick Dallemagne d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour sa participation au projet.

Merci à Sylvie Gazzeri d'avoir accepté d'être présidente de mon jury de thèse.

Enfin, je tiens à remercier particulièrement ma directrice de thèse Laurence Lafanechère. Laurence, merci d'avoir mis votre confiance en moi, dès le début de cette aventure lors de la préparation au concours de l'EDCSV. J'ai pu apprécier votre bienveillance et votre optimisme durant ces années. Merci de m'avoir soutenu, encouragé et pour tout ce que vous m'avez appris durant cette thèse.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse :

Merci à Annie Molla, Marc Blondel et Annie Andrieux de m'avoir conseillé tout au long de mes travaux de thèse.

Un grand merci aux membres de mon équipe :

Merci à l'ensemble de mon équipe pour leur bonne humeur ! Merci Karin pour ta gentillesse et tes conseils au cours de ma thèse. Sophie et Clotilde, merci pour votre aide et pour nos discussions au café le matin. Merci Anne-Sophie pour tes nombreux encouragements. Un grand merci à Sacnicté qui m'a beaucoup encouragé, appris (sur la téquila aussi) et aidé au cours de ma thèse. C'est avec toi que j'ai appris qu'une extraction de tubuline ne se faisait pas un lendemain de soirée...

Merci à Renaud Prudent, pour ses nombreux conseils au cours de ma thèse.

Merci aux membres de l'équipe Guilly :

Merci à Lydia, Sandrine, Monica, Nejnej, Julien et Christophe pour vos encouragements, votre sourire et votre bonne humeur.

Un grand merci aux membres de la plateforme Optimale :

Merci à Véronique pour ses conseils au cours de la mise en place des expériences sur petit animal. Merci à Maxime, Mélanie et Julien qui m'ont beaucoup appris sur l'expérimentation animale. Merci à eux d'avoir pris le temps de m'aider, toujours avec le sourire et la bonne humeur.

Un grand merci à la plateforme de microscopie de l'IAB :

Merci à Mylène, Jacques et Alexei pour leur aide et leur patience au cours des formations que j'ai effectué.

Un grand merci aux chimistes du CERMN de Caen :

Merci pour votre implication dans le projet. Merci à Peggy Suzanne pour son aide et sa réactivité.

Un grand merci aux membres de l'équipe d'Annie Andrieux au GIN :

Un grand merci à vous de m'avoir si bien accueillie lors de mon arrivée et pendant l'écriture de ma thèse. Cela a été un réel plaisir de discuter avec vous durant les petits déjeuners, les vendredis bières et les nombreuses soirées auxquelles j'ai été conviée. Vos conseils et vos encouragements m'ont permis d'avancer avec le sourire.

Un grand merci à Christian Delphin pour ses conseils. Christian, j'ai vraiment apprécié ton aide et ton expertise au cours des manip d'extraction de tubuline et de TIRF. Tu n'as pas hésité à nous prêter le matériel dont nous avons besoin et je t'en suis très reconnaissante.

Un grand merci également à Eric Denarier. Eric, j'ai eu la chance de pouvoir travailler avec toi durant ma thèse et cela a été un vrai plaisir. J'ai beaucoup appris en ta présence, notamment sur *Saccharomyces cerevisiae* (levure très importante !). Merci pour ta sympathie, ton dynamisme et pour l'ensemble de tes conseils au cours de cette thèse.

Un grand merci également aux membres de l'équipe d'Isabelle Arnal au GIN :

Un merci particulier à Isabelle Arnal pour son soutien technique et ses nombreux conseils.

Un grand merci à nos collaborateurs :

Merci à Fernando Diaz de nous avoir si bien accueillies Laurence et moi à Madrid et pour son implication dans le projet. Merci à Anna Akhmanova et à Ankit Rai pour leur aide et pour les expériences qu'ils mènent actuellement sur notre projet.

Un grand merci à mes amis :

Claire, merci d'avoir toujours été présente pour moi durant toutes ces années et ce, malgré la distance. Merci pour tes conseils et tes nombreux encouragements.

Anca, tu as été la première personne avec laquelle je me suis liée d'amitié à Grenoble. Merci pour les moments passés ensemble à l'IAB mais également en dehors. Merci pour ton sourire et ta gentillesse !

Sophie, j'ai eu le plaisir de te rencontrer peu après mon arrivée sur Grenoble. Merci d'avoir été présente au cours de cette aventure qu'est la thèse et merci pour tes encouragements.

Justin, merci de m'avoir si bien accueillie chez toi. Merci pour ta bonne humeur et tes petits plats qui m'ont donné des forces pour aller jusqu'au bout de ma thèse.

Un merci particulier à Benoit :

Benoit, j'ai eu la chance de te rencontrer au cours de ma thèse. Quitter le Nord et ma famille pour débiter ma thèse à Grenoble n'a pas toujours été facile, surtout dans les moments de stress. Tu as su être présent et trouver les mots qu'il fallait pour m'encourager et m'aider à poursuivre avec le sourire. Un très grand merci !

Un grand merci à ma famille :

Merci à ma grande famille du Nord ! J'ai eu l'énorme chance de grandir parmi vos encouragements, vos sourires et votre bonne humeur.

Un très grand merci à ma sœur, Laureen, qui a toujours pris le temps de venir me tenir compagnie à Grenoble. Ta présence, ta bonne humeur et ton sourire m'ont permis d'aller au bout de cette aventure. Tu m'as toujours encouragé et je ne te remercierais jamais assez !

Un merci très particulier à mes parents, sans qui je ne serais certainement pas là aujourd'hui. Vous avez toujours su m'encourager et me pousser dans mes projets d'études et dans la vie. C'est votre confiance en moi et la fierté que je peux lire dans vos yeux qui m'ont permis d'aller chaque jour un peu plus loin. De simples mots ne suffiraient pas à décrire la gratitude que j'éprouve à votre égard.

Je terminerais avec une énorme pensée pour mon grand-père, parti trop tôt, qui me répétait constamment « ma tiote fil', écoutes tin papi. Les études, c'est important. Continues tant qu'tu peux, ce sont les plus belles années d'ta vie ». C'est en terminant les miennes que je me rends compte à quel point il avait raison...

Avant-Propos

Les premiers textes décrivant le cancer remontent à l'Égypte ancienne. Le plus ancien texte connu à ce jour semble être un papyrus chirurgical traduit par Edwin Smith, qui daterait de 2800 avant J-C, décrivant des ulcérations et des tumeurs du sein traitées par cautérisation.

C'est durant l'antiquité, qu'Hippocrate donne pour la première fois le nom de « cancer » à cette pathologie. Les Asclépiades, médecins grecs auxquels se rattachait Hippocrate, avaient en effet remarqué que les prolongements des tumeurs, lorsqu'elles touchaient les tissus voisins, pouvaient - notamment sur les blanches poitrines - faire apparaître des vaisseaux sanguins dont le dessin faisait penser aux pinces d'un crabe. D'où la comparaison avec le *karkinos* en grec, l'écrevisse ou le crabe, le *cancre* ou cancer.

Longtemps, le cancer a été considéré comme une maladie complexe et incurable. En 1320, en France, Henri de Mondeville écrivait : « aucun cancer ne guérit, à moins d'être radicalement extirpé tout entier. En effet, si peu qu'il en reste, la malignité augmente dans la racine ». Ce n'est qu'au 19^{ème} siècle qu'un pathologiste Allemand, Rudolf Virchow, énonce la théorie cellulaire du cancer et propose la notion de « maladie cellulaire ». Cette découverte permet de mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués et dérégulés dans le cancer, et de chercher à mettre au point de nouveaux traitements. C'est également durant ce siècle qu'apparaissent les techniques d'anesthésie et d'asepsie, qui améliorent les interventions chirurgicales. Puis, en 1895, Röntgen découvre les rayons X, à l'origine du développement des premières radiothérapies du cancer au début du 20^{ème} siècle. Quant à la chimiothérapie, elle apparaît dans les années 1940 grâce à la découverte des effets thérapeutiques des dérivés du gaz moutarde. On trouve alors, dans les années 1950, les premières substances chimiques s'opposant à la division cellulaire. Les premières chimiothérapies du cancer du sein apparaîtront en 1960. Depuis, de nouvelles stratégies ont vu le jour comme par exemple l'immunothérapie et les thérapies ciblées.

Aujourd'hui, malgré l'amélioration des techniques de diagnostic, des prises en charge des patients et de l'arsenal thérapeutique, le cancer reste la cause principale de mortalité précoce chez l'Homme. À l'origine de cette mortalité, on observe le développement de mécanismes de résistance des cellules cancéreuses ainsi que l'apparition de métastases. De plus, l'apparition d'effets secondaires induits par les chimiothérapies réduit la fenêtre thérapeutique et

complexifie l'utilisation des molécules antiprolifératives. La recherche de nouveaux traitements contre le cancer reste un enjeu majeur.

TABLES DES MATIERES

AVANT-PROPOS	- I -
LISTE DES PUBLICATIONS, DES COMMUNICATIONS ET DES FORMATIONS	- 5 -
TABLE DES FIGURES	- 6 -
TABLE DES TABLEAUX	- 10 -
LISTE DES ABBREVIATIONS	- 11 -
INTRODUCTION	- 13 -
I. Le cancer : généralités et traitements	- 14 -
I.1 Généralités	- 14 -
I.2 Qu'est qu'un cancer ?	- 14 -
<i>I.2.1 Caractéristiques du cancer</i>	- 15 -
<i>I.2.2 Le cycle cellulaire et sa régulation</i>	- 17 -
I.3 Les traitements anticancéreux	- 21 -
<i>I.3.1 La chirurgie</i>	- 21 -
<i>I.3.2. La radiothérapie</i>	- 22 -
<i>I.3.3. Les traitements médicamenteux (chimiothérapie)</i>	- 22 -
II. Les microtubules	- 28 -
II.1 Structure des microtubules	- 28 -
<i>II.1.1 Structure générale</i>	- 28 -
<i>II.1.2 Les tubulines</i>	- 29 -
II.2. La dynamique des microtubules	- 36 -
<i>II.2.1 Cinétique d'assemblage et désassemblage des microtubules in vitro</i>	- 36 -
<i>II.2.2 Cinétique d'assemblage et désassemblage des microtubules in vivo</i>	- 41 -
<i>II.2.3 Les protéines associées aux microtubules</i>	- 45 -
II.3 Rôle des microtubules dans les cellules	- 49 -
<i>II.3.1 Organisation et rôle des microtubules en interphase</i>	- 49 -
<i>II.3.2 Organisation et rôle des microtubules en mitose</i>	- 50 -
III. Les poisons du fuseau	- 56 -
III.1 Généralités	- 56 -
III.2 Fixation des MTAs sur la tubuline	- 57 -
<i>III.2.1 Sites de fixation des MDAs</i>	- 58 -
<i>III.2.2 Sites de fixation des MSAs</i>	- 63 -
III.3 Mécanisme d'action des MTAs	- 66 -
<i>III.3.1 Effets des MTAs sur la dynamique des microtubules in vitro</i>	- 67 -

III.3.2 Effets des MTAs sur la dynamique des microtubules dans les cellules	- 68 -
III.3.3 Effets antimitotiques des MTAs	- 70 -
III.4 Utilisation clinique des MTAs	- 73 -
III.4.1 Les MTAs en chimiothérapie	- 73 -
III.4.2 Mécanisme d'action des MTAs dans les tumeurs	- 73 -
III.4.3 Toxicité des MTAs	- 78 -
III.5 Mécanismes de résistance aux MTAs	- 79 -
III.5.1 Altération de la cible des MTAs	- 80 -
III.5.2 Surexpression des pompes d'efflux membranaires	- 83 -
III.5.3 Altérations de protéines associées aux microtubules	- 83 -
III.5.4 Autres mécanismes de résistance	- 84 -
III.6 Combinaison de drogues	- 84 -
OBJECTIFS	- 87 -
<hr/>	
MATERIELS ET METHODES	- 89 -
<hr/>	
RESULTATS	- 101 -
<hr/>	
1. Identification du composé carba1	- 102 -
1.1 Choix de la banque de molécules à cribler	- 102 -
1.2 Criblage chimique en létalité synthétique	- 103 -
1.3 Sélection du carbazole le plus efficace	- 104 -
1.3.1 Effets des dérivés de carbazole sur la viabilité des cellules HeLa	- 104 -
1.3.2 Effets de la combinaison carbazole/paclitaxel sur la viabilité des cellules HeLa	- 106 -
1.3.3 Synergie entre le composé carba1 et le paclitaxel	- 109 -
2. Analyse des effets de la combinaison carba1/PTX dans les cellules	- 110 -
2.1 Effets de la combinaison carba1/PTX sur les différentes phases du cycle cellulaire	- 110 -
2.1.1 Carba1/PTX bloque les cellules en phase G2/M	- 110 -
2.1.2 Carba1/PTX cause l'apparition de fuseaux mitotiques anormaux	- 111 -
2.1.3 Carba1/PTX favorise l'apoptose des cellules	- 114 -
2.2 Comparaison des effets de carba1/PTX à ceux causés par carba1 et le paclitaxel à des concentrations cytotoxiques	- 115 -
2.2.1 Des concentrations cytotoxiques de carba1 et de paclitaxel causent un arrêt des cellules en phase G2/M	- 115 -
2.2.2 Carba1 accentue les effets du paclitaxel dans les cellules	- 117 -
3. Recherche de la cible du composé carba1	- 119 -
3.1 Carba1 n'altère pas le réseau de microtubules en interphase	- 119 -
3.2 Effets de carba1 sur un ensemble de kinases	- 120 -
3.3 Recherche de cibles potentielles de carba1 par criblage génétique chez la levure	- 121 -
3.3.1 Carba1 potentialise les effets du paclitaxel dans la levure	- 121 -
3.3.2 Criblage génétique chez la levure	- 122 -
3.3.3 Cible(s) potentielle(s) de carba1	- 124 -
3.4 Effets de carba1 sur la tubuline <i>in vitro</i>	- 125 -

3.4.1 Carba1 est un agent dépolymérisant les microtubules	- 125 -
3.4.2 Carba1 se fixe sur ou à proximité du site colchicine	- 126 -
3.4.3 Carba1 diminue la vitesse de croissance des microtubules	- 127 -
4. Analyse du mécanisme d'action de la combinaison carba1/PTX	- 129 -
4.1 Analyse des effets de carba1/PTX sur l'instabilité dynamique des microtubules dans les cellules	- 129 -
4.2 Analyse des effets de carba1/PTX sur la cinétique d'assemblage de la tubuline <i>in vitro</i>	- 130 -
5. Analyse de l'efficacité thérapeutique de la combinaison carba1/PTX	- 132 -
5.1 Analyse de la toxicité de carba1	- 132 -
5.1.1 Analyse de la cytotoxicité de carba1 sur différentes lignées cancéreuses humaines	- 132 -
5.1.2 Analyse de la toxicité de carba1 sur modèle animal	- 133 -
5.2 Analyse de l'efficacité anti-tumorale de la combinaison carba1/PTX dans un modèle murin	- 134 -
5.2.1 Description et caractéristiques du modèle animal utilisé	- 135 -
5.2.2 Posologie de carba1 et du paclitaxel <i>in vivo</i>	- 136 -
5.2.3 Effets carba1/PTX sur un modèle de cancer mammaire murin agressif, essai 1	- 136 -
5.2.4 Effets carba1/PTX sur un modèle de cancer mammaire murin agressif, essai 2	- 140 -
<u>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u>	- 145 -
<u>CONCLUSION</u>	- 161 -
<u>ANNEXE 1</u>	- 163 -
<u>ANNEXE 2</u>	- 169 -
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	- 173 -

Liste des publications, des communications et des formations

Publications

A novel derivative carbazole that targets the tubulin colchicine binding site and synergizes with paclitaxel. (En cours de rédaction).

Communications

2017 : Présentation d'un Poster à l'ASCB EMBO (Philadelphie)

2017 : Présentation orale lors du congrès nationale France microtubule (Versaille)

2017 : Présentation orale lors de la journée annuelle des doctorants (UGA)

2016 et 2017 : Présentation d'un Poster au CLARA (Cancéropôle Lyon Auvergne-Rhône-Alpes)

Formations

Obtention du Label RES (Recherche et Enseignement) : 120h

Diplôme expérimentation animale de niveau 1 et 2

Table des figures

Figure 1. Les étapes de la cancérisation.....	15
Figure 2. Les caractéristiques de la cellule cancéreuse.....	16
Figure 3. Les étapes de la mitose	18
Figure 4. Régulation du cycle cellulaire	19
Figure 5. Mécanisme du checkpoint mitotique.....	20
Figure 6. Structure d'un microtubule et de ses sous-unités	29
Figure 7. Alignement des séquences primaires des tubulines α et β	30
Figure 8. Structure tridimensionnelle de l'hétérodimère de tubuline α et β	31
Figure 9. Les domaines fonctionnels des tubulines α et β	32
Figure 10. Localisation des modifications post-traductionnelles des tubulines α et β	35
Figure 11. Représentation schématique de la polymérisation des microtubules <i>in vitro</i>	36
Figure 12. Mécanisme de nucléation des microtubules <i>in vitro</i>	37
Figure 13. Coiffe de GTP à l'extrémité croissante des microtubules	38
Figure 14. Instabilité dynamique des microtubules	39
Figure 15. Représentation schématique du processus de tapis roulant.....	40
Figure 16. Technique permettant de mesurer la dynamique des microtubules <i>in vitro</i>	41
Figure 17. Mécanisme de nucléation des microtubules <i>in vivo</i>	42
Figure 18. Nucléation à partir des COMT centrosomaux.....	43
Figure 19. Nucléation à partir des COMT non-centrosomaux.....	43
Figure 20. Technique du plus end tracking.....	45
Figure 21. Régulation négative des protéines EBs par des MAPs structurales	48
Figure 22. Organisation du réseau de microtubules dans les cellules en interphase	49
Figure 23. Représentation schématique du transport intracellulaire par les kinésines et les dynéines.....	50
Figure 24. Organisation des microtubules au cours de la mitose.....	51
Figure 25. Composition du fuseau mitotique.....	51
Figure 26. Représentation schématique de l'alignement des chromosomes par des protéines motrices	53
Figure 27. Représentation schématique du mécanisme DCP	53

Figure 28. Représentation schématique des différentes configurations d'attachement des kinétochores aux microtubules du fuseau mitotique	54
Figure 29. Sites de fixation des MTAs sur la tubuline.....	57
Figure 30. Fixation des MDAs sur le site colchicine.....	59
Figure 31. Fixation des MDAs sur le site vinca.....	60
Figure 32. Fixation des MDAs sur le site maytansine	62
Figure 33. Fixation des MDAs sur le site pironétine	63
Figure 34. Fixation des MSAs sur le site taxane.....	64
Figure 35. Mode d'action du paclitaxel	65
Figure 36. Fixation des MSAs sur le site laulimalide/péloruside	66
Figure 37. Effets du paclitaxel sur l'assemblage des microtubules <i>in vitro</i>	67
Figure 38. Effets de la vinblastine sur l'assemblage des microtubules <i>in vitro</i>	68
Figure 39. Effets des MTAs à forte concentration dans les cellules.....	69
Figure 40. Effets des MTAs sur le réseau de microtubules	70
Figure 41. Effets du paclitaxel sur le fuseau mitotique.....	71
Figure 42. À faible concentration, le paclitaxel détruit les cellules tumorales en induisant des divisions multipolaires.....	72
Figure 43. Représentation schématique des phénotypes mitotiques les plus observés dans les cellules traitées avec des MDAs	72
Figure 44. Mécanismes d'action potentiels du paclitaxel sur les cellules tumorales.....	75
Figure 45. Les microtubules dans les neurones	79
Figure 46. Alignement des séquences des régions riches en leucine de la tubuline β humaine.....	82
Figure 47. Modification de la taille du site taxane de la tubuline β III.....	82
Figure 48. Mécanisme d'action des transporteurs de la famille ABC	83
Figure 49. Effets du paclitaxel sur la viabilité des cellules HeLa.....	103
Figure 50. Principe du criblage pour l'identification de composés potentialisateurs de l'effet du paclitaxel	103
Figure 51. Dérivés de carbazole issus du criblage.....	104
Figure 52. Effets des dérivés de carbazole sur la viabilité des cellules HeLa	105
Figure 53. Analyse de la sensibilisation des cellules au paclitaxel par les dérivés de carbazole sélectionnés à l'issue du criblage	108
Figure 54. Réduction de l'IC ₅₀ du paclitaxel en présence de T4, T21, T30 et T32.....	109
Figure 55. Synergie entre le composé carba1 et le paclitaxel.....	110

Figure 56. Caractérisation des effets de carba1/PTX sur la progression du cycle cellulaire.....	111
Figure 57. Carba1/PTX bloque les cellules en prométaphase et provoque l'apparition de cellules aneuploïdes et/ou plurinucléées.....	113
Figure 58. Carba1/PTX favorise la mort des cellules par apoptose.....	115
Figure 59. Caractérisation des effets de carba1 et du paclitaxel à forte concentration sur le cycle cellulaire	116
Figure 60. Effets de carba1 et du paclitaxel à forte concentration sur les cellules en mitose.....	118
Figure 61. Effets de carba1 sur le réseau microtubulaire des cellules HeLa	120
Figure 62. Effets de carba1 sur un ensemble de kinases.....	121
Figure 63. Effets de carba1, du paclitaxel et d'une combinaison de carba1/PTX sur la viabilité des levures.....	122
Figure 64. Localisation de CENP-E en présence de carba1	125
Figure 65. Carba1 inhibe la polymérisation des microtubules.....	126
Figure 66. Carba1 se fixe sur ou à proximité du site colchicine.....	127
Figure 67. Effets de carba1 sur les paramètres d'instabilité dynamique <i>in vitro</i>	128
Figure 68. Effets de carba1/PTX sur les paramètres d'instabilité dynamique dans les cellules	130
Figure 69. Effets de carba1/PTX sur l'assemblage des microtubules <i>in vitro</i>	131
Figure 70. Cytotoxicité de carba1 sur des lignées cancéreuses humaines	133
Figure 71. Analyse de la toxicité de carba1 grâce à un modèle de xénogreffes sur membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet	134
Figure 72. Sensibilisation des cellules 4T1rvluc2 au paclitaxel par carba1	136
Figure 73. Schéma expérimental du modèle d'allogreffes de cellules 4T1rvluc2, utilisé pour tester l'efficacité anti-tumorale de carba1/PTX, lors du premier essai	137
Figure 74. Effets de carba1/PTX sur la croissance tumorale, essai 1	138
Figure 75. Effets de carba1/PTX sur l'évolution métastatique.....	139
Figure 76. Schéma expérimental du modèle d'allogreffes de cellules 4T1rvluc2, utilisé pour tester l'efficacité anti-tumorale de carba1/PTX, lors du deuxième essai	140
Figure 77. Courbe de survie des souris traitées ou non au cours de la seconde étude sur modèle animal.....	141
Figure 78. Effets de carba1/PTX sur la croissance tumorale par mesure au pied à coulisse, essai 2.....	142

Figure 79. Effets de carba1/PTX sur la croissance tumorale par imagerie de bioluminescence, essai 2.....	142
Figure 80. Fixation d'un dérivé de carbazole sur le site colchicine.....	147
Figure 81. Comparaison des effets de carba1, UA62784 et GSK92325 sur la localisation de CENP-E au cours de la mitose.....	150
Figure 82. Sensibilité des MEF <i>LKB1</i> déficientes au composé carba1	165
Figure 83. Effets anti-tumoral de carba1 sur un modèle d'embryon de poulet	167
Figure 84. Sensibilité des MEF <i>LKB1</i> déficientes pour la combinaison carba1/PTX.....	168
Figure 85. Effets de carba1 seul sur la croissance tumorale des allogreffes 4T1rvluc2	170
Figure 86. Évolution du poids des souris au cours de la première étude de l'effet anti-tumoral de la combinaison carba1/PTX sur modèle murin	170
Figure 87. Analyse en bioluminescence de la croissance tumorale (première étude sur modèle murin).....	171
Figure 88. Analyse de l'envahissement ganglionnaire des souris après 28 jours de traitement	171
Figure 89. Évolution du poids des souris (seconde étude de l'effet anti-tumoral de la combinaison carba1/PTX sur modèle murin)	172
Figure 90. Évolution de la croissance des tumeurs primaires pour chaque souris de chaque groupe (seconde étude de l'effet anti-tumoral de la combinaison carba1/PTX sur modèle murin).....	172

Table des tableaux

Tableau 1. Les poisons du fuseau, indications thérapeutiques et toxicités (quelques exemples).....	25
Tableau 2. Localisation tissulaire et chromosomale de quelques isotypes de la tubuline β humaine.....	33
Tableau 3. Principales MAPs stabilisatrices des microtubules.....	46
Tableau 4. Principales MAPs déstabilisatrices des microtubules.....	47
Tableau 5. Temps de doublement de la taille des tumeurs (en jour) : Comparaison entre les modèles précliniques <i>in vivo</i> et les patients.....	74
Tableau 6. Exemples d'altérations de l'expression des isotypes de tubuline β dans les cancers.....	81
Tableau 7. Composition du mix pour les études de TIRF.....	100
Tableau 8. Présentation de certains gènes dont la surexpression permet la survie des levures sur un milieu toxique carba1/PTX.....	123

Liste des abréviations

APC/C : Anaphase promoting complex
ATP-Binding-Cassette : Transporteurs ABC
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
CAM : Membrane chorio-allantoïdienne
CDC25 : Cell division cycle-25
Cdk : Cyclin dependent kinase
CENP-E : Centrosome protein E
CI : Indice de combinaison
COMT : Centre organisateur des microtubules
CPRC : Cancer de la prostate résistant à la castration
DCP : Depolymerisation-coupled tension
GCP : γ -Tubulin complex proteins
GDP : Guanosine diphosphate
GTP : Guanosine 5'-triphosphate
 γ -TuSC : γ -Tubulin complex small complex
IP : Iodure de propidium
KT : Kinétochore
MAP : Protéine associée aux microtubules
MCC : Mitotic checkpoint complex
MDA : Microtubules destabilizing agent
MEF : Fibroblastes embryonnaires de souris
MPT : Modification post-traductionnelle
MRP1, 2 : Multidrug-resistance-associated protein 1,2
MSA : Microtubules stabilizing agent
MT : Microtubule
MTA : Microtubules targeting agent
PCM : Matrice péricentriolaire
P-gp : Glycoprotéine P
P/S : Pénicilline/streptomycine
PTX : Paclitaxel
RA : Récepteurs aux androgènes

SAC : Spindle assembly checkpoint

SVF : Sérum de veau fœtal

TCP : Tubuline carboxy peptidase

TIRF : Total internal reflection fluorescence microscopy

TMD : Domaines transmembranaires

TTL : Tubuline tyrosine ligase

Introduction

I. Le cancer : généralités et traitements

I.1 Généralités

Selon le dernier rapport du Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), en 2014, 14,1 millions de nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués dans le monde et 8,2 millions de personnes sont décédées d'un cancer.

En France, le nombre de nouveaux cas de cancer a été estimé à 400000 : 214000 chez les hommes et 186000 chez les femmes, en 2017. C'est la première cause de mortalité prématurée, devant les maladies cardiovasculaires. Le cancer est la première cause de mortalité chez l'homme et la deuxième chez la femme.

Les trois cancers les plus fréquents chez l'homme sont ceux de la prostate, du poumon et du côlon-rectum. Chez la femme, ce sont les cancers du sein, du côlon-rectum et du poumon.

Cependant, il a été observé une diminution du taux d'incidence des cancers chez les hommes (- 1,3 % par an entre 2005 et 2012), due à une réduction du nombre de cancers de la prostate, et une stabilisation de ce taux chez les femmes (+ 0,2 % par an), liée à la baisse du nombre de cancers du sein. Le taux de mortalité est également en constante diminution depuis 25 ans. Cela résulte d'une amélioration des méthodes de diagnostic qui permettent de déceler les cancers à un stade plus précoce et donc de faciliter la prise en charge des patients, mais également de la découverte de nouveaux traitements (Institut National du Cancer, 2017).

L'apparition de cancer peut être due à des facteurs exogènes tels que la consommation de tabac, d'alcool, un comportement alimentaire non contrôlé ainsi qu'à l'exposition aux UV, aux radiations, à des agents chimiques mutagènes, *etc.* Cette maladie peut également être causée par des facteurs génétiques. En effet, lorsque plusieurs personnes d'une même famille sont atteintes d'un type de cancer similaire, il se peut que l'apparition du cancer soit due à la mutation d'un gène qui se transmet de génération en génération (cancer héréditaire). On estime que 5 à 10% des cancers du sein sont héréditaires.

I.2 Qu'est qu'un cancer ?

Le cancer est un processus en plusieurs étapes au cours duquel les cellules subissent de profonds changements métaboliques et comportementaux, les amenant à proliférer de manière excessive, à échapper à la surveillance du système immunitaire et à envahir les tissus distaux pour former des métastases (Merlo *et al.*, 2006).

I.2.1 Caractéristiques du cancer

a. Les étapes de cancérisation

On distingue quatre étapes majeures lors du développement du cancer. La phase d'initiation correspond à l'apparition de mutations génétiques contrôlant des processus physiologiques essentiels à l'équilibre cellulaire. Vient ensuite la phase de progression tumorale qui correspond à la multiplication de la cellule mutée et l'apparition d'une masse constituée de cellules identiques. Dans le cas de tumeurs solides, ces cellules sont cohésives entre elles et forment donc une structure compacte que l'on appelle tumeur primaire (**Fig.1**).

Au début de la phase de progression, les cellules mutées gardent leur structure ainsi que leur fonction au sein du tissu. Puis elles acquièrent d'autres mutations et perdent peu à peu leur identité. Plus la tumeur croît, plus les cellules ont besoin de nutriments et d'oxygène afin de continuer à proliférer. Pour cela de nouveaux vaisseaux sanguins vont venir irriguer les cellules tumorales et leur apporter les éléments nutritionnels. C'est l'étape d'angiogenèse. Enfin, le processus métastatique débute lorsqu'une cellule de la tumeur primaire acquiert la capacité à se détacher du tissu et à migrer vers les organes voisins puis jusqu'au vaisseaux sanguins ou lymphatiques afin d'atteindre de nouveaux tissus (Wirtz *et al.*, 2011).

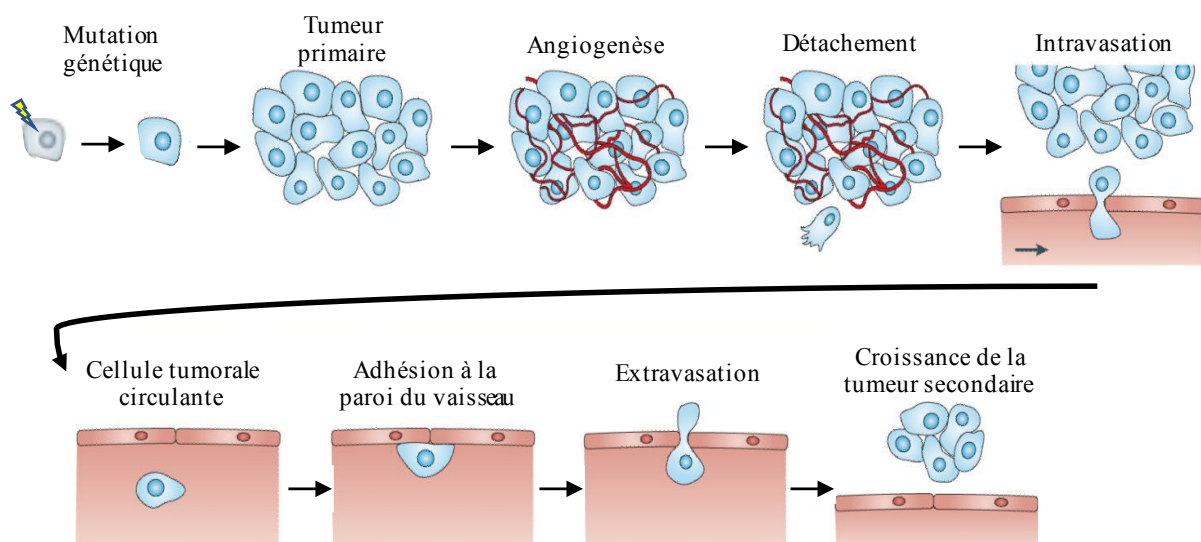


Figure 1. Les étapes de la cancérisation.

Adapté de Wirtz et al., 2011b.

b. Les caractéristiques acquises par une cellule cancéreuse

Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par une dizaine de caractéristiques. Elles ont été décrites par Hanahan et Weinberg en 2011. Ce sont ces différentes caractéristiques qui vont conduire la cellule au travers des étapes de la cancérisation. Comme dit précédemment, une cellule cancéreuse est marquée par une instabilité génétique qui entraîne l'apparition de mutations, un maintien de son état prolifératif associé à une résistance à la mort cellulaire, une dérégulation du métabolisme et une accélération de l'angiogenèse (**Fig.2**). Les facteurs favorisant l'étape de progression sont la capacité d'échapper au système immunitaire et la promotion de l'inflammation. Enfin, l'acquisition de la mobilité et la capacité à dégrader la matrice sont les premières caractéristiques acquises par les cellules métastatiques.

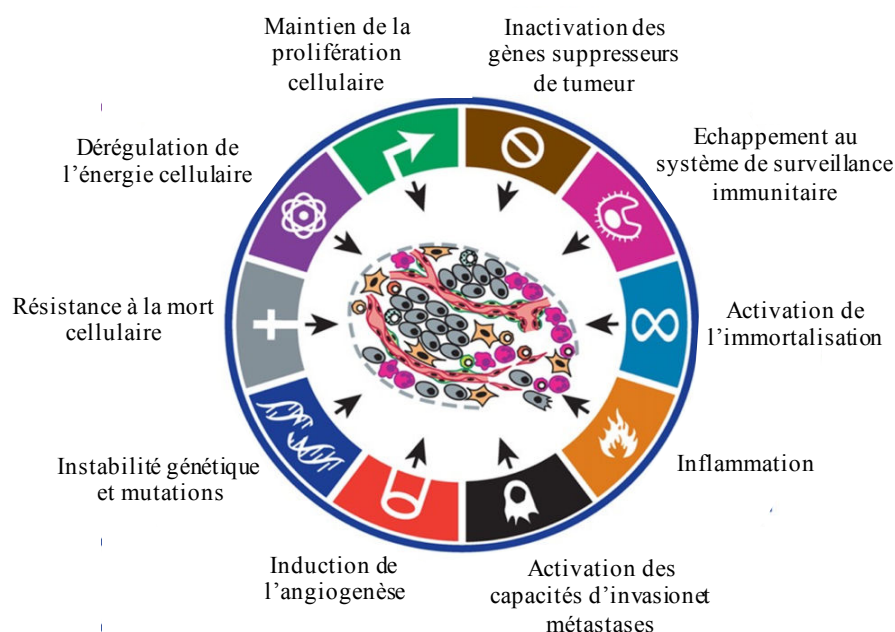


Figure 2. Les caractéristiques de la cellule cancéreuse.

Tiré de Hanahan et Weinberg, Cell, 2011.

Afin de limiter au maximum la propagation d'une anomalie génétique et l'apparition de cancers, la division est finement régulée. En effet, le cycle cellulaire est contrôlé et des processus de surveillance, appelés points de contrôle, sont mis en place pour éliminer les erreurs.

I.2.2 Le cycle cellulaire et sa régulation

Le cycle cellulaire regroupe l'ensemble des étapes qui séparent la naissance d'une cellule mère, de celle des deux cellules filles qui en sont issues et qui lui sont totalement identiques. Il est divisé en deux grandes périodes : l'interphase (qui comprend les phases G1 (Gap1), S, G2 (Gap2)) et la mitose qui permet une division équitable de l'ADN entre les deux cellules filles.

a. Interphase

L'interphase est la première étape du cycle cellulaire et est caractérisée par une augmentation de la masse cellulaire. Elle est subdivisée en plusieurs phases. Les cellules en phase G0 sont en quiescence et attendent un signal de croissance afin d'entrer en phase G1, qui constitue l'étape la plus longue du cycle. La cellule croît jusqu'à atteindre sa taille maximale et vérifie si son matériel génétique ne comporte aucune erreur. Cette phase est marquée par une forte synthèse de protéines puisque la cellule se prépare à la phase suivante, à savoir la phase de réplication (S). Durant cette phase, la cellule double son ADN et possède alors des chromosomes à deux chromatides. Enfin, lors de la phase G2, la cellule se prépare à l'étape de division appelée mitose.

b. La mitose

C'est au cours de la mitose que les chromosomes et le cytoplasme se séparent pour former deux cellules filles. La mitose se divise en plusieurs étapes (Mcintosh, 2018) (**Fig.3**).

(A) La prophase : Les chromosomes se condensent. Les centrosomes dupliqués se séparent et commencent à migrer vers les pôles de la cellule. Le fuseau mitotique se forme.

(B) La prométaphase : L'enveloppe nucléaire se rompt et les chromosomes s'attachent aux microtubules au niveau des kinétochores et commencent à migrer vers la plaque équatoriale (congression des chromosomes).

(C) La métaphase : L'ensemble des chromosomes est attaché aux microtubules du fuseau mitotique et est aligné le long de la plaque équatoriale.

(D) L'anaphase : Les chromatides sœurs se séparent et migrent vers les pôles du fuseau.

(E) La télophase / cytokinèse : Les chromosomes se décondensent et l'enveloppe nucléaire se forme de nouveau. Le fuseau mitotique se désassemble. La membrane plasmique se resserre au niveau de la zone équatoriale, ce qui entraîne un clivage du cytoplasme et une séparation en deux cellules filles.

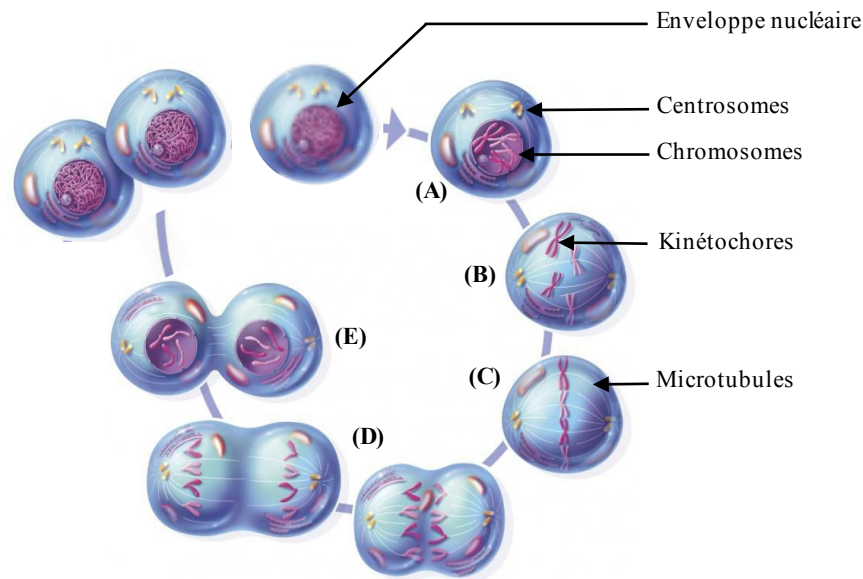


Figure 3. Les étapes de la mitose.

La mitose se divise en cinq étapes. (A) Prophase, (B) Prométaphase, (C) Métaphase, (D) Anaphase, (E) Télaphase / Cytocinèse.

c. La régulation du cycle cellulaire

Le déroulement du cycle cellulaire est finement contrôlé par la coordination entre les cyclines et les Cdks (cyclin dependent kinases). En effet, les cyclines sont des protéines qui n'ont pas d'activité propre mais qui sont indispensables au fonctionnement des Cdks (cycline-dépendantes). La synthèse des cyclines est dépendante du cycle cellulaire : la cycline B est présente en phase de mitose, la cycline D en phase G1, la cycline E en fin de phase G1 et la cycline A en phase S et en phase G2 (Obaya and Sedivy, 2002). La production des Cdks est constante au cours du cycle. Puisque leur activité catalytique n'est possible qu'en association avec une cycline (Dorée and Galas, 1994), le déroulement du cycle dépendra de la présence ou non des cyclines. Chaque couple Cycline-Cdk possède une spécificité de phase et de substrats (facteurs de transcription, protéines catalytiques) nécessaire au bon déroulement de la phase en question (**Fig.4**). Le couple CyclineH-Cdk7 est un peu particulier et va permettre d'augmenter l'activité des couples CyclineD-Cdk4/6 et CyclineB-Cdk1 (Fisher, 2005).

D'autres protéines interviennent également dans la régulation du cycle cellulaire, comme les kinases inhibitrices Wee1 et MYT1 qui phosphorylent Cdk1 et empêchent l'activation du couple CyclineB-Cdk1 (Ayeni and Campbell, 2014). Parmi les inhibiteurs, on trouve aussi les CKI (cyclin kinase inhibitors) tels que P16^{INK4a}, P15^{INK4b}, P18^{INK4c} et P19^{INK4d} qui interfèrent dans la fixation entre Cdk4/6 et la cycline D. La famille CIP/KIP contient les inhibiteurs P21^{CIP1}, P27^{KIP1} et P57^{KIP2} qui, quant à eux, se fixent sur le couple CyclineE-Cdk2, empêchant

son activité (Vidal and Koff, 2000). A l'inverse, les phosphatases de la famille CDC25 (Cell Division Cycle-25) tels que CDC25A, B et C déphosphorylent les Cdk phosphorylées par les kinases inhibitrices, permettant ainsi leur réactivation (Sur and Agrawal, 2015).

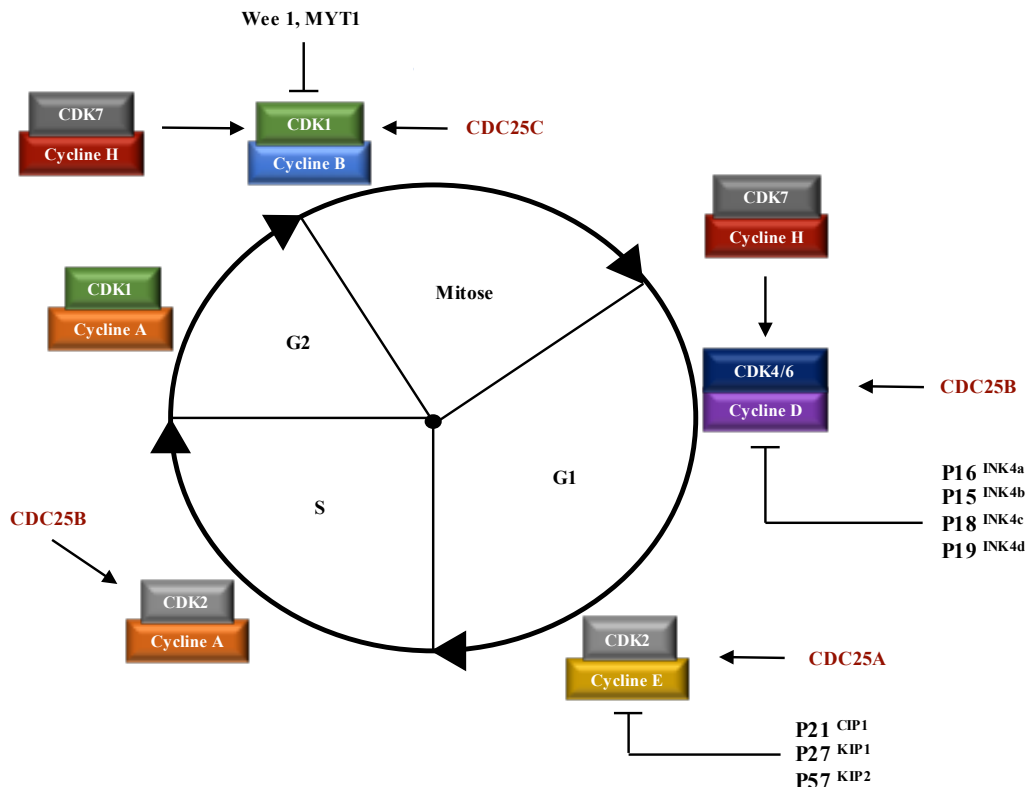


Figure 4. Régulation du cycle cellulaire.

d. Les points de contrôle du cycle cellulaire

Le contrôle du cycle cellulaire se déroule en trois étapes. Un senseur va repérer les erreurs et transmettre le message à la cellule grâce à diverses voies de signalisation. La cellule répond à ce signal en arrêtant la progression du cycle jusqu'à ce que les erreurs soient réparées. Si les erreurs ne sont pas réparables, la cellule déclenche une apoptose.

Il existe plusieurs points de contrôle. L'un d'eux permet de vérifier si l'ADN n'a pas subi de dommages au cours du cycle. Lorsque c'est le cas, la protéine P53 est activée. Cette protéine stimule la transcription de P21 qui inhibe le complexe CyclineE-Cdk2, ce qui entraîne un arrêt du cycle en phase G1. De plus, en fin de phase G1, CDC25A est phosphorylée, ce qui accélère sa dégradation et empêche également la progression du cycle (Kastan and Bartek, 2004). La régulation au cours de la phase S (ADN correct avant/après réplication) se fait grâce à l'activation ou l'inhibition de CDC25A (Zhou and Bartek, 2004).

Durant la mitose, un contrôle est également présent afin de limiter au maximum une mauvaise ségrégation des chromosomes. Il est appelé SAC pour Spindle Assembly Checkpoint (**Fig.5**). Lorsque qu'un chromosome n'est pas attaché correctement au fuseau mitotique, le complexe MCC (Mitotic Checkpoint Complex) constitué de Mad2, BubR1 et Bub3, se met en place. Ce complexe séquestre Cdc20 et empêche ainsi l'activation de APC/C (Anaphase Promoting Complex). Suite à l'attachement correct des chromosomes au fuseau, Cdc20 est libérée et se fixe sur APC/C. Une fois activé, celui-ci provoque l'ubiquitinylation de la cycline B et de la sécurine qui libère la séparase. Cette étape permet ainsi la séparation des chromatides lors de l'anaphase (Karess, 2005).

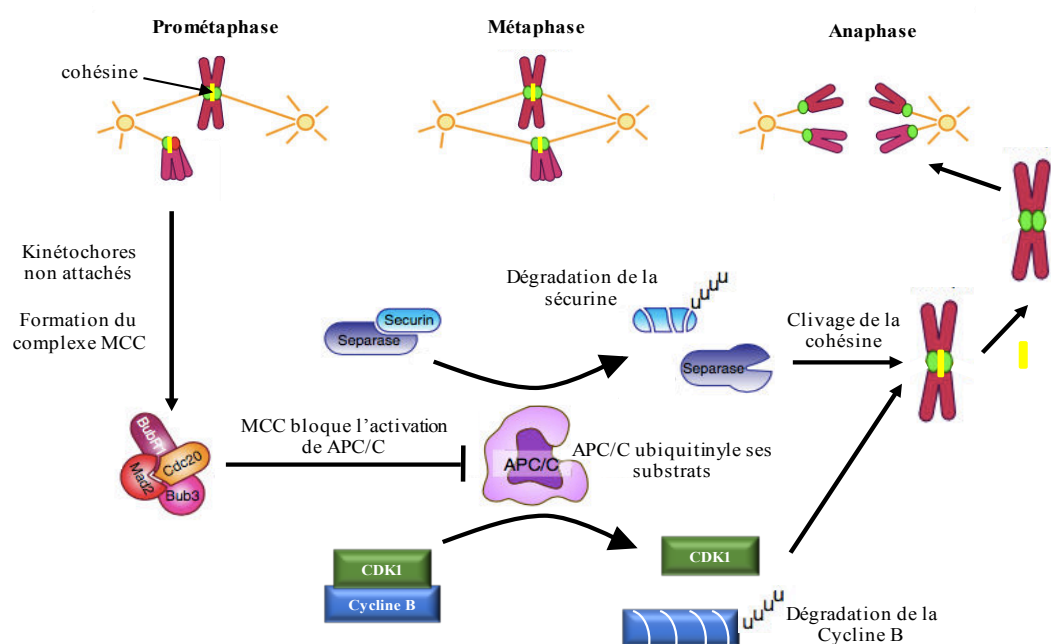


Figure 5. Mécanisme du checkpoint mitotique.

(Lara-Gonzalez et al., 2012)

Le cancer s'accompagne d'une perturbation de la régulation normale du cycle cellulaire (Malumbres and Barbacid, 2001). En effet, malgré la précision de la régulation du cycle et un taux d'erreurs faible, l'apparition de cellules transformées dont la prolifération incontrôlée aboutit à un cancer reste encore trop fréquente. Les altérations que subissent les cellules et qui entraînent l'apparition de tumeurs se font principalement sur des gènes codant des protéines nécessaires à la régulation du cycle cellulaire. En effet, l'analyse moléculaire de tumeurs humaines montre par exemple que le gène codant la protéine p53 est muté dans plus de 50% des cancers (côlon, poumons, sein, cerveau, os) (Hainaut and Hollstein, 1999). La surexpression de protéines stimulatrices de la prolifération telles que la cycline D (cancer du

sein), Cdk4, ou encore l'inactivation de protéines inhibitrices de la prolifération telles que p27 (cancer du côlon, de la prostate, des poumons) ont également pu être observées (Santamaria and Ortega, 2006).

I.3 Les traitements anticancéreux

Comme décrit précédemment, le cancer se caractérise principalement par une prolifération incontrôlée et l'échappement à la mort programmée (apoptose) des cellules cancéreuses. Actuellement, les traitements visent à retirer l'ensemble de ces cellules par ablation ou à inhiber leur prolifération et à induire leur mort. Pour cela, plusieurs moyens sont mis à disposition : la chirurgie d'exérèse, la radiothérapie, les traitements médicamenteux. Ils peuvent être utilisés seuls ou en combinaison et sont plus ou moins ciblés.

Le choix du traitement est important. En effet, il existe de multiples cancers aux caractéristiques différentes. Le choix du traitement prend en compte différents facteurs tels que le type de cancer, son stade ainsi que la vitesse de développement de la tumeur, l'organe touché, mais également les caractéristiques propres au patient comme son état de santé, son âge, son aptitude à supporter les traitements (Anne *et al.*, 2009).

I.3.1 La chirurgie

Pendant très longtemps, la chirurgie a été le seul traitement des tumeurs cancéreuses dites solides. Aujourd'hui, elle en reste le traitement principal et s'adresse aux formes localisées. Souvent, elle impose de retirer la tumeur ou l'organe atteint, mais également une zone de tissus sains autour de la tumeur et les ganglions voisins. Cette exérèse large permet, en principe, de ne laisser aucune cellule cancéreuse et limite les récurrences. La chirurgie est souvent associée à d'autres types de traitement, tels que la radiothérapie et la chimiothérapie. Lorsqu'elles sont réalisées avant la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie sont dites néo-adjuvantes. Leur but est de faire diminuer la taille de la tumeur afin d'en faciliter l'ablation. Lorsque la chimiothérapie ou la radiothérapie sont prescrites après la chirurgie, on parle de traitements adjuvants. Leur but est d'éliminer les cellules cancéreuses qui seraient encore présentes dans l'organisme (chimiothérapie) ou au niveau de la zone concernée par la tumeur (radiothérapie), afin de limiter le risque de récurrence.

I.3.2. La radiothérapie

La radiothérapie consiste à utiliser des rayonnements pour détruire les cellules cancéreuses en bloquant leur capacité à se multiplier, tout en préservant le mieux possible les tissus sains et les organes avoisinants. Plus de la moitié des patients atteints d'un cancer sont traités par radiothérapie. Cette technique utilise différents types de rayonnements dont la caractéristique est de produire des particules ionisantes dans le milieu qu'ils traversent et ainsi provoquer la mort cellulaire par des lésions irréversibles de l'ADN.

Il existe plusieurs types de radiothérapie. La radiothérapie externe consiste en l'émission de rayons en faisceau, par une machine située à proximité du patient. Ces rayons traversent la peau pour atteindre la tumeur. La radiothérapie métabolique consiste à administrer, par voie orale ou par injection intraveineuse une substance radioactive, qui se fixe préférentiellement sur les cellules cancéreuses pour les détruire. La radiothérapie métabolique est utilisée pour traiter certains cancers de la thyroïde, la maladie de Vaquez (un syndrome myéloprolifératif) et certaines métastases osseuses. Enfin, lors de la curiethérapie, des sources radioactives sont implantées directement à l'intérieur du corps de la personne malade (Cancer Info, 2009). La curiethérapie, du fait de son action ciblée, permet de limiter les effets secondaires liés aux atteintes des parties non cancéreuses.

I.3.3. Les traitements médicamenteux (chimiothérapie)

La chimiothérapie fait appel à l'ensemble des molécules chimiques utilisées en médecine à des fins de traitement. Elle occupe une place importante dans la lutte contre le cancer mais n'est pas le choix premier. En effet, elle est née de la nécessité de traiter des cancers ne pouvant être atteints par la chirurgie ou la radiothérapie. Il existe plusieurs types de chimiothérapie. La chimiothérapie curative est utilisée à des fins de guérison pour les cancers chimiosensibles (leucémie, lymphomes, *etc.*). Quant à la chimiothérapie palliative, elle vise à atteindre les métastases non accessibles lors de la généralisation du cancer. Enfin, comme décrit précédemment, la chimiothérapie peut être utilisée à la suite d'une ablation de la tumeur primaire afin d'éliminer les cellules tumorales pouvant s'être disséminées (adjuvante) ou avant une ablation afin de diminuer au maximum la taille de la tumeur (néo-adjuvante). Quelques exemples d'applications de la chimiothérapie du cancer sont présentés ci-dessous.

a. L'hormonothérapie

Les hormones stéroïdiennes (œstrogènes, progestérone, androgènes, corticostéroïdes) peuvent être impliquées dans la croissance et la multiplication des cellules cancéreuses. Comme les tissus sains qui utilisent ces hormones, certaines tumeurs expriment des récepteurs hormonaux et les utilisent comme signal de prolifération. Parmi ces cancers, on trouve les cancers du sein et de l'endomètre, sensibles à l'action des œstrogènes et les cancers de la prostate sensibles à l'action des androgènes. Plusieurs types de traitement sont proposés pour les cancers hormono-dépendants. Le premier consiste à diminuer la production d'hormones en supprimant leur stimulation via une thérapie ablative ou castration chimique. Les molécules utilisées provoquent une diminution des sécrétions gonadiques d'hormones stéroïdes en bloquant leur stimulation au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire (goséréline, leuproréline), ou encore la production d'œstrogènes par les ovaires et d'androgènes par les testicules. Le deuxième type de traitement utilise des inhibiteurs (exémestane, anastrozole, létrozole) qui interfèrent dans la synthèse des hormones. Un troisième moyen est d'utiliser des molécules prenant la place des œstrogènes ou androgènes au niveau de leurs récepteurs en bloquant ainsi l'accès (tamoxifène, létrozole) (Robert, 2010).

b. L'immunothérapie

L'immunothérapie consiste à utiliser les éléments du système immunitaire (SI) pour lutter contre le cancer. Elle peut être utilisée seule ou en combinaison avec un autre traitement, ce qui est souvent le cas. Il existe deux types d'immunothérapie : l'immunothérapie non spécifique et l'immunothérapie spécifique. La première consiste à traiter les patients avec un groupe de protéines appelés cytokines qui permettent l'activation des défenses immunitaires. La deuxième, comme son nom l'indique va chercher à cibler de façon plus spécifique les cellules cancéreuses à l'aide d'anticorps. C'est le cas par exemple du Trastuzumab, utilisé pour traiter le cancer du sein au stade précoce HER2 positif. Le récepteur HER2 est surexprimé dans 20 à 30% des cancers du sein primitifs. L'utilisation du Trastuzumab, qui se fixe sur ce récepteur, bloque la voie de signalisation HER2 et réduit la prolifération des cellules tumorales. Les cellules cancéreuses sont également capables de détourner le SI afin d'éviter d'être attaquées et détruites. Pour cela, la tumeur déclenche des mécanismes qui inactivent le SI par le biais de points de contrôle (CTLA-4, PD-1, PD-L1). La liaison de la protéine PD-L1, présente sur la surface des cellules tumorales, au récepteur PD-1 des lymphocytes T entraîne l'inactivation de ces derniers. Le blocage de cette liaison par

l'emploi d'anticorps permet de réactiver le SI qui peut lutter de nouveau contre les cellules cancéreuses (anti-PD-1 : Nivolumab ; anti-PD-L1 : Pembrolizumab) (Ligue contre le cancer).

c. Les molécules ciblant l'ADN

Le mode d'action de ces molécules est un blocage de la réplication de l'ADN et de la transcription afin de limiter la prolifération des cellules cancéreuses. Parmi ces molécules on trouve par exemple les agents alkylants qui se fixent de manière covalente à l'ADN, les inhibiteurs de la topoisomérase qui induisent des cassures mono ou bicaténares, des agents intervenant dans la synthèse de l'ADN (anti-métabolites).

d. Les poisons du fuseau

Le fuseau mitotique est un élément clef lors de la division cellulaire. Il permet en effet la séparation des chromosomes en deux parts égales. Ce fuseau est constitué de petites sous-unités protéiques appelées tubuline, qui s'associent entre elles pour former les microtubules (MTs). Il s'agit d'une structure très dynamique. En effet, les sous-unités de tubuline s'assemblent et se désassemblent constamment afin d'assurer le bon déroulement du cycle. Les poisons du fuseau constituent un ensemble de molécules capables d'interagir avec les MTs et d'en altérer la dynamique. Ces molécules sont connues pour bloquer le cycle cellulaire en mitose et sont considérées comme des antimitotiques (Jordan and Wilson, 2004). En effet, l'altération de la dynamique des MTs par ces molécules entraînent un blocage des cellules en mitose suivis d'une mort cellulaire. À l'origine, les poisons du fuseau ont été isolés à partir d'extraits d'origine naturelle. Les premiers à avoir été découverts sont les alcaloïdes de la pervenche (vinca-alcaloïde) suivis du paclitaxel, purifié à partir de l'écorce de l'if. Puis de nombreux analogues structuraux semi-synthétiques ainsi que de nouvelles familles chimiques ont été développés.

Le **tableau 1** représente quelques exemples de poisons du fuseau mis sur le marché et utilisés en chimiothérapie ainsi que leurs toxicités connues.

Nom de la molécule	Nom du traitement	Indications	Toxicités
Vincristine	Oncovin®	Leucémie aigüe lymphoblastique, Lymphomes malins, Myélome multiple, Cancer du sein métastatique et du poumon à petites cellules, Cancer pédiatrique (sarcome d'Ewing, neuroblastome...)	Hématologique, Neurologique (Toxicité principale) : neuropathie périphérique, sensitivo-motrice, atteignant parfois le système nerveux centrale, Nausées et vomissements
Vinblastine	Velbé®	Lymphomes malins, Cancer testicule, sein, ovaires, rein, vessie, Sarcome de Kaposi, Choriocarcinome	Hématologique (en première ligne) : leucopénie, Neurologique : neuropathie périphérique sensitivo-motrice, Nausées et vomissements
Vinorelbine	Navelbine®	Cancer du sein métastatique, Cancer du poumon non à petites cellules	Neuropénies sévères, Neurotoxicités : atteinte périphérique, sensorielle, motrice, parésies intestinales entraînant la constipation, Nausées, vomissements, alopecie
Vinflunine	Javlor®	Carcinome urothélial avancé ou métastatique en cas d'échec d'un traitement à base de platine	Neuropénies sévères, Anémie fréquente mais grave chez 20% des patients, Neurotoxicités, Stomatite, nausées, vomissements
Eribuline	Halaven®	Cancer du sein métastatique ou localement avancé en troisième ligne	Hématologique, Neuropathies périphériques, Nausées, vomissements
Auristatine	Adcetris®	Lymphome hodgkinien, lymphome anaplasique à grande cellules (couplé à un anti-CD30)	Neuropathie périphérique sensitive, neutropénie, nausées, thrombopénie
Paclitaxel	Taxol®	Cancer des ovaires en première ligne (cisplatine, carboplatine), Cancer des ovaires en deuxième ligne, Cancer des poumons non à petites cellules métastatique ou localement avancé (cisplatine), Sarcome de Kaposi lié au SIDA après échec de la doxorubicine liposomale	Réactions d'hypersensibilité, Hématologique (prédominant sur la lignée granulocytaire), Neurologique (plus importante avec le paclitaxel que le docétaxel), Myalgies, Arthralgies, Alopecie fréquente, Nausées, vomissements
Docétaxel	Taxotère®	Cancer des ovaires, sein (métastatique ou situation adjuvante), poumon non à petites cellules, gastrique métastatique, des voies aérodigestives supérieures (cisplatine, 5-fluorouracile)	
Cabazitaxel	Jevtana®	Cancer de la prostate en phase d'insensibilité au traitement hormonal (prednisone, prednisolone)	
Ixabepilone (épothilone)	Ixempra®	Cancer du sein métastatique après échec d'un Anthracycline et d'un Taxane	
Emtansine (maytansine)	Kadcyla®	Cancer du sein métastatique (après traitement taxane et trastuzumab) (couplé au trastuzumab)	Neuropathie périphérique, anémie, vomissements, nausées

Tableau 1. Les poisons du fuseau, indications thérapeutiques et toxicités (quelques exemples).

Les mots en vert correspondent au nom des molécules utilisés en association avec le traitement initial (Robert, 2015). Bleu : drogues du site Vinca ; Vert : drogues du site Taxane ; Rose ; drogue du site Maytansine (voir la partie III.2, p57).

e. Autres traitements

La plupart des traitements anticancéreux entraînent l'apparition d'effets secondaires importants ce qui en limite l'utilisation. En effet, contrairement à la chirurgie ou à la radiothérapie, la plupart des chimiothérapies constituent un traitement systémique, c'est à dire que tous les organes du corps sont exposés. C'est toutefois intéressant dans certain cas, notamment après une chirurgie, afin d'éliminer les cellules cancéreuses résiduelles ou en cas de cancer métastatique.

Cependant, de nombreuses recherches visent à optimiser la distribution des médicaments au niveau de la tumeur afin de diminuer la toxicité systémique. Il existe différents types de ciblage. Le ciblage passif repose sur les caractéristiques particulières de l'environnement tumoral : pH diminué, vascularisation plus perméable aux systèmes particuliers que la vascularisation des tissus normaux, architecture des vaisseaux anarchique. Les molécules sont enfermées dans des vecteurs tels que des liposomes ou des nanoparticules qui utilisent ces particularités afin de libérer les drogues au niveau de la tumeur. Actuellement, quelques molécules utilisées sous forme liposomale (Doxorubicine (Doxil[®]), Vincristine (Marqibo[®]), Vinorelbine (Alocrest[®])) ou sous forme nanoparticulaire (Paclitaxel (Abraxane[®], Genexol[®])) sont trouvées en clinique.

Le ciblage actif quant à lui, utilise des moyens de reconnaissance spécifiques vis à vis de la tumeur (épitopes, récepteurs, *etc.*). Les molécules sont enfermées dans des vecteurs portant des anticorps dirigés contre des protéines spécifiques de la tumeur. Ce type de traitement est en cours d'étude (Danhier *et al.*, 2010).

L'une des nouvelles thérapies prometteuses et qui constitue un autre type de ciblage actif est la technique d'immunoconjugaison. Cette méthode consiste en la liaison entre un anticorps et une petite molécule cytotoxique (Vigne and Sassoon, 2014).

Enfin, la thérapie génique est également une technique étudiée afin de cibler plus précisément les tumeurs. En effet, ces maladies sont dues à l'apparition d'anomalies génétiques et il est logique de penser pouvoir guérir les cancers en réparant l'ADN. Le problème majeur est que les altérations génomiques des cancers sont multiples et changeantes, ce qui en complique le traitement.

Bien que l'arsenal thérapeutique pour traiter les cancers soit de plus en plus développé, les effets secondaires et l'apparition de résistances en compliquent l'utilisation. La découverte de nouvelles molécules capables d'agir seules ou en combinaison avec d'autres médicaments reste un enjeu de taille. Dans cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés aux poisons du fuseau. En effet, encore aujourd'hui les MTs restent une cible validée en thérapie anticancéreuse.

II. Les microtubules

Les microtubules (MTs), au même titre que l'actine, les filaments intermédiaires et les septines, font partie du cytosquelette des cellules eucaryotes (Mostowy and Cossart, 2012). Ces différentes structures interagissent afin de maintenir l'intégrité de la cellule. Le cytosquelette microtubulaire joue différents rôles clés au sein des cellules. En effet, il permet le maintien de la forme de la cellule, les transports intracellulaires, la mobilité, la signalisation et est indispensable à la division cellulaire.

II.1 Structure des microtubules

II.1.1 Structure générale

Les MTs sont des polymères formés à partir d'une protéine, la tubuline. Celle-ci est elle-même un hétérodimère comportant deux sous-unités protéiques globulaires, la tubuline α et la tubuline β , solidement reliées de façon non covalente (**Fig.6**) (Downing and Nogales, 1998a). Ces dimères de 8nm de long sont capables de s'associer selon une conformation tête-à-queue le long de l'axe longitudinal du MT. En effet, la tubuline β d'un premier hétérodimère s'associe à la tubuline α de l'hétérodimère adjacent et ainsi de suite jusqu'à la formation de protofilaments linéaires. Puis, l'interaction latérale entre les tubulines α (α - α) et les tubulines β (β - β) permet l'association des protofilaments entre eux (Desai and Mitchison, 1997). Cette association entraîne tout d'abord la formation d'un feuillet plan qui se replie ensuite afin de former un tube creux de 25nm de diamètre appelé MT (Chrétien *et al.*, 1995). Bien que le nombre de protofilaments par MT *in vitro* peut varier entre 10 et 18, *in vivo*, un MT est composé de 13 protofilaments (Chretien *et al.*, 1992).

Lors de la formation du MT, les protofilaments adjacents se décalent les uns par rapport aux autres, ce qui se traduit par l'apparition d'une structure en hélice avec un pas de 12nm. Ce décalage fait apparaître, après la formation du MT, une ligne de suture qui fait intervenir des interactions latérales entre les tubulines α et β (Metoz *et al.*, 1997).

Chaque protofilament d'un MT est assemblé à partir de sous-unités orientées dans la même direction et les protofilaments s'associent eux-mêmes parallèlement. Cette particularité est à l'origine de la polarité structurale des MTs : l'une des extrémités expose la tubuline β , alors que l'autre extrémité expose la tubuline α . Les MTs présentent aussi une polarité dynamique : l'extrémité exposant la sous-unité β incorpore plus facilement les dimères

de tubuline que l'extrémité exposant la sous-unité α . Elles sont dénommées respectivement extrémité "plus" et extrémité "moins".

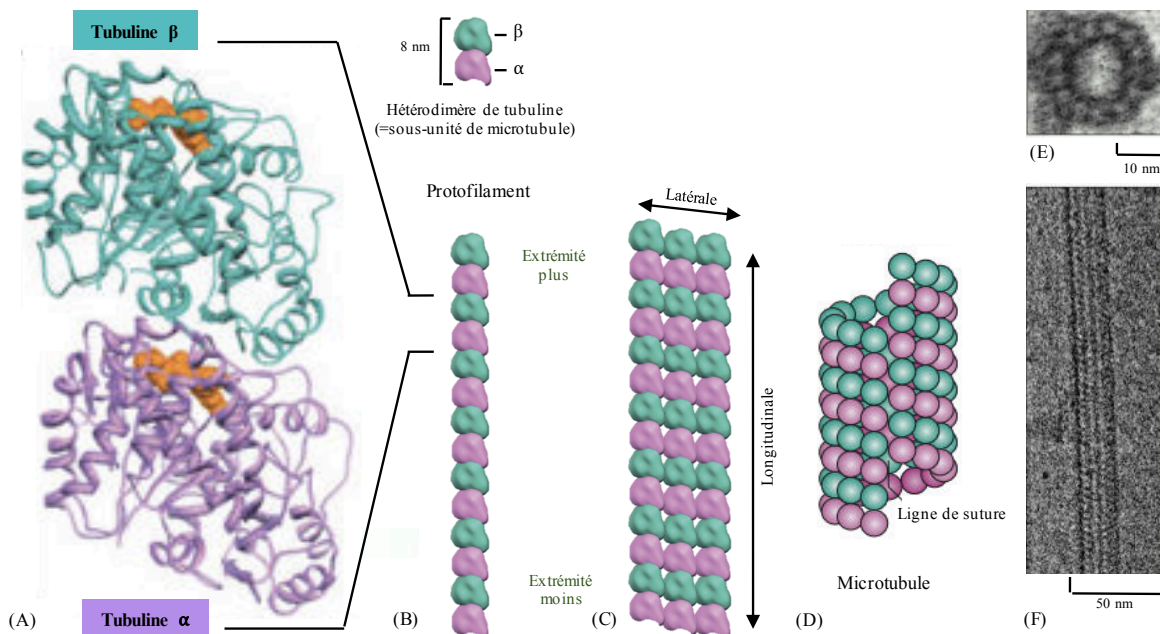


Figure 6. Structure d'un microtubule et de ses sous-unités.

(A) Hétérodimère de tubuline α et β associées par liaison non covalente. La molécule de GTP est représentée en orange. (B) Représentation schématique d'un dimère de tubuline et d'un protofilament. (C) Les protofilaments s'associent entre eux grâce aux contacts latéraux entre les tubulines α (α - α) et les tubulines β (β - β). (D) Une association de 13 protofilaments forme un MT. (E) Photographie en microscopie électronique d'une coupe transversale d'un MT montrant un anneau de 13 protofilaments. (F) Photographie en microscopie électronique d'un segment de MT. Adapté de Kollman et al., 2011 et Alberts et al., 2002.

II.1.2 Les tubulines

La tubuline fait partie des protéines les plus abondantes présentes chez tous les eucaryotes. Les tubulines α et β ont été découvertes en 1968 par Weisenberg. Vient ensuite la découverte d'autres familles de tubuline qui s'élèvent aujourd'hui au nombre de 6. Les tubulines α , β et γ sont trouvées chez tous les eucaryotes contrairement aux tubulines δ , ϵ , répandues mais non ubiquitaires et la tubuline ξ , présente uniquement chez les kinétoplastidés (Oakley, 2000). Seules les tubulines α , β et γ seront détaillées ici.

a. Les tubulines α et β

Les tubulines α et β sont des protéines globulaires d'environ 450 acides aminés et ont un poids moléculaire de 55kDa. Elles sont très similaires et présentent 40 à 50% d'homologie. Un alignement de séquence réalisé par Nogales et ses collaborateurs en 1998 (Nogales et al.,

1998b) a permis de déterminer les différences entre les monomères α et β au niveau de la structure primaire. Ainsi ils ont montré la présence d'une insertion de deux résidus (à la position 45-46) et une insertion de 8 résidus (à la position 361-368) sur la tubuline α . L'absence des 8 résidus sur la tubuline β permet la formation d'une poche où vient se fixer le paclitaxel (PTX) (**Fig.7**). Le PTX est une molécule utilisée en thérapie anticancéreuse et stabilisant les MTs (Kumar, 1981). Les tubulines α et β sont composées de deux feuillets β de 6 et 4 brins (B1-B10) et de 12 hélices α (H1-H12) (Nogales *et al.*, 1998b).

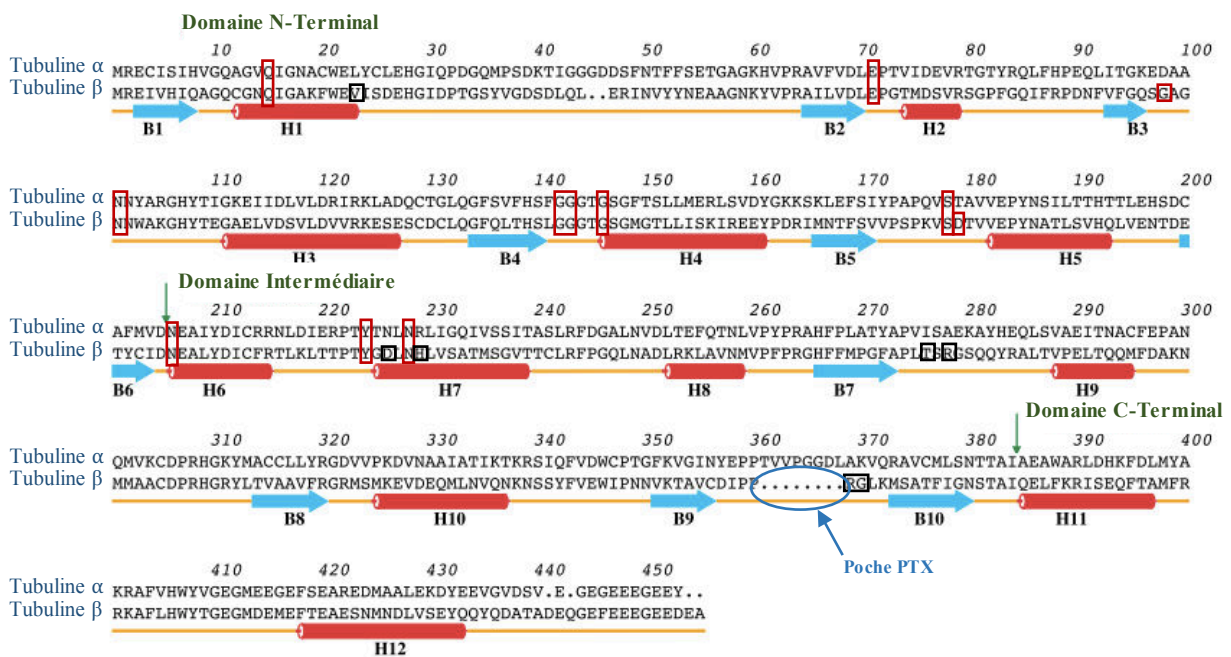


Figure 7. Alignement des séquences primaires des tubulines α et β .

Les tubulines sont issues de cerveaux de cochon. Les éléments de la structure secondaire sont représentés sous les séquences. Les lettres H correspondent aux hélices α et les lettres B aux brins de feuillets β . Les résidus impliqués dans l'interaction avec la guanosine 5'-triphosphate (GTP) sont encadrés en rouge et ceux impliqués dans l'interaction avec le paclitaxel (PTX) sont encadrés en noir. L'insertion de 8 résidus à la position 361-368 sur la tubuline α forme une grande boucle B9-B10. Au niveau de la tubuline β , cette boucle est plus petite et permet la fixation du PTX. Adapté de Amos and Löwe, 1999; Eva Nogales *et al.*, 1998.

La structure tridimensionnelle de ces tubulines a été mise en évidence dans les années 1990 grâce à la cristallographie électronique de feuillets de protofilaments obtenus en présence d'ions de Zinc et de PTX (Nogales *et al.*, 1995). Dans les années suivantes, l'amélioration de la résolution de la cristallographie électronique permet une description plus précise de leur organisation structurale (**Fig.8**) (Nogales *et al.*, 1998a).

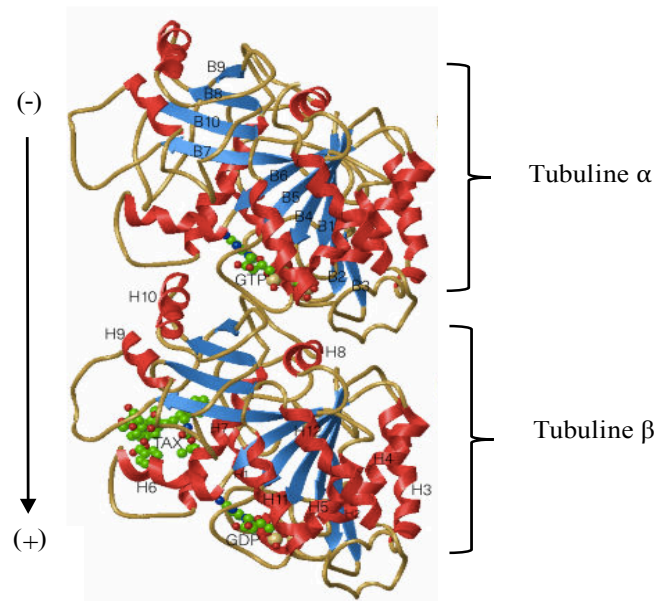


Figure 8. Structure tridimensionnelle de l'hétérodimère de tubuline α et β .

Les feuillets β sont représentés en bleu et les hélices α en rouge. Le GTP, la guanosine diphosphate (GDP) et le PTX (noté TAX) sont représentés en vert. La flèche indique l'axe du MT ainsi que sa polarité. Adapté de Nogales *et al.*, 1998a.

Les sous-unités α et β sont toutes deux constituées de trois domaines fonctionnels (**Fig.9**).

Le **domaine N-terminal** (1-205 acides aminés) forme un pli de Rossmann constitué de 5 hélices α (H1-H5) et de 6 brins de feuillet β parallèles (B1-B6), à l'origine de la fixation d'un nucléotide GTP (Downing and Nogales, 1998a). En effet, chaque monomère est capable de fixer une molécule de GTP. Seule la molécule de GTP liée à la tubuline β au niveau du site E (à l'interface entre les hétérodimères) est hydrolysée ou échangée en GDP. Sur la tubuline α , la molécule de GTP fixée au niveau du site N (à l'interface entre les 2 sous-unités de tubuline) est physiquement piégée et non échangeable (Löwe *et al.*, 2001). Un cation magnésium, Mg^{2+} , intervient dans l'interaction des monomères de tubuline avec le GTP (Correia *et al.*, 1988).

Le **domaine intermédiaire** (206-381) est formé de brins de feuillets β (B7-B10) entourés par 5 hélices α (H6-H10) et contient les sites de fixation aux drogues (le PTX par exemple) (Downing and Nogales, 1998a). Parmi les hélices α , H8 joue un rôle de cohésion au niveau de l'interface longitudinale entre les monomères. La boucle qui connecte B7 et H9 au niveau des tubulines α et β , nommée M-loop, est également impliquée dans les interactions latérales entre les protofilaments. Flexible, cette boucle joue un rôle charnière lors de l'assemblage des MTs et peut être stabilisée par un ion Zn^{2+} (Downing and Nogales, 1999).

Enfin, le **domaine C-terminal** (382-440) est constitué uniquement d'hélices α (H11-H12) et recouvre les deux autres domaines. Il se trouve exposé à la surface externe du MT et constitue le site de fixation des protéines associées aux MTs (MAPs) et des protéines motrices (Downing and Nogales, 1998a). Cette extrémité est sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles (détyrosination, phosphorylation, acétylation, *etc.*). Lors de l'assemblage des MTs, la boucle connectant les hélices H11 et H12 intervient dans l'interaction entre les différents monomères ajoutés le long du protofilament (Keskin *et al.*, 2002).

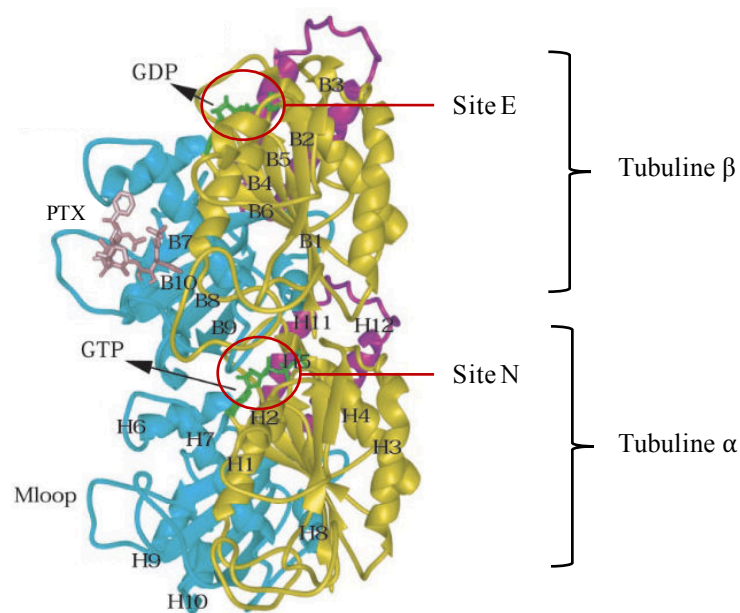


Figure 9. Les domaines fonctionnels des tubulines α et β .

Domaine N-terminal en jaune, domaine intermédiaire en bleu et domaine C-terminal en magenta. Les nucléotides sont représentés en vert et le PTX en rose. Adapté de Keskin *et al.*, 2002.

b. La tubuline γ

La tubuline γ est découverte en 1989, soit une vingtaine d'années après les tubulines α et β , à la suite d'un criblage génétique chez le champignon *Aspergillus nidulans* (Oakley and Oakley, 1989). Cette tubuline possède environ 35% d'homologie avec les tubulines α et β (Oakley, 2000). Cependant, contrairement à celles-ci, la tubuline γ n'est pas impliquée directement dans la composition des MTs mais joue un rôle essentiel dans leur nucléation *in vivo* (Oakley and Akkari, 1999). En effet, les tubulines γ s'assemblent pour former un complexe en anneau, γ -TuRC (γ Tubulin Ring Complex) nécessaire à l'initiation de la polymérisation des MTs dans les cellules et localisé au niveau des centres organisateurs des MTs (COMT) (Aldaz *et al.*, 2005).

c. Les isotypes de la tubuline

Malgré la conservation de la structure des tubulines, de nombreux variants, appelés isotypes ont été découverts (Cleveland and Sullivan, 1985). Ils diffèrent selon leur séquence en acides aminés et sont codés par différents gènes, eux-mêmes localisés sur plusieurs chromosomes. Ces variants ont une distribution distincte au sein des tissus et des types cellulaires et sont partiellement mais pas complètement interchangeables (Downing and Nogales, 1998a). Chez l'Homme, 15 isotypes de tubuline α , 21 isotypes de tubuline β et 3 isotypes de tubuline γ ont été découverts (Dutcher, 2003). Le **tableau 2** présente la localisation chromosomale de quelques gènes codant pour des isotypes de tubuline β humaine, ainsi que leur localisation tissulaire. La conservation de cette diversité au cours de l'évolution montre l'importance fonctionnelle de ces isotypes.

Isotypes de la tubuline β	Localisation chromosomale	Localisation tissulaire
β I	6q21.33	Ubiquitaire
β IIa	6p25.2	Neurones
β IIb	6p25.2	Neurones
β III	16q24.3	Neurones Cellules de Sertoli
β IVa	19p13.3	Cerveau
β IVb	9q34.3	Ubiquitaire
β V	19p11.21	Utérus Endomètre
β VI	20q13.32	Mégacaryocytes Plaquettes

Tableau 2. Localisation tissulaire et chromosomale de quelques isotypes de la tubuline β humaine. (Kavallaris, 2010).

La majorité des différences entre les isotypes se trouve sur les 15 derniers acides aminés de la séquence, au niveau de la partie C-terminale (Nogales, 2000). Ce domaine a été identifié comme étant important dans l'interaction entre les MTs et les MAPs, mais également pour les modifications post-traductionnelles. Les isotypes ne sont donc pas soumis aux mêmes types de régulation, ce qui pourrait représenter les bases moléculaires des différences d'organisation

des réseaux microtubulaires. L'état dynamique des MTs est également dépendant de la composition en isotypes de ceux-ci. En effet, *in vitro*, les MTs assemblés à partir de tubuline $\alpha(\beta\text{III})$ sont plus dynamiques que les MTs assemblés à partir de tubuline $\alpha(\beta\text{II})$ et $\alpha(\beta\text{IV})$ (Panda *et al.*, 1994). Enfin, ce polymorphisme génétique intervient également dans la résistance aux drogues. Une surexpression des isotypes βIII et βIVa a été observée dans les cellules du cancer de la prostate, résistante au PTX (Downing and Nogales, 1998b) (voir la partie III.5.1, p80).

d. Les modifications post-traductionnelles de la tubuline

La tubuline est sujette à une hétérogénéité importante générée par l'expression de divers isotypes mais également par des modifications post-traductionnelles (MPTs) (**Fig.10**). A ce jour, seules les MPTs des tubulines α et β ont été décrites. Ces modifications se font essentiellement au niveau du domaine C-terminal des hétérodimères en solution ou assemblés en MTs. Elles permettent de réguler la fixation des protéines associées aux MTs et des protéines motrices, afin de contrôler la dynamique des MTs et leurs fonctions dans la cellule (Janke, 2014).

Le cycle de détyrosination/tyrosination par exemple, est crucial pour la régulation de la dynamique des MTs. La plupart des gènes de la tubuline α code pour un résidu tyrosine à l'extrémité du domaine C-terminal (Valenzuela *et al.*, 1981). Cette tyrosine peut être retirée (Hallak *et al.*, 1976) de manière enzymatique par la Tubuline Carboxy Peptidase (TCP) et peut être ajoutée de nouveau par la Tubuline Tyrosine Ligase (TTL) (Arce *et al.*, 1975). La réaction de détyrosination est connue depuis une quarantaine d'années, mais ce n'est que très récemment que l'identité de la TCP a été découverte. Une étude protéomique chimique utilisant un inhibiteur irréversible de l'activité détyrosinase, ainsi qu'une analyse en spectrométrie de masse des fragments co-purifiés avec l'inhibiteur, a permis d'identifier la famille des Vasohibines. En complexe avec la protéine SVBP (Small Vasohibin Binding Protein), la protéine VASH1 (vasohibin-1) et son homologue VASH2 (vasohibin-2) présentent une forte activité détyrosinase *in vitro* et *in vivo* (Aillaud *et al.*, 2017). La tubuline détyrosinée est principalement trouvée dans les MTs stables, comme dans les neurones par exemple (Janke, 2014). Cette détyrosination permet également de protéger les MTs de la dépolymérisation par des moteurs protéiques tels que KIF2 ou MCAK (Peris *et al.*, 2009). A l'inverse, des protéines de l'extrémité (+) (+TIPs) des MTs telle que CLIP 170 interagissent uniquement avec des MTs tyrosinés (Peris *et al.*, 2006).

Une étude a montré la présence d'une tubuline cérébrale ne pouvant être retyrosinée (Paturle-Lafanechère *et al.*, 1991) en raison de l'absence de l'avant-dernier résidu glutamate de la séquence protéique primaire du domaine C-terminal. La perte des deux derniers résidus est à l'origine du nom donné à cette tubuline : tubuline $\Delta 2$. Elle s'accumule dans les MTs stables des neurones différenciés, dans les axonèmes des cils et des flagelles, ainsi que dans les MTs cellulaires stabilisés artificiellement, avec du PTX par exemple (Paturle-Lafanechère *et al.*, 1994). Une forme supplémentaire de tubuline, la tubuline $\Delta 3$, correspondant à la tubuline α dépourvue des 3 derniers acides aminés a également été trouvée dans les tissus neuronaux. Elle est plus abondante dans le cerveau embryonnaire que dans le cerveau adulte, suggérant un rôle au cours du développement (Aillaud *et al.*, 2016).

L'acétylation de la tubuline α se fait sur un résidu lysine situé du côté N-terminal (Lysine 40). C'est aussi un bon marqueur des MTs stables des cellules. Cependant, en raison de sa localisation sur la surface interne des MTs, ses effets sont mal connus (pour une revue récente, voir Sadoul *et al.*, 2018).

Les polyglutamylations et les polyglycylations sont à l'origine de l'apparition de chaînes latérales au niveau du domaine C-terminal des tubulines α et β . Ces MPTs sont principalement observées dans les axonèmes des cils, des flagelles, au niveau des centrosomes, dans les neurones et apparaissent actuellement comme des régulateurs de la fonction des MTs (Natarajan *et al.*, 2017). Une dérégulation de la polyglutamylation et de la glycylation est liée à une désorganisation des axonèmes mais également à des ciliopathies, au cancer et à la neurodégénérescence.

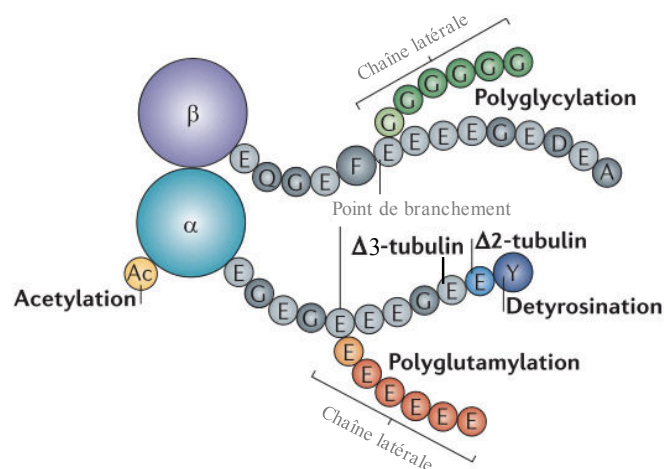


Figure 10. Localisation des modifications post-traductionnelles des tubulines α et β .

Représentation schématique de l'hétérodimère de tubuline α , β et les principales MPTs associées (acétylation, détyrosination, polyglutamylation, polyglycylation) (Janke and Bulinski, 2011).

II.2. La dynamique des microtubules

Les MTs sont des structures extrêmement dynamiques qui oscillent entre polymérisation et dépolymérisation. Ils utilisent cette dynamique afin d'assurer différentes fonctions au sein de la cellule. La dynamique des MTs est directement liée aux caractéristiques des tubulines, notamment à leur capacité à fixer le GTP.

II.2.1 Cinétique d'assemblage et désassemblage des microtubules *in vitro*

In vitro, l'assemblage des MTs à partir de tubuline pure repose sur deux facteurs limitants : la température et la présence de GTP. Le réchauffement d'une solution tamponnée contenant de la tubuline et du GTP, jusqu'à une température allant de 30 à 37°C, déclenche la polymérisation de la tubuline en MTs et peut être suivie par turbidimétrie (**Fig.11**). Cette polymérisation se divise en trois étapes majeures : la nucléation, la phase de croissance (élongation) et l'état stationnaire. L'assemblage de la tubuline est un phénomène réversible et l'exposition d'une suspension de MTs au froid ou l'emploi de molécules dépolymérisantes entraînent un désassemblage rapide des MTs.

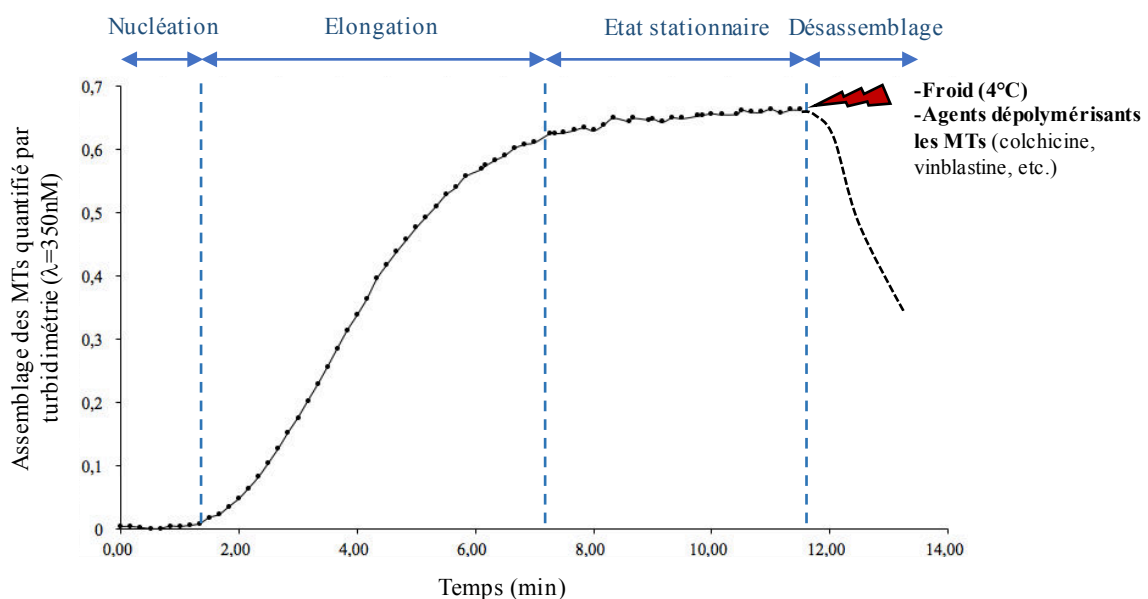


Figure 11. Représentation schématique de la polymérisation des microtubules *in vitro*.

L'assemblage de la tubuline *in vitro* se divise en différentes étapes : la nucléation, l'élongation, l'état stationnaire. La mise au froid des MTs ou l'emploi de molécules déstabilisantes provoque un désassemblage rapide des MTs.

a. La nucléation

La phase de nucléation est « silencieuse ». Le modèle proposé pour expliquer le fonctionnement de cette étape *in vitro*, fait intervenir de petits intermédiaires d'assemblage. Dans ces structures intermédiaires, le désassemblage est favorisé par rapport à l'assemblage et entraîne une croissance initiale lente. Puis, lorsqu'un oligomère atteint une taille suffisamment grande, la croissance des MTs devient favorisée et l'addition d'hétérodimères de tubuline se déroule rapidement (**Fig.12**) (Rice *et al.*, 2008). La concentration minimale de tubuline qui permet une polymérisation des MTs *in vitro* est appelée concentration critique d'assemblage. Elle va dépendre du type de tubuline (bovine, porcine), de sa pureté, du type de tampon utilisé, du GTP et de la température.

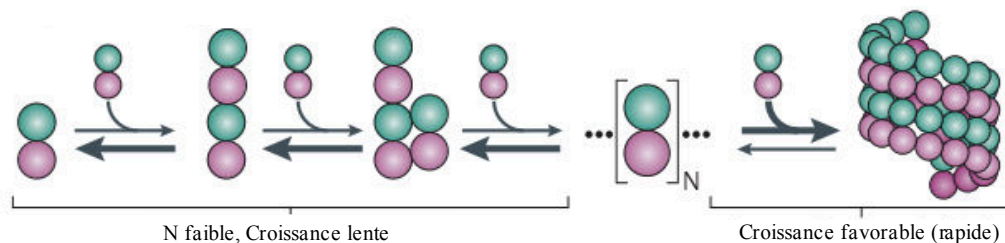


Figure 12. Mécanisme de nucléation des microtubules *in vitro*.

Adaptée de Kollman et al., 2011.

b. Elongation des MTs

L'élongation correspond à un allongement des MTs résultant de l'incorporation d'hétérodimères libres de tubuline-GTP (tubuline liée au GTP) préférentiellement à l'extrémité (+) des MTs. Elle requiert la liaison, l'hydrolyse et l'échange d'un nucléotide GTP sur le monomère de tubuline β (David-Pfeuty *et al.*, 1977). Lors de l'addition des hétérodimères, la sous-unité α de l'hétérodimère libre (associée à des protéines activant la GTPase) entre en contact avec la sous-unité β de l'hétérodimère incorporé dans le MT (E Nogales *et al.*, 1998). Ce rapprochement entraîne l'hydrolyse du GTP en GDP au niveau du site E de la tubuline β . L'hydrolyse du GTP se produit un peu après l'incorporation de tubuline-GTP à l'extrémité (+) des MTs, faisant apparaître une coiffe GTP à l'extrémité croissante des MTs (**Fig.13**) (Mitchison, 1993). L'hydrolyse du GTP n'est pas nécessaire en soi pour l'assemblage des MTs, mais est indispensable à leur comportement dynamique.

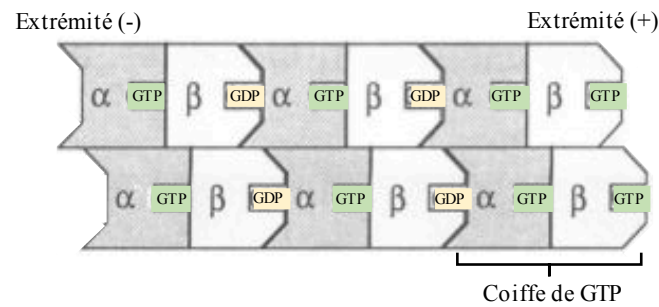


Figure 13. Coiffe de GTP à l'extrémité croissante des microtubules.

Adapté de Mitchison, 1993.

c. La phase stationnaire

À l'état stationnaire, il y a un équilibre entre la proportion de tubuline sous forme polymérisée et la tubuline sous forme libre en solution. Bien que la masse de tubuline polymérisée reste constante, un flux d'échange s'établit entre les MTs et la tubuline libre, du fait des propriétés dynamiques des MTs. Ce comportement dynamique des MTs résulte de deux mécanismes principaux : le phénomène de tapis roulant ou « treadmilling » et l'instabilité dynamique.

L'instabilité dynamique est définie par le gain ou la perte de sous-unités de tubuline α et β au niveau de l'extrémité d'un MT, durant les phases de polymérisation et dépolymérisation (**Fig.14A**). Cette instabilité est directement en lien avec l'hydrolyse du GTP. Les extrémités des MTs en croissance maintiennent une coiffe GTP qui stabilise le MT et dont la perte entraîne une dépolymérisation rapide, appelé catastrophe (Walker *et al.*, 1989). Si le MT reprend sa croissance avant sa dépolymérisation complète, il s'agit d'un sauvetage. Ce phénomène peut être dû à la présence « d'îlots GTP » au sein du MT (Dimitrov *et al.*, 2008) ou de « facteurs de sauvetage » (MAPs) présents dans les cellules. À la suite d'une catastrophe, les dimères de tubuline-GDP sont libérés dans le cytosol. La tubuline β peut alors échanger de nouveau son GDP avec du GTP avant d'intégrer de nouveau un cycle de polymérisation.

La structure des MTs en cours de dépolymérisation est caractérisée par la présence de protofilaments incurvés qui perdent leurs contacts latéraux et « pèlent » de chaque côté du MT. En revanche, les extrémités des MTs en cours de polymérisation possèdent des protofilaments droits et effilés, avec des longueurs inégales. Les transitions entre la conformation incurvée et la conformation droite de la tubuline sont généralement reconnues comme étant importantes pour contrôler la dynamique des MTs.

En se basant sur ces observations, un premier modèle a été proposé selon lequel la tubuline-GTP avait une conformation droite et la tubuline-GDP une conformation courbée (Brouhard and Rice, 2014). En effet, l'idée était que l'incorporation de tubuline-GTP à l'extrémité (+) des MTs entraînait la formation de protofilaments linéaires nécessaires à l'assemblage. Puis l'hydrolyse du GDP provoquait un changement de conformation des sous-unités de tubuline donnant naissance à une structure incurvée à l'origine de la dépolymérisation brutale des MTs. Cependant, de récentes études structurales ont montré que les hétérodimères de tubuline α et β liés au GTP adoptent une conformation incurvée (**Fig.14B**), incompatible avec ce modèle (Brouhard and Rice, 2014). Comment expliquer l'instabilité dynamique dans ce cas ?

Le phénomène d'instabilité dynamique est observé *in vitro* et suggère la mise en jeu de mécanismes liés intrinsèquement aux caractéristiques de la tubuline. Il a par exemple été montré que les MTs ayant polymérisés plus longtemps (MTs « plus âgés ») ont plus de chance de subir une catastrophe. Il a donc été proposé que les dimères de tubuline α et β adoptent une gamme de conformations différentes au fur et à mesure qu'ils se déplacent au sein du MT (Akhmanova and Steinmetz, 2015). Ces différentes conformations affectent la dynamique des MTs en modifiant la force de l'interaction entre les dimères au sein du MT et le taux d'hydrolyse du GTP (Brouhard and Rice, 2014).

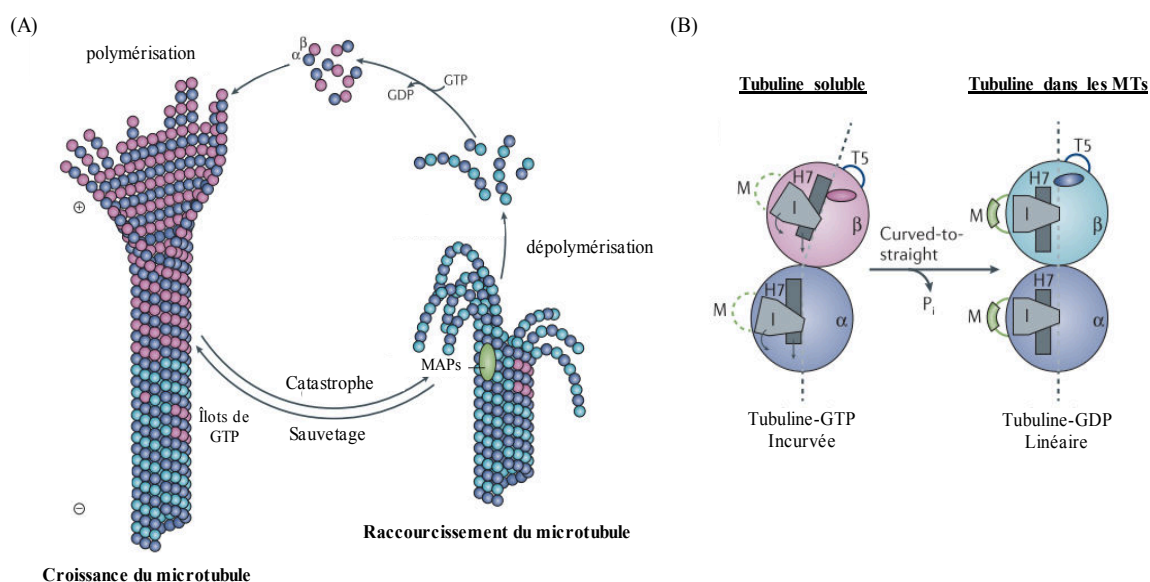


Figure 14. Instabilité dynamique des microtubules.

(A) Cycle de polymérisation / dépolymérisation des MTs. (B) La tubuline-GTP passe graduellement d'une conformation incurvée à une conformation linéaire lors de son incorporation au niveau de l'extrémité (+) des MTs. Ce changement entraîne une rotation du domaine intermédiaire (I) et de l'hélice H7 des tubulines, à l'origine du placement de la boucle M (impliquée dans les interactions latérales) et de l'hydrolyse du GTP. La boucle T5 est à l'origine des interactions longitudinales dans les MTs. Adaptée de Akhmanova & Steinmetz, 2015.

Le phénomène de tapis roulant a tout d'abord été découvert *in vitro*. Il consiste en l'ajout de dimères de tubuline à l'extrémité (+) des MTs et à la perte simultanée de dimères à l'extrémité (-) (Margolis and Wilson, 1981). La taille du MT ne varie pas au cours de ce processus. Il en résulte un flux de tubuline au sein du MT ainsi que le déplacement du MT, mimant un tapis roulant (**Fig.15**). Ultérieurement, il a été démontré que le phénomène du tapis roulant existe aussi *in vivo*, lorsque les MTs ne sont plus insérés sur le centrosome (Rodionov and Borisy, 1997).

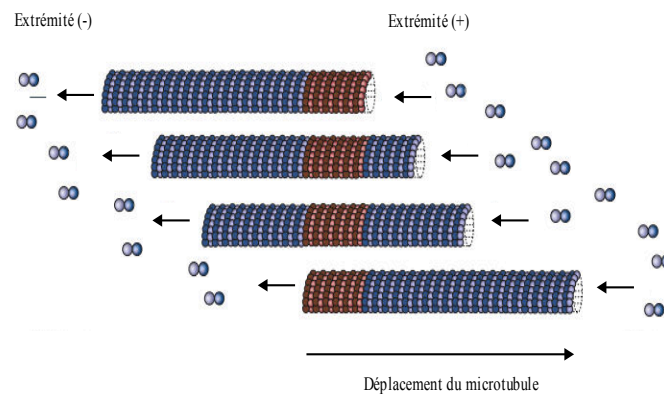


Figure 15. Représentation schématique du processus de tapis roulant.

Adapté de Jordan and Wilson, 2004.

d. Etude de la dynamique des microtubules *in vitro*

Plusieurs techniques ont été mises en place afin d'étudier la cinétique d'assemblage des MTs *in vitro*. Le suivi de la polymérisation des MTs par turbidimétrie renseigne sur l'assemblage d'une population de MTs dans sa globalité : à chaque instant, on a une mesure moyenne de l'état d'assemblage de plusieurs MTs, qui peuvent être de longueurs variées, certains en phase de croissance ou en pause, d'autres subissant des catastrophes. Pour analyser de manière approfondie le comportement de MTs individualisés, on a recours à une autre technique qui consiste à faire polymériser de la tubuline fluorescente sur des amorces de tubuline stables (également fluorescentes), préalablement fixées sur des lamelles de verre. La formation de MTs est ensuite observée en vidéomicroscopie grâce à un microscope de fluorescence par réflexion totale interne ou microscope à onde évanescente (TIRF, Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) (**Fig.16**). Cette méthode ne permet pas de visualiser l'étape initiale de nucléation, puisque des amorces sont utilisées mais elle permet de déterminer précisément les paramètres suivants : la vitesse de croissance et de raccourcissement, les temps de pause, le nombre de sauvetages et de catastrophes.

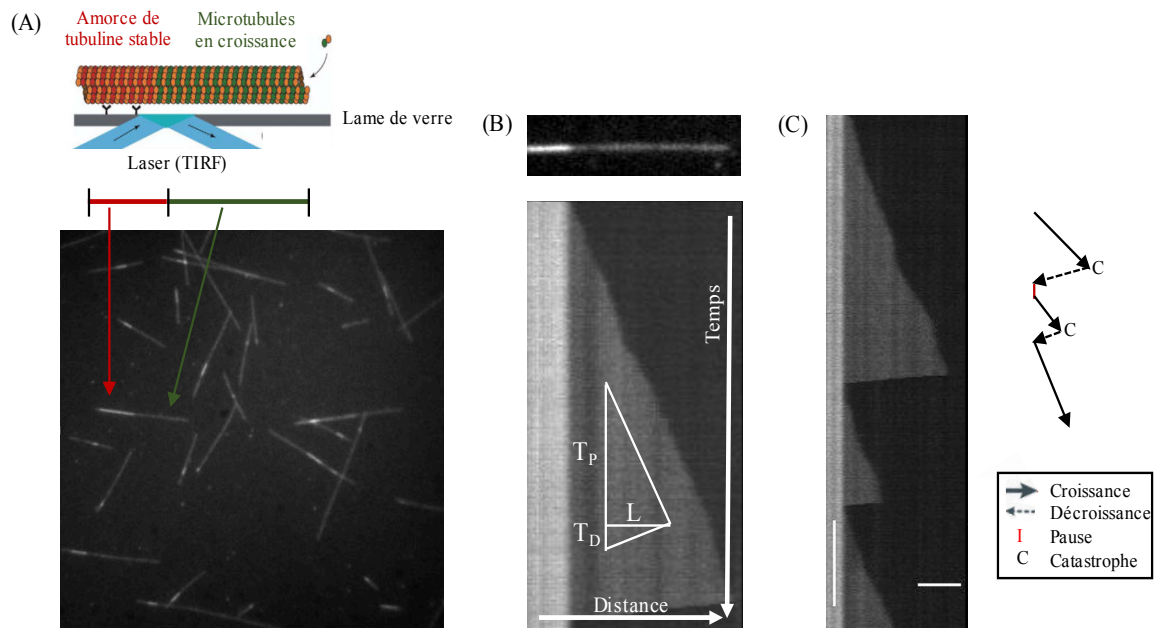


Figure 16. Technique permettant de mesurer la dynamique des microtubules *in vitro*.

(A) Représentation schématique de la technique permettant de mesurer la dynamique des MTs *in vitro*. Photo en microscopie TIRF montrant des MTs en cours de polymérisation (gris foncé) à partir d'amorces de tubuline stables fixées sur lame de verre (gris clair). (B) Représentation en kymographe qui permet de mesurer les différentes phases de l'instabilité dynamique d'un MT. L : Longueur ; T_P : Temps de polymérisation ; T_D : Temps de dépolymérisation. (C) Exemple de l'analyse d'un kymographe montrant la dynamique d'un MT *in vitro*. Échelle verticale, 5 minutes ; Échelle horizontale, $5\mu\text{m}$.

II.2.2 Cinétique d'assemblage et désassemblage des microtubules *in vivo*

Le comportement dynamique des MTs dans les cellules est très similaire à celui des MTs *in vitro*. Cependant, il existe des différences concernant principalement la nucléation, la régulation de la cinétique d'assemblage et de la dynamique des MTs.

a. Nucléation à partir de centres organisateurs des microtubules

Afin de pallier l'étape lente de nucléation observée *in vitro*, les cellules ont développé des sites de nucléation spécialisés qui favorisent la nucléation et la formation de MTs. Ces sites de nucléation servent également de point d'ancrage et stabilisent l'extrémité (-) des MTs afin de limiter la dépolymérisation. Dans les cellules, les sites de nucléation sont composés de tubulines γ qui forment deux types de complexes : un petit, γ -TuSC (γ -Tubulin complex Small Complex) et un plus grand, γ -TuRC, tous deux contenant des protéines GCPs (γ -tubulin Complex Proteins) : GCP2 à GCP6 (Sulimenko *et al.*, 2017). Les complexes γ -TuSC oligomérisent pour former le γ -TuRC (Fig.17).

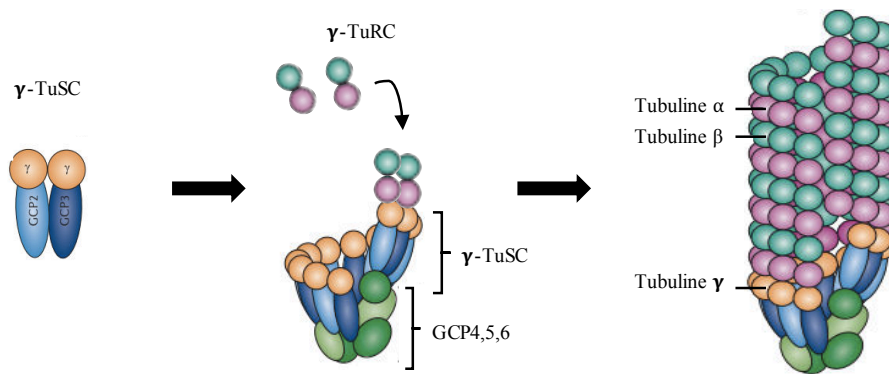


Figure 17. Mécanisme de nucléation des microtubules *in vivo*.

Croissance des MTs à partir d'un complexe formé de tubuline γ et de protéines GCP. Adaptée de Kollman et al., 2011.

Ces sites de nucléation se trouvent en grande partie dans les centres organisateurs des MTs (COMT). Le centrosome a été identifié en 1928 comme étant le principal COMT dans les cellules animales et se localise dans le cytoplasme à proximité du noyau. Il est composé d'une paire de centrioles, formés à partir de triplets de MTs organisés en cylindre d'environ 25nm de diamètre et entourés d'une matrice péricentriolaire (PCM), contenant les complexes γ -TuRC (**Fig.18A**). Les centrioles sont attachés entre eux au niveau de leur extrémité proximale par une matrice composée principalement de péricentrine/kendrine, AKAP450/CG-Nap, *etc.* Une fois nucléés au niveau des complexes γ -TuRC, les MTs peuvent soit être libérés dans le cytoplasme, soit rester ancrés via leur extrémité (-) au niveau du centrosome. Les appendices sub-distaux du centriole père représentent les sites majeurs d'ancrage des MTs au centrosome grâce à la présence de la ninéine. D'autres protéines interviennent également dans cet ancrage : le complexe CAP350-FOP-EB1 et la dynactine/P150glued (Azimzadeh and Bornens, 2007). Les satellites centriolaires (gros granules) sont également essentiels à l'ancrage des MTs puisqu'ils fixent des protéines centriolaires (péricentrine, centrine et ninéine) et permettent leur localisation au niveau de la PCM. La localisation de ces satellites est dynéine/dynactine dépendant.

Les sites de nucléation permettent une croissance orientée des MTs dans la cellule avec les extrémités (-) ancrées au niveau des centrosomes et les extrémités (+) qui s'étendent vers la périphérie de la cellule (**Fig.18B**). Durant l'interphase, le centrosome organise les MTs, leur permettant de participer à des fonctions cellulaires essentielles : trafic intracellulaire, mobilité, adhésion, *etc.* Dans les cellules en division, le centrosome se duplique et permet la mise en place du fuseau mitotique nécessaire à la répartition de l'ADN en deux parts égales (Alberts *et al.*, 2002).

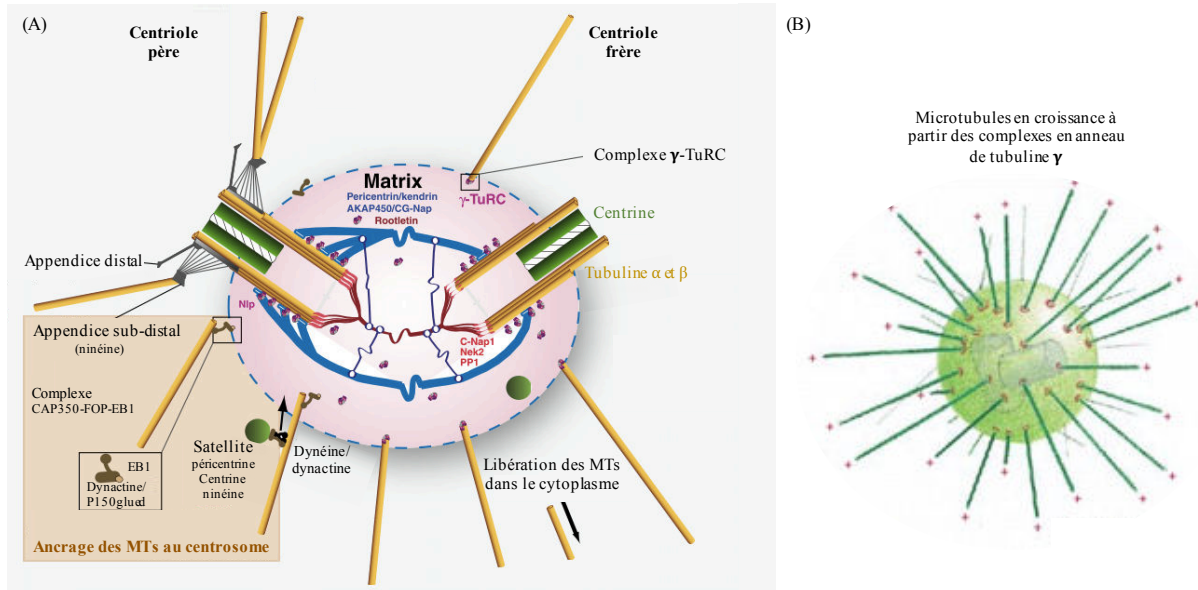


Figure 18. Nucléation à partir des COMT centrosomiaux.

(A) Représentation schématique de la composition du centrosome et de l'ancrage des MTs (Azimzadeh and Bornens, 2007). (B) Représentation schématique de la croissance des MTs à partir du centrosome (Alberts et al., 2002).

b. Nucléation à partir des COMT non-centrosomiaux

Les centrosomes constituent le principal site de nucléation et d'ancrage des MTs dans la cellule. Cependant, le réseau microtubulaire issu de la nucléation à partir du centrosome possède une organisation radiale qui ne convient pas toujours à certains types cellulaires ayant besoin d'une organisation plus spécifique. C'est pourquoi les cellules musculaires, épithéliales ou neuronales possèdent des MTs non-centrosomiaux. Ces MTs sont générés par trois types de processus. Ils peuvent être formés après rupture ou détachement d'un MT préexistant issu du centrosome, mais également nucléés à partir d'autres sites de nucléation (golgi, filaments d'actine corticale, MAPs, etc.) (Fig.19) (Nishita et al., 2017).

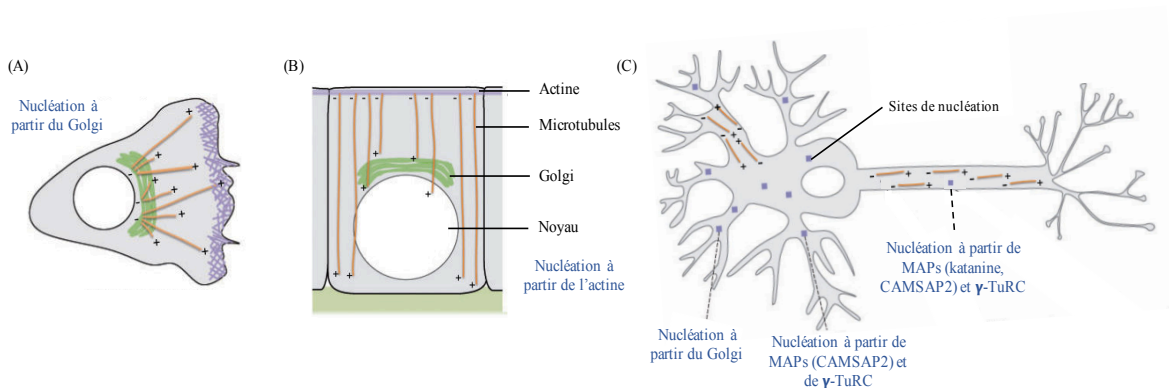


Figure 19. Nucléation à partir des COMT non-centrosomiaux.

(A) Cellule polarisée. (B) Cellule épithéliale. (C) Cellule neuronale. Adaptée de Nishita et al., 2017.

c. Dynamique des microtubules *in vivo*

Méthodes d'étude de la dynamique

Les MTs dans les cellules sont également soumis à l'instabilité dynamique et le phénomène de tapis roulant. *In vivo*, il est possible de mesurer, par vidéomicroscopie, la dynamique de MTs fluorescents de cellules exprimant par exemple la tubuline mcherry ou GFP. Une autre méthode couramment utilisée consiste à transfecter des cellules avec des plasmides contenant un gène exprimant une protéine de l'extrémité (+) (+TIPs) des MTs, couplée à une protéine fluorescente (EB3-GFP par exemple). Enfin, on peut combiner un marquage du réseau microtubulaire par expression de tubuline m-cherry et un marquage des + TIPs par transfection d'EB1 ou d'EB3-GFP. Ces différentes constructions permettent de mesurer tous les paramètres de la cinétique d'assemblage des MTs dans les cellules. Il s'agit du "plus end tracking "(Fig.20).

Il existe de nombreuses autres méthodes pour mesurer la dynamique des MTs, comme l'ablation laser, l'utilisation de tubuline α GFP photoactivable, l'utilisation de sondes fluorescente (i.e. docetaxel fluorescent/ SiR-Tubuline), qui ne seront pas détaillées ici (pour revue, voir Microtubule dynamics, methods and protocols, éditeur Anne Straube).

Caractéristiques de la dynamique des microtubules *in vivo*

La dynamique de polymérisation des MTs *in vivo* est caractérisée par une vitesse de polymérisation supérieure à celle observée *in vitro*. De plus, les alternances entre les périodes de polymérisation et dépolymérisation sont plus fréquentes, ainsi que les événements de sauvetage et de pause (Desai and Mitchison, 1997). Ces différences sont dues à la présence, dans les cellules, de protéines régulant la dynamique des MTs (MAPs). Les catastrophes peuvent être déclenchées par différents obstacles que rencontrent les extrémités (+) des MTs. En effet, le cortex cellulaire par exemple, ralentit la croissance des MTs, entraîne la perte de la coiffe GTP suivie d'une éventuelle catastrophe. Ces événements peuvent également être provoqués par la liaison de MAPs (Akhmanova and Steinmetz, 2015). Enfin, dans les cellules, les MTs sont attachés aux centrosomes par leur extrémité (-). Cependant ils sont capables, une fois formés, de se détacher et se déplacer via le phénomène de tapis roulant (Rodionov and Borisy, 1997).

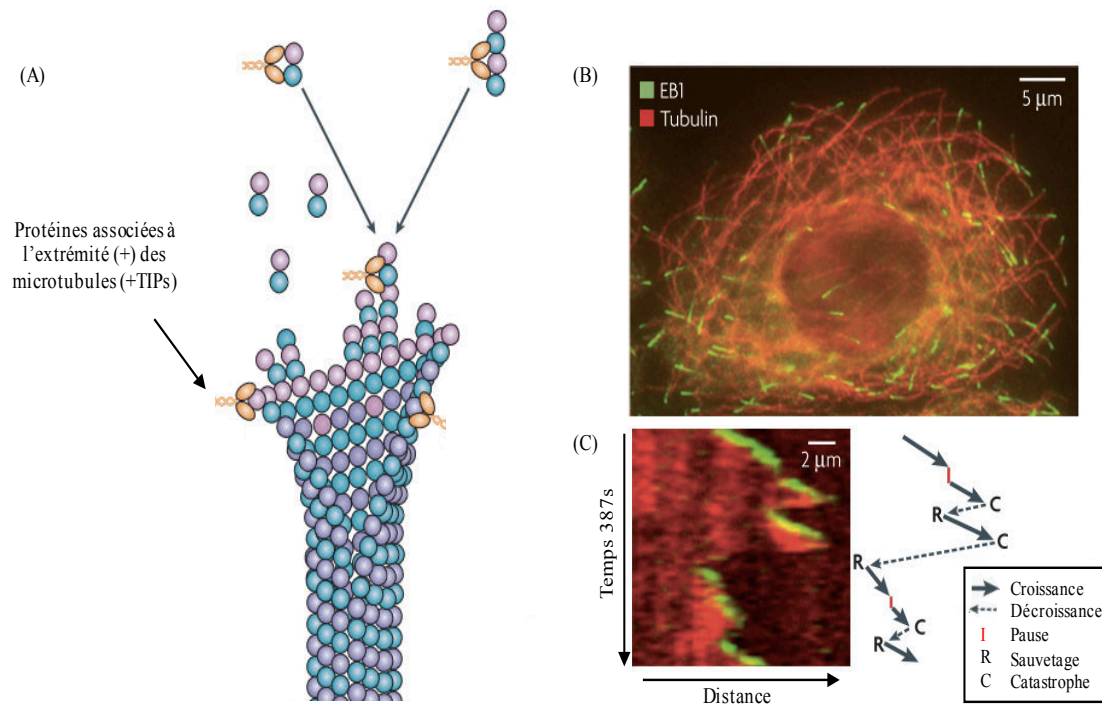


Figure 20. Technique du plus end tracking.

(A) Les protéines appelées +TIPs sont des protéines associées à l'extrémité (+) des MTs (EB3 ou EB1 par exemple). (B) Image en microscopie à fluorescence d'une cellule tubuline- α -mcherry (rouge) transfectée avec un plasmide EB1-GFP. L'extrémité (+) des MTs apparaît donc en vert. (C) Kymographe montrant les différentes phases de l'instabilité dynamique. L'axe vertical représente le temps et l'axe horizontal, la distance parcourue par le MT. MTs en rouge (tubuline- α -mCherry) et extrémité (+) en vert (EB3-GFP). Adapté de Akhmanova and Steinmetz, 2008.

II.2.3 Les protéines associées aux microtubules

Les protéines associées aux MTs sont des éléments régulateurs importants de la dynamique des MTs dans les cellules. Ces différentes protéines peuvent se fixer sur la tubuline libre ou bien sur les MTs, soit sur toute leur longueur, soit à leurs extrémités comme c'est le cas pour des protéines +TIPs et -TIPs, s'associant respectivement à l'extrémité (+) et (-) des MTs.

Selon leur mode d'action, on peut classer ces protéines en deux familles principales : les MAPs stabilisatrices et les MAPs déstabilisatrices, dont la description est résumée ci-dessous sous forme de tableaux synthétiques.

a. Les MAPs stabilisatrices des microtubules

Famille (protéines)	Effets sur les fonctions et la dynamique des MTs	Réfs
MAP1 (MAP1A et B)	Stabilisation des MTs dans les neurones	a
MAP2/Tau (MAP2, Tau, MAP4)	MAP4 : non-neuronale, MAP2 et Tau : neuronales Stabilisation des MTs et inhibition de la dépolymérisation	b
MAP6	Stabilisation et protection des MTs contre le froid et les drogues dépolymérisantes dans les neurones. Impliquée dans la fonction synaptique	c, d
ATIP3	Stabilisation des MTs. Régulation de la localisation de EB1. Impliquée dans la progression de la mitose : une surexpression de ATIP3 prolonge la métaphase à l'origine d'un délai mitotique	e, f
Kinésine 7 (CENPE)	Promotion de l'élongation des MTs (stabilisation de la conformation linéaire des MTs à l'extrémité (+)) Impliquée dans les interactions latérales microtubules-kinétochore (MT-KT), l'alignement et la ségrégation des chromosomes	g
EBs (EB1, EB2, EB3)	Stabilisation des MTs par stimulation de la croissance Impliquées dans la nucléation des MTs astraux ; le positionnement du fuseau ; l'achèvement de la cytokinèse ; l'adhésion cellulaire après la mitose	h, i
TOG (XMAP215)	Recrutement des dimères de tubuline et promotion leur polymérisation Régulation de la dynamique des MTs Impliquée dans l'organisation des pôles du fuseau mitotique, la mise en place du fuseau ; protection des fibres kinétochoriennes contre les dépolymérisations	h, i
Spectraplakines (MACF, ACF7)	Stabilisation des MTs via l'interaction avec le cortex cellulaire et le réseau d'actine	j, k
APC (APC1 et 2)	Stabilisation des MTs via l'interaction avec le cortex cellulaire et le réseau d'actine. Stimulation de la croissance microtubulaire et diminution des catastrophes Impliquées dans la régulation de l'interaction MT-KT ; positionnement du fuseau ; séparation des chromosomes	j, l, i
CLASPs (CLASP1 et 2)	Stabilisation des MTs et augmentation des sauvetages Impliquées dans l'organisation et l'assemblage du fuseau ; dans l'attachement MT-KT et l'achèvement de la cytokinèse	j, i
NuSAP	Stabilisation des MTs proches des chromosomes Impliquée dans l'alignement correct des chromosomes en métaphase	m
Kinésine-5 (Eg5)	Stabilisation par interaction avec des MTs antiparallèles (MTs interpolaires) venant des pôles opposés lors de la mitose	n, o
MAP65 (PRC1)	Impliquées dans la séparation et la stabilisation du fuseau mitotique	p
CLIP (CLIP170 et 115)	Stabilisation des MTs et augmentation du taux de sauvetage Impliquées dans la régulation de l'interaction MT-KT et MTs-Cortex cellulaire	q, i
CAMSAPs (CAMSAP1 à 3)	Protège l'extrémité (-) de la dépolymérisation. Intervient dans la nucléation des MTs à partir des COMT non centrosomaux.	h
NuMA (NUMA)	Stabilisation des MTs aux pôles dans les cellules en mitose Impliquée dans l'organisation des pôles du fuseau et l'assemblage du fuseau	r
TPX2	Stabilisation des MTs et augmentation du taux de sauvetage Impliquée dans la régulation de l'interaction MTs-KT et MTs-Cortex cellulaire	s
γ -TURC	Nucléation des MTs, Stabilisation de l'extrémité (-) des MTs	voir II.2.2 a

Tableau 3. Principales MAPs stabilisatrices des microtubules.

Fond bleu : MAPs qui se fixent le long des MTs. Fond vert : MAPs qui se fixent au niveau de l'extrémité (+) des MTs. Fond rose : MAPs qui se fixent au niveau de l'extrémité (-) des MTs. Écriture bleue : Fonctions spécifiques lors de la mitose. a. (Halpain and Dehmelt, 2006), b. (Dehmelt and Halpain, 2005), c. (Guillaud et al., 1998), d. (Peris et al., 2018), e. (Nehlig et al., 2017), f. (Rodrigues-Ferreira et al., 2009), g. (Prosser and Pelletier, 2017), h. (Akhmanova and Steinmetz, 2015), i. (Ferreira et al., 2014), j. (Akhmanova and Steinmetz, 2010), k. (Kodama et al., 2003), l. (Kita et al., 2006), m. (C. Li et al., 2016), n. (Chen and Hancock, 2015), o. (Ferenz et al., 2010), p. (Bechstetd and Brouhard, 2013), q. (Arnal et al., 2004), r. (Haren et al., 2009), s. (Wadsworth, 2015).

Cette liste n'est pas exhaustive et par exemple, de nombreuses protéines régulatrices de l'actine comme les formines (mDia1, mDia2, INF1, etc.) sont aussi capables de se lier aux MTs et de réguler leur dynamique (Bartolini and Gundersen, 2010).

b. Les MAPs déstabilisatrices des microtubules

Famille (protéines)	Effets sur les fonctions et la dynamique des MTs	Réfs
Katanine	Activité GTPase et dépolymérase. Coupure des MTs en fragments sans coiffe GTP. Dépolymérisation des extrémités (-) libres des MTs	t
Oncoprotéine 18 ou Stathmine	Stimulation de l'hydrolyse du GTP à l'extrémité (+) des MTs provoquant la perte de la stabilisation par la coiffe GTP. Augmentation du taux de catastrophe <i>Impliquées dans la déstabilisation des longs MTs issus de l'interphase, avant la mitose ; stathmine : Séquestration des dimères libres de tubuline α et β, fixation sur les dimères de l'extrémité (+) des MTs, augmentation du nombre de catastrophes</i>	t, u
Kinésine 8 (Kif18A, B et Kif 19)	Réduction de la vitesse de polymérisation de l'extrémité (+) des MTs à proximité des kinétochores. Augmentation du taux de catastrophe <i>Impliquées dans la régulation de la taille des MTs lors de l'alignement des chromosomes</i>	v, w, h
Kinésine 13 (MCAK/Kif2C, Kif2A)	Changement conformationnel des tubulines induisant l'apparition d'une structure incurvée qui favorise la dépolymérisation des MTs. Augmentation du taux de catastrophe <i>Impliquées dans la déstabilisation des longs MTs issus de l'interphase, avant la mitose ; Régulation de la taille des MTs lors de l'alignement des chromosomes</i>	v, w

Tableau 4. Principales MAPs déstabilisatrices des microtubules.

Fond bleu : MAPs qui se fixent le long des MTs. Fond vert : MAPs qui se fixent au niveau des extrémités (+) ou (-) des MTs. Écriture bleue : Fonctions spécifiques lors de la mitose. h. (Akhmanova and Steinmetz, 2015), t. (Nogales, 2000), u. (Gigant et al., 2003), v. (Auckland and McAinsh, 2015), w. (Vicente and Wordeman, 2016).

c. Régulation des MAPs

La fixation des MAPs est fortement influencée par des modifications post-traductionnelles ou par d'autres protéines dont les MAPs elles-mêmes.

Les protéines EBs, par exemple, sont majoritairement régulées par phosphorylation au cours du cycle cellulaire. Ces phosphorylations modifient l'interaction des protéines EBs avec les MTs ou avec d'autres protéines et régulent ainsi la dynamique des MTs, la migration

cellulaire et la mitose (Nehlig *et al.*, 2017). D'autre part, une acétylation au niveau du domaine C-terminal de la protéine EB1, participe au contrôle de l'interaction MT-KT et une ubiquitination de cette protéine entraîne sa protéolyse (Akhmanova and Steinmetz, 2015).

Des protéines peuvent également intervenir dans la régulation des MAPs. C'est le cas de la Mapmoduline, qui fixe les MAPs solubles telles que MAP2, MAP4 et Tau au niveau de leur domaine d'interaction avec la tubuline, les empêchant ainsi de se fixer sur les MTs (séquestration) (Ulitzur *et al.*, 1997). Les MAPs peuvent elles-mêmes intervenir dans la régulation d'autres MAPs. Les protéines structurales MAP1, MAP2, Tau et ATIP3 régulent la fixation de EB1 à l'extrémité croissante des MTs (**Fig.21**) (Nehlig *et al.*, 2017).

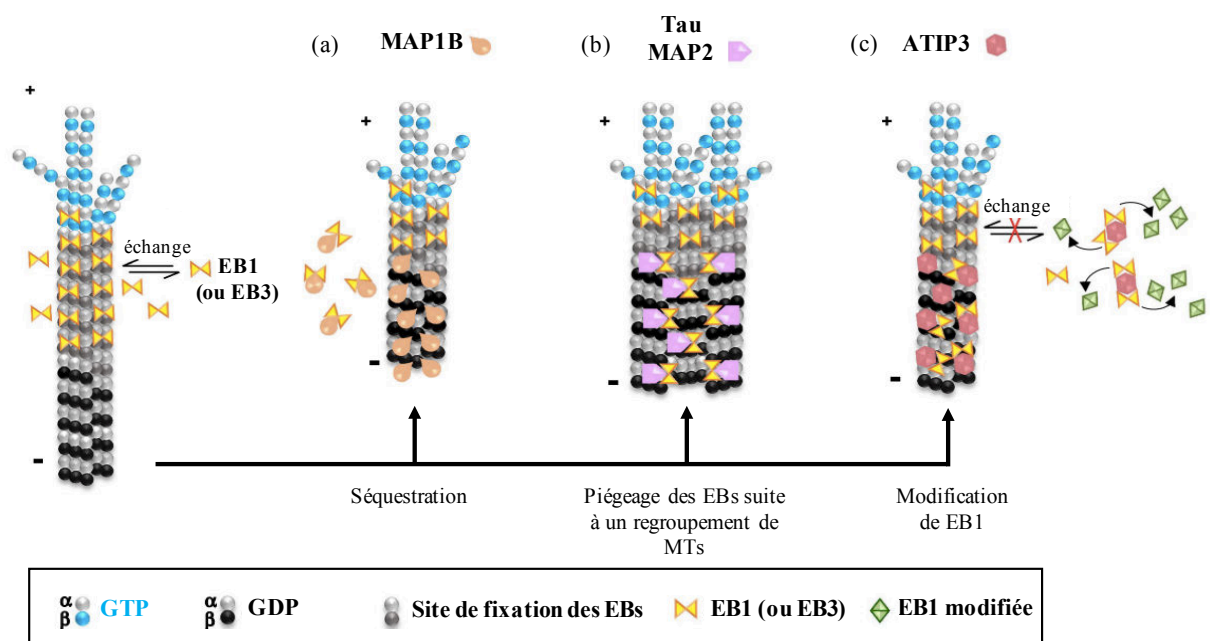


Figure 21. Régulation négative des protéines EBs par des MAPs structurales.

(a) MAP1B co-localise avec EB1 et EB3 au niveau des cônes de croissance des cellules neuronales. MAP1B séquestre les protéines EBs dans le cytosol empêchant leur fixation sur les MTs. (b) Lorsqu'elle est fortement exprimée, la protéine Tau favorise la formation d'un regroupement de MTs à l'origine du piégeage de EB1 et EB3 le long du MT. Tau peut également interagir directement avec les protéines EBs et les piéger dans le cytosol. Le même mécanisme est observé avec MAP2. (c) ATIP3 interagit directement avec EB1. Le complexe EB1-ATIP3 se localise dans le cytosol et le long des MTs. Le mécanisme d'action de ATIP3 est mal connu. L'hypothèse est que cette protéine modifie l'affinité d'EB1 pour son site de fixation grâce à des MPTs. Adapté de Nehlig *et al.*, 2017.

II.3 Rôle des microtubules dans les cellules

Le cytosquelette microtubulaire est extrêmement important pour l'organisation spatio-temporelle des cellules eucaryotes. Cette structure dynamique est finement régulée par des modifications post-traductionnelles et la fixation de protéines régulatrices, lui permettant de jouer différents rôles clés dans les cellules.

II.3.1 Organisation et rôle des microtubules en interphase

Les réseaux de MTs contrôlent l'organisation intracellulaire et aident à définir la morphologie cellulaire. L'orientation uniforme des dimères de tubuline α et β lors de l'assemblage des MTs leur confère une polarité nécessaire à de nombreux processus biologiques. En interphase, les MTs s'organisent à partir du centrosome situé à proximité du noyau au centre de la cellule et polymérisent vers la périphérie de la cellule (**Fig.22**).

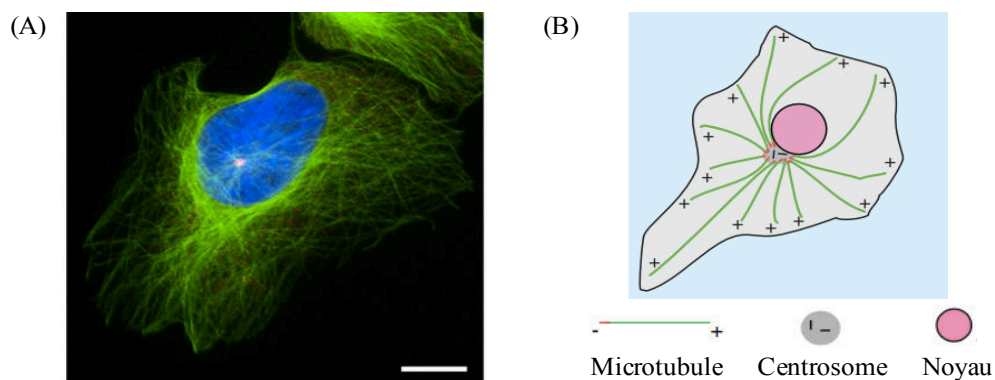


Figure 22. Organisation du réseau de microtubules dans les cellules en interphase.

(A) Photo d'une cellule U2OS (ostéosarcome humain) en interphase, vue au microscope à fluorescence. Les MTs sont marqués en vert, le centrosome en rouge et le noyau en bleu. Échelle : $10\mu\text{m}$ (Sulimenko et al., 2017). (B) Représentation schématique de l'organisation des MTs en interphase (Dammermann et al., 2003).

Les MTs sont responsables de nombreux mouvements cellulaires, comprenant le transport intracellulaire, à l'origine du positionnement correct des vésicules membranaires et des organites mais aussi le battement des cils et des flagelles. Le transport intracellulaire est réalisé grâce à des protéines motrices se comportant comme des "cargos". Les vésicules par exemple, se fixent et transitent le long des MTs qui leur servent de rails. Les membres de deux grandes familles de protéines motrices, les kinésines et les dynéines, sont responsables de la variété des mouvements au sein des cellules. Ces protéines se déplacent le long des MTs dans des directions opposées, la kinésine vers l'extrémité (+) et la dynéine vers l'extrémité (-) des MTs (**Fig.23**) (Cooper, 2000).

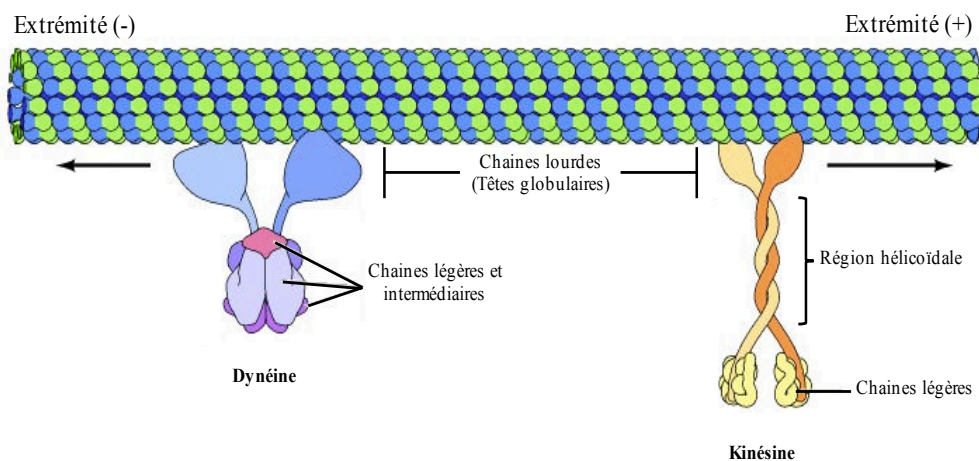


Figure 23. Représentation schématique du transport intracellulaire par les kinésines et les dynéines. *Adaptée de Cooper, 2000.*

Les kinésines sont des molécules d'environ 380 Kd constituées de 2 chaînes lourdes et de 2 chaînes légères. Les chaînes lourdes forment 2 domaines moteurs (têtes globulaires) qui se lient à la fois aux MTs et à l'ATP, dont l'hydrolyse fournit l'énergie nécessaire au mouvement le long des MTs. Ces domaines sont suivis de longues régions hélicoïdales α qui s'enroulent et forment une structure en spirale qui s'associe aux chaînes légères. Cette portion des kinésines est responsable de l'interaction avec d'autres composants cellulaires (vésicules membranaires et organites) qui sont transportés le long des MTs.

Les dynéines sont des molécules plus grandes (jusqu'à 2000 Kd) et sont constituées de deux ou trois chaînes lourdes complexées avec un nombre variable de polypeptides légers et intermédiaires. Comme pour les kinésines, les chaînes lourdes forment des domaines moteurs utilisant l'ATP pour se déplacer le long des MTs et les chaînes légères et intermédiaires leur permettent de fixer d'autres structures cellulaires (organites et les vésicules) (Cooper, 2000).

II.3.2 Organisation et rôle des microtubules en mitose

La mitose est une étape importante du cycle cellulaire qui permet la répartition de l'ADN (préalablement dupliqué en phase S) en deux parts égales entre les cellules filles. Toutes les cellules eucaryotes se préparent à la division cellulaire en formant un appareil mitotique, constitué de MTs et de nombreuses protéines associées. La formation et le bon fonctionnement de cet appareil nécessitent toutes deux une dynamique des MTs importante et contrôlée, ainsi que l'action de plusieurs MAPs.

a. Les microtubules en mitose

La mitose se réalise en plusieurs étapes : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase/cytocinèse (voir la partie I.2.2 b, p17). Dans les cellules de mammifères, l'appareil mitotique a la forme d'un fuseau. C'est un réseau bipolaire de MTs hautement dynamiques de longueurs variées qui croissent et se rétractent en permanence (**Fig.24**). En effet, le réseau de MTs en interphase se réorganise au début de la mitose et fait place à une population de MTs 4 à 100 fois plus dynamiques que les MTs du cytosquelette interphasique (Rusan *et al.*, 2001).

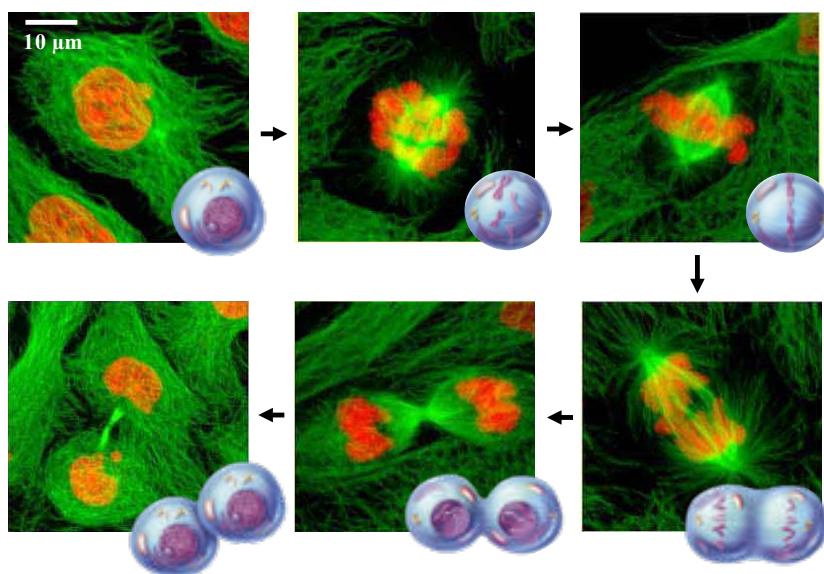


Figure 24. Organisation des microtubules au cours de la mitose.

Le fuseau mitotique est composé de trois grandes catégories de MTs : les MTs kinétochoriens, les MTs astraux et les MTs polaires (**Fig.25**).

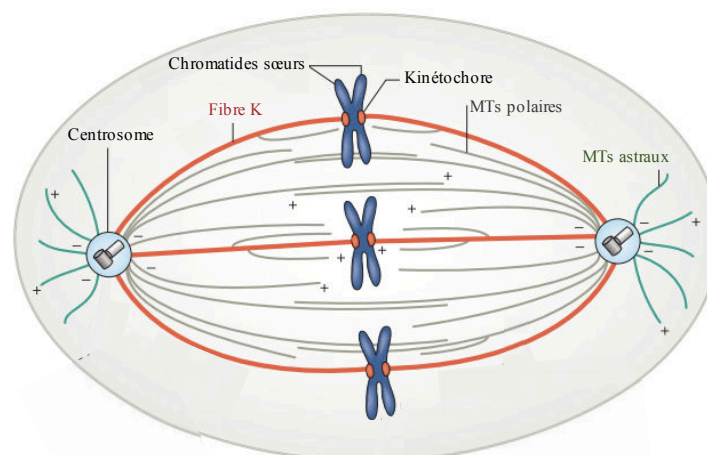


Figure 25. Composition du fuseau mitotique.

Adaptée de Prosser and Pelletier, 2017.

Les MTs polaires, provenant des pôles opposés, glissent et interagissent entre eux via des protéines motrices et permettent ainsi la séparation et la stabilisation du fuseau mitotique. Les MTs astraux, quant à eux, rayonnent à partir des pôles du fuseau et interagissent avec le cortex cellulaire, permettant le positionnement du fuseau dans la cellule. Enfin, les MTs kinétochoriens ont pour rôle essentiel d'attacher les chromosomes au fuseau *via* le kinétochore, structure protéique assemblée à la surface de chaque centromère des chromosomes. 20 à 30 MTs sont attachés par kinétochore, constituant ce qu'on appelle les fibres K (Helmke *et al.*, 2013; McEwen *et al.*, 1997). Ces fibres K, contrairement aux autres MTs du fuseau, sont connues pour leur résistance au froid ou à de faibles doses de molécules dépolymérisantes (Rieder, 1981).

Les mouvements des chromosomes durant la mitose sont dus à la fois à une dynamique des MTs finement régulée et à l'action de diverses protéines (MAPs). De nombreuses MAPs régulant la dynamique des MTs, interviennent dans la mise en place du fuseau mitotique, l'attachement des MTs au niveau des kinétochores et la ségrégation des chromosomes (voir tableau 3 et 4 de la partie II.2.3, p45-47).

b. Attachement des chromosomes au fuseau mitotique

Avant que les chromosomes ne se séparent pendant l'anaphase, ils s'attachent au fuseau mitotique et s'alignent au niveau de la plaque équatoriale, au centre de la cellule. Il s'agit d'un processus complexe, mettant en jeu différents mécanismes.

La rupture de l'enveloppe nucléaire lors de la prométaphase entraîne la libération et la répartition des chromosomes dans la cellule. Les chromosomes positionnés au centre de la cellule sont facilement capturés par les MTs issus du fuseau mitotique. Pour les chromosomes situés à la périphérie, des mécanismes particuliers sont mis en jeu pour les acheminer à la plaque équatoriale. L'un des mécanismes fait intervenir de manière coordonnée deux protéines motrices qui transportent ces chromosomes vers le centre de la cellule (**Fig.26**). La dynéine et la protéine CENP-E (Centrosome Protein E, appartient à la famille kinésine 7) sont capables de se fixer à la fois aux kinétochores et aux MTs sur lesquels ils transitent. La dynéine prend en charge les chromosomes localisés aux pôles et les amène, *via* les MTs astraux, au niveau du centrosome où CENP-E prend le relais. Cette protéine migre vers l'extrémité (+) des MTs kinétochoriens, amenant ainsi les chromosomes au centre de la cellule. Ces deux protéines motrices sont sensibles aux modifications post-traductionnelles de la tubuline.

En effet, la protéine CENP-E a une préférence pour la tubuline détyrosinée contrairement à la dynéine qui se fixe préférentiellement sur la tubuline tyrosinée (Barisic and Maiato, 2016).

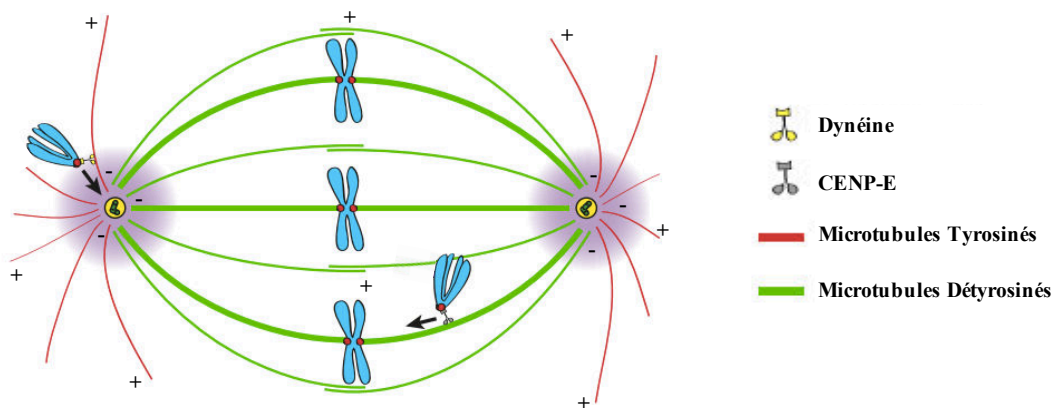


Figure 26. Représentation schématique de l'alignement des chromosomes par des protéines motrices. Adaptée de Barisic and Maiato, 2016.

Lorsqu'un chromosome est attaché aux deux pôles du fuseau, son positionnement correct au niveau de la plaque équatoriale s'établit par polymérisation / dépolymérisation des MTs au niveau des kinétochores (système DCP pour Depolymerisation-coupled tension) (Fig.27). Ce système fait intervenir des MAPs régulatrices telles que MCAK et Kif 18A (Auckland and McAinsh, 2015).

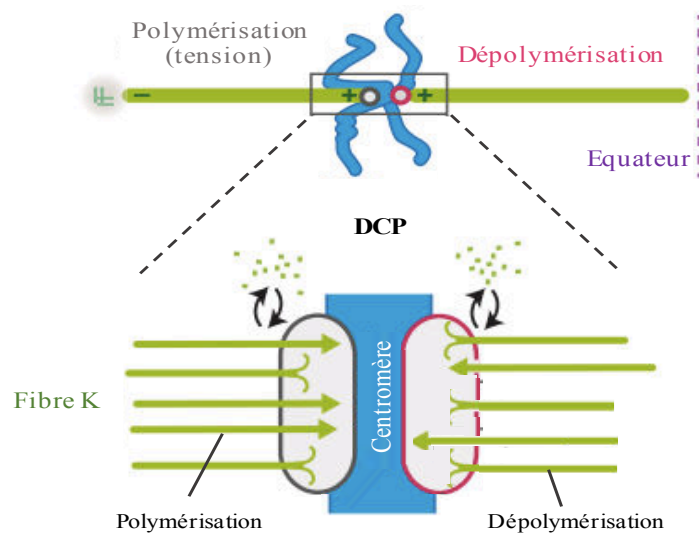


Figure 27. Représentation schématique du mécanisme DCP. Adaptée de Auckland and McAinsh, 2015.

La séparation équitable des chromosomes est essentielle pour la stabilité du génome et à la vie cellulaire. Une mauvaise répartition chromosomique entraîne une létalité ou une aneuploïdie (nombre aberrant de chromosomes dans la cellule). Cette aneuploïdie expose à des mutations délétères, à l'origine d'anomalies favorisant l'apparition et la prolifération de cellules cancéreuses.

Une ségrégation correcte des chromosomes est réalisée par l'attachement latéral bi-orienté des chromosomes au fuseau mitotique. On parle d'attachement amphitélétique (**Fig.28A**). Il garantit une tension égale des chromosomes de part et d'autre et leur alignement au niveau de la plaque équatoriale. Toutefois, les kinétochores d'un même chromosome (kinétochores frères) sont capables de se lier de manière équivalente aux MTs de l'un ou l'autre pôle, ce qui peut conduire à des attachements incorrects (**Fig.28B**). Ainsi, les MTs d'un même pôle peuvent s'attacher à un seul des kinétochores frères ou aux deux, on parle respectivement d'attachement monotélétique et syntélétique. Il peut aussi arriver qu'un kinétochore soit attaché correctement à un pôle, alors que son kinétochore frère est attaché aux deux pôles. On parle alors d'attachement mérotélétique (London and Biggins, 2014).

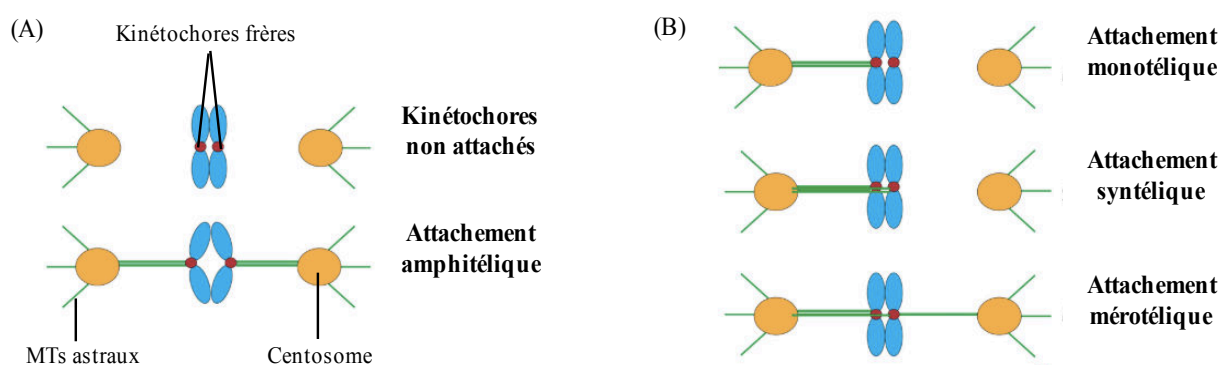


Figure 28. Représentation schématique des différentes configurations d'attachement des kinétochores aux microtubules du fuseau mitotique. Adaptée de London and Biggins, 2014.

Seuls les attachements bi-orientés provoquent au niveau des kinétochores, la tension nécessaire à la poursuite de la mitose (Sarangapani and Asbury, 2014). Afin de garantir cette configuration, les cellules ont mis en place un mécanisme de surveillance permettant de détecter et d'éliminer les erreurs. Il s'agit du point de contrôle "Spindle Assembly Checkpoint" ou SAC. Un point de contrôle est un mécanisme qui fait intervenir un détecteur, qui identifie la survenue d'un problème, et une voie de transduction du signal qui permet l'activation d'un effecteur dont le rôle est d'arrêter la progression dans le cycle tant que le problème n'est pas corrigé. Le SAC fait intervenir un ensemble de protéines initialement liées

aux kinétochores (MAD, Bub) et un ensemble de boucles de régulation faisant intervenir des kinases et des phosphatases. Le rôle des phosphatases est de contrebalancer l'action des kinases au kinétochore. Deux phosphatases jouent un rôle déterminant dans la régulation de l'activité du SAC : PP1 (Protein Phosphatase 1) et PP2A (Protein Phosphatase 2 A). Le SAC retarde l'anaphase et reste activé tant que les chromosomes ne sont pas correctement attachés au fuseau mitotique (voir la partie I.2.2 c et d, p18-19). Si les erreurs ne sont pas corrigées, différents phénotypes peuvent apparaître. En effet, après une étape de blocage de la mitose par le SAC, la cellule peut mourir, se diviser et donner naissance à des cellules filles aneuploïdes ou encore ne pas se diviser et conserver une quantité de matériel génétique de 4N (tétraploïdes).

Les MTs sont impliqués dans divers processus essentiels pour la vie cellulaire. Leur importance dans la mitose et la division cellulaire fait des MTs une cible importante pour les agents anticancéreux. Les MTs et leur dynamique sont les cibles d'un groupe chimiquement diversifié de médicaments antimitotiques utilisés avec succès dans le traitement du cancer. Compte tenu du succès clinique de cette classe d'agent, il a été avancé que les MTs représentent l'une des meilleures cibles identifiées jusqu'à présent pour traiter le cancer. Il semble donc probable que les médicaments de cette classe continueront d'être importants malgré l'apparition d'effets indésirables et même si des approches plus sélectives sont développées.

III. Les poisons du fuseau

III.1 Généralités

Nous avons vu précédemment que le cytosquelette microtubulaire jouait un rôle essentiel dans diverses fonctions biologiques : positionnement des composants cellulaires et trafic intracellulaire en interphase ; formation du fuseau mitotique durant la division cellulaire ; établissement et maintien de la morphologie et de la motilité cellulaire. L'étude du rôle des MTs dans ces activités cellulaires clés, a indubitablement bénéficié du développement de composés pharmacologiques. Les petites molécules ciblant le cytosquelette présentent en effet de nombreux avantages pour la recherche. Ce sont des outils irremplaçables pour sonder les phénomènes dynamiques. Capables d'agir en quelques minutes, voire quelques secondes, elles autorisent un degré de contrôle temporel important sur la fonction des protéines. Comme leur effet est souvent réversible, elles permettent aussi bien une activation qu'une inactivation rapide. De plus, elles permettent un contrôle dose-dépendant des fonctions biologiques. Pour l'étude d'un système dynamique comme le cytosquelette, les molécules pharmacologiques sont donc des outils bien adaptés. En outre, plusieurs de ces molécules ont été développées en médicaments largement utilisés dans le traitement de maladies telles que les cancers et la goutte.

À la fin des années 1960, la recherche de la cible de la colchicine, molécule utilisée depuis l'antiquité pour traiter la goutte, a permis de découvrir la tubuline et de comprendre qu'il s'agissait de la protéine constitutive des MTs (Peterson and Mitchison, 2002). La colchicine est le premier exemple d'agent ciblant les MTs (ou MTA pour « Microtubule Targeting Agent »). Les premiers MTAs approuvés pour le traitement des lymphomes et de diverses tumeurs solides sont les alcaloïdes de la Pervenche (vinca-alcaloïdes) : la vinblastine et la vincristine. Ces composés et leurs dérivés ont longtemps été les seuls représentants de MTAs utilisés en thérapie anticancéreuse, jusqu'à la découverte, du paclitaxel (PTX) dans l'écorce de l'if. C'est au début des années 1990 que le PTX devient un médicament de première intention pour le traitement des cancers de l'ovaire, du sein, de la vessie, de la prostate et du poumon (Dumontet and Jordan, 2010; Yang and Horwitz, 2017).

Cependant, malgré leur succès massif en clinique, l'utilisation de MTAs est entravée par leur toxicité et l'apparition de résistances (Kavallaris, 2010; Miltenburg and Boogerd, 2014). Pour tenter de pallier ces effets indésirables, de nombreux analogues structuraux du PTX, des

alcaloïdes de la pervenche ou de la colchicine ont été développés. Puis, de nouvelles familles de molécules ont également vu le jour (épothilones, maytansine, halichondrines, *etc.*). Aujourd'hui, plusieurs dizaines de classes chimiques différentes de MTAs sont connues. La majorité est d'origine naturelle (éponges marines, plantes, bactéries) ou dérivée de substances naturelles (Robert, 2015).

III.2 Fixation des MTAs sur la tubuline

Les MTAs se lient à la tubuline soluble et/ou directement à la tubuline dans les MTs, sur différents sites de fixation. Il existe trois principaux sites distincts de liaison des MTAs sur la tubuline, appelés site taxane (famille du PTX), site de la colchicine et site vinca. Récemment, de nouveaux sites de fixation ont été découverts : le site maytansine, le site laulimalide/péloruside et le site pironétine (**Fig.29**) (Steinmetz and Prota, 2018).

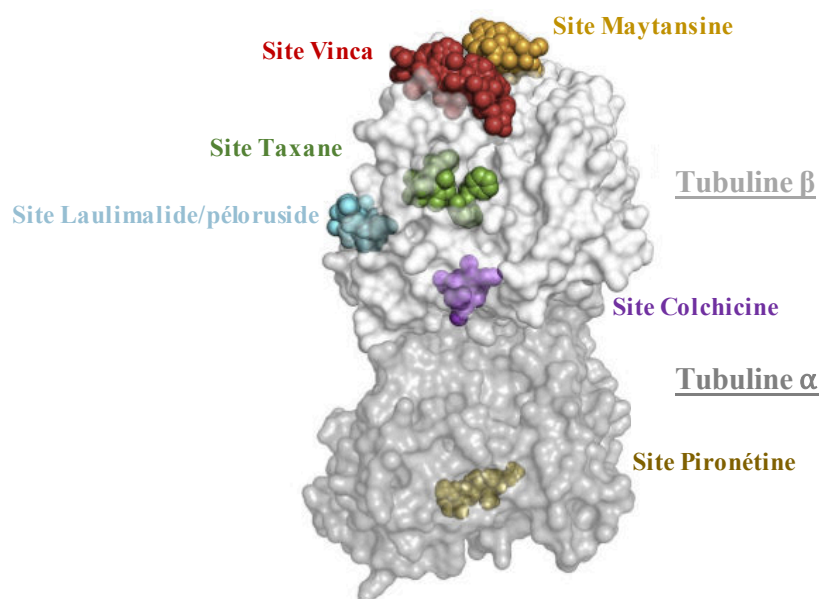


Figure 29. Sites de fixation des MTAs sur la tubuline.
(Steinmetz and Prota, 2018).

L'amélioration des techniques de cristallographie à rayon X et de cryo-microscopie électronique a permis de mieux caractériser l'interaction des MTAs avec la tubuline et de comprendre leur mécanisme d'action au niveau moléculaire. L'action de ces différents agents dépend de leur localisation sur la tubuline, c'est pourquoi ils sont souvent décrits en fonction de leur site de fixation. On distingue deux types d'agents ciblant les MTs : les MTAs qui déstabilisent les MTs seront dénommés MDAs (Microtubules Destabilizing Agents) et les agents stabilisants les MTs seront dénommés MSAs (Microtubules Stabilizing Agents).

III.2.1 Sites de fixation des MDAs

Tous les MTAs qui se fixent au niveau des sites maytansine, colchicine, vinca et pironétine sont considérés comme étant des MDAs.

a. Site colchicine

La colchicine est un alcaloïde tricyclique, extrait des colchiques (plantes du genre *colchicum*), principalement le colchique d'automne. Le terme alcaloïde désigne des composés organiques azotés et basiques extraits de végétaux. Le site de fixation de la colchicine est l'un des plus étudié parmi les sites fixant les MDAs. De nombreuses molécules présentant une grande diversité structurale et interagissant avec ce site ont été conçues et synthétisées (**Fig.30A**) (Lu *et al.*, 2013).

Le site colchicine forme une poche profonde enfouie dans le domaine intermédiaire de la tubuline β et est localisé à proximité de l'interface intradimère, entre les sous-unités α et β . Il est constitué des hélices H7-H8, de la boucle T7 et de 2 brins de feuillet β , S8-S9 de la tubuline β . Il implique également la boucle T5 de la tubuline α (Raimond *et al.*, 2004; Steinmetz and Prota, 2018). Ce site peut être subdivisé en 3 zones : une zone proche de la sous-unité α (Zone I), une zone centrale (Zone II) et une dernière zone profondément enfouie dans la sous-unité β (Zone III). Les MDAs interagissant avec ce site se fixent généralement sur les zones I et II, ou II et III, mais ne couvrent jamais simultanément les 3 zones (**Fig.30B**). Les interactions entre les MDAs et le site colchicine sont principalement hydrophobes (Steinmetz and Prota, 2018).

Le site colchicine est accessible uniquement sur les dimères libres de tubuline et la fixation d'une molécule sur un dimère forme un complexe tubuline-colchicine faiblement réversible. Ce complexe co-polymérise ensuite avec les tubulines libres au niveau de l'extrémité (+) des MTs (Jordan and Wilson, 2004). Le mécanisme moléculaire de l'action dépolymérisante de la colchicine est désormais mieux compris. Au cours de l'assemblage des microtubules, les dimères de tubuline passent d'une conformation incurvée quand ils sont libres à une conformation droite quand ils sont incorporés dans le microtubule (voir la partie II.2.1 c). Ce changement de conformation est caractérisé par le mouvement sur les hétérodimères α et β , de deux brins de feuillet β S8-S9 du domaine intermédiaire, vers l'hélice H8 qui s'accompagne d'une rotation de l'hélice H7, provoquant une contraction, un "écrasement" du site de liaison de la colchicine. Ainsi, la liaison de la colchicine pourrait empêcher la

formation du MT essentiellement en empêchant la transition du dimère d'une conformation courbée à une conformation droite (**Fig.30C**).

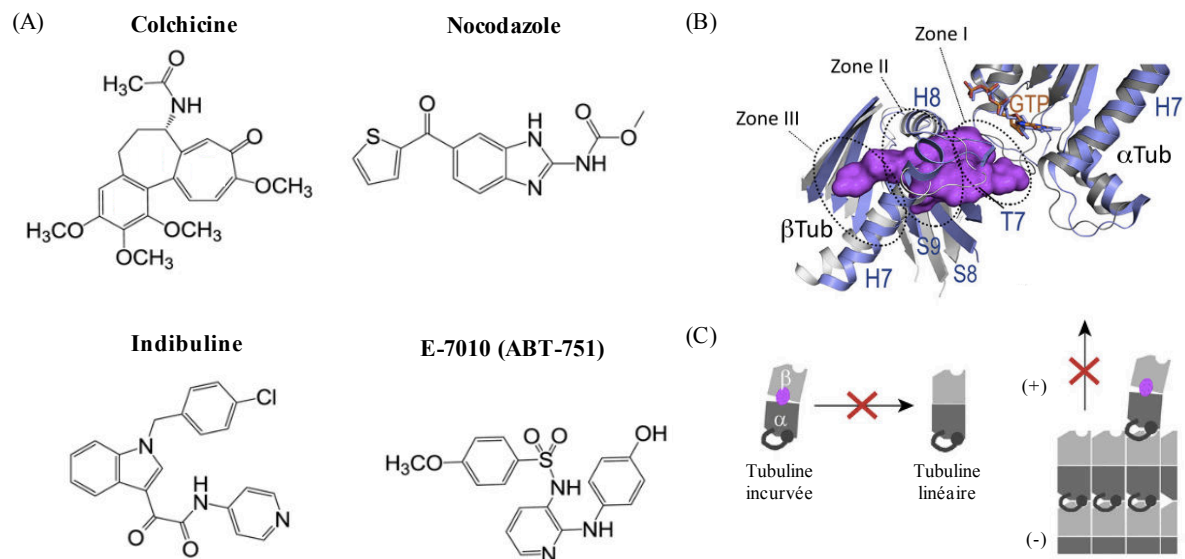


Figure 30. Fixation des MDAs sur le site colchicine.

(A) Structure chimique de la colchicine et d'autres agents interagissant avec le site colchicine (Robert, 2015). (B) Représentation de la structure du site colchicine. Le MDA est représenté en violet. (C) La fixation du MDA sur le site colchicine déstabilise les MTs en empêchant l'hétérodimère de tubuline de passer d'une conformation recourbée à une conformation droite (Steinmetz and Prota, 2018).

b. Site vinca

Les alcaloïdes de la Pervenche représentent la plus ancienne famille de MTAs. Des scientifiques canadiens, Robert Noble et Charles Beer, découvrent la vinblastine à la fin des années 1950. Isolée à partir d'extraits des feuilles de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*), cette molécule est utilisée pour son potentiel antimittotique et anticancéreux. La vincristine, qui ne diffère de la vinblastine que légèrement, est à son tour isolée de ces plantes, au début des années 1960. Les alcaloïdes de la Pervenche sont d'abord utilisés en monothérapie dans le traitement des hémopathies malignes de l'enfant, puis ils sont largement employés pour traiter les tumeurs malignes solides et les hémopathies malignes chez l'adulte (Mukhtar *et al.*, 2014). Puis de nouveaux analogues apparaissent, obtenus par des substitutions diverses à partir des deux premières molécules (vindésine, vinorelbine, vinflurine) (**Fig.31A**). Les alcaloïdes de la pervenche sont constitués de l'association de deux noyaux reliés par une liaison carbone-carbone : un noyau dihydroindole (vindoline) et un noyau indole (catharantine) (Robert, 2015). D'autres classes de composés chimiques à la fois naturels et synthétiques sont également connus pour se fixer sur le site vinca : les dolastatines, l'éribuline, l'auristatine, *etc.*

Le site vinca est localisé sur la tubuline β , à l'interface entre deux hétérodimères α - β . Il est constitué d'une zone centrale qui permet l'établissement de l'interaction avec le MDA et d'une poche qui s'étend jusqu'au site de fixation du GTP échangeable sur la tubuline β . La zone centrale fait intervenir l'hélice H6, les boucles T5 et H6-H7 de la tubuline β du premier dimère (β 1) et l'hélice H10, le brin S9 et la boucle T7 de la tubuline α du deuxième dimère (α 2) (**Fig.31B**) (Gigant *et al.*, 2005).

La fixation d'un MDA au niveau de ce site forme une « cale » moléculaire qui empêche l'alignement correct des dimères de tubuline, provoquant la formation de protofilaments incurvés, incompatibles avec l'assemblage linéaire des MTs (**Fig.31C**).

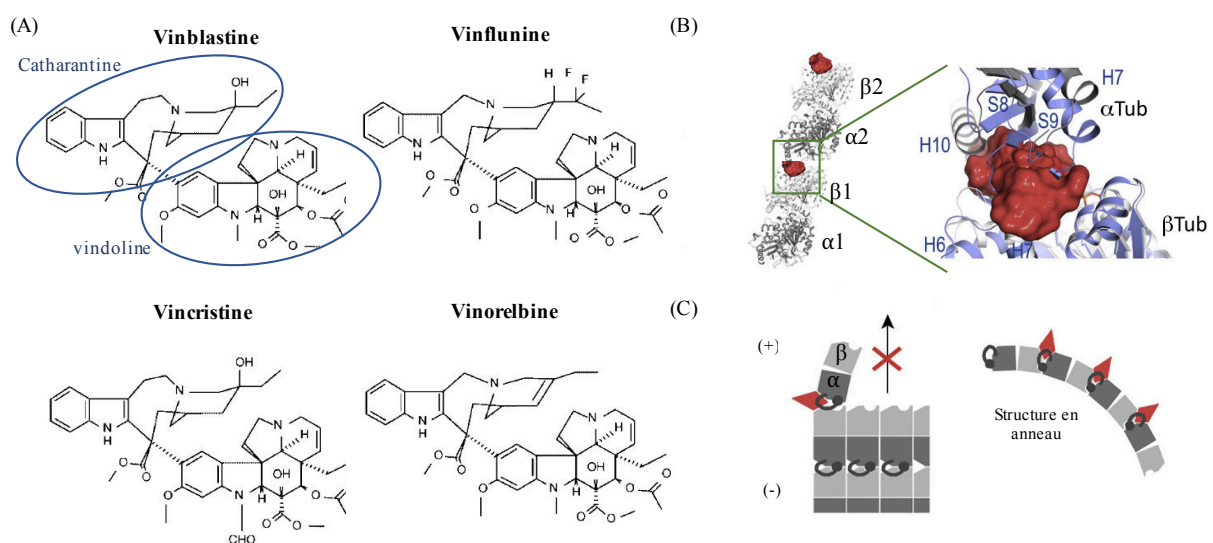


Figure 31. Fixation des MDA sur le site vinca.

(A) Structure chimique de la vinblastine et d'autres agents interagissant avec le site vinca (Perez, 2009). (B) Représentation de la structure du site vinca. Le MDA est représenté en rouge. (C) À faible concentration le MDA bloque la polymérisation des MTs. À forte concentration, il séquestre les dimères de tubuline et provoque la formation de structures en anneaux (Steinmetz and Prota, 2018).

Le degré de déformation des protofilaments peut être modulé par différents types de MDA. De plus, utilisés à forte concentration, les alcaloïdes de la Pervenche peuvent entraîner la séquestration des dimères α - β en formant des structures en anneau avec la tubuline libre. Par ailleurs, la liaison d'un MDA sur le site vinca interdit le positionnement correct des résidus catalytiques de la tubuline α 2 sur la tubuline β 1, empêchant ainsi l'hydrolyse du GTP en GDP (Steinmetz and Prota, 2018). Les alcaloïdes de la Pervenche se fixent à l'extrémité (+) des MTs avec une forte affinité et sur les tubulines du corps des MTs avec une faible affinité (Jordan, 2012; Mukhtar *et al.*, 2014).

c. Site maytansine

La maytansine est un macrolide de la famille des ansamycines et est présente dans une bactérie de la famille des actinomycètes. Elle a été isolée à partir d'une plante du genre *Maytenus* qui vit en symbiose avec la bactérie (Robert, 2015). Jusqu'à récemment, on pensait que la maytansine interférait avec le site vinca. Cependant, la cristallographie à rayon X a permis de démontrer qu'elle se lie sur un site distinct de celui de la vinblastine, où se fixent également d'autres molécules telles que la PM60184, la spongistatine, la rhizoxine et le disorazole. (**Fig.32A**) (Steinmetz and Prota, 2018).

Le site maytansine est localisé sur la tubuline β , à l'interface entre deux hétérodimères α - β . Il est adjacent au site GTP. Le MDA qui se fixe au niveau de ce site crée des interactions hydrophobes et polaires avec les résidus des hélices H3', H11 et H11', mais également avec les boucles S3-H3' (T3), S5-H5 (T5) et H11-H11' de la tubuline β . Le site maytansine fait aussi intervenir la boucle H10-S9, le brin S8 et l'hélice H8 de la tubuline α (**Fig.32B**) (Prota et al., 2014). Les hélices H3' et H11' sont des petites portions respectives des hélices H3 et H11.

La fixation d'un MDA sur le site maytansine est indépendante de la nature droite ou courbée de la conformation de la tubuline. Elle bloque la formation des contacts longitudinaux entre les dimères de tubuline, soit en inhibant l'addition de dimères au niveau de l'extrémité (+) des MTs, soit en formant des complexes non fonctionnels avec la tubuline lorsque les MDAs sont utilisés à forte concentration (**Fig.32C**).

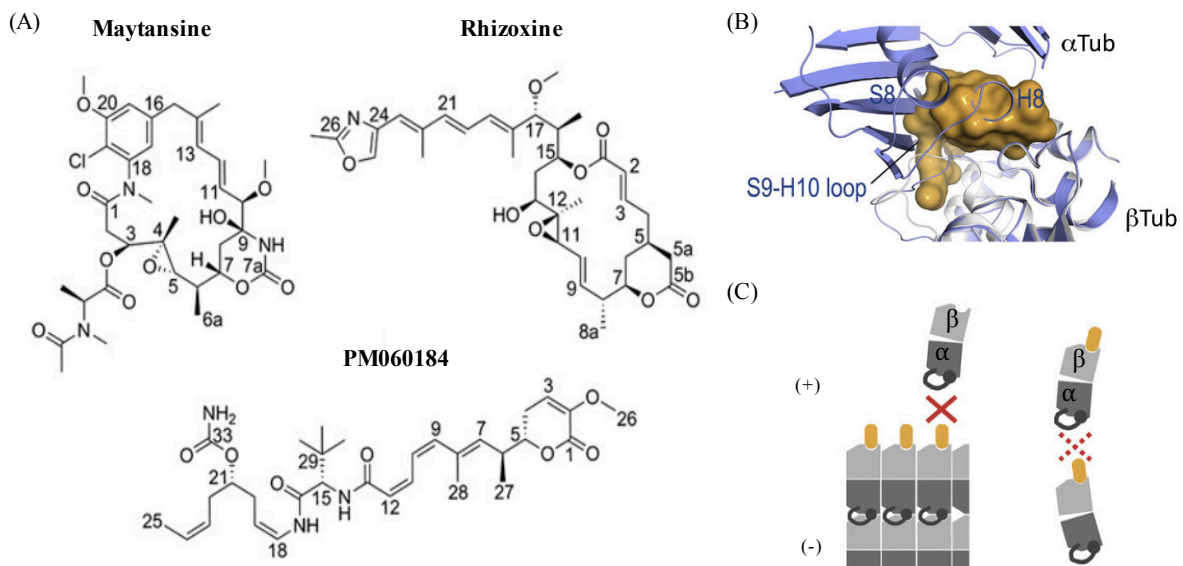


Figure 32. Fixation des MDAs sur le site maytansine.

(A) Structure chimique de la maytansine et d'autres agents interagissant avec le site maytansine (Prota *et al.*, 2014). (B) Représentation de la structure du site maytansine. Le MDA est représenté en jaune. (C) À faible concentration le MDA bloque l'addition de dimères à l'extrémité (+) des MTs. À forte concentration, il forme des complexes non fonctionnels avec les dimères de tubuline (Steinmetz and Prota, 2018).

d. Site pironétine

La pironétine est une lactone insaturée (**Fig.33A**) et est, à ce jour, le seul composé connu pour interagir avec la tubuline α uniquement, par établissement d'une liaison irréversible (Yang *et al.*, 2016). Cette molécule a été extraite de souches de *Streptomyces* en fermentation, dans les années 1990 et utilisée dans un premier temps comme un régulateur de croissance dans les plantes (Kobayashi *et al.*, 1994). Son activité anti-tumorale et son action sur les MTs ont été mises en évidence un peu plus tard (Kondoh *et al.*, 1999, 1998).

Le site pironétine est localisé sur la sous-unité α de la tubuline et forme une poche hydrophobe. La pironétine interagit avec les résidus des brins S8, S10 et avec l'hélice H7 (**Fig.33B**). La chaîne latérale de cette molécule est plus profondément enfouie dans la poche formée par l'hélice H7 et les brins S4, S5 et S6. La fixation de la pironétine provoque une perturbation de la conformation de la boucle T7 et de l'hélice H8 de la tubuline α . Ces deux éléments structuraux jouent un rôle clé dans les contacts longitudinaux entre les dimères du protofilament. Il a donc été proposé que l'assemblage des MTs soit perturbé, à des concentrations élevées de ligand en formant des complexes tubuline-pironétine non-compétents pour l'assemblage, ou bien, à des concentrations sub-stoechiométriques, en

empêchant l'addition de dimères de tubuline supplémentaires à l'extrémité (-) des MTs pour lesquels les sous-unités α de la tubuline sont exposés (**Fig.33C**) (Prota *et al.*, 2016).

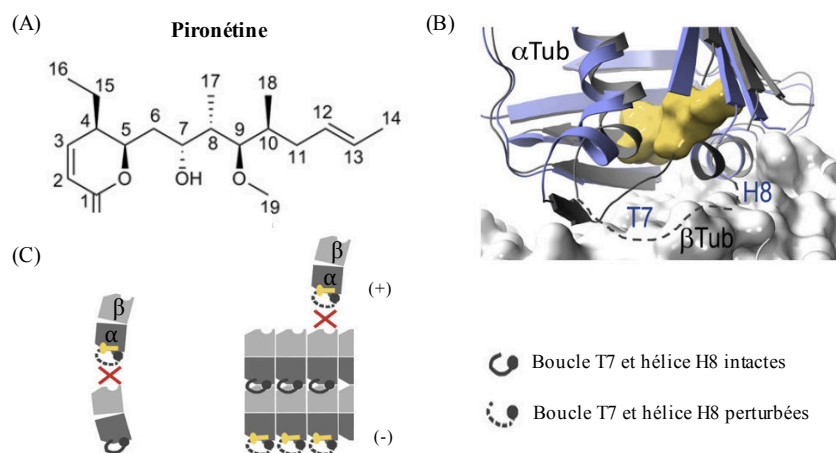


Figure 33. Fixation des MDAs sur le site pironétine.

(A) Structure chimique de la pironétine (Prota *et al.*, 2016). (B) Représentation de la structure du site pironétine. Le MDA est représenté en jaune. (C) À faible concentration la pironétine bloquerait l'addition de dimères à l'extrémité (-) des MTs. À forte concentration, elle formerait avec les dimères de tubuline des complexes incompatibles pour l'assemblage (Steinmetz and Prota, 2018).

III.2.2 Sites de fixation des MSAs

Les MTAs qui se fixent au niveau des sites taxane et laulimalide/péloruside sont considérés comme étant des MSAs.

a. Site taxane

Les taxanes sont des diterpènes comprenant entre autres le paclitaxel (PTX), le docétaxel et le cabazitaxel. Le PTX a été isolé pour la première fois à partir de l'écorce de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*) dans le cadre d'un programme de criblage de produits naturels. Il est constitué d'un noyau polycyclique (la désacétyl-baccatine III) lié à une chaîne latérale. L'amélioration des techniques d'hémi-synthèse à partir de ce noyau (présent en grande quantité dans les feuilles de l'if Européen) a permis d'en produire davantage et a ouvert la voie à la préparation de dérivés parmi lesquels le docétaxel (un intermédiaire de synthèse) et le cabazitaxel (Robert, 2015). Aujourd'hui, de nombreux MSAs se fixent sur le site taxane : les épothilones, le zampanolide, le discodermolide, les taccalonolides (**Fig.34A**).

L'ensemble de ces agents s'insère dans une poche de la tubuline β située dans la lumière du MT (**Fig.34B**) (Kellogg *et al.*, 2017). Le site taxane est formé par des résidus hydrophobes présents sur l'hélice H7, le brin S7 et les boucles H6-H7, S7-S9 (M-loop) et S9-S10. Tous les

MSAs se fixant sur ce site établissent des liaisons à la fois hydrophobes et polaires avec plusieurs de ces résidus (**Fig.34C**) (Kellogg *et al.*, 2017; Steinmetz and Prota, 2018). Il faut noter que le zampanolide et le taccalonolide AJ (un variant de la famille des taccalonolides) se lient de façon covalente à l'His229 et l'Asp226, respectivement.

Les MSAs du site taxane stabilisent les MTs par plusieurs mécanismes moléculaires. Le taccalonolide AJ déplace la boucle M dans une conformation plus ouverte qui facilite les contacts latéraux au sein du MT (Steinmetz and Prota, 2018). Le zampanolide et l'épothilone A, en se fixant sur le site taxane et grâce à leur chaîne latérale, restructurent la boucle M (qui était désordonnée) en une hélice courte, favorisant les contacts latéraux entre les tubulines du MT (**Fig.34D**) (Prota *et al.*, 2013).

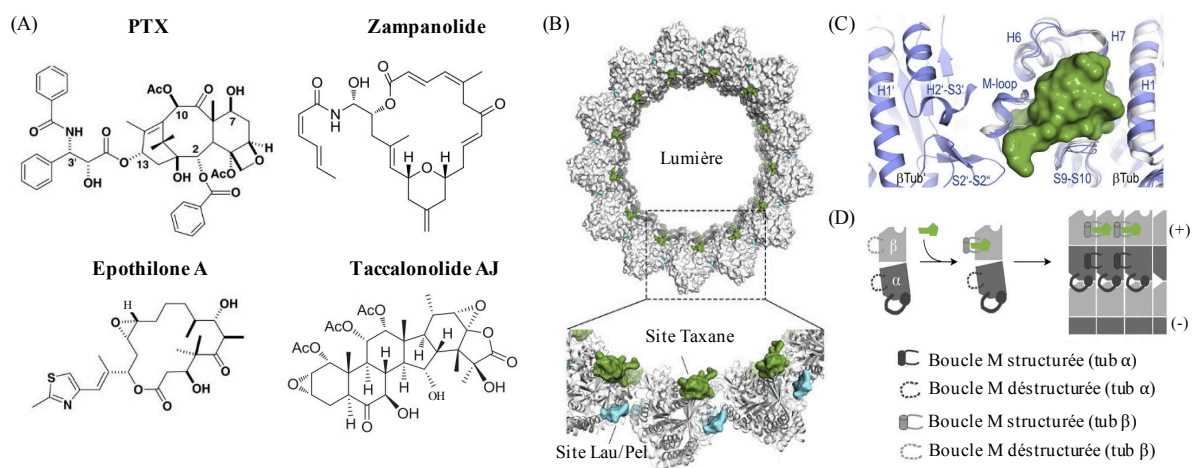


Figure 34. Fixation des MSAs sur le site taxane.

(A) Structure chimique du PTX et d'autres agents interagissant avec le site taxane. (B) MT vu du dessus avec le site taxane (vert) et laulimalide/péloruside (bleu). (C) Représentation de la structure du site taxane. Le MDA est représenté en vert. (D) Le MSA modifie la conformation et/ou la structure de la boucle M. Stabilisation des MTs en favorisant les contacts latéraux (Steinmetz and Prota, 2018).

Le mécanisme d'action du PTX, du taccalonolide et du discodermolide est différent puisque ces agents ne possèdent pas de chaîne latérale qui se projette au niveau de la boucle M (**Fig.35A**) (Prota *et al.*, 2017). Plusieurs études suggèrent que le PTX stabilise les MTs en renforçant les contacts longitudinaux au sein du MT grâce à un mécanisme allostérique (Steinmetz and Prota, 2018). De plus, une analyse en cryo-microscopie électronique à haute résolution a montré que l'hydrolyse du GTP en GDP et la libération d'un groupement phosphate lors de l'assemblage, conduit à une compaction au niveau de l'interface entre les dimères, adjacent au site E de la tubuline β. Le PTX semble inverser partiellement cet effet et restaure une conformation plus lâche entre les dimères, même après hydrolyse du GTP (**Fig.35B**) (Wade *et al.*, 2013). Cependant, les détails de cette expansion au sein du MT

induite par le PTX et le mécanisme allostérique qui relie le site taxane aux contacts longitudinaux restent inconnus (Kellogg *et al.*, 2017).

Ainsi, différents ligands du site taxane peuvent stabiliser les MTs par des mécanismes différents. Le site des taxanes pourrait donc être considéré comme un ensemble de plusieurs sites fonctionnels: selon leur mode d'occupation, on observera des effets conformationnels différents sur la tubuline dans la lattice des MTs.

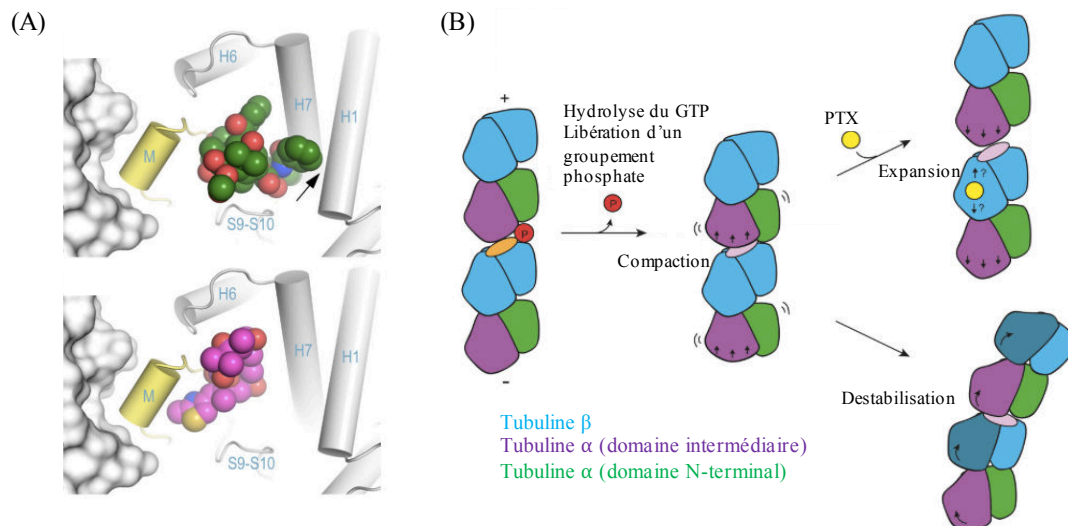


Figure 35. Mode d'action du paclitaxel.

(A) Représentation schématique de la liaison du PTX (vert) et de l'épothilone A (rose) sur le site taxane. Les hélices impliquées dans le site taxane sont sous forme de cylindres et la sous-unité β du protofilament adjacent est en représentation de surface. La boucle M est surlignée en jaune. Les interactions clés sont indiquées par une flèche noire (Wade *et al.*, 2013). (B) Représentation schématique de l'hypothèse de la stabilisation des MTs par le PTX (jaune) (Wade *et al.*, 2013).

b. Site laulimalide/péloruside A

Le laulimalide et le péloruside A (**Fig.36A**) ont été isolés à partir des éponges marines *Mycale hentscheli* et *Cacospongia mycofijiensis*, respectivement. Leur site de liaison est localisé au niveau de la tubuline β mais, contrairement au site taxane, il se trouve sur la partie extérieure du MT, proche de l'interface latérale entre les protofilaments (**Fig.34B**).

Le site laulimalide/péloruside A est formé des résidus hydrophobes et polaires des hélices H9, H10 et des boucles H9-H9', H10-S9 de la tubuline β (**Fig.36B**).

L'hypothèse du mode d'action de ces molécules est qu'elles établissent des contacts latéraux avec l'hélice H3 de la tubuline du protofilament adjacent et inhibent le désassemblage en formant des sortes d'attaches moléculaires entre les protofilaments d'un MT. Le péloruside A aurait un rôle d'attache plus important au niveau des contacts latéraux de la couture. Enfin, la

fixation de ces molécules sur leur site entraîne la stabilisation d'éléments à proximité de la boucle M, contribuant à l'établissement de contact latéraux dans les MTs (**Fig.36C**) (Steinmetz and Prota, 2018)

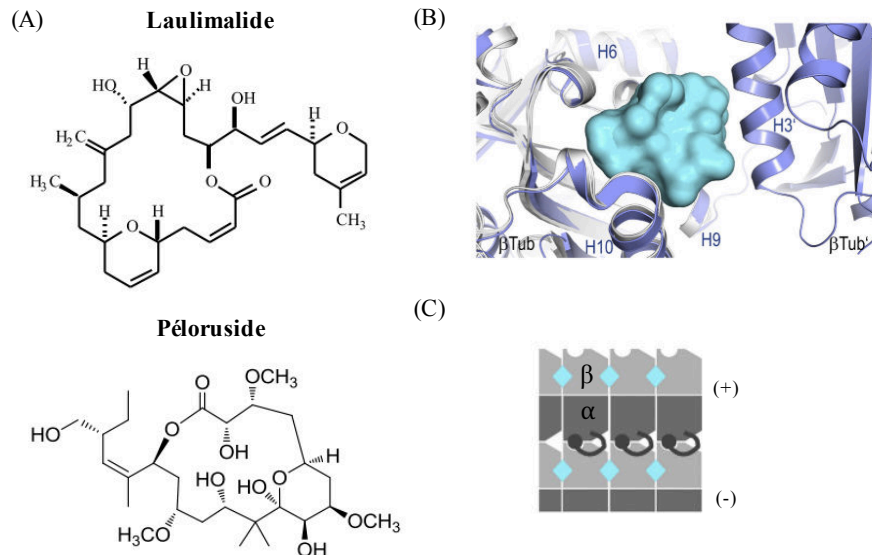


Figure 36. Fixation des MSA sur le site laulimalide/péloruside.

(A) Structure chimique du laulimalide et du péloruside. (B) Représentation de la structure du site laulimalide/péloruside. Le MDA est représenté en bleu cyan. (C) Ces molécules favorisent les contacts latéraux entre les tubulines β - β au sein du MT mais également entre les tubulines α - β au niveau de la couture (Steinmetz and Prota, 2018).

III.3 Mécanisme d'action des MTAs

Les MTAs se lient à la tubuline et interfèrent avec le réseau microtubulaire de plusieurs manières. À fortes concentrations, ils peuvent favoriser ou inhiber l'assemblage des MTs provoquant respectivement une augmentation ou une diminution de la masse de MTs. Sur la base de ces effets, les MTAs sont regroupés en agents stabilisants les MTs (PTX, épothilones, *etc.*) ou en agents déstabilisants les MTs (vinblastine, vincristine, colchicine, nocodazole, *etc.*). À concentrations plus faibles, l'ensemble de ces agents supprime principalement la dynamique des MTs sans affecter significativement la masse de MTs (Dumontet and Jordan, 2010).

III.3.1 Effets des MTAs sur la dynamique des microtubules *in vitro*

a. Les agents stabilisants les microtubules (MSAs)

Les MSAs rassemblent les molécules qui se fixent au niveau des sites taxane et laulimalide/péloruside. *In vitro*, ces molécules diminuent la concentration critique de tubuline nécessaire à l'assemblage des MTs et favorisent la polymérisation (Schiff *et al.*, 1979). La **figure 37** montre qu'à une concentration de $50\mu\text{M}$, légèrement supérieure à la concentration critique d'assemblage dans ces conditions expérimentales, la tubuline polymérise lentement et n'atteint pas encore un état d'équilibre après 80 minutes d'assemblage. L'ajout de concentrations croissantes de PTX favorise l'assemblage, augmente la vitesse de polymérisation des MTs et diminue la concentration critique d'assemblage. En effet lorsque le PTX est utilisé à 500nM , l'état d'équilibre est atteint après 25 minutes de polymérisation, avec un nombre de MTs formés plus important, à l'origine d'une densité optique plus élevée.

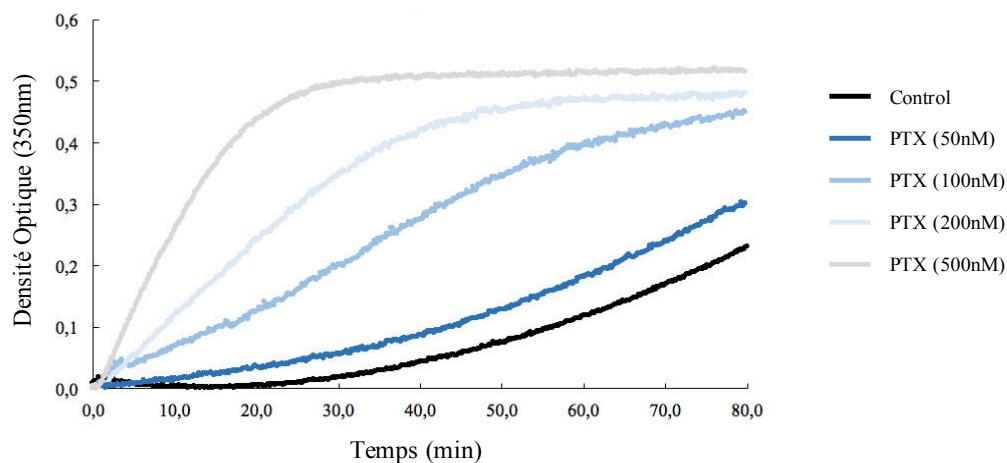


Figure 37. Effets du paclitaxel sur l'assemblage des microtubules *in vitro*.

Polymérisation de la tubuline purifiée (à partir de cervelles de bœufs) à la concentration limite d'assemblage ($50\mu\text{M}$ ici), en présence ou non de concentrations croissantes de PTX. L'ajout de PTX favorise l'assemblage de la tubuline de manière dose-dépendante (données personnelles).

L'observation de la polymérisation des MTs *in vitro* à l'aide de la technique TIRF (voir **Fig.16**, p41) permet de décrire de manière détaillée, l'impact du PTX sur les paramètres de la cinétique d'assemblage des MTs. Ces analyses montrent qu'à faible concentration le PTX a peu d'effet sur la vitesse de croissance des MTs. En revanche, il augmente significativement le temps que les MTs passent en croissance, réduit fortement la vitesse de raccourcissement des MTs et faiblement le nombre de catastrophes. À forte concentration, l'ensemble de ces effets est accentué, principalement le nombre de catastrophes qui passe à zéro, ce qui a pour conséquence d'augmenter la longueur des MTs (Mohan *et al.*, 2013).

b. Les agents déstabilisants les microtubules (MDAs)

Les MDAs rassemblent les molécules qui se fixent sur les sites vinca, colchicine, maytansine, pironétine et perturbent l'assemblage des MTs. La **figure 38** présentent les effets de la vinblastine sur l'assemblage des MTs *in vitro*. Cette molécule se fixe préférentiellement sur l'extrémité croissante des MTs et diminue leur vitesse d'assemblage. Plus la concentration de vinblastine est forte, plus son affinité pour la tubuline libre est importante. Ce mécanisme de séquestration est à l'origine d'une augmentation de la concentration critique d'assemblage et d'un état d'équilibre tardif, avec un nombre de MTs formés plus faible (densité optique réduite).

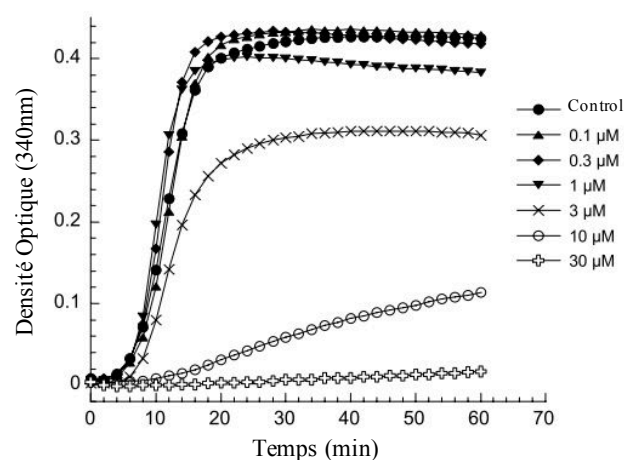


Figure 38. Effets de la vinblastine sur l'assemblage des microtubules *in vitro*.

Polymérisation de la tubuline purifiée (à partir de cervelles de bœufs) en présence ou non de concentrations croissantes de vinblastine. La tubuline est utilisée ici à une concentration de 30µM. L'ajout de vinblastine inhibe l'assemblage de la tubuline de manière doses-dépendantes (Kuznetsov et al., 2009).

L'analyse des paramètres d'instabilité dynamique lors de l'ajout de MDAs montre une réduction de la vitesse de croissance et de raccourcissement des MTs, une diminution des évènements de polymérisation/dépolymérisation, une augmentation du temps passé en pause et de la fréquence des catastrophes (Jordan and Wilson, 1998; Mohan *et al.*, 2013).

III.3.2 Effets des MTAs sur la dynamique des microtubules dans les cellules

Des effets similaires des MTAs sur les paramètres d'instabilité dynamique observés *in vitro* peuvent être observés dans les cellules. En effet, des études montrent une forte corrélation entre les effets de la vinblastine sur la dynamique des MTs *in vitro* et dans les cellules. Cependant, il est possible d'observer certaines différences entre les deux situations pouvant être dues à la présence dans les cellules de MAPs qui contrôlent la dynamique des

MTs (Mohan *et al.*, 2013). De plus, il est important de noter que la concentration intracellulaire des drogues est différente de la concentration dans le milieu (Jordan and Wilson, 1998). Ainsi, la concentration intracellulaire dépend des mécanismes d'entrées (par diffusion) et de sortie (souvent à l'aide de pompes d'efflux) des drogues, ainsi que de leur affinité pour leurs cibles. Par exemple le PTX a beaucoup d'affinité pour la tubuline et a tendance à s'accumuler dans les cellules. Les concentrations de MTAs testées réellement dans les cellules peuvent donc être souvent très différentes de celles appliquées. Enfin, la possibilité que certains de ces agents puissent avoir une autre cible cellulaire que les MTs n'est pas à exclure et peut compliquer la compréhension du mécanisme d'action de la drogue.

À forte concentration (de l'ordre du micromolaire), il a toutefois été observé que les MSAs stimulent la polymérisation des MTs et augmentent la masse de MTs dans les cellules alors que les MDAs provoquent la dépolymérisation des MTs et diminuent la masse des MTs dans les cellules (**Fig.39**).

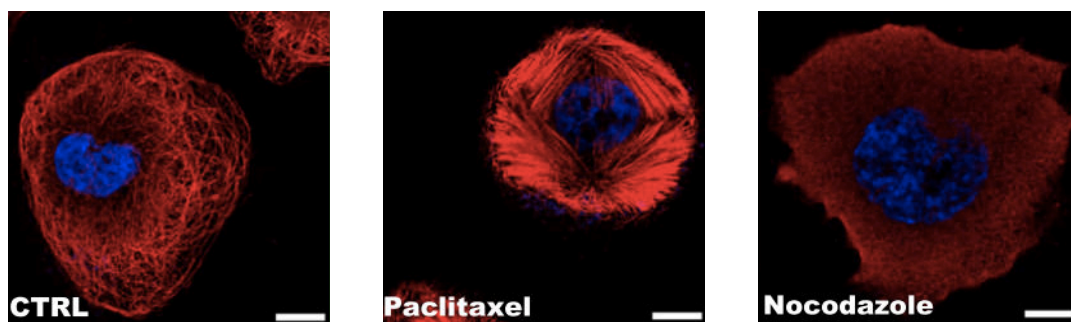


Figure 39. Effets des MTAs à forte concentration dans les cellules.

Les cellules MDA-MB-237 (cellules du cancer du sein) sont traitées ou non pendant 2 heures avec un agent stabilisant (paclitaxel) ou un agent déstabilisant (nocodazole), tous deux à une concentration de 10µM. Les MTs sont en rouges et les noyaux en bleu (Lv et al., 2017). Le PTX augmente la masse de MTs et induit également la formation de faisceaux de MTs. Le nocodazole dépolymérise l'ensemble des MTs. Échelle, 10µm.

Malgré ces différences observées entre les effets des MTAs appliqués à fortes concentrations, il a été montré que ces deux classes de molécules ralentissent la dynamique des MTs quand elles sont appliquées à plus faibles concentrations (**Fig.40**), exerçant un effet stabilisant. Cela se traduit par une diminution de l'instabilité dynamique des MTs et du treadmilling (Jordan and Wilson, 2004, 1998).

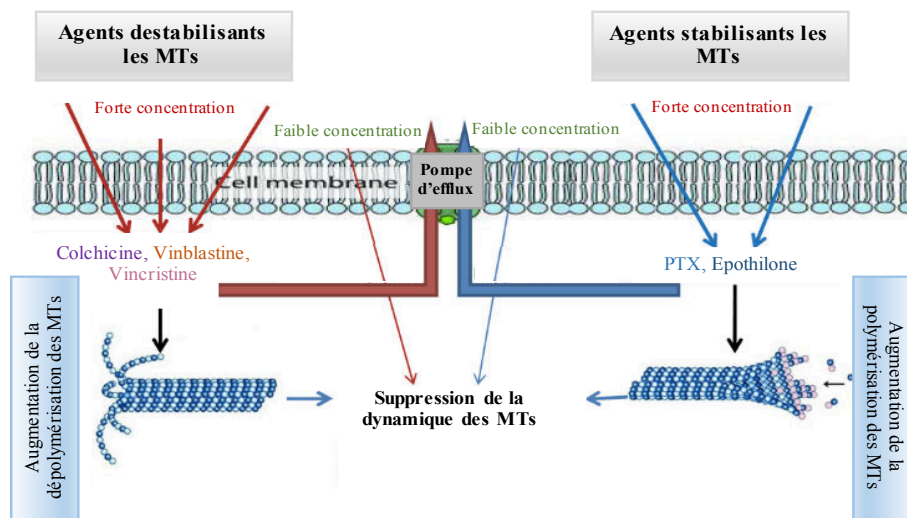


Figure 40. Effets des MTAs sur le réseau de microtubules.

Les MTAs sont de petites molécules qui diffusent à travers les membranes plasmiques des cellules, se fixent sur les MTs et en modifient l'assemblage et la dynamique. Ils peuvent être rejetés hors de la cellule par des pompes d'efflux (Mukhtar *et al.*, 2014).

III.3.3 Effets antimitotiques des MTAs

Dans les cellules en culture, les MTAs sont principalement connus pour leur action antimitotique. En effet, les cellules traitées par ces agents présentent des phénotypes mitotiques anormaux conduisant à la mort cellulaire. Le passage des cellules par la mitose semble être une condition préalable indispensable à l'apoptose induite par les MTAs (Chen *et al.*, 2003; Mukhtar *et al.*, 2014).

a. Les MSAs

Le PTX représente l'un des agents le plus étudié parmi les MSAs. Il se lie aux MTs et stabilise le réseau, ce qui inhibe l'instabilité dynamique et favorise une nucléation ectopique au sein des cellules. L'effet prédominant du PTX dans les cellules en culture est caractérisé par la présence de phénotypes mitotiques anormaux. En effet les cellules traitées présentent un nombre anormal d'hémi-fuseaux mitotiques et des chromosomes anormalement présents au niveau des pôles (**Fig.41A**). Le degré de perturbation du fuseau dépend de la concentration de drogue utilisée, de la durée d'exposition et du type cellulaire. Le nombre anormal de pôles serait causé par la nucléation de MTs, favorisée par le PTX et le recrutement de certaines MAPs telles que la dynéine et NUMA (Mitchison *et al.*, 2017; Verde *et al.*, 1991). Ces pôles ne contiennent pas de centrioles. Plus la concentration en molécule est élevée, plus le PTX favorise la nucléation et donc plus le nombre de pôles est important (**Fig.41B**) (Zasadil *et al.*, 2014).

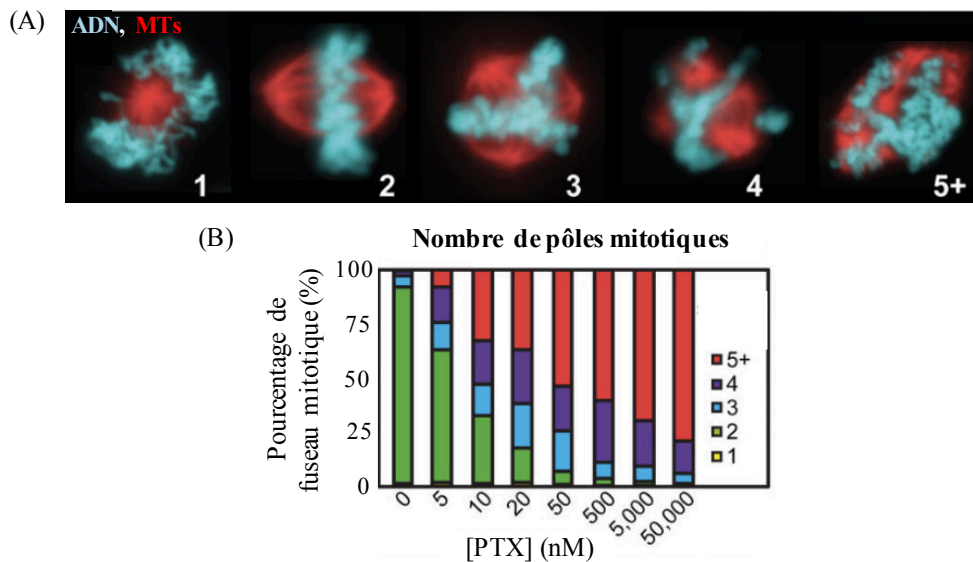


Figure 41. Effets du paclitaxel sur le fuseau mitotique.

(A) Les cellules traitées au PTX présentent un nombre anormal d'hémi-fuseaux mitotiques dont le nombre est indiqué sur chaque image. Les MTs sont en rouge et l'ADN en bleu. (B) Quantification du nombre d'hémi-fuseaux mitotiques en fonction des concentrations de PTX. $n=100$. (Zasadil *et al.*, 2014).

L'apparition d'un grand nombre d'hémi-fuseaux mitotiques après application de concentrations élevées de PTX provoque un arrêt des cellules en mitose. Ce blocage est dû à l'activation du point de contrôle SAC. Le devenir de ces cellules est très variable selon les lignées cellulaires. En effet, les cellules bloquées peuvent soit directement mourir en mitose, soit échapper au point de contrôle et se diviser. Après la sortie de la mitose, les cellules peuvent mourir, passer en sénescence ou entrer de nouveau dans un cycle cellulaire (Mitchison *et al.*, 2017).

L'arrêt mitotique n'est pas nécessaire à la mort cellulaire. Des concentrations plus faibles de PTX (cliniquement pertinentes) détruisent les cellules tumorales en induisant des divisions multipolaires (Fig.42). Les cellules présentent également des fuseaux anormaux contenant des pôles supplémentaires mais ne restent pas bloquées en mitose. Elles entrent en anaphase et dispersent leurs chromosomes dans plusieurs directions causant l'apparition de deux ou trois cellules filles. La ségrégation des chromosomes est randomisée en raison de la division multipolaire suivie d'une cytokinèse partielle. Les cellules filles résultantes sont aneuploïdes et une partie de celles-ci meurt, probablement à cause de la perte d'un ou de plusieurs chromosomes essentiels (Weaver, 2014).

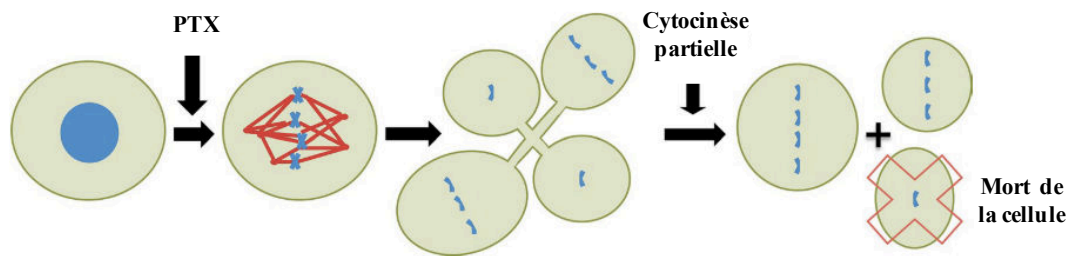


Figure 42. À faible concentration, le paclitaxel détruit les cellules tumorales en induisant des divisions multipolaires. (Weaver, 2014).

b. Les MDAs

Les cellules exposées à des agents déstabilisants présentent également des phénotypes mitotiques anormaux avec une augmentation de la longueur et du nombre de MTs astraux, une diminution de la longueur du fuseau central et la présence de chromosomes au niveau des pôles du fuseau. À de faibles concentrations de vinblastine et de nocodazole, ces changements se produisent en l'absence de dépolymérisation des MTs (Jordan *et al.*, 1992).

Ces différentes perturbations dépendent de la molécule et de sa concentration, du temps d'exposition et du type cellulaire. La **figure 43** représente les phénotypes mitotiques observés de manière récurrente dans les cellules traitées par des agents déstabilisants.

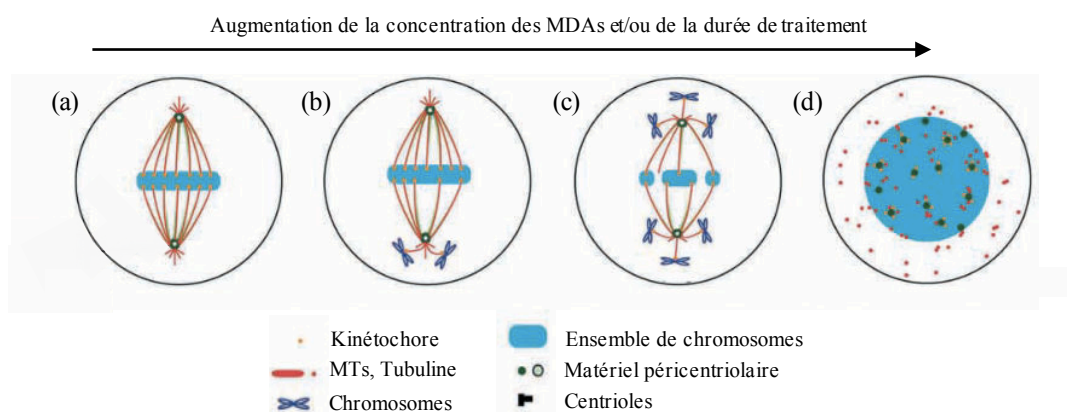


Figure 43. Représentation schématique des phénotypes mitotiques les plus observés dans les cellules traitées avec des MDAs.

(a) Sans traitement les cellules en métaphase présentent deux héli-fuseaux partant des centrosomes vers le centre de la cellule où les chromosomes sont alignés sur la plaque équatoriale. (b) Inhibition de l'instabilité dynamique entraînant une diminution de la croissance des MTs. Quelques chromosomes restent bloqués au niveau des pôles. (c) Raccourcissement du fuseau en raison d'une diminution de la croissance de nombreux MTs. Grande quantité de chromosomes au niveau des pôles. (d) Dépolymérisation complète des MTs et destruction du fuseau mitotique. Dispersion du matériel péricentriolaire. Adaptée de Moisoï *et al.*, 2002.

L'action antimitotique des MDAs à faibles concentrations dans les cellules est principalement due à la suppression de la dynamique des MTs. Le blocage en mitose se fait généralement au cours de la métaphase. En effet, la perte de la dynamique perturbe la migration des chromosomes vers la plaque équatoriale et provoque une accumulation de matériel génétique au niveau des pôles. L'absence d'alignement correct des chromosomes qui en résulte est à l'origine de l'activation du SAC, bloquant les cellules en mitose et pouvant éventuellement conduire à la mort cellulaire (Jordan and Wilson, 2004).

III.4 Utilisation clinique des MTAs

III.4.1 Les MTAs en chimiothérapie

Les MTAs sont largement utilisés en chimiothérapie anti-cancéreuse (voir le tableau 1 de la partie I.3.3 d, p25). Les principales molécules utilisées en clinique sont des dérivés des alcaloïdes de la Pervenche (Oncovin[®], Velbe[®], Navelbine[®], *etc.*) et des taxanes (Taxol[®], Taxotère[®], *etc.*). Bien que la colchicine soit utilisée depuis l'antiquité pour traiter la goutte, la fenêtre thérapeutique entre activité et toxicité de cette molécule est trop étroite pour son emploi en cancérologie. De nombreux composés qui se fixent sur le site colchicine ont été identifiés comme anti-cancéreux potentiels à cause de leur habilité à passer outre les résistances impliquant les pompes d'efflux. De plus leur action anti-angiogénique et anti-vasculaire en fait des anti-cancéreux intéressants. C'est pourquoi, malgré leur toxicité, un grand nombre de molécules dérivées de la colchicine continue à apparaître dont la plupart sont en essai clinique (Lu *et al.*, 2013).

III.4.2 Mécanisme d'action des MTAs dans les tumeurs

Contrairement à ce que l'on connaît du mécanisme d'action des MTAs *in vitro* et *in vivo*, leur mécanisme d'action dans un organisme entier est plus complexe. En plus des problèmes (pas toujours compris) liés à la variabilité inter-individus, qui fait que des patients avec un même diagnostic peuvent répondre de manières différentes aux traitements, on ne comprend pas très bien le mécanisme d'action des MTAs en clinique, à l'origine de leur efficacité thérapeutique. Il a longtemps été admis que le blocage des cellules en mitose dans les tumeurs était à l'origine de l'efficacité des MTAs. Cependant, de nouvelles études montrent que l'action des MTAs pourrait ne pas se limiter uniquement à des mécanismes antimitotiques. En effet, l'équipe de T.J Mitchison a réussi à mesurer la fréquence de division des cellules par imagerie intra-vitale dans les tumeurs et a démontré que dans beaucoup de

tumeurs chimio-sensibles, elle n'est pas particulièrement élevée contrairement à ce qui a toujours été pensé (Mitchison, 2012). De plus, si le temps de doublement des cellules du cancer du sein en culture est d'environ 24 heures, il est estimé être compris entre 40 et 300 jours dans une tumeur primaire. De même, la plupart des modèles précliniques de xénogreffes a été établi de manière à ce que les expérimentateurs puissent conduire les expériences assez rapidement et ne reflète pas exactement ce qui est observé chez les patients (**Tableau 5**). Comment des drogues ciblant uniquement la mitose pourraient être aussi efficaces dans ce cas ?

	Modèles précliniques (Moyenne en jour)	Patients (Moyenne en jour)
Cancer du sein	5,6	152
Cancer du colon	3,4	391
Cancer du poumon	4,4	114
Cancer de la prostate	3,4	219
Mélanome	5,4	147

Tableau 5. Temps de doublement de la taille des tumeurs (en jour) : Comparaison entre les modèles précliniques *in vivo* et les patients. Adapté de Komlodi-Pasztor *et al.*, 2012.

Par ailleurs, des drogues ciblant sélectivement et de manière efficace les processus mitotiques (inhibiteurs du moteur mitotique Eg5, inhibiteurs de la kinase Aurora), développées initialement pour pallier la neurotoxicité des taxanes et des vincas, ont apporté des résultats décevants lors des essais cliniques (Jue Shi and Mitchison, 2015). Elles ne sont pas efficaces sur la croissance tumorale et provoquent une aplasie médullaire importante. L'ensemble de ces observations suggère que la mitose n'est pas la cible principale des MTAs (Komlodi-Pasztor *et al.*, 2011). Quelques hypothèses quant à l'action toxique du PTX dans les tumeurs sont présentées **figure 44**.

L'efficacité thérapeutique des MTAs pourrait ainsi résulter : d'une accumulation sélective à la tumeur ; de caractéristiques particulières de l'environnement tumoral ; de leur action sur d'autres fonctions des MTs, sélectivement importantes pour les tumeurs ; de leur action sur d'autres types cellulaires, importants pour la croissance des tumeurs ; de leur action sur d'autres cibles que les MTs. Il s'agit d'une liste non exhaustive. De plus ces différentes hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives. Nous allons les détailler ci-dessous dans le cas particulier du PTX.

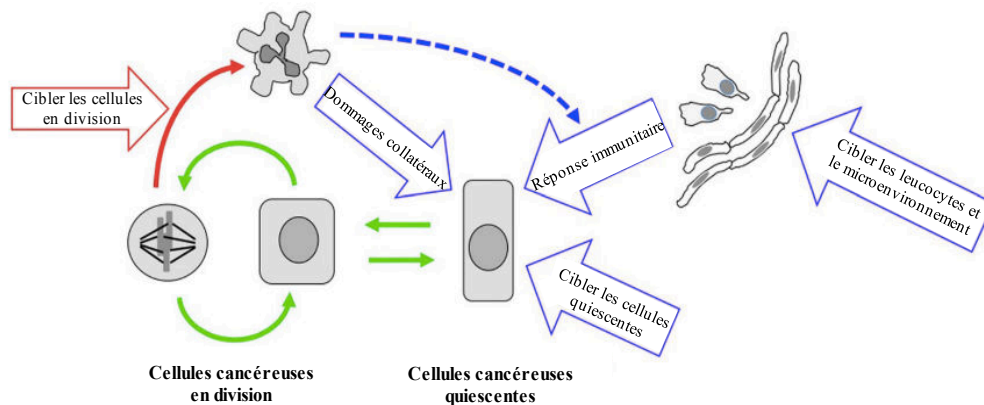


Figure 44. Mécanismes d'action potentiels du paclitaxel sur les cellules tumorales.

Les flèches vertes représentent les transitions entre les différentes phases du cycle cellulaire. La flèche rouge représente le mécanisme d'action le plus connu et le mieux caractérisé du PTX, à savoir de cibler les cellules en division. Les flèches bleues indiquent les mécanismes hypothétiques du PTX pour tuer les cellules quiescentes. Adaptée de Mitchison, 2012.

a. Rétention du PTX dans les tumeurs

Il a été montré que le PTX est retenu dans les tumeurs pendant plusieurs jours, même après son élimination dans la circulation sanguine (Mori *et al.*, 2006). Cette rétention serait probablement due à la fixation peu réversible du PTX sur les MTs. De plus, des études ont montré que les cellules transformées étaient plus sensibles au PTX que les cellules saines, expliquant ainsi l'accumulation préférentielle du PTX dans les tumeurs (Mori *et al.*, 2006; Weaver, 2014). Cette rétention prolongée peut être à l'origine de la mort des cellules qui se divisent mais également des cellules quiescentes qui entrent doucement en mitose. Cependant, la rétention du PTX n'explique pas son efficacité dans certaines tumeurs où la majorité des cellules meurent sans passer par un arrêt mitotique (Jordan *et al.*, 1993; Orth *et al.*, 2011).

b. Effets du PTX sur les cellules en interphase

Les MTAs peuvent agir sur les réseaux de MTs en interphase et affecter le trafic intracellulaire et les voies de signalisation. En effet, malgré la cinétique de croissance lente des cellules du cancer de la prostate, les taxanes ont montré une réelle efficacité anti-tumorale, notamment dans le cas du cancer de la prostate résistant à la castration (CPRC). Les androgènes et les récepteurs aux androgènes (RAs) jouent un rôle essentiel dans le développement et la progression de ce cancer (Mukhtar *et al.*, 2014). La fixation de l'androgène sur son récepteur conduit à une translocation nucléaire via le réseau de MTs et participe à l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Des études ont montré que l'utilisation de PTX dans le traitement du CPRC conduisait à une réduction de

l'expression des RAs et de leur translocation dans le noyau. Le PTX inhibe également l'activité des RAs dans les cellules du CRPC en induisant une accumulation nucléaire de la protéine FOXO1 qui se lie aux RAs et empêche leur action (Mistry and Oh, 2013). Un autre exemple d'altération du trafic intracellulaire provoqué par le PTX et causant la mort des cellules cancéreuses, concerne le suppresseur de tumeur p53. En réponse à un dommage à l'ADN, p53 est transporté dans le noyau par une dynéine via les MTs. Une faible concentration de PTX supprime la dynamique des MTs et favorise l'accumulation nucléaire de p53, induisant l'activation de gènes à l'origine de la mort de la cellule (Giannakakou *et al.*, 2002).

Le traitement des tumeurs par le PTX active également les voies apoptotiques mitochondriales conduisant à la mort des cellules. En effet, le stress provoqué par la molécule cause une perturbation membranaire à l'origine de la libération de facteurs pro-apoptotiques tels que les cytochromes c et d'autres facteurs induisant l'activation des caspases (Bhalla, 2003). En parallèle, ce stress conduit à l'activation de ROS (reactive oxygen species) impliquée également dans les voies de signalisation apoptotiques (Selimovic *et al.*, 2008) et dans la régulation de EB1. Son activation entraîne une réduction de la phosphorylation de Akt suivie d'une activation de GSK3 β , à l'origine de la phosphorylation de EB1 causant une réduction de la vitesse de croissance des MTs (Nehlig *et al.*, 2017).

c. Effets du PTX sur l'environnement tumoral et le système immunitaire

Bien qu'à des concentrations cliniques, le PTX puisse perturber la dynamique des MTs en interphase, rares sont les cellules cancéreuses en culture qui meurent sans entrer en mitose. Cependant, les cellules tumorales sont soumises à un environnement particulier (manque de nutriments et d'oxygène, présence d'une matrice extracellulaire, *etc.*) et peuvent être plus sensibles au PTX (Mitchison, 2012).

Afin de pallier ce problème, les cellules tumorales mettent en place de nouveaux vaisseaux sanguins capables d'irriguer correctement la tumeur. Les cellules endothéliales jouent un rôle essentiel dans ce mécanisme et une modification de la dynamique des MTs dans ces cellules peut interférer avec cette néo-angiogenèse. De nombreuses études réalisées *in vitro* et sur des modèles animaux révèlent une activité anti-angiogénique du PTX dont de nombreux mécanismes moléculaires et cellulaires ont été proposés. À faible concentration, le PTX augmente la dynamique des MTs en interphase dans les cellules endothéliales. Cette

particularité semble être spécifique de ces cellules puisque aucune observation similaire n'a été rapportée dans les cellules tumorales (Pasquier *et al.*, 2005). La perturbation de la dynamique des MTs par le PTX serait à l'origine d'une dérégulation des fonctions interphasiques (signalisations, transports, perméabilisation des mitochondries, *etc.*) causant un ralentissement de la mitose et une réduction de la migration des cellules endothéliales. Le délai mitotique n'est pas strictement nécessaire à l'activité anti-angiogénique du PTX. Il a également été montré qu'un traitement au PTX provoque une dérégulation de certaines protéines impliquées dans l'angiogenèse : surexpression de TSP-1 (inhibiteur de l'angiogenèse), réduction de l'expression de facteurs de survie des cellules endothéliales tels que Ang-1 et la famille VEGF. Enfin il cause une diminution de la quantité de cellules progénitrices endothéliales (CPEs) qui jouent un rôle essentiel dans la régénération de la muqueuse endothéliale des vaisseaux sanguins (Bocci *et al.*, 2013). Malgré ces différentes études, aucun consensus n'a été établi concernant l'activité anti-angiogénique du PTX *in vivo*.

Le PTX présente également de multiples actions sur le système immunitaire. Il régule la production de diverses cytokines et stimule / inhibe différents lymphocytes (Javeed *et al.*, 2009). Dans le même ordre d'idée, il a été tout récemment proposé que la micronucléation post-mitotique soit responsable de l'effet toxique et thérapeutique du PTX, en favorisant la signalisation inflammatoire via cGAS-STING et d'autres voies. Dans les tumeurs, cette signalisation peut recruter des leucocytes cytotoxiques, endommager les vaisseaux sanguins et améliorer la réponse des lymphocytes T, conduisant à une régression de la tumeur (Mitchison *et al.*, 2017).

d. Action du PTX sur d'autres cibles cellulaires

Le PTX est capable de cibler aussi directement la protéine Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (Ferlini *et al.*, 2009; Rodi and Makowski, 1999). Bcl-2 est un facteur anti-apoptotique souvent surexprimé dans les cancers. La fixation du PTX sur cette molécule provoque son inactivation à l'origine de l'activation des voies apoptotiques (Kroon *et al.*, 2016).

d. Des dommages collatéraux

Dans l'hypothèse où les drogues agissent uniquement sur un sous-groupe de cellules cancéreuses, nous pouvons imaginer que la mort de ces cellules induise des changements environnementaux, à l'origine de la mort des cellules cancéreuses voisines. Un tel mécanisme est décrit pour les cellules soumises à des radiations. Les cellules irradiées peuvent

endommager les cellules voisines saines par des signaux transmis via des jonctions GAP ou par des facteurs sécrétés (Little, 2006).

III.4.3 Toxicité des MTAs

Malgré l'efficacité des MTAs en chimiothérapie, l'apparition d'effets secondaires en limite l'utilisation et restreint la fenêtre thérapeutique (voir le tableau 1 de la partie I.3.3 d, p25). Même si le mécanisme d'action précis des MTAs dans les tumeurs est encore mal compris, son effet bloquant de la division cellulaire est reconnu. La plupart des traitements sont systémiques et s'attaquent non seulement aux cellules cancéreuses mais également aux cellules saines. Ainsi, les MTAs inhibent aussi les mécanismes de division des cellules saines qui prolifèrent rapidement, telles que les cellules du tube digestif, les cellules à l'origine des cheveux et des poils et les cellules de la moelle. Ces altérations provoquent l'apparition d'effets indésirables importants : diarrhées, neutropénie (diminution des globules blancs), anémie (diminution des hématies), aplasie (diminution simultanée de plusieurs types de cellules sanguines), alopecie (perte des poils), *etc.* (Institut National du Cancer, 2008).

La plupart des agents utilisés en chimiothérapie agissent également sur le système nerveux périphérique et causent de nombreuses neuropathies. Parmi les alcaloïdes de la Pervenche, la vincristine est la molécule la plus neurotoxique. En effet, elle provoque des neuropathies essentiellement sensorielles à l'origine de picotements, de démangeaisons chez 30 à 40% des patients traités. Les fibres sensorielles sont touchées plus tôt et plus sévèrement que les neurones moteurs. Les neuropathies des patients traités avec d'autres alcaloïdes tels que la vinblastine et la vinorelbine sont similaires mais moins sévères que celles causées par la vincristine. Les taxanes sont également connus pour causer des neuropathies périphériques chez plus de 50% des patients traités par le docétaxel et au moins 70% pour ceux traités par le PTX (Green and Holton, 2016). Bien que l'on comprenne que les effets des MTAs sur la mitose sont à l'origine des effets secondaires observés dans les cellules en division, les mécanismes causant des neuropathies restent encore mal connus. Les MTs sont essentiels au fonctionnement et au maintien des neurones (**Fig.45**) et l'altération de leur dynamique pourrait avoir de graves conséquences. Ainsi, les neuropathies peuvent être le résultat d'une perturbation du flux axonal causée à la fois par la perte (MDAs) ou le regroupement (MSAs) de MTs mais également par la suppression de la dynamique des MTs (Jordan and Wilson, 2004). *In vitro*, les taxanes et les alcaloïdes de la Pervenche peuvent interrompre le transport au sein des axones et causer des neuropathies (Chan *et al.*, 1980; Komiya and Tashiro, 1988). Le PTX se lie sur toute la longueur des MTs et inhibe la vitesse du transport axonal

antérograde (kinésine) des mitochondries dans les cellules neuronales. La vincristine qui se lie aux extrémités croissantes des MTs n'inhibe ce transport qu'à des concentrations significativement plus élevées. En revanche, aucune de ces molécules n'affecte le transport rétrograde (dynéine) dans les cellules neuronales ou les nerfs de souris (Smith *et al.*, 2016). La déstabilisation des MTs par les MDAs ou la suppression de la dynamique des MTs par les MTAs dans les cellules neuronales peut réduire l'arborisation au niveau du cônes de croissance et causer également l'apparition de neuropathies (Jordan and Wilson, 2004).

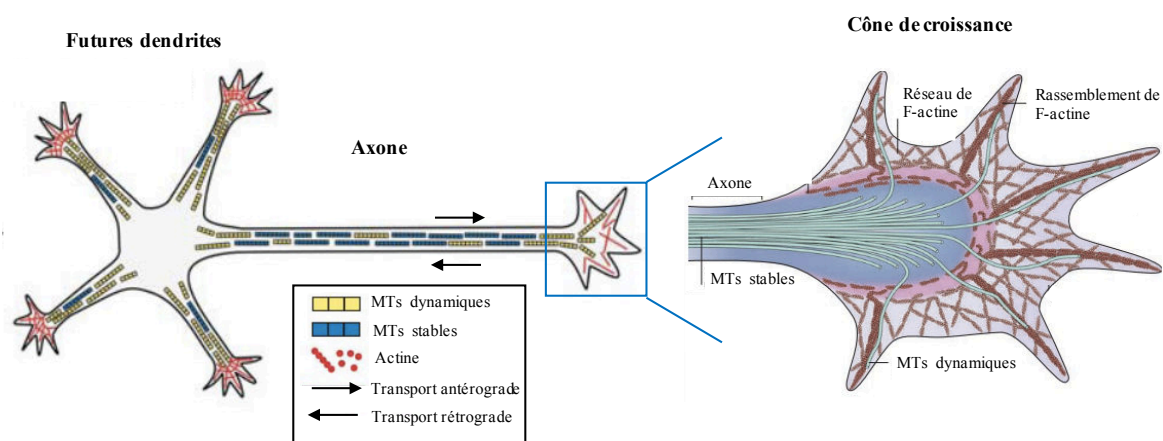


Figure 45. Les microtubules dans les neurones.

Adaptée de Lowery and Vactor, 2009 et Neukirchen and Bradke, 2011.

III.5 Mécanismes de résistance aux MTAs

Bien que la chimiothérapie soit efficace dans de nombreux cancers et améliore nettement le pronostic des patients, un phénomène de résistance est fréquemment observé en clinique et limite les effets des médicaments. La résistance aux agents anti-cancéreux peut être classée en deux catégories : la résistance primaire et la résistance acquise. La résistance primaire se traduit par une absence de réponse au traitement et s'explique par une altération génétique de la cible thérapeutique ou des protéines impliquées dans des voies de signalisation liées à la cible. Elle repose également sur des modifications, spécifiques au patient, des facteurs pharmacocinétiques tels que l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion, qui influent sur les niveaux et la cinétique d'exposition aux médicaments. La résistance primaire est relativement rare et de nombreux examens permettent de déterminer préalablement la sensibilité d'un patient à un traitement. La résistance acquise fait référence à la progression de la maladie après une réponse initiale à la thérapie. Elle apparaît alors que le patient est toujours sous traitement et s'explique par un mécanisme d'échappement des cellules cancéreuses au médicament. Parmi les mécanismes de résistance acquise on distingue

des altérations de la cible thérapeutique ou des protéines associées à la cible (mutation, surexpression), le contournement de la voie de signalisation, la modification des propriétés histologiques de la tumeur et la surexpression de certaines pompes d'efflux à l'origine de l'élimination des drogues (Lovly and Shaw, 2014).

Les MTAs n'échappent pas à ces mécanismes de résistance. La connaissance des processus mis en place par la cellule afin d'échapper aux traitements permet non seulement de mieux comprendre le fonctionnement des tumeurs et des traitements, mais également de trouver des alternatives thérapeutiques.

III.5.1 Altération de la cible des MTAs

En raison de la spécificité des MTAs pour la tubuline β , la majorité des études des mécanismes de résistance a porté sur les altérations de cette sous-unité protéique. Chez l'Homme, les MTs sont composés d'un mélange de différents isotypes de tubuline, codés par des gènes différents (voir la partie II.1.2 c, p33). Ces isotypes se distinguent les uns des autres principalement par des différences situées dans leur partie C-terminale. Dans de nombreux cancers, l'altération du niveau d'expression de certains isotypes, notamment ceux de la tubuline β est associée à l'apparition de résistances aux MTAs (**Tableau 6**) (Parker *et al.*, 2017).

Des mutations de la tubuline β au niveau des sites de fixation des drogues pourraient être à l'origine de résistances. En effet, il a été montré *in vitro* que le remplacement d'un résidu thréonine par un résidu alanine à la position 364 de la tubuline β I, dans une lignée de cellules cancéreuses ovariennes provoquait une résistance au PTX (Pusztai, 2007). De nombreuses mutations de la tubuline β ont aussi été identifiées dans des cellules cancéreuses résistantes aux alcaloïdes de la Pervenche (Robert, 2015). Cependant, aucun de ces résultats n'a pu être validé en clinique.

Altération des isotypes de la tubuline	Effets observés	Type de Cancer
Surexpression de la tubuline β I	Réponse faible aux Taxanes	Cancer du sein
Diminution de l'expression de la tubuline β II	Réponse faible aux Taxanes	Cancer du sein et des ovaires
	Aggravation du cancer	
Surexpression de la tubuline β III	Réponse faible aux MTAs	Cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC)
	Faible taux de survie	
	Réponse faible au Platiniun et aux Taxanes	Cancer des ovaires
	Peu de survie	
	Aggravation du cancer	
		Réponse faible aux Taxanes
	Réponse faible au Platiniun et aux Taxanes	Cancer de l'endomètre
	Réponse faible aux Taxanes	Cancer de l'estomac
Surexpression de la tubuline β IVa	Réponse faible aux Taxanes	Cancer des ovaires
Surexpression de la tubuline β V	Réponse favorable aux Taxanes	NSCLC

Tableau 6. Exemples d'altérations de l'expression des isotypes de tubuline β dans les cancers.
Adaptée de Parker *et al.*, 2017.

L'un des isotypes le plus étudié dans la résistance des cellules cancéreuses aux MTAs est la tubuline β III. Des études ont été menées afin de comprendre en quoi une surexpression de cet isotype pouvait être à l'origine de la résistance. Une analyse approfondie du site de fixation du PTX sur la tubuline β a montré l'importance d'une région riche en leucine au niveau de la boucle H6-H7. En effet, la majorité des mutations de la leucine 215 entraîne une modification de la dynamique des MTs, mais également une variation d'affinité pour le PTX (Wang *et al.*, 2006). Un alignement de séquence entre les isotypes de tubuline β au niveau de cette zone a permis de mettre en évidence la présence d'un résidu alanine à la position 218 sur la tubuline β III, à la place d'un résidu thréonine sur les autres isotypes (T218A) (**Fig.46**).

```

βI      212FRTLKLTTPTYGDLNHLVS230
βIIa    212FRTLKLTTPTYGDLNHLVS230
βIIb    212FRTLKLTTPTYGDLNHLVS230
βIII    212FRTLKLAATPTYGDLNHLVS230
βIVa    212FRTLKLTTPTYGDLNHLVS230
βIVb    212FRTLKLTTPTYGDLNHLVS230
βV      212FRTLKLTTPTYGDLNHLVS230
βVI     212FRTLKLTTPTYGDLNHLVS230

```

*

Figure 46. Alignement des séquences des régions riches en leucine de la tubuline β humaine.
L'étoile indique une modification de l'un des résidus (en rouge) (Yang and Horwitz, 2017).

Des modèles moléculaires pour la liaison tubuline β III/PTX et β I/PTX ont été construits et des simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées. Ces études permettent de mesurer précisément la taille du site de fixation du PTX dans différentes conditions : tubuline β I et β III seules et après fixation du PTX (Fig.47). Elles ont montré que le changement de résidu T218A sur la tubuline β III provoquait une réduction de la taille du site taxane, ne permettant pas de fixer le PTX. La fréquence des conformations compatibles avec le PTX diminue donc significativement pour la tubuline β III, par rapport à la tubuline β I. Les résultats suggèrent que la présence du résidu alanine à la position 218 de la tubuline β III empêche la fixation correcte du PTX sur son site de fixation (Yang and Horwitz, 2017).

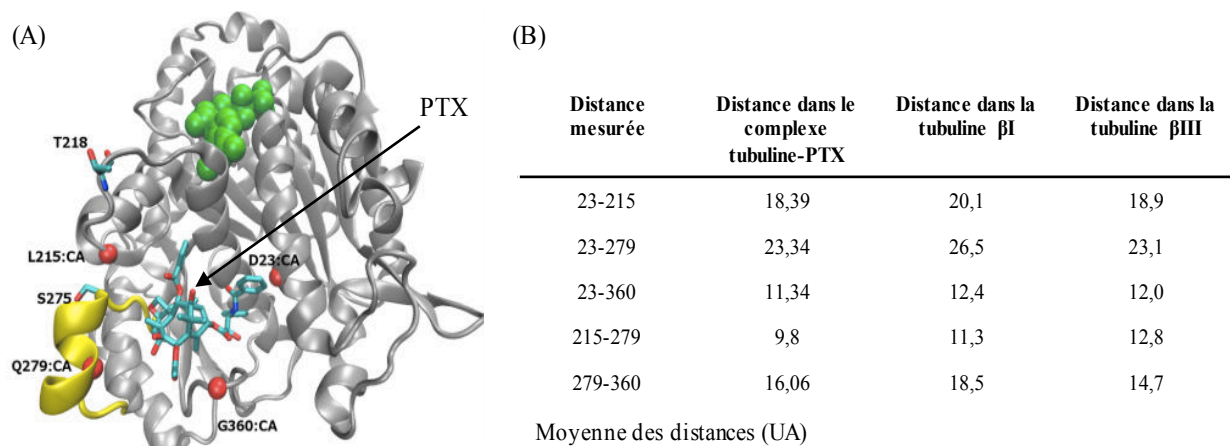


Figure 47. Modification de la taille du site taxane de la tubuline β III.

(A) Complexe tubuline β I (gris)-PTX-GDP (vert). Quatre atomes de carbone (boules rouges) sont utilisés pour mesurer la taille du site de fixation au PTX en fonction du type de résidu présent à la position 218. (B) Tableau des distances mesurées entre les différents points de repère (boules rouges) du site taxane dans différentes conditions.

La raison des modifications d'expression des isotypes de tubuline dans les cellules cancéreuses reste encore mal comprise. Cependant il a été remarqué, par exemple, que l'expression de la tubuline β III peut être induite en conditions hypoxiques dans les cellules du cancer des ovaires. Il est donc possible que, dans les conditions tumorales où l'accès aux nutriments et à l'oxygène est limité, l'expression de la tubuline β III soit favorisée (Kavallaris, 2010).

III.5.2 Surexpression des pompes d'efflux membranaires

La surexpression des pompes d'efflux membranaires de la famille des transporteurs ABC (ATP-Binding-Cassette) est un des mécanismes de résistance le plus observé à la suite de traitements répétés. Ces transporteurs ATP-dépendants sont constitués de deux domaines transmembranaires (TMD) formant un canal qui permet le passage des molécules et de deux domaines de fixation à l'ATP (NBD). Leur action consiste à rejeter activement les molécules en dehors des cellules, réduisant ainsi leur concentration intracellulaire et leur activité cytotoxique (**Fig.48**). Parmi cette famille, la glycoprotéine P (P-gp) et les protéines MRP1, 2 (Multidrug-Resistance-associated protein 1,2) constituent les principales pompes d'efflux impliquées dans la résistance aux MTAs. P-gp est responsable de la perte d'activité des alcaloïdes de la Pervenche dans les cellules cancéreuses. Quant aux protéines MRP1 et MRP2, elles sont impliquées respectivement dans la résistance aux alcaloïdes de la Pervenche et aux taxanes (Chen *et al.*, 2016; Dumontet and Jordan, 2010).

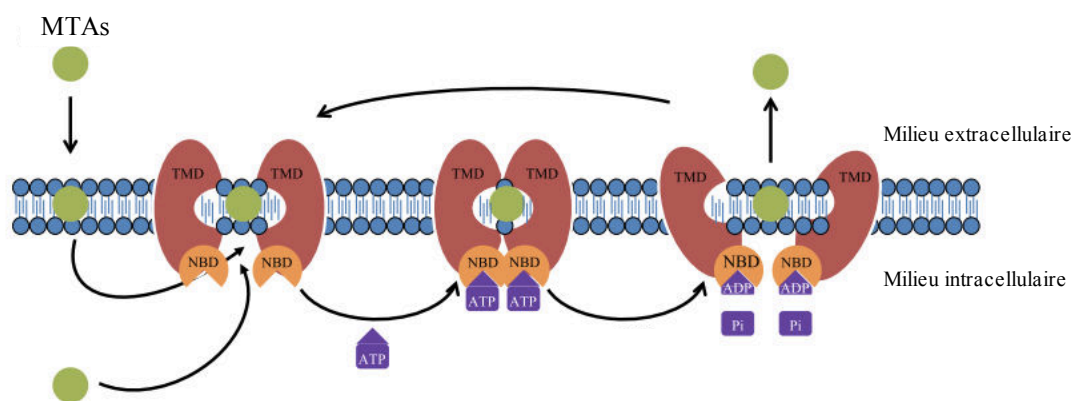


Figure 48. Mécanisme d'action des transporteurs de la famille ABC.

Adaptée de Chen et al., 2016.

III.5.3 Altérations de protéines associées aux microtubules

Une altération de l'expression de certaines MAPs peut être associée à l'apparition de résistances des cellules cancéreuses aux MTAs. En effet, la surexpression de la protéine Tau

(présente dans les tissus neuronaux), est liée à une diminution de la sensibilité des cellules au PTX dans le cancer du sein métastatique (Tanaka *et al.*, 2009). Ce mécanisme de résistance reposerait sur le fait que la fixation de Tau limite l'accès du PTX sur la surface interne des MTs. À l'inverse, une diminution de l'expression du variant protéique MAP2c est à l'origine de la résistance à la vincristine dans les neuroblastomes. MAP2a et b sont à l'origine d'une stabilisation forte des MTs dans les cellules, contrairement à MAP2c dont l'effet est beaucoup plus faible. Une diminution de son expression déplace l'équilibre entre ces trois variants, vers une stabilisation accrue des MTs. Cet effet contrecarre l'action de la vincristine et entraîne l'apparition de résistances (Don *et al.*, 2004).

III.5.4 Autres mécanismes de résistance

Le cytosquelette d'actine et les MTs coordonnent leurs fonctions dans un grand nombre de types cellulaires. De fait, des études pharmacologiques ont montré que l'altération d'un des cytosquelettes pouvait impacter l'organisation des autres. Par exemple, des cellules en culture traitées par des agents déstabilisants des MTs montrent rapidement une modification dans l'organisation de cytosquelette d'actine en particulier les fibres de stress (Danowski, 1988; Kanthou and Tozer, 2018). De plus, des analyses protéomiques ont mis en évidence la présence d'altérations de protéines apparentées au cytosquelette d'actine, dans des lignées leucémiques résistantes aux MTAs. La plupart de ces protéines interviennent dans la régulation de la dynamique des microfilaments d'actine (Verrills *et al.*, 2003). Ces résultats supposent l'implication du réseau d'actine dans la résistance des cellules aux MTAs (Kavallaris, 2010).

III.6 Combinaison de drogues

L'association de plusieurs agents anti-cancéreux est souvent répandue en chimiothérapie. En effet, la combinaison de médicaments antiprolifératifs a débuté dans les années 1960, tout d'abord prescrite de façon empirique, puis utilisée plus intelligemment après vérification préalable de la sensibilité du patient, à l'aide de marqueurs prédictifs. Le but de ces associations est d'augmenter l'efficacité du traitement en maintenant la tolérance des médicaments à un niveau supportable pour le patient. Plusieurs situations dérivent de cette combinaison : une situation d'additivité où les effets individuels de chaque molécule s'ajoutent et une situation de synergie, où l'effet de l'association est supérieur à la somme des effets des drogues seules. La synergie entre deux composés est très recherchée puisqu'elle

permet soit de favoriser les effets thérapeutiques, soit de réduire les concentrations de drogues afin de limiter les effets secondaires. En principe, la combinaison concerne des médicaments ne partageant ni le même mécanisme d'action, ni les mêmes toxicités, et ne mettant pas en jeu les mêmes mécanismes de résistance. Cependant, l'association d'une anthracycline (intercalant de l'ADN) et d'un taxane est particulièrement active dans les cancers du sein, malgré une résistance commune liée à la glycoprotéine-P (Robert, 2015).

Même si les poisons du fuseau ciblent le dimère de tubuline, il y a des exemples de tentatives de leur administration combinée, dans l'espoir d'améliorer l'efficacité thérapeutique et de réduire les effets secondaires liés au traitement.

L'association du discodermolide et du PTX représente l'une des combinaisons les plus intéressantes. Le discodermolide, isolé à partir d'éponge marine, est un agent stabilisant les MTs qui se fixe sur le site taxane avec une forte affinité. Il est plus soluble que le PTX et ne présente pas de résistance liée à la glycoprotéine-P avec laquelle il a une faible affinité (Martello *et al.*, 2000). Des études menées sur des modèles de xénogreffe de cellules cancéreuses ovariennes chez la souris nude montrent une importante synergie entre le Taxol® et le discodermolide. De manière intéressante, la combinaison de ces deux composés réduit significativement la taille des tumeurs sans apparition d'effets secondaires (Huang *et al.*, 2006). Contrairement au PTX, le discodermolide se fixe sur la tubuline β à proximité de la boucle H1-S2 de la partie N-terminale. Les effets stabilisants complémentaires du Taxol® et du discodermolide pourraient expliquer une partie de la synergie observée entre ces deux médicaments (Yang and Horwitz, 2017).

D'autres combinaisons de poisons du fuseau ont également montré une action synergique. C'est le cas des associations vinorelbine/PTX, vinorelbine/docétaxel, vinblastine/PTX ou encore docétaxel/CI-980 (analogue de la colchicine) (Jordan and Wilson, 2004).

La plupart des situations synergiques ne sont pas comprises d'un point de vue mécanistique. Cependant, les résultats discutés ci-dessus sont prometteurs et de nombreuses associations sont en essais clinique (Martello *et al.*, 2000; Martí *et al.*, 2001; Robert, 2015).

Objectifs

Les microtubules (MTs) sont une cible validée en thérapie anticancéreuse. De nombreux agents ciblant les MTs sont utilisés en clinique pour traiter les cancers. Ils perturbent la dynamique des MTs et interfèrent à la fois avec le processus mitotique des cellules mais également avec les fonctions interphasiques. Le paclitaxel (Taxol[®]) (PTX) est largement utilisé en thérapie anti-cancéreuse. Cependant malgré son efficacité, il est responsable d'effets secondaires importants et de nombreux patients sont ou deviennent résistants au traitement, limitant les doses employées. Afin de pallier ces problèmes, l'équipe de Laurence Lafanechère a cherché à identifier, par des approches de "chemical biology", de nouvelles molécules capables de potentialiser l'effet anti-tumorale du PTX et/ou de diminuer l'apparition d'effets indésirables. Pour cela, l'équipe a réalisé un criblage de collections de molécules chimiques, sur le principe de la létalité synthétique, visant à sélectionner des composés capables, en association à des doses non toxiques de PTX, de tuer les cellules cancéreuses. Parmi les composés identifiés et validés, des composés de la classe des carbazoles ont été retenus, en particulier le composé carba1. Les principaux travaux développés au cours de ma thèse ont eu pour but de comprendre le mécanisme d'action de cette nouvelle molécule et de tester son intérêt thérapeutique.

Matériels et méthodes

Cette partie regroupe et détaille les techniques que j'ai utilisé au cours de ma thèse.

1. Outils cellulaires et pharmacologiques, réactifs

Culture cellulaire

Les cellules HeLa, issues du cancer du col de l'utérus, proviennent de l'ATCC et ont été cultivées dans du milieu RPMI + 10% Sérum de veau Fœtal (SVF) + 1% pénicilline/streptomycine (P/S) à 37°C et 5% CO₂.

Les cellules HeLa Kyoto expriment de manière stable les plasmides contenant la tubuline α EGFP et la tubuline H2B mCherry et proviennent du CLS (Cell Lines Service). Elles ont été cultivées dans du milieu DMEM + 10% SVF + 1% P/S à 37°C et 5% CO₂.

Les cellules 4T1rvluc2 ont été cultivées du milieu DMEM + 10% SVF + 1% P/S à 37°C et 5% CO₂ et nous ont été fournies par la plateforme Optimal. Elles expriment la luciférase de manière stable.

Les cellules MEF LKB1 déficientes ou rescues sont issues de fibroblastes embryonnaires de souris développées par Bardeesy *et al.*, 2002. Elles ont été cultivées dans du milieu DMEM + 10% SVF + 1% P/S à 37°C et 5% CO₂.

Composés pharmacologiques et réactifs

Les réactifs et les composés pharmacologiques utilisés comprennent : diméthyl sulfoxyde (DMSO, sigma, D4540), paclitaxel (Sigma, T7402), nocodazole (Sigma, M1404), vinblastine (Sigma, V1377), Colchicine (Sigma, C9754), GSK923295 (Biosciences, A11435), UA62784 (Sigma, U3385), CK666 (Sigma, SM10006), [H³]-colchicine (Perkin-Elmer, NET189250UC, 82,6Ci), le SVF (Dutscher, S1810), cremophor (ou Kolliphor, Sigma, C5135), GTP (Sigma, G8877), MgCl₂ (Sigma, M1028), RPMI (Gibco, 61870-010), DMEM (Gibco, 31966-021), PIPES (Sigma, P6757), BSA (Sigma, A7906), EGTA (Sigma, E3889), EDTA (Sigma, E-6758), KOH (Carlo Erba, 472057), Prestoblué (Invitrogen, A13262), Neutravidine (ThermoScientific, 31000), PLL-PEG (Jenken, PLL20K-G35-PEG2K), Glucose (Sigma, G8270), Méthyl cellulose (Sigma, M-0555), PEG-silane (Creative PEGWorks, PSB-2014), PEG-silane-biotine (LaysanBio, Biotin-PEG-SIL, MW1400), DTT (Sigma, D0632).

Le composé carbal a été synthétisé par l'équipe de chimistes du CERMN (Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie) (Laboratoire du Pr. Dallemagne, Université de Caen). Mm = 297,79g/mol. Pour les études *in vitro*, les molécules pharmacologiques ont été dissoutes dans du DMSO à une concentration finale de 10mM, à l'exception du PTX pour

lequel la concentration finale est de 1mM. Ils ont ensuite été conservés à -20°C avant d'être dilués aux concentrations indiquées. Carbal peut poser des problèmes de solubilité, notamment au-dessus de 25µM dans le milieu RPMI ou DMEM. Pour les études *in vivo*, carbal et le PTX ont été dissouts dans 5% éthanol, 5% crémophore, 90% NaCl (0,9%).

2. Expériences menées sur les cellules

Test de viabilité cellulaire

Le test Prestoblue est une méthode rapide pour évaluer la viabilité cellulaire. Le Prestoblue contient la résazurine, un indicateur coloré bleu qui est réduit en résorufine (indicateur coloré rose fortement fluorescent dans le rouge) de manière irréversible dans les cellules vivantes. Ce changement de couleur, proportionnel à la quantité de cellules vivantes peut être détecté grâce aux mesures de fluorescence ou d'absorbance. Ainsi, par simple mesure de la densité optique entre 590 et 615nm (longueur d'onde d'émission de la résorufine) au spectrophotomètre, il est possible de déterminer la quantité de cellules vivantes, actives métaboliquement.

Les tests ont été réalisés dans des plaques 96 puits. Les cellules HeLa ont étéensemencées à une densité de 2500 cellules/puits, les cellules 4T1rvluc2 à 800 cellules/puits et les MEF *LKBI* déficientes ou rescues à 2000 cellules/puits. Ces différentes densités ont préalablement été déterminées en fonction du temps de doublement des lignées cellulaires. Le volume final par puits est de 80µl. 24 heures après l'ensemencement, 20µl de drogues ou de DMSO dilués dans du milieu ont été ajoutés dans chacun des puits. Au bout de 72 heures de traitement, 10µl de Prestoblue ont été ajoutés au milieu et les plaques remises à 37°C pendant 45 minutes avant la lecture des plaques.

Immunofluorescence et anticorps

Les cellules HeLa ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 20000 cellules/puits, sur des lamelles de verre durant 2 jours, puis traitées ou non avec des drogues pendant 5 heures. Le milieu a ensuite été retiré, les cellules lavées au PBS1x tiède avant d'être fixées au méthanol froid 6 minutes à -20°C et lavées de nouveau au PBS1x. Puis, les cellules ont été mises en contact avec du PBS1x/BSA3% (étape de saturation) durant 30 minutes. Enfin, les cellules ont été exposées aux différents anticorps, dilués dans du PBS1x/BSA3%, durant 45 minutes et les lavages entre les marquages ont été réalisés avec du PBS1x/Tween0,1%. Le milieu de montage utilisé est le Mowiol/Dapi.

Les anticorps primaires utilisés sont dirigés contre :

- La tubuline α (clone $\alpha 3a1$) : produit par Laurence Lafanechère ; monoclonal de souris ; 1/4000.
- La kinésine CENP-E : Abcam, 5093 ; monoclonal de souris ; 1/300.
- Le centromère CREST : ImmunoVision, HCT-0100 ; humain ; 1/1500.

Les anticorps secondaires utilisés sont : polyclonal anti-humain conjugué à FITC (Sigma, F-4637, 1/1000), polyclonal anti-souris conjugué à l'A488 (Jackson immunoresearch, 115-545-166, 1/1000) et polyclonal anti-souris conjugué à la Cy3 (Jackson immunoresearch, 115-165-166).

Vidéomicroscopie

Les cellules HeLa Kyoto tubuline- α -EGFP/H2B-mCherry ont étéensemencées à une densité de 70000 cellules/puits dans un support ibidi (ibidi, 80297), la veille de l'étude. Le milieu a ensuite été retiré et les drogues ajoutées un peu avant le début de l'acquisition. La vidéomicroscopie a été réalisée sur un microscope confocal Spinning Disk Andromeda, TILL- FEI (caméra EMCCD iXon 897 et objectif Plan-Apochromat 20x/0,75, WD 610) couplé à un système de vidéomicroscopie. Une enceinte entourant le microscope permet de contrôler les paramètres environnementaux nécessaires à la vie des cellules pendant le temps de l'étude (37°C et 5% de CO₂). Les images ont été prises par intervalles de 2,5 minutes sur des temps d'acquisition de 12 et 20 heures. La quantification de la durée des différentes phases de la mitose a en effet nécessité de courts intervalles entre les prises de vue, les transitions entre les phases étant très rapides. Cependant, la prise répétée d'images à intervalles très courts favorise l'induction d'un photoblanchiment et une phototoxicité cellulaire. La puissance des lasers a donc été réglée au minimum (laser 488 nm : 12% ; laser 561 nm : 12%) pour limiter ces phénomènes. De plus, afin de pouvoir observer à la fois le comportement des cellules en interphase et en mitose (où les cellules sont souvent arrondies), plusieurs plans ont été pris pour un même temps (Z=7).

L'acquisition des images a été effectuée avec le logiciel LA, FEI et l'analyse avec le logiciel Fiji.

Analyse du cycle cellulaire et mesure de l'apoptose en cytométrie en flux

Étude du cycle cellulaire : Les cellules ont été décollées à l'aide de la trypsine, lavées au PBS1x puis comptées. 600000 cellules ont été resuspendues dans 300 μ l de PBS1x auxquels ont été ajoutés goutte à goutte 700 μ l d'éthanol froid sous vortex, puis incubées à 4°C sur la nuit

(étape de fixation). Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 1400rpm 5 minutes à 4°C et les culots lavés dans du PBS1x avant ajout de 496,5µl de PBS1x, de 2,5µl de Iodure de Propidium (0,05mg/ml) et 1µl de RNase (0,2mg/ml). À la suite d'une incubation de 30 minutes à 37°C, les échantillons ont été analysés grâce au cytomètre Accuri-C6 (BD-Biosciences) et au logiciel FCS express.

Mesure de l'apoptose : Elle a été réalisée grâce au kit « BD Pharmingen FITC AnnexinV Apoptosis detection » (BD Biosciences, 556547). Dans une cellule non-apoptotique les phosphatidylsérines membranaires ne sont situées que sur la face interne de la membrane. Dès qu'une cellule entre en apoptose, elles sont délocalisées et exprimées des deux côtés de la membrane. L'annexine ayant une forte affinité pour ces phosphatidylsérines va marquer les cellules apoptotiques. Il faut noter que les cellules mortes seront également marquées par l'annexine. Toutefois, il est possible de discriminer par double marquage les cellules apoptotiques des cellules mortes (nécrotiques) en rajoutant de l'Iodure de Propidium lors du marquage qui ne pénétrera que dans les cellules mortes. Les cellules apoptotiques mais pas mortes seront Annexine+ IP- et les cellules mortes Annexine+ IP+. Les échantillons ont été analysés grâce au cytomètre Accuri-C6 (BD-Biosciences) et au logiciel FCS express.

Calcul de l'index de combinaison (CI)

L'interaction spécifique entre carbal à 12µM et PTX à 1nM dans les cellules HeLa a été évaluée par le calcul de l'indice de combinaison (CI) (Chou, 2010; Feng *et al.*, 2014). La valeur de CI a été calculée à partir des résultats des tests de viabilité cellulaire, avec la formule suivante : $CI = (D1/Df1) + (D2/Df2)$, où D1 est la concentration de molécule 1 requise pour réduire la viabilité cellulaire de 70% en association avec la molécule 2 (effets carba1(12µM)/PTX(1nM)) et où Df1 est la concentration de molécule 1 requise pour produire le même effet. De même, D2 est la concentration de molécule 2 requise pour réduire la viabilité cellulaire de 70% en association avec la molécule 1 (effets carba1(12µM)/PTX(1nM)) et Df2 est la concentration de molécule 2 requise pour produire le même effet. CI<1 indique un effet synergique, CI=1, un effet additif et CI>1, un effet antagoniste.

Mesure de l'instabilité dynamique des microtubules dans les cellules

Les expériences de plus end tracking ont été réalisées par Anne Martinez, suivant la procédure décrite par Prudent *et al.*, 2012.

3. Criblage génétique chez *Saccaromyces cerevisiae*

Nous avons utilisé une souche de levure mutée sur 7 pompes d'efflux et transformée avec un fragment d'ADN contenant le gène de tubuline β (*TUB2*) mutée sur 5 acides aminés permettant ainsi la liaison au PTX, décrite par Foland *et al.*, 2005.

Les milieux utilisés sont les suivants : SCC (milieu synthétique complet contenant les 20 acides aminés nécessaires à la croissance des levures), SC-U (milieu synthétique sans uracile), YPD (milieu constitué de levure, de peptone et de glucose D).

Criblage : Nous avons utilisé une banque génomique de levure constituée de fragments d'ADN génomique de 4 à 5 kb clonés dans un vecteur multicopie. La procédure a été tirée et adaptée de Gietz and Schiestl, 2008. Les levures ont été mises en culture dans un milieu liquide complet, YPD, à 30°C 200rpm sur la nuit. Puis, la culture a été diluée dans du milieu YPD2x à une densité optique (DO) de 0,5 correspondant à 5×10^6 cellules/ml et remise à 30°C 200rpm durant environ 4 heures, jusqu'à obtenir une DO de 2 (2×10^7 cellules/ml, phase exponentielle de croissance). La culture a ensuite été centrifugée à 3000g durant 5 minutes et le culot lavé 2 fois dans 25ml d'eau avant d'être resuspendu dans 1ml. Puis 100 μ l de cette culture ont été distribués dans des tubes et centrifugés. Chaque culot a ensuite été resuspendu dans un mélange dont la composition est la suivante : 240 μ l de PEG (50%), 36 μ l de LiAc (1M), 10 μ l d'ADN de sperme de saumon (10mg/ml), 1 μ l de plasmide (500ng/ μ l), 73 μ l d'eau et incubé à 42°C durant 20 minutes. Les levures ont ensuite été centrifugées et resuspendues dans 500 μ l d'eau avant d'être étalées sur boîtes SC-U contenant 25 μ M de carba1 et 25 μ M de PTX, puis placées à 30°C. La transformation des souches par un plasmide leur confère une autotrophie à l'uracile permettant une sélection. Ainsi, seules les souches transformées seront capables de pousser sur un milieu SC-U. Les colonies ont été repiquées sur des boîtes SC-U et conservées à 40°C.

Extraction des plasmides de levures : Les colonies obtenues lors du criblage ont été mises en culture dans un milieu SC-U liquide à 30°C 200rpm sur la nuit. L'extraction de plasmides a été réalisée à partir du kit « EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Mini Preps Kit » (BioBasic, BS624) en suivant la procédure décrite pour la purification d'ADN plasmidique à faible copie.

Transformation de bactéries : Afin d'amplifier les plasmides extraits des levures, nous avons utilisé les bactéries compétentes Stellar (ClonTech, ST0213). 2 μ l de plasmides ont été ajoutés à 30 μ l de bactéries et placés 20 minutes sur glace avant d'être transférés 1 minute à 42°C

(choc thermique). Les bactéries ont ensuite été ajoutées à 250µl de milieu de régénération et placées à 37°C durant 1 heure puis étalées sur boîte LB/carbénicilline. L'extraction des plasmides de bactéries a été réalisée en suivant la même procédure que pour l'extraction des plasmides de levures. Enfin, les plasmides ont été analysés par Eurofins Genomics.

4. Expériences menées sur modèles animaux

Test sur modèle murin

L'ensemble des expériences animales a été réalisé selon un protocole soumis et accepté par le comité d'éthique en expérimentation animale de Grenoble et par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche.

Le suivi de la croissance tumorale et de l'évolution métastatique a été réalisé à partir d'un modèle d'allogreffes orthotopiques 4T1rluc2 (cellules de cancer mammaire agressif de souris). Des souris nude NMRI (femelles de 6 semaines) ont reçu une injection de 20000 cellules 4T1rluc2, modifiées pour exprimer de manière stable le gène de la luciférase, en phase exponentielle de croissance dans le coussinet adipeux de la mamelle. Compte tenu de la vitesse de croissance de ces cellules, les traitements ont commencé le jour de l'injection.

Lors du premier essai, les souris ont été réparties en 4 groupes de 10 et le traitement a été administré quotidiennement (sauf le weekend), de manière intrapéritonéale. Le premier groupe a reçu le véhicule (5% éthanol, 5% crémosol, 90% NaCl (0,9%)), le deuxième groupe le composé carba1 à 20mg/kg, le troisième groupe le paclitaxel à 0,75mg/kg et le dernier groupe, la combinaison carba1(20mg/kg)/paclitaxel (0,75mg/kg). La croissance tumorale et l'évolution métastatique dans les poumons ont été suivies par mesure de la bioluminescence, à l'aide d'une caméra EMCCD, à raison de 1 fois par semaine, après injection de luciférase comme décrit plus précisément ci-après. La taille des tumeurs primaires a également été mesurée au pied à coulisse 3 fois par semaine.

Lors du deuxième essai, les souris ont été réparties en 5 groupes de 8 et le traitement a été administré quotidiennement (weekend inclus), de manière intrapéritonéale. Le premier groupe a reçu le véhicule (5% éthanol, 5% crémosol, 90% NaCl (0,9%)), le deuxième groupe le composé carba1 à 30mg/kg, le troisième groupe le paclitaxel à 2mg/kg, le quatrième groupe le paclitaxel à 8mg/kg et le dernier groupe, la combinaison carba1(30mg/kg)/paclitaxel (2mg/kg). Contrairement au premier essai, une seule analyse en bioluminescence a été réalisée en fin d'étude. La taille des tumeurs primaires a également été mesurée au pied à coulisse 3 fois par semaine.

Imagerie de Bioluminescence

La croissance de la tumeur primaire et la dispersion métastatique ont été suivies *in vivo* par imagerie de bioluminescence. 5 minutes avant l'imagerie, la souris a reçu une injection intrapéritonéale de 300µl de D-luciférine (Promega, France) à 10mg/ml. Sous anesthésie gazeuse (4% isoflurane pour l'induction puis 1.5%) la souris a été placée dans le système optique (IVIS Kinetic, Perkinelmer) afin de détecter et mesurer la quantité de cellules tumorales exprimant la luciférase. Les données semi-quantitatives ont été obtenues à partir des images de bioluminescence en définissant des régions d'intérêt sur la tumeur primaire ou sur le corps entier, à l'aide du logiciel Living Image software (Perkinelmer). Les résultats ont été exprimés en unité arbitraire ou en photons par seconde (ph/s).

Test sur des embryons de poulet

Un essai de croissance tumorale et de métastases sur des embryons de poulet (InOvation, Grenoble, France) a été réalisé comme décrit précédemment (Hasasna *et al.*, 2016; Prudent *et al.*, 2012). Selon la législation française, aucune approbation éthique n'est nécessaire pour les expérimentations scientifiques utilisant des embryons ovipares (décret n°2013-118, 1e Février 2013, Art. R-214-88). Des œufs de Leghorn blancs fécondés (Hendrix Genetics) ont été incubés à 38°C avec une humidité relative de 60% pendant 9 jours. Puis, une fenêtre de 1cm² a été découpée dans la coquille d'œuf au-dessus de la membrane chorio-allantoïdienne (CAM). Les cellules déficientes pour le gène *LKB1* ont été récoltées par trypsinisation, lavées avec un milieu complet et mises en suspension dans un milieu sans sérum. Puis une suspension de 50µl de cellules (1x10⁶) a été ajoutée directement sur la CAM de chaque œuf. Les œufs ont ensuite été répartis au hasard dans 2 groupes de 18 et au jour 10, lorsque les tumeurs ont commencé à être détectables, les œufs ont été traités tous les deux jours pendant 10 jours en laissant tomber doucement 100µl de 50µM de carbal ou 0,5% de DMSO dans du PBS (véhicule) sur la tumeur. Les fenêtres ont été scellées avec du ruban adhésif en cellophane et les œufs ont été remis dans l'incubateur. En fin d'étude, la partie supérieure de la CAM a été retirée, transférée dans du PBS et les tumeurs ont été soigneusement découpées du tissu, puis pesées. En parallèle, une partie de 1cm² de la CAM inférieure a été recueillie afin d'évaluer le nombre de nodules. Enfin, la toxicité du traitement a été évaluée en notant le nombre d'embryons morts et en recherchant des anomalies morphologiques ou fonctionnelles chez les embryons survivants.

5. Expériences menées à partir de tubuline, *in vitro*

Le matériel utilisé au cours des différentes études est le suivant : tampon CB (50mM K-Pipes, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, pH 6.8 avec KOH), tampon AB (0,1M Pipes, 0,5mM MgCl₂, 2mM EGTA, 0,1mM EDTA pH 6.8 avec KOH), tampon BRB80 (80mM K-Pipes, 1mM EGTA, 1mM MgCl₂, pH 6.74 avec KOH).

Extraction et purification de la tubuline

La purification de la tubuline se divise en deux étapes : la première consiste à extraire de la tubuline des cerveaux de bœuf ou de porc et la seconde, à purifier cette tubuline afin d'en retirer toutes les protéines associées. La procédure a été tiré de Ramirez-Rios *et al.*, 2017.

Extraction de la tubuline et de ses protéines associées : en chambre froide, les cerveaux bovins frais ont été nettoyés : retrait des éventuels morceaux d'os, des méninges et du cervelet. Puis ils sont pesés et mixés avec un tampon AB froid (1ml de tampon AB par gramme de cerveau) auquel est ajouté de l'ATP à 0,1M (10µl/g de cerveau) et du β-mercaptoéthanol à 14,3M (1µl/g de cerveau). 4 cycles de 20 secondes sont réalisés pour l'homogénéisation : le premier cycle à basse vitesse, le deuxième cycle à vitesse modérée et les troisième et quatrième cycle à grande vitesse. Le mélange est ensuite centrifugé à 22680g pendant 20 minutes dans un rotor Beckman JLA16.250 à 4°C afin d'éliminer les gros débris. Puis, le surnageant est centrifugé de nouveau à 100000g pendant 90 minutes à 4°C.

- Première réaction de polymérisation/dépolymérisation : la tubuline présente dans le surnageant est polymérisée en MTs en ajoutant un demi-volume de glycérol anhydre préchauffé, 0,5mM GTP, 1,5mM ATP, 3mM MgCl₂. Le mélange est placé dans un bain-marie à 37°C pendant 60 minutes. La solution est ensuite centrifugée (100000g, 75 minutes, 35°C) dans un rotor préchauffé à 35°C (centrifugeuse Beckman, rotor Ti-45). Puis, les surnageants sont retirés et les culots solubilisés dans du tampon AB froid (4ml maximum). Les MTs sont dissociées au froid à l'aide d'un potter. La concentration en tubuline est déterminée à 280nm et est ajustée à 250mM avec un tampon AB froid. La solution est maintenue sur de la glace pendant 30 minutes pour compléter le processus de dépolymérisation, puis centrifugée à 140000g, 30 minutes à 4°C.

- Deuxième réaction de polymérisation/dépolymérisation : le surnageant est complété par un demi-volume de glycérol préchauffé, du GTP 1mM, de l'ATP 0,5mM et du MgCl₂ 4mM. Le mélange est ensuite chauffé à 37°C pendant 60 minutes, puis centrifugé à 100000g, 75 minutes à 35°C. Les culots sont solubilisés avec un tampon AB froid (environ 20ml) comme

décrit précédemment. Après 30 minutes sur de la glace, la solution est centrifugée à 4°C, 140000g, 30 minutes. Dosage de la concentration en tubuline à 280nm.

Purification de la tubuline : une colonne de Fractogel est équilibrée la veille de l'expérience avec du tampon CB et du tampon CB + 0,1mM de GTP (1ml/min). Un échantillon de tubuline préparé durant l'extraction est rapidement décongelé au bain-marie à 32°C puis conservé sur de la glace. La solution de protéines est diluée à 10-12mg/ml avec un tampon CB/GTP 0,1mM. Le volume total (environ 30ml) est injecté lentement (0,5ml/min) dans la colonne. L'élution de la tubuline se fait avec 250ml de tampon CB/GTP à 2ml/min. Les fractions avec une absorbance à 280nm supérieure à 0,9 ont été réunies.

- Réaction de polymérisation/dépolymérisation : la solution de tubuline est ensuite soumise à un cycle de polymérisation dans du BRB80, MgCl₂ 5mM, GTP 1mM, 33% de glycérol (V_{final}/2), 60 minutes à 35°C. La solution est ensuite doucement versée sur un coussin constitué de 60% de glycérol dans du tampon BRB80 à 35°C, puis centrifugée à 35000rpm, à 35°C durant 90 minutes (rotor Beckman Ti-45). Les culots sont rapidement lavés avec 200-300µl de tampon BRB80 chaud. Puis 100-200µl de tampon BRB80 froid sont ajoutés afin de resuspendre les culots. Les MTs sont dissociées à l'aide d'un potter et maintenus sur glace pendant 30 minutes. Dosage de la concentration de tubuline à 280nm. La concentration doit être d'environ 40mg/ml. Ensuite, une dernière centrifugation de 15 minutes, 4°C, 70000rpm (rotor Beckman TLA-100.3) est réalisée. Le surnageant est récupéré et la concentration finale en tubuline est estimée à 280nm.

Polymérisation de la tubuline *in vitro*

Les essais de polymérisation de la tubuline sont réalisés à 37°C, dans des cuves de quartz, à partir du mélange suivant : 7µM de tubuline pure (430µM), 1µl de GTP (100mM), 5µl de MgCl₂ (100mM), 20µl de molécule (DMSO 0,2%) et 67µl de BRB80. Il est important de bien conserver ce mélange au froid avant de démarrer l'étude. La turbidité est mesurée toutes les 10 secondes à 350nm, grâce à un spectrophotomètre (ThermoScientific, Evolution 201) couplé à un système de chauffage permettant de maintenir la température à 37°C.

Test de compétition avec la [H³]-colchicine

À 4°C, la tubuline à une concentration finale (Cf) de 3µM dans 196µl de BRB80, est ajoutée à 2µl de molécule à tester à 10mM (Cf 100µM) et 2µl [H³]-colchicine à 5µM (Cf 50nM). Après 30 minutes d'incubation à 30°C, les mélanges sont déposés sur 50µl de résine DEAE Sephadex A25 (préalablement équilibrée dans du BRB80). L'ensemble des étapes suivantes

sont réalisées à 4°C. Afin d'assurer la liaison de la tubuline aux billes de Sephadex, les échantillons sont incubés pendant 10 minutes sous agitation continue. Après centrifugation (2400g, 4 minutes), les surnageants sont écartés et les culots contenant les complexes molécule-tubuline liés sont lavés à 4 reprises avec du BRB80. Les billes sont ensuite incubées pendant 10 minutes avec 500µl d'éthanol afin de déshydrater les billes qui tombent au fond des tubes et de libérer les complexes molécule-tubuline. 400µl de surnageants sont enfin transférés dans 5ml de liquide scintillant (Ultima Gold, Perkin-Elmer) afin de détecter la présence de la radioactivité, à l'aide d'un compteur à scintillation liquide.

Mesure de l'instabilité dynamique des microtubules *in vitro*

Les lames et les lamelles de verre utilisées pour les expériences de TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) sont nettoyées par une succession de traitements chimiques décrits dans le papier méthode Ramirez-Rios et al., 2017. Elles sont ensuite activées par KOH 1M durant 15 minutes, puis soumises à un processus de sonication par cycles répétés (4 minutes suivie d'une pause de 1 minute, répétée 5 fois) à température ambiante avant d'être lavées dans de l'eau filtrée déionisée et séchées. Les lames et les lamelles sont incubées toute la nuit sous agitation, à l'obscurité dans des solutions de PEG-silane et PEG-silane-biotine, respectivement. Enfin chaque lames et lamelles est lavée dans de l'éthanol à 96%, puis dans de l'eau filtrée déionisée avant d'être séchée et conservée à 4°C. Les chambres sont construites en plaçant une lamelle sur le dessus d'une lame à l'aide de deux morceaux de ruban adhésif double-face prédécoupé. Dans cette étude, le volume des chambres est d'environ 15µl.

Le jour de l'étude, les chambres sont perfusées avec 30µl de Neutravidine (25µg/ml dans du BRB80/BSA1%) durant 2 minutes à température ambiante puis saturées 30 secondes à l'aide de 50µl de PLL-PEG (0,1mg/ml). Les chambres sont ensuite lavées 3 fois avec 100µl de BRB80/BSA1%. Puis, 30µl d'amorces de tubuline ATTO-565 stabilisées par GMPCPP (dilué au 400e dans du BRB80 chaud) sont perfusées durant 5 minutes avant 3 lavages de 100µl au BRB80/BSA1%. Enfin 30µl du mélange dont la composition est présentée ci-dessous sont introduits dans la chambre avant sa fermeture à l'aide d'une pâte et analyse au microscope.

Les images sont prises à l'aide d'un microscope Eclipse Ti inversé (Nikon) avec un objectif à immersion dans l'huile, Apochromatique x60/1,49 (Nikon), équipé d'un système TIRF iLas2 (Roper Scientific). Une enceinte placée autour du microscope ainsi qu'une platine chauffante ont été installées afin de stabiliser la température à 37°C.

Solutions et concentrations initiales	Volume (μ l)	Concentrations finales
H ₂ O	9,6	
BRB5x	4	1x
BSA 1%	3	0,1%
KCl 500mM	3	50mM
Déoximix (Catalase + glucose oxydase)	0,7	Catalase 82 μ g/ml Glucose oxydase 580 μ g/ml
Glucose 1/10	0,7	1mg/ml
DTT 200mM	0,6	4mM
Méthyl cellulose 1%	3	0,1%
GTP 20mM	1,5	1mM
Tubuline	0,4	12 μ g/ml (20% de tubuline rouge ATTO-565)
Molécules	3	

Tableau 7. Composition du mélange pour les études de TIRF.

6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées en utilisant le test de Student excepté pour les expériences en TIRF (Mann-whitney), de plus-end-tracking (Tukey) et sur modèles animaux (Tukey et Kruskal-Wallis). Les résultats ayant une valeur de probabilité inférieure à 0,05 sont considérés comme statistiquement significatifs.

Résultats

La létalité synthétique est un phénomène résultant d'une interaction génétique où la combinaison de mutations entre deux ou plusieurs gènes conduit à la mort cellulaire, alors que chacune de ces mutations n'a, individuellement, pas d'effet sur la viabilité cellulaire. Ce concept a ultérieurement été appliqué au criblage de composés chimiques. Dans ce cas, le criblage est réalisé sur deux lignées : une lignée contrôle et une lignée présentant une altération moléculaire (expression d'un oncogène, inactivation d'un gène suppresseur de tumeur, *etc.*). Les composés retenus sont ceux capables d'affecter spécifiquement la viabilité des cellules de la lignée présentant l'altération moléculaire (Lord and Ashworth, 2010).

Dans l'optique d'identifier des composés qui, à des concentrations non toxiques, étaient capables de potentialiser l'action du PTX dans les cellules cancéreuses, nous avons choisi de réaliser un criblage se rapprochant conceptuellement de la létalité synthétique, mais en remplaçant les perturbations génétiques par des perturbations chimiques. Ainsi, une lignée contrôle et une même lignée, mais exposée au PTX, ont été mises en présence d'une collection de molécules chimiques.

1. Identification du composé carba1

1.1 Choix de la banque de molécules à cribler

Afin de maximiser les chances de découvrir de nouvelles molécules à effet thérapeutique, nous avons établi une collaboration avec l'équipe de chimistes du CERMN (Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, dirigé par P. Dallemagne) qui nous a donné accès à une collection de 8000 composés qu'ils avaient eux-mêmes rassemblés. Cette chimiothèque comprend de nombreux hétérocycles, correspondant à la classe chimique de la majorité des inhibiteurs de kinases. Par ailleurs, il s'agit d'une chimiothèque d'origine académique, donc moins explorée que les chimiothèques commerciales, ce qui augmentait les chances de découvrir des composés originaux. Enfin, l'équipe du CERMN présente l'expérience indispensable à l'optimisation pharmacologique des touches d'intérêt si celle-ci s'avère nécessaire.

1.2 Criblage chimique en létalité synthétique

Le criblage a été réalisé sur les cellules cancéreuses HeLa (cellules du cancer du col de l'utérus). Dans un premier temps, ces cellules ont été traitées avec des concentrations croissantes de PTX afin de déterminer celle ne causant ni toxicité sur les cellules et ni modification détectable de la dynamique des MTs (**Fig.49**). Nous avons décidé d'utiliser le PTX à 1nM.

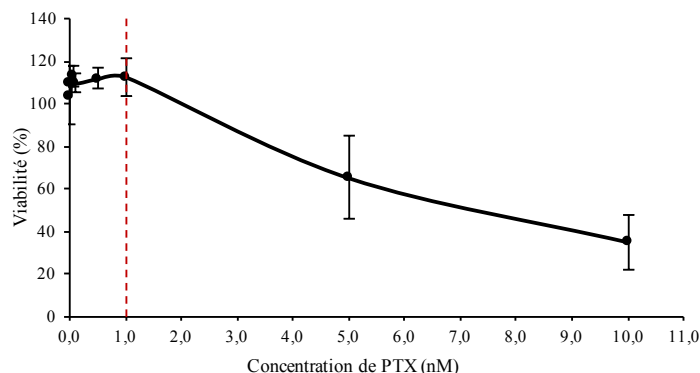


Figure 49. Effets du paclitaxel sur la viabilité des cellules HeLa.

Mesure de la viabilité (par test MTT) de cellules HeLa, à la suite d'une exposition de 48 heures à des concentrations croissantes de PTX. Barres = SEM, n=3.

Les cellules HeLa ont ensuite été traitées pendant 48 heures soit avec une dose non toxique de PTX (1nM), soit avec seulement les molécules de la banque à 5 et 25µM, soit avec une combinaison PTX/molécule (1nM/ 5 et 25µM). À la suite d'un test de viabilité (MTT), nous avons sélectionné les composés uniquement capables de diminuer la viabilité cellulaire en présence de PTX (**Fig.50**).

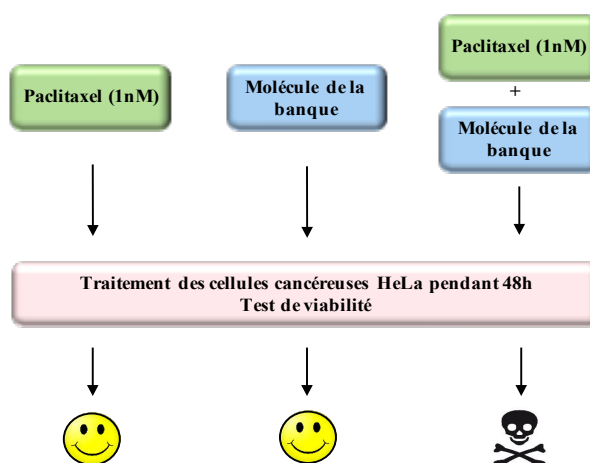


Figure 50. Principe du criblage pour l'identification de composés potentialisateurs de l'effet du paclitaxel.

Nous avons ainsi identifié des molécules de la classe des carbazoles. Ces composés sont constitués d'hétérocycles aromatiques et obtenus à partir de sources naturelles ou par des voies de synthèse. Les dérivés de carbazole ont été largement étudiés au cours des dernières décennies pour leurs nombreuses propriétés biologiques : activités antibactériennes, anti-inflammatoires, antihistaminiques, anti-tumorales et plus récemment, anti-oxydantes et neuro-protectrices (Saturnino *et al.*, 2014). La **figure 51** présente les composés dérivés des carbazoles issus du criblage et sélectionnés pour une caractérisation plus poussée.

Composés	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
T4	Cl	H	H	H	H	H	H
T21	Br	H	H	H	H	H	H
T22	Br	H	H	H	CH3	CH3	H
T23	OH	H	H	H	H	H	H
T25	F	H	H	H	CH3	CH3	H
T26	EtOCOO	H	H	H	CH3	CH3	H
T27	EtOCOO	H	H	H	H	H	H
T28	Cl	H	H	H	CH3	CH3	H
T29	F	H	H	H	H	H	CHO
T30	Br	H	H	H	H	H	CHO
T31	H	H	Et	H	H	H	H
T32	H	Cl	H	H	H	H	H
T33	H	H	H	Cl	H	H	H

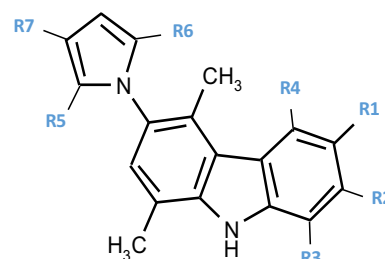


Figure 51. Dérivés de carbazole issus du criblage.

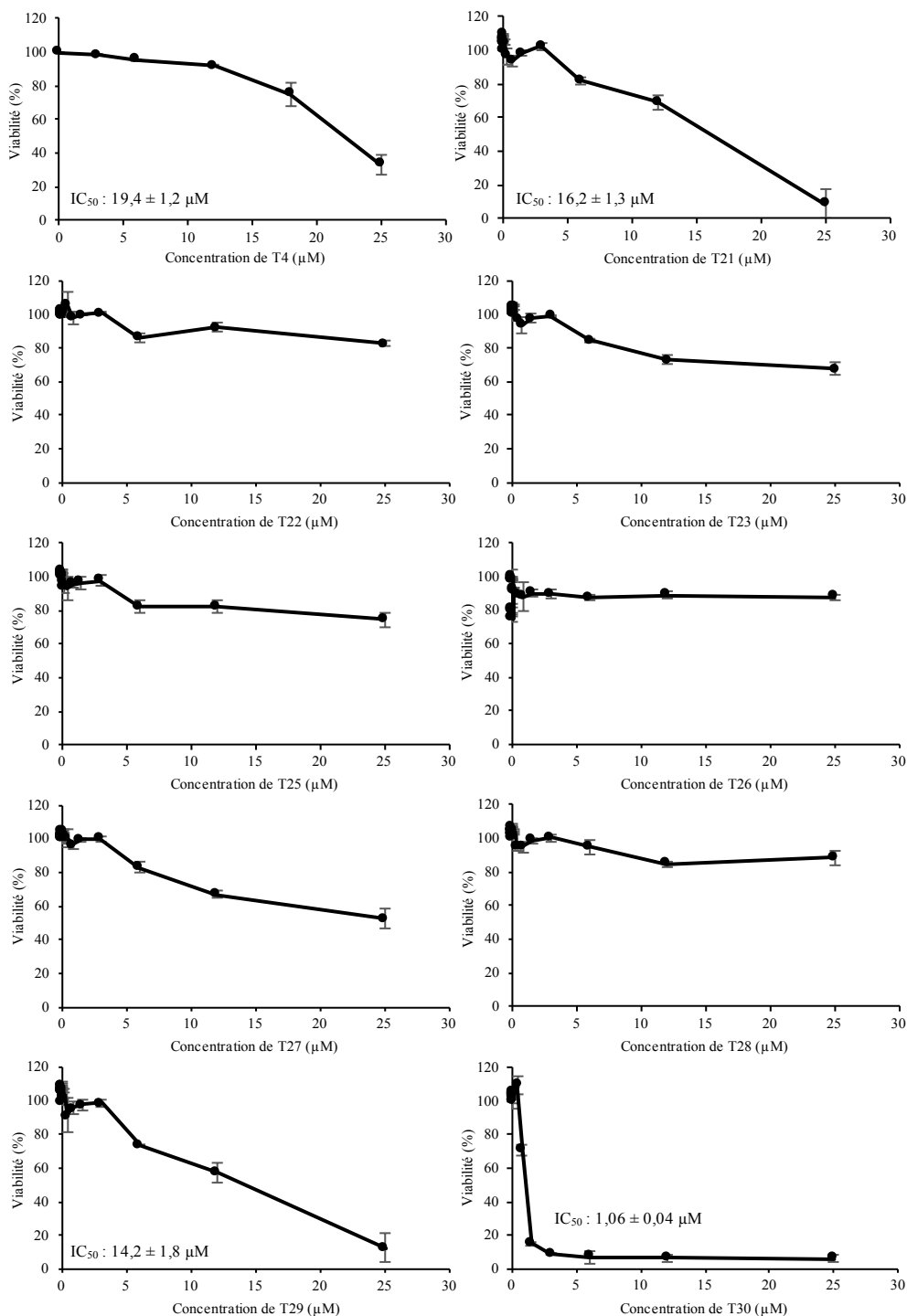
1.3 Sélection du carbazole le plus efficace

Lors du criblage, les molécules de la banque ont été utilisées à deux concentrations différentes. Il est probable que ces concentrations ne soient pas représentatives de l'effet de certains des composés. Afin de sélectionner au mieux le carbazole le plus efficace dans la potentialisation du PTX, nous avons procédé à une analyse plus approfondie de la cytotoxicité de chacun des composés, appliqués seuls ou en combinaison avec le PTX, à des doses variables.

1.3.1 Effets des dérivés de carbazole sur la viabilité des cellules HeLa

Dans le but de déterminer les concentrations actives des dérivés de carbazoles sur les cellules, nous avons traité des cellules HeLa avec des concentrations croissantes de chacune des molécules pendant 72 heures et procédé à un test de viabilité (**Fig.52**). Les résultats

montrent que les dérivés de carbazole n'ont pas tous la même efficacité sur les cellules HeLa. En effet, seules les molécules T4, T21, T29, T30 et T32 sont capables d'induire une diminution de la viabilité cellulaire d'au moins 70%. Les concentrations nécessaires pour inhiber la croissance des cellules de 50% (IC50) ont été mesurées pour chacun de ces 5 composés. T30, avec une IC50 de 1,06µM est le plus toxique. Les IC50 des quatre autres composés sont entre 14 et 20µM. Nous n'avons pas testé des doses supérieures à 25µM car au-delà de cette concentration la plupart des composés précipitent dans le milieu.



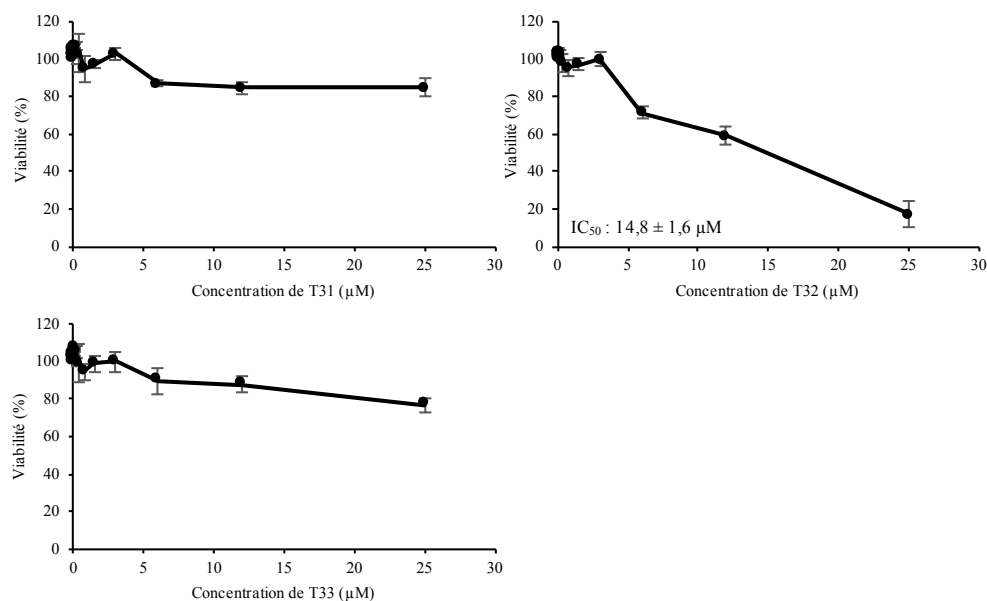
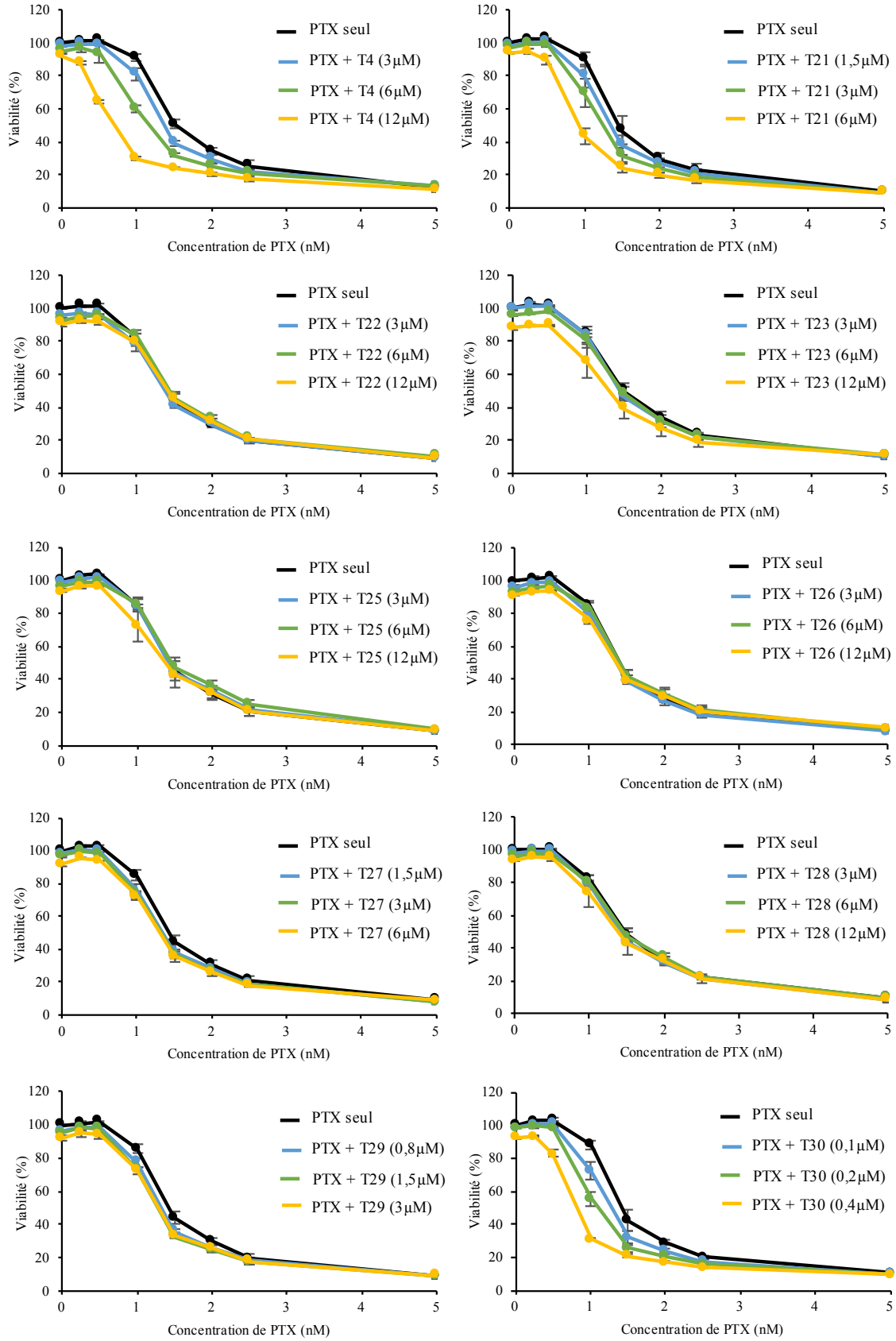


Figure 52. Effets des dérivés de carbazole sur la viabilité des cellules HeLa.

Les cellules HeLa ont été traitées pendant 72 heures avec des concentrations croissantes de chacun des dérivés de carbazole issus du criblage. La viabilité des cellules est déterminée par un test au prestoblue. Les concentrations nécessaires pour inhiber la croissance des cellules de 50% (IC₅₀) ont été mesurées lorsque c'était possible. Barres = SEM, n=3.

1.3.2 Effets de la combinaison carbazole/paclitaxel sur la viabilité des cellules HeLa

Les tests précédents ont permis de déterminer les concentrations à tester en combinaison avec le PTX. Nous voulions en effet sélectionner un composé capable de potentialiser le PTX sans provoquer, à lui seul, une trop forte diminution de la viabilité cellulaire. Pour chaque molécule nous avons donc sélectionné trois concentrations provoquant, au maximum, une réduction de la viabilité cellulaire de 10%. L'effet de ces concentrations en combinaison avec des concentrations croissantes de PTX sur la viabilité des cellules HeLa a ensuite été testé (**Fig.53**).



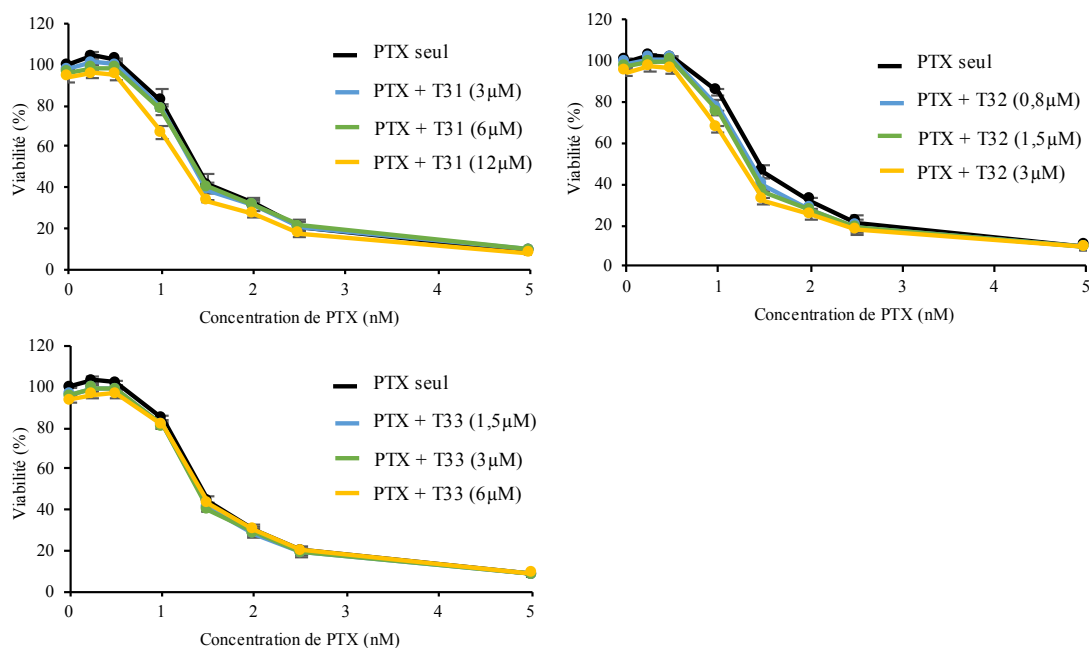


Figure 53. Analyse de la sensibilisation des cellules au paclitaxel par les dérivés de carbazole sélectionnés à l'issue du criblage.

Les cellules HeLa ont été traitées pendant 72 heures avec différentes combinaisons de PTX et de dérivés de carbazole. La viabilité des cellules est déterminée par un test au prestoblue. Barres = SEM, n=3.

Bien que les structures chimiques des dérivés de carbazole soient très similaires, ils ne sont pas tous capables de potentialiser les effets du PTX sur la viabilité des cellules HeLa. En effet, seuls les composés T4, T21, T30 et T32 induisent une diminution de l'IC₅₀ du PTX de manière dose dépendante. La **figure 54** représente sous forme d'histogramme les IC₅₀ du PTX seul ou celles mesurées lorsque le PTX est administré en combinaison avec différentes concentrations des dérivés de carbazole. L'IC₅₀ du PTX seul est de 1,5nM. Le facteur maximal de diminution de l'IC₅₀ du PTX est de : 1,7 pour 6µM de T21 ; 1,9 pour 0,4µM de T30 ; 1,25 pour 3µM de T32 ; 2,2 pour 12µM de T4. Bien que le composé T30 puisse paraître plus intéressant d'un point de vue concentration, il possède une fonction aldéhyde sur le pyrrole, pouvant être très réactive dans les cellules et être à l'origine de nombreux effets secondaires. Nous avons donc décidé de concentrer nos efforts sur l'étude du composé T4, qui provoque une importante diminution de l'IC₅₀ du PTX et que nous avons renommé carba1.

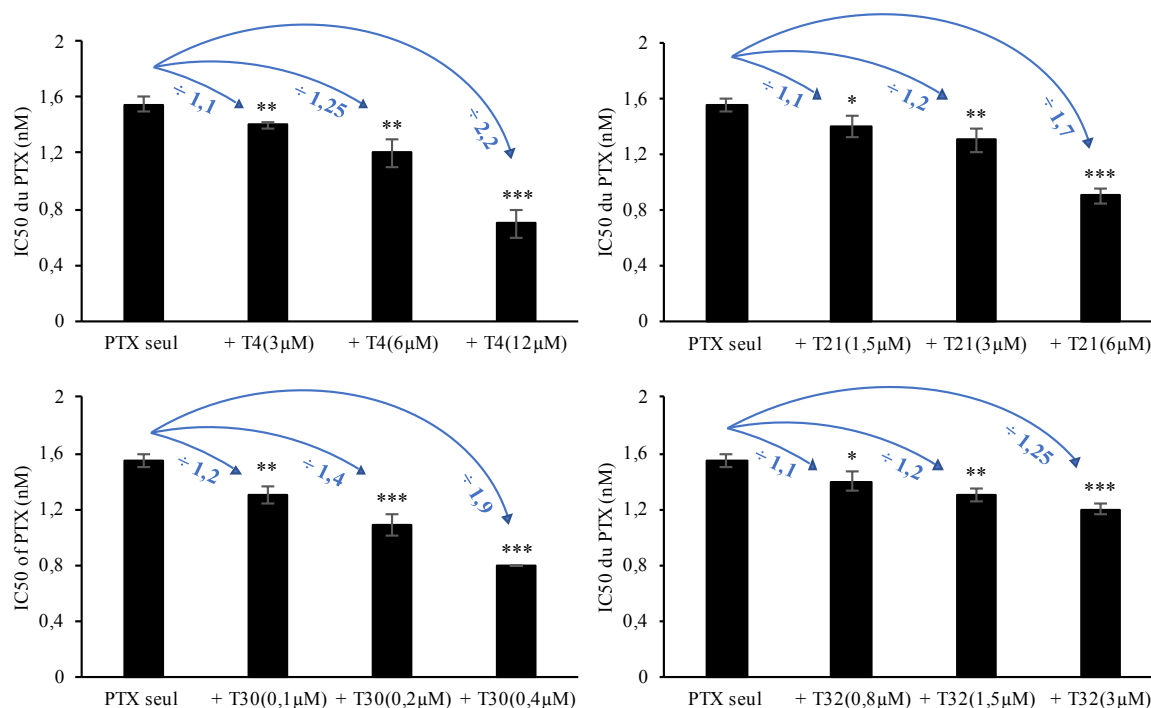


Figure 54. Réduction de l'IC50 du paclitaxel en présence de T4, T21, T30 et T32.

Les cellules HeLa ont été traitées pendant 72 heures avec différentes combinaisons de PTX et dérivés de carbazole. La viabilité des cellules est déterminée par un test au prestoblué. Barres = SEM, n=3. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; test de student.

1.3.3 Synergie entre le composé carba1 et le paclitaxel

Nous avons vu précédemment qu'une concentration peu toxique de carba1 (12µM) pouvait réduire l'IC50 du PTX de manière significative. Nous avons ensuite cherché à déterminer la concentration de PTX réduisant au maximum la survie cellulaire en présence de carba1 à 12µM. Nous avons analysé en détail l'effet de concentrations croissantes de PTX sur la survie cellulaire, appliquées seules ou en combinaison avec 12µM de carba1. La **figure 55** montre ce résultat sous forme d'histogramme. On observe que l'association de PTX à 1nM et de carba1 à 12µM provoque une réduction de la survie cellulaire de 70%. De manière intéressante, à ces concentrations, chacune des deux molécules seules ne cause qu'une faible diminution de la survie (inférieure à 10%). Dans ces conditions, l'association carba1/PTX a un effet supérieur à la somme de leurs effets lorsque ces composés sont administrés séparément, indiquant un effet synergique. Dans la suite de cette étude nous avons donc décidé de travailler avec le PTX à 1nM et carba1 à 12µM.

L'interaction spécifique entre carba1 à 12µM et PTX à 1nM dans les cellules HeLa a pu être évaluée par le calcul de l'indice de combinaison (CI). Cet indice permet de déterminer si les effets de l'association de molécules sont synergiques ($CI < 1$), additifs ($CI = 1$) ou antagonistes

(CI>1). Dans le cas spécifique de carba1 à 12 μ M et PTX à 1nM, le CI est de $0,86 \pm 0,08$, validant l'effet synergique de ces 2 molécules, à ces concentrations.

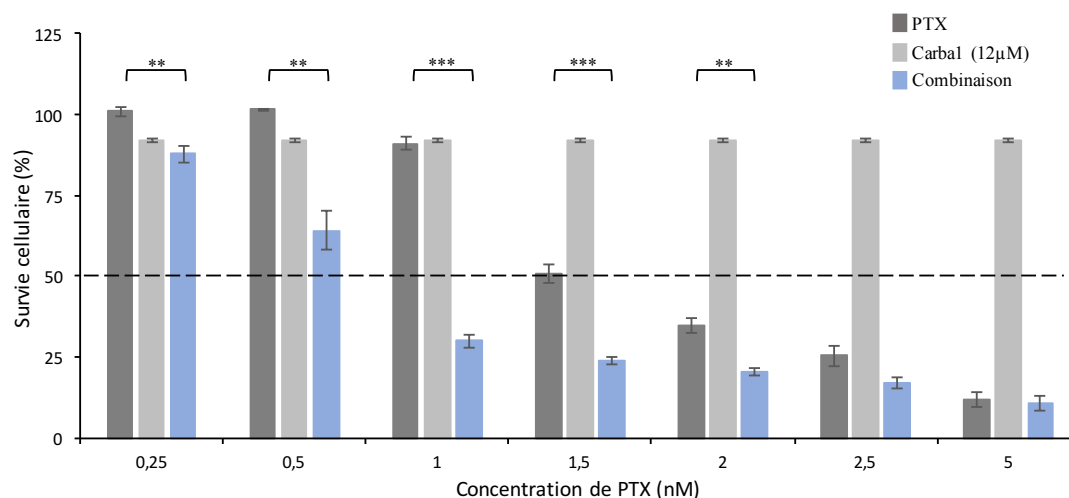


Figure 55. Synergie entre le composé carba1 et le paclitaxel.

Les cellules HeLa ont été traitées pendant 72 heures avec des concentrations croissantes de PTX seules ou en combinaison avec carba1 à 12 μ M. La viabilité des cellules est déterminée par un test au prestoblue. Barres = SEM, n=3. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; test de student.

2. Analyse des effets de la combinaison carba1/PTX dans les cellules

Afin d'analyser de manière approfondie les effets de la combinaison carba1(12 μ M)/PTX(1nM), à l'origine d'une réduction de la viabilité cellulaire de 70%, observée après 72h de traitement, nous avons procédé à une analyse du cycle cellulaire en cytométrie en flux puis en vidéomicroscopie.

2.1 Effets de la combinaison carba1/PTX sur les différentes phases du cycle cellulaire

2.1.1 Carba1/PTX bloque les cellules en phase G2/M

Dans un premier temps, les effets de la combinaison carba1(12 μ M)/PTX(1nM) sur le cycle cellulaire ont été analysés, par cytométrie en flux (**Fig.56**). À ces concentrations, les molécules appliquées séparément n'ont que très peu d'impact sur la répartition des cellules au cours du cycle. En effet, le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle est très similaire aux conditions contrôles (DMSO). Nous avons observé tout de même une légère accumulation des cellules en phase G2/M ainsi qu'une augmentation des cellules plurinucléées (>4N) après 15 heures de traitement par carba1 seul. Cependant, cette tendance s'estompe au cours du temps et après 48 heures de traitement, aucune différence significative

n'apparaît en comparaison avec les conditions contrôles. Nous avons également remarqué une augmentation du nombre de cellules plurinucléées ou apoptotiques dans la fraction sub-G1 après un traitement au PTX à 1nM.

Les cellules HeLa traitées avec une combinaison de ces molécules s'accumulent de manière transitoire en phase G2/M. En effet, 54% des cellules sont présentes dans cette phase après 15 heures d'exposition au traitement, contre environ 32% pour les cellules non traitées ainsi que pour celles traitées par carba1 et PTX seuls. Puis le pourcentage des cellules en G2/M diminue progressivement, parallèlement à une accumulation de cellules apoptotiques et de cellules plurinucléées, s'additionnant à un nombre déjà élevé de cellules présentes dans ces deux phases après 15 heures de traitement. Enfin, à 48 heures, environ 20% des cellules traitées ont subi une apoptose ou sont plurinucléées, contre seulement 1% et 4% pour les cellules non traitées ou exposées à carba1 et contre 6% et 10% pour les cellules traitées au PTX. Il semble donc que l'association carba1/PTX provoque principalement des dérèglements au cours de la phase G2/M pouvant être à l'origine de la mort des cellules ou de l'apparition de cellules plurinucléées.

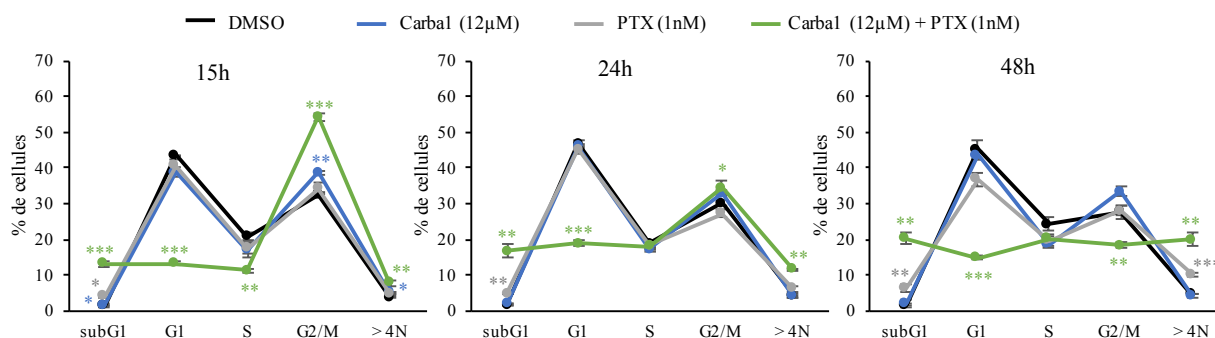


Figure 56. Caractérisation des effets de carba1/PTX sur la progression du cycle cellulaire.

Les cellules HeLa ont été traitées ou non par carba1 à 12µM, PTX à 1nM ou une combinaison de ces deux molécules. Les phases du cycle cellulaire ont été déterminées par cytométrie en flux à la suite d'un marquage à l'iodure de propidium (IP), en fonction du temps comme indiqué. Les courbes représentent la moyenne du pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire. Barres = SEM, n=3. Pour l'analyse statistique, les molécules seules ont été comparées au DMSO, carba1/PTX a été comparé au PTX seul. * P < 0,05 ; ** P < 0,01 ; *** P < 0,001 ; test de student.

2.1.2 Carba1/PTX cause l'apparition de fuseaux mitotiques anormaux

Les populations de cellules en phases G2/M du cycle cellulaire ne peuvent pas être discriminées les unes des autres sur la seule mesure de leur contenu en ADN. Afin de mieux comprendre le blocage des cellules en phase G2/M observé en cytométrie en flux avec

carba1/PTX et dans le but d'obtenir plus de précision quant aux effets de cette association sur les cellules, nous avons procédé à des analyses en vidéomicroscopie.

Les cellules HeLa ont été traitées par carba1 à 12 μ M, PTX à 1nM ou la combinaison de ces deux molécules, puis filmées pendant une douzaine d'heures. En condition contrôle les cellules HeLa se divisent en 40 minutes et présentent toutes les étapes de la mitose, indiquées par les cadres de couleurs (**Fig.57A**).

Les cellules HeLa traitées par carba1 à 12 μ M ou par le PTX à 1nM présentent un retard en mitose (**Fig.57B**). En effet, bien que la majorité des cellules se divise correctement, la durée de la mitose est de 100 minutes à la suite d'une exposition à carba1 et atteint 195 minutes pour les cellules traitées au PTX. La **figure 57C** représente sous forme d'histogrammes la durée des différentes phases de la mitose : prométaphase, métaphase et anaphase/télophase, calculée sur 50 cellules pour chaque condition. L'augmentation de la durée mitotique à la suite de ces deux traitements est corrélée avec une durée de prométaphase globalement plus longue qu'en condition contrôle. Nous avons également observé que 5 et 12% des cellules exposées à carba1 ou PTX respectivement, se divisent anormalement. Ces anomalies sont signalées par une étoile sur les barres d'histogrammes ; cette étoile fait également référence au phénotype représentatif exposé en **figure 57B**. Les cellules présentent un fuseau tripolaire conduisant à la division de l'ADN en 3 cellules filles aneuploïdes.

La combinaison carba1(12 μ M)/PTX(1nM) entraîne un blocage beaucoup plus long en prométaphase qu'en conditions « contrôle » ou « molécules seules » (**Fig.57B et C**). En effet, après 150 minutes de mitose, 76% des cellules n'ont toujours pas leurs chromosomes correctement alignés le long de la plaque équatoriale. De plus, non seulement la quantité de cellules bloquées est nettement plus importante, mais le nombre de divisions anormales est accru. Ces divisions anormales sont illustrées par des images représentatives de la **figure 57B** ; elles sont signalées par 2 ou 3 étoiles sur les barres d'histogrammes et sur la **figure 57B**. Cette analyse en vidéomicroscopie montre que les cellules bloquées en prométaphase finissent par se diviser et donner naissance à des cellules filles aneuploïdes, dont certaines peuvent présenter plusieurs noyaux après décondensation de l'ADN. Nous avons également remarqué que certaines cellules bloquées en mitose finissent par se diviser. Ces divisions sont souvent multipolaires. Ainsi, sur la **figure 57B**, on observe un « mid-body » à trois parties dont l'une disparaît (indiquée par une flèche **Fig.57B**, traitement carba1/PTX, ***). À la fin de la mitose, on a séparation complète de deux cellules dont l'une est clairement plurinucléée.

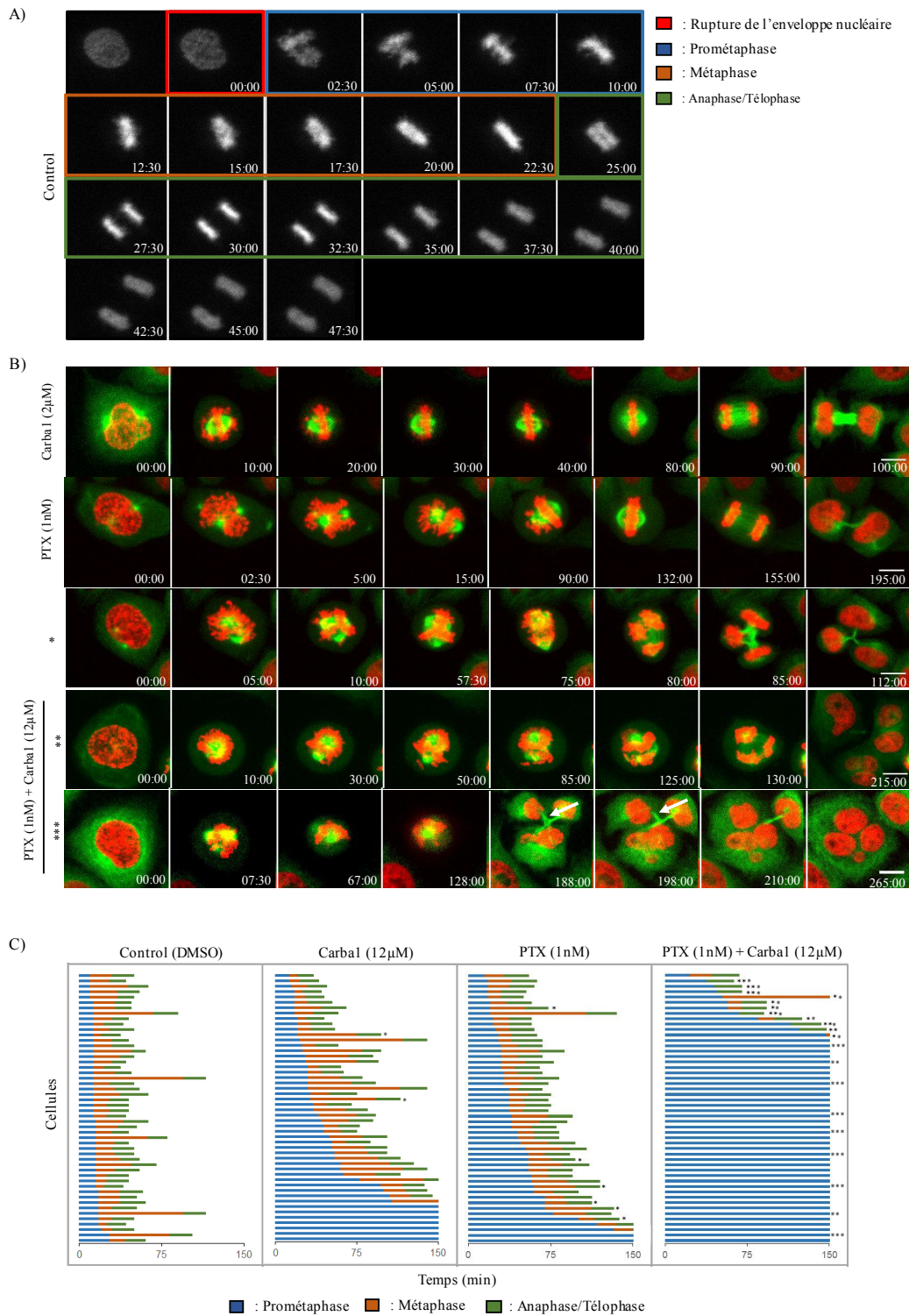


Figure 57. Carba1/PTX bloque les cellules en prométaphase et provoque l'apparition de cellules aneuploïdes et/ou plurinucléées.

(A, B) Images représentatives, sélectionnées à partir de vidéos, de cellules HeLa Kyoto (tubuline-EGFP, H2B-mcherry) non traitées (A) ou traitées avec les concentrations indiquées de molécules (B). Le temps sur les images est en minutes. Échelle : 10µm. (C) Histogrammes représentant la durée de chaque phase mitotique dans les cellules (prométaphase, métaphase, anaphase/télophase). Chaque barre représente une cellule ; 50 cellules par traitement ont été analysées. Les étoiles signalent les phénotypes particuliers observés lors de l'analyse, dont des images représentatives figurent en B. La flèche indique le « mid-body ».

Les résultats indiquent que carba1/PTX provoque un arrêt des cellules en prométaphase, se poursuivant ensuite par des divisions anormales à l'origine de l'apparition de cellules aneuploïdes et/ou plurinucléées.

2.1.3 Carba1/PTX favorise l'apoptose des cellules

Comme nous l'avons expliqué précédemment, les cellules en apoptose peuvent être détectées en cytométrie en flux et sont contenues dans la phase sub-G1. En effet, la dégradation de l'ADN par des endonucléases endogènes n'est pas continue et une proportion d'ADN double brin reste intacte et capable de fixer les sondes comme l'IP. Cependant, la fixation étant réduite, la fluorescence émise par les cellules apoptotiques est plus faible que celle émise par les cellules 2n et un pic apparaît juste avant la phase G1 (Grunwalg *et al.*, 2010). Nous avons ainsi observé qu'à la suite d'un traitement carba1/PTX, le pourcentage de cellules en G2/M diminuait progressivement, parallèlement à une accumulation de cellules apoptotiques contenues dans cette phase sub-G1. Cependant, les variations du nombre de cellules présentes dans la phase sub-G1 peuvent être dues aux conditions expérimentales, notamment au protocole de marquage. De plus, cette méthode de mesure peut sous-estimer la quantité de cellules apoptotiques dans les phases S et G2/M. Ces dernières possèdent une quantité d'ADN supérieure aux cellules en G1. Au cours du processus de fragmentation de l'ADN, les cellules apoptotiques en phase S et G2/M conservent momentanément une quantité d'ADN supérieure à celles des cellules en G1 et ne sont donc pas comptabilisées dans le pic sub-G1.

Afin de confirmer la mort en apoptose des cellules traitées par carba1/PTX, nous avons procédé à une analyse en cytométrie en flux en présence d'IP et d'Annexin-V (marqueur apoptotique) (**Fig.58**). Un traitement des cellules par carba1 à 12 μ M ou PTX à 1nM ne cause pas d'augmentation du pourcentage de cellules en apoptose par rapport aux conditions contrôles. En revanche, les résultats montrent une hausse significative du pourcentage d'apoptose à partir de 48 heures de traitement par carba1(12 μ M)/PTX(1nM), allant jusqu'à 35% après 72 heures de traitement. Les résultats obtenus corréleront avec ceux observés en cytométrie en flux.

La combinaison carba1/PTX provoque un arrêt en prométaphase suivi d'une division anormale des cellules. Les études réalisées ne permettent pas de connaître le devenir précis des cellules aneuploïdes et/ou plurinucléées. En effet, nous ne pouvons dire si ces cellules meurent directement en interphase ou si elles redémarrent un cycle à la suite de la mitose.

Nous pouvons cependant supposer qu'une grande partie de ces cellules finissent par mourir en apoptose comme l'indique la **figure 58**.

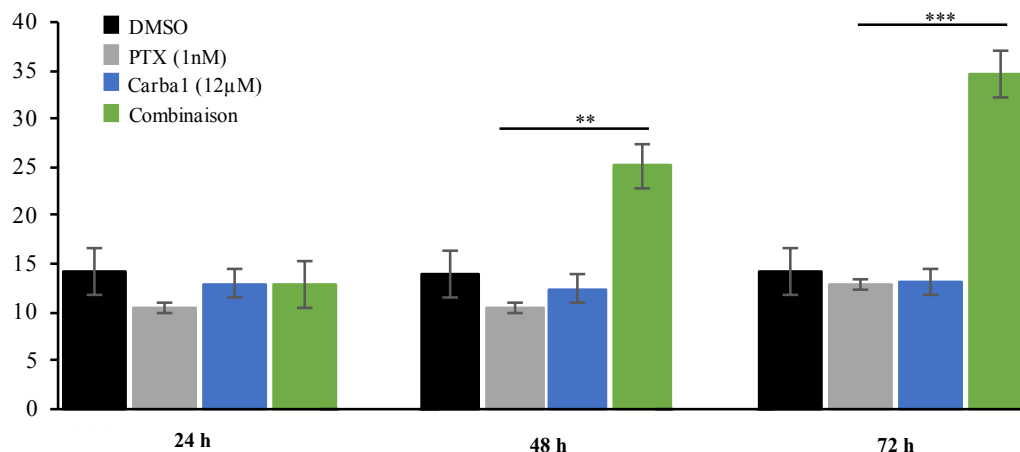


Figure 58. Carba1/PTX favorise la mort des cellules par apoptose.

Mesure de l'apoptose dans une population de cellules HeLa traitées ou non par carba1 à 12µM, PTX à 1nM ou une combinaison de ces deux molécules à différents temps, par cytométrie en flux (Annexin-V, IP). Barres = SEM, n=3. * P < 0,05 ; ** P < 0,01 ; *** P < 0,001 ; test de student.

2.2 Comparaison des effets de carba1/PTX à ceux causés par carba1 et paclitaxel à des concentrations cytotoxiques

Nous avons ensuite voulu voir si les effets de la combinaison carba1/PTX sur les cellules étaient similaires à ceux provoqués par carba1 et/ou le PTX appliqués isolément à des concentrations cytotoxiques. Des cellules HeLa ont donc été traitées avec des concentrations plus fortes de carba1 et de PTX, puis analysées en cytométrie en flux et en vidéomicroscopie.

2.2.1 Des concentrations cytotoxiques de carba1 et de paclitaxel causent un arrêt des cellules en phase G2/M

Des cellules HeLa ont été traitées avec carba1 à 25µM ou PTX à 5nM et analysées à différents temps en cytométrie en flux (**Fig.59B**). La **figure 59A** rappelle les effets de la combinaison carba1(12µM)/PTX(1nM) sur la répartition des cellules entre les phases du cycle cellulaire.

Les cellules HeLa traitées avec 25µM de carba1 s'accroissent de manière transitoire en phase G2/M, comme nous l'avons observé pour carba1 à 12µM. En effet, 61% des cellules sont présentes dans cette phase après 15 heures d'exposition à carba1, contre environ 32% des cellules non traitées. Puis le pourcentage des cellules en G2/M diminue progressivement,

parallèlement à une accumulation non seulement de cellules apoptotiques dans la fraction sub-G1, mais également de cellules plurinucléées. Après 48 heures de traitement, environ 11% des cellules sont apoptotiques et 9% sont plurinucléées, contre seulement 1% et 4% des cellules non traitées, respectivement.

Après 15 heures de traitement au PTX à 5nM, la moitié de la population cellulaire est bloquée en phase G2/M et près de 20% des cellules sont déjà en apoptose. Puis la proportion de cellules en G2/M diminue progressivement, parallèlement à une augmentation du nombre de cellules en apoptose ou plurinucléées.

De manière intéressante, nous observons que la répartition des cellules entre chaque phase du cycle cellulaire à la suite d'un traitement avec la combinaison des drogues est très similaire à celle obtenue à la suite d'un traitement avec PTX à 5nM. Ces résultats suggèrent que l'effet de la combinaison carba1/PTX est dû à une accentuation des effets du PTX dans les cellules. Étant-donné que nous ne pouvons pas utiliser carba1 au-dessus de 25µM à cause de problèmes de solubilité, nous ne pouvons cependant pas exclure que l'effet de la combinaison carba1/PTX soit dû à une accentuation des effets de carba1 à très forte concentration.

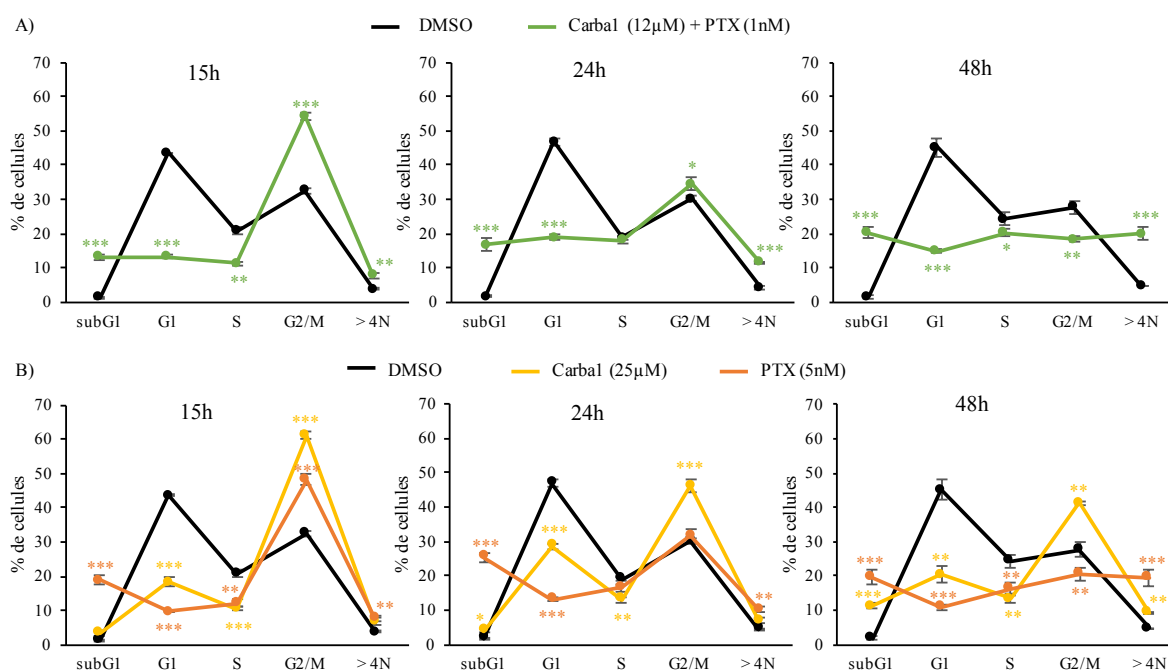


Figure 59. Caractérisation des effets de carba1 et du paclitaxel à forte concentration sur le cycle cellulaire.

(A) Rappel des effets de la combinaison carba1/PTX sur la répartition des cellules entre les phases du cycle cellulaire. (B) Les cellules HeLa ont été traitées ou non par carba1 à 25µM ou PTX à 5nM. Les phases du cycle cellulaire ont été déterminées par cytométrie de flux après marquage à l'IP, en fonction du temps comme indiqué. Les courbes représentent la moyenne du pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire. Barres = SEM, n=3. * P < 0,05 ; ** P < 0,01 ; *** P < 0,001 ; test de student (comparaison au DMSO).

2.2.2 Carba1 accentue les effets du paclitaxel dans les cellules

Les résultats de l'analyse du cycle cellulaire laissent supposer que la combinaison carba1(12 μ M)/PTX(1nM) a les mêmes effets que le PTX à forte concentration plutôt que carba1 à forte dose. Afin de vérifier cette hypothèse, les cellules HeLa ont été traitées avec une forte concentration de PTX (5nM) ou bien avec une concentration élevée de carba1 (25 μ M) et suivies en vidéomicroscopie pendant une douzaine d'heures (**Fig.60**).

Les cellules traitées par carba1 à forte concentration restent majoritairement bloquées en mitose et présentent une partie de leurs chromosomes alignée sur la plaque équatoriale ainsi qu'une seconde partie présente aux pôles (**Fig.60A**). Une analyse quantitative a permis de montrer que 82% des cellules sont toujours en prométaphase à 150 minutes après le début de la mitose (**Fig.60B**). Le blocage de ces cellules est tellement long que le suivi en vidéomicroscopie de ces cellules pendant 12 heures n'est cependant pas suffisant pour déterminer leur devenir. Nous avons donc mis en place une seconde étude et filmé les cellules sur une période de 20 heures. Nous avons ainsi pu observer que 60% des cellules arrêtées en prométaphase finissent par mourir directement en mitose et 28% des cellules se divisent anormalement (**Fig.60C**). Parmi ces cellules, 21% finissent par mourir en interphase et 7% entrent de nouveau dans un cycle cellulaire. Enfin, seulement 10% des cellules présentent une mitose normale.

Tout comme les cellules traitées par carba1 à forte concentration, les cellules exposées au PTX à 5nM restent bloquées en prométaphase (**Fig.60A**). Cependant la durée de blocage est moins longue et 80% des cellules qui entrent en mitose se divisent dans les 150 minutes, donnant naissance à des cellules aneuploïdes et/ou plurinucléées. De plus, seulement 14% des cellules sont toujours bloquées en prométaphase après 12 heures d'observation (**Fig.60D**). Les différentes phases mitotiques étant plus difficiles à déterminer pour cette concentration de PTX, nous n'avons pas pu représenter, comme pour les autres conditions, la durée de chaque phase sous forme d'histogrammes.

La combinaison carba1(12 μ M)/PTX(1nM) cause un blocage plus long des cellules en prométaphase qu'un traitement au PTX à 5nM. Chacun des composés est capable, à ces mêmes concentrations (carba1 à 12 μ M et PTX à 1nM), d'augmenter la durée de la prométaphase quand il est appliqué individuellement. Nos résultats ne permettent pas de savoir si l'allongement de la durée de la prométaphase observé avec la combinaison résulte d'un effet additif de ces molécules ou d'une potentialisation de l'une par l'autre. En revanche,

la majorité des cellules traitées avec une combinaison carba1/PTX se divisent avant de mourir en apoptose, de la même manière que le PTX à 5nM et contrairement aux cellules exposées à 25µM de carba1, dont plus de la moitié meurent en mitose. En culture, l'effet de l'association carba1/PTX semble donc être similaire à celui observé avec le PTX à dose cytotoxique. Ceci indique que l'administration de carba1 pourrait provoquer une accentuation des effets du PTX dans les cellules.

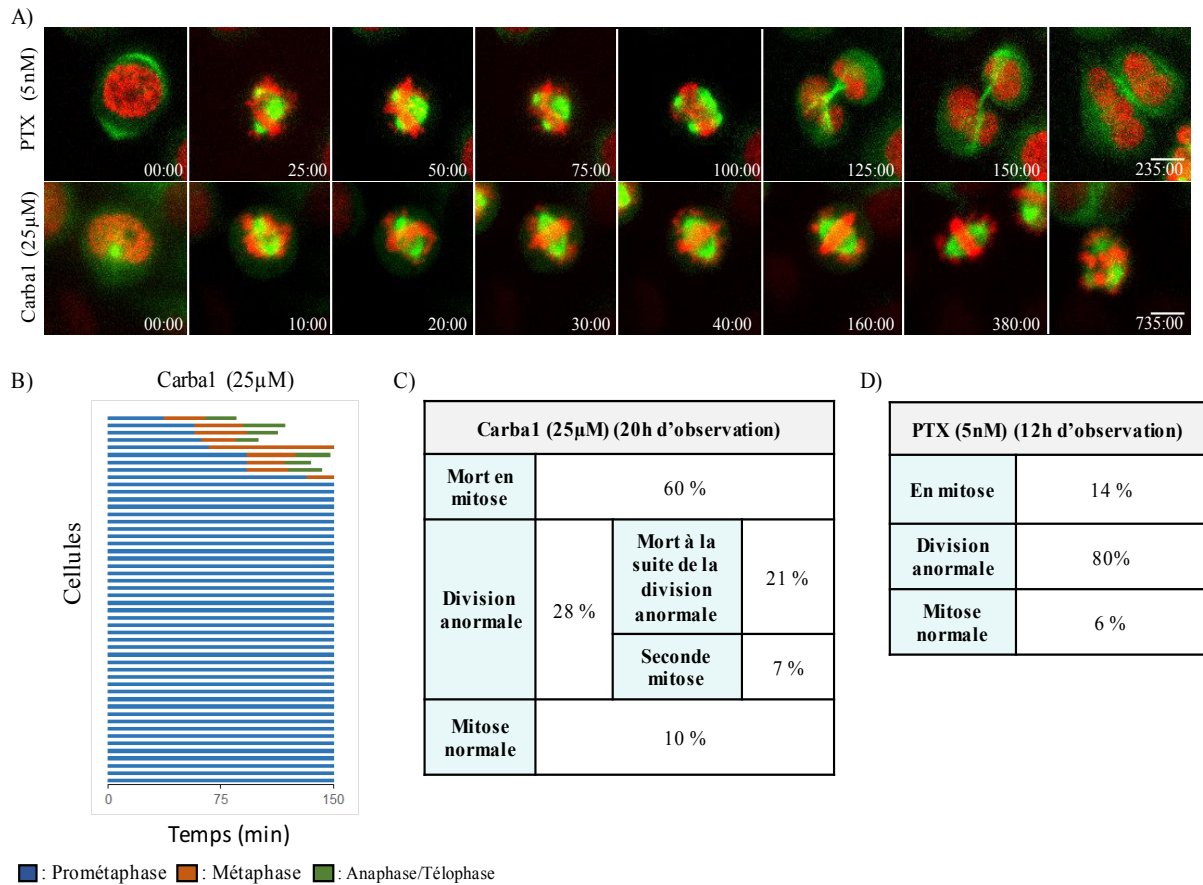


Figure 60. Effets de carba1 et du paclitaxel à forte concentration sur les cellules en mitose.

(A) Images représentatives, sélectionnées à partir des vidéos, de cellules HeLa Kyoto (tubuline-EGFP, H2B-mcherry) traitées par carba1 à 25µM et PTX à 5nM. Échelle : 5µm. Le temps indiqué est en minute (B) Graphique représentant la durée de chaque phase mitotique dans les cellules traitées avec carba1. Chaque barre représente une cellule (n=50). (C) Tableau récapitulatif du devenir des cellules bloquées en mitose par carba1, n=105. (E) Tableau récapitulatif du devenir des cellules traitées par les PTX à 5nM, n=50.

3. Recherche de la cible du composé carba1

Avant de nous intéresser au mécanisme d'action et à l'efficacité thérapeutique de la combinaison carba1/PTX, nous avons cherché à identifier la cible du composé carba1 dans les cellules. De plus, cette information est importante dans l'hypothèse d'une future utilisation clinique de la molécule.

3.1 Carba1 n'altère pas le réseau de microtubules en interphase

Nous avons vu précédemment, grâce aux études menées en vidéomicroscopie, que le composé carba1 provoquait l'apparition de fuseaux mitotiques anormaux. Il est montré que l'action toxique du PTX dans les cellules en culture, résulte de sa fixation sur la tubuline et de ses effets sur les MTs, à l'origine de la formation de fuseaux mitotiques anormaux causant l'arrêt des cellules en mitose. Puisque carba1 exerce une synergie avec le PTX, nous nous sommes demandés s'il avait lui-même un effet sur les MTs, qui pourrait s'additionner à l'effet du PTX. L'objectif utilisé pour les études de vidéomicroscopie, à savoir le x20, ne nous permet pas de voir précisément l'organisation du réseau microtubulaire après traitement. Nous avons donc traité des cellules avec carba1 et analysé les phénotypes mitotiques et interphasiques des MTs par immunofluorescence (IF) au x63. Afin d'avoir une idée claire de l'effet de carba1 sur l'organisation du réseau microtubulaire, nous l'avons testé à une concentration maximale, c'est à dire 25 μ M.

Après 5 heures de traitement, les cellules HeLa présentent une organisation des MTs en interphase similaire à celle des cellules non traitées (**Fig.61A**). De même que précédemment, nous avons observé que ce composé provoque l'apparition de phénotypes mitotiques anormaux. Ainsi, au cours de la métaphase, les cellules non traitées présentent 2 fuseaux bipolaires symétriques avec des chromosomes alignés au centre de la cellule au niveau de la plaque équatoriale (**Fig.61B**). En revanche, les cellules traitées avec carba1 présentent une répartition anormale des chromosomes au cours de la mitose, avec une partie alignée au centre et une partie présente aux extrémités de la cellule.

Bien que carba1 induise un phénotype mitotique anormal, les résultats de cette expérience suggèrent que la tubuline n'est pas la cible de carba1. En effet, pour des concentrations similaires, de l'ordre du micromolaire, les agents stabilisants ou déstabilisants des MTs provoquent une augmentation ou une réduction de la masse des MTs dans les cellules, visible en interphase.

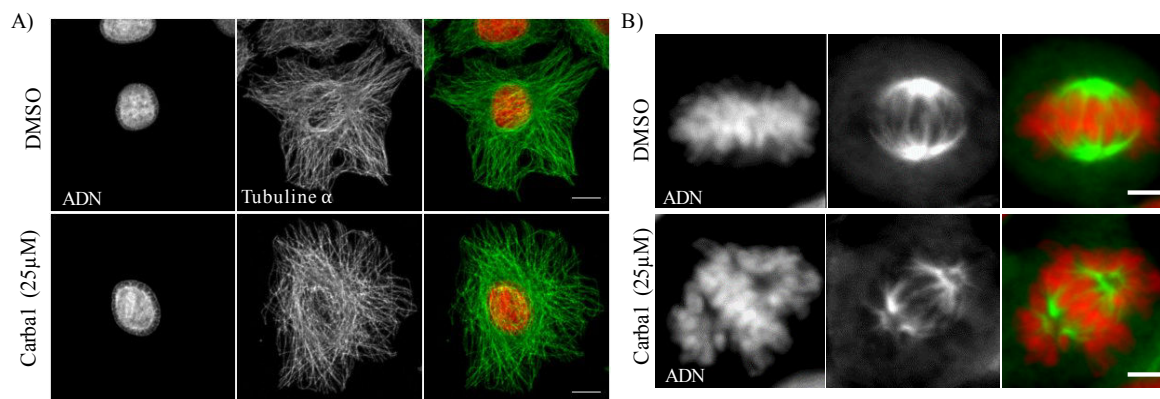


Figure 61. Effets de carba1 sur le réseau microtubulaire des cellules HeLa.

Les cellules HeLa ont été traitées avec carba1 à 25 μ M durant 5 heures. (A, B) Images représentatives en microscopie à fluorescence des MTs dans des cellules en interphase (A) ou en mitose (B). En vert : la tubuline α , en rouge : l'ADN (coloration au DAPI). Échelle : 10 μ m.

Nous avons donc, dans un premier temps, écarté l'hypothèse que carba1 cible la tubuline et recherché d'autres cibles.

3.2 Effets de carba1 sur un ensemble de kinases

Le phénotype des cellules traitées par carba1 est très similaire à celui de cellules exposées à des inhibiteurs spécifiques de protéines kinases impliquées dans le processus mitotique, telles que Aurora B ou la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) par exemple (*Lens et al.*, 2010). De plus, la structure moléculaire de carba1, avec plusieurs hétérocycles était compatible avec celle d'un inhibiteur de kinase. Nous avons donc testé l'effet possible de carba1 sur un ensemble de kinases (**Fig.62**). Il s'avère que, dans les conditions utilisées par le prestataire Merck-Millipore, carba1 n'inhibe fortement aucune kinase testée. Ce n'est donc vraisemblablement pas un inhibiteur direct de ces kinases.

Carba1 (10 μ M)

CaMKII β (h)	67	AMPK α 2(h)	104
PKC ϵ (h)	71	CaMKII γ (h)	104
Aurora-B(h)	72	FAK(h)	104
FGFR1(h)	72	Aurora-A(h)	105
GSK3 β (h)	73	JAK2(h)	106
CaMKII δ (h)	74	MAPK1(h)	106
Tie2 (h)	77	Pyk2(h)	107
IR(h), activated	81	ROCK-I(h)	107
MLCK(h)	82	ROCK-II(h)	109
MLK1(h)	83	ALK(h)	110
CaMKIV(h)	85	CDK2/cyclinA(h)	110
Met(h)	86	LKB1(h)	110
ARK5(h)	87	p70S6K(h)	110
Ret(h)	90	NEK2(h)	111
IGF-1R(h), activated	92	PDGFR α (h)	112
FGFR2(h)	94	Plk1(h)	112
TAK1(h)	94	PKC ζ (h)	113
cKit(h)	97	CDK7/cyclinH/MAT1(h)	115
mTOR(h)	98	PKB α (h)	116
TGFBRI(h)	98	PKB β (h)	116
AMPK α 1(h)	99	LIMK1(h)	117
FGFR3(h)	99	SIK(h)	124
PAR-1B α (h)	99	EGFR(h)	125
Plk3(h)	99	PDGFR β (h)	126
c-RAF(h)	100	CaMKI δ (h)	127
cSRC(h)	100	BrSK2(h)	134
Src(1-530)(h)	100	Flt3(h)	134
BrSK1(h)	101	MRCK β (h)	136
CaMKI(h)	102	MRCK α (h)	140
EphA2(h)	102	Abl(h)	141
MARK1(h)	102	PKA(h)	141
PAK2(h)	103	eEF-2K(h)	145
Syk(h)	103	DCAMKL2(h)	249

Figure 62. Effets de carba1 sur un ensemble de kinases.

Profiling réalisé par Merck-Millipore. Le composé carba1 a été utilisé à 10 μ M. 100 correspond à une activité normale de la kinase.

3.3 Recherche de cibles potentielles de carba1 par criblage génétique chez la levure

3.3.1 Carba1 potentialise les effets du paclitaxel dans la levure

En collaboration avec l'équipe d'Annie Andrieux (équipe Physiopathologie du cytosquelette, Grenoble-Institut de Neurosciences), nous avons testé si le composé carba1 était actif sur la levure *S. cerevisiae* (*S.c.*) et présentait des propriétés similaires. Contrairement aux cellules humaines, la levure possède de nombreuses pompes d'efflux qui la rendent partiellement résistante aux drogues. De plus, la séquence de la tubuline β est différente et ne permet pas de lier le PTX. Nous avons donc utilisé une souche de levure mutée sur 7 pompes d'efflux et transformée avec un fragment d'ADN contenant le gène de tubuline β (*TUB2*) mutée sur 5 acides aminés permettant ainsi la liaison au PTX.

Nous avons tout d'abord réalisé des gammes de concentrations de carba1 et observé qu'il était toxique pour la levure à une concentration de 800 μ M. Cette même souche est sensible à une concentration de PTX à 50 μ M. Dans un second temps, nous avons recherché si, dans cette

espèce, carba1 était également capable d'induire une synergie avec le PTX. Nous avons ainsi observé que des doses de carba1 (25 μ M) ou de PTX (25 μ M), sans effet sur la croissance des levures quand elles sont appliquées séparément, inhibent la prolifération des levures quand elles sont appliquées conjointement (**Fig.63**). L'effet synergique de carba1/PTX, observé dans les cellules humaines, est donc également valable chez la levure, ce qui suggère que la cible de carba1 et son effet sont conservés de la levure à l'Homme.

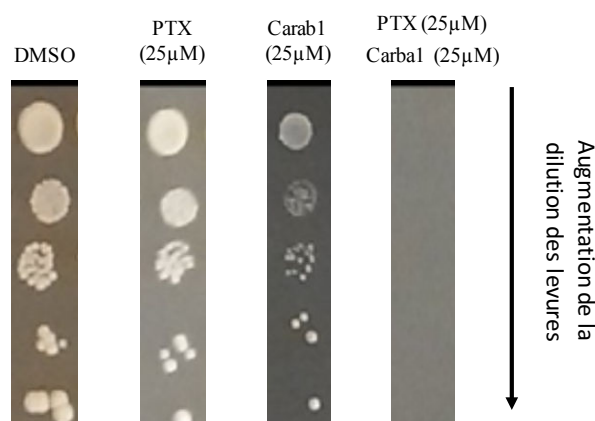


Figure 63. Effets de carba1, du paclitaxel et d'une combinaison de carba1/PTX sur la viabilité des levures. Les levures sont déposées sur un milieu contenant du DMSO, du PTX (25 μ M), carba1 (25 μ M) ou l'association de ces deux molécules. Les photos ont été prises après 48 heures de traitement.

Comme la levure est un eucaryote simple unicellulaire facile à manipuler d'un point de vue génétique, des stratégies basées sur l'utilisation de mutants étaient envisageables pour identifier la cible cellulaire du composé carba1.

3.3.2 Criblage génétique chez la levure

La recherche des mécanismes ciblés par carba1 a été basée sur le principe d'identifier les gènes qui permettent aux levures, quand ils sont surexprimés, de survivre en présence de carba1. Cependant la concentration de carba1 nécessaire pour tuer les levures était bien trop élevée et nous avons décidé de tirer parti de l'effet toxique de la combinaison carba1/PTX. Nous avons entrepris de cribler une banque génomique de levure constituée de fragments d'ADN génomique de 4 à 5 kb clonés dans un vecteur multicopie. Ces vecteurs permettent d'interroger l'effet de la surexpression de chacun des 6200 gènes de levure sur la sensibilité de cet eucaryote simple unicellulaire à la combinaison carba1/PTX.

Le tableau 8 ci-dessous présente quelques gènes d'intérêt que nous avons identifié, dont la surexpression permet la survie des levures sur un milieu toxique carba1/PTX.

Nom du gène	Nom de la protéine	Fonctions cellulaires	Ref.
<i>ENA1</i>			
<i>ENA2</i>		Pompes d'efflux	
<i>ATRI</i>			
<i>TUB2</i>	Tubuline β	La tubuline est la protéine structurelle des MTs, un constituant majeur du cytosquelette.	a
<i>TOS3</i>	Tos3 (équivalent humain : Lkb1)	Tos3 est une sérine/thréonine kinase qui régule un large spectre de fonctions cellulaires, notamment la croissance, le métabolisme, l'autophagie et la polarité cellulaire.	b
<i>DAD2</i>	Dad2	Dad2 est une sous-unité essentielle du complexe Dam1 chez <i>S. cerevisiae</i> . Le complexe Dam1 forme un anneau autour des MTs au niveau de l'extrémité (+) et se lie aux kinétochores (KTs). Il forme ainsi un attachement MTs/KTs solide. Lors de la dépolymérisation des MTs, ce complexe est entraîné vers l'extrémité (-) et emmène le chromosome auquel il est attaché, facilitant ainsi la ségrégation des chromosomes.	c
<i>DSN1</i>	Dsn1	Dsn1 et Nsl1 s'associent aux protéines Nnfl et Mis12 et forment un complexe stable localisé au niveau des KTs. Bien que ce complexe ne lie pas directement les MTs aux KTs, il renforce l'activité d'autres protéines (Knl1 et le complexe Ndc80) impliquées dans la liaison MTs/KTs.	d
<i>NSL1</i>	Nsl1		
<i>STU2</i>	Stu2 (ou XMAP215) (orthologue humain : ch-TOG)	Stu2 est une MAP qui interagit avec le complexe Ndc80 au niveau des KTs et peut renforcer la liaison MTs/KTs lors d'un attachement correct des chromosomes au fuseau (attachement amphitélique) ou à l'inverse défaire cette liaison en cas d'attachement incorrect (attachement syntélique par exemple).	e
<i>CDC42</i>	Cdc42	Cdc42 fait partie de la famille Rho-GTPase. Cette protéine intervient dans différentes voies de signalisation nécessaires à l'attachement amphitélique des chromosomes au fuseau mitotique, à l'intégrité du centrosome et à l'orientation du fuseau. L'ensemble de ces fonctions est nécessaire à l'alignement correct des chromosomes au cours de la mitose.	f
<i>TPM2</i>	Tropomyosine 2	Isoforme mineure de la tropomyosine, Tpm2 lie et stabilise les câbles et les filaments d'actine qui dirigent la croissance cellulaire polarisée et la distribution de plusieurs organites.	g
<i>ARC15</i>	Arc15	Il s'agit de trois sous-unités du complexe Arp2/3. Ce complexe possède une structure proche de l'actine et sert de point de nucléation au niveau des jonctions entre les filaments d'actine. Il peut être activé par Cdc42. L'activité de Arp2/3 est importante au cours de l'interphase, puis diminue lors de la prophase pour augmenter de nouveau durant la télophase. Ce complexe est impliqué dans la motilité cellulaire et l'endocytose.	h
<i>ARC18</i>	Arc18		
<i>ARC35</i>	Arc35		

Tableau 8. Présentation de certains gènes dont la surexpression permet la survie des levures sur un milieu toxique carba1/PTX. a. (Downing and Nogales, 1998a) ; b. (Momcilovic and Shackelford, 2015) ; c. (Zelter et al., 2015) ; d. (Kline et al., 2006) ; e. (Miller et al., 2016) ; f. (Chircop, 2014) ; g. (Drees et al., 1995) ; h. (Grunwalg et al., 2010).

Comme nous pouvions nous y attendre, nous avons identifié de nombreux gènes codant pour des pompes d'efflux et le gène codant la tubuline β (*TUB2*) dont la surexpression annule la sensibilité de la levure au PTX.

Nous avons aussi pu identifier plusieurs gènes impliqués dans le processus de régulation d'attachement KT/MTs lors de la mitose et des gènes régulant le cytosquelette d'actine.

Il a été intéressant de retrouver le gène *TOS3* équivalent de *LKB1* chez les mammifères. En effet, en parallèle du criblage mené afin de trouver des agents potentialisant le PTX, un second criblage visant à identifier des composés ciblant sélectivement des cellules déficientes pour le gène suppresseur de tumeur *LKB1* avait été réalisé. Lors de ce criblage, le composé carba1 avait également pu être identifié (**voir annexe 1**). L'identification de *TOS3* lors du criblage chez la levure valide non seulement notre approche, mais indique également que la sensibilité des cellules à carba1 (ou carba1/PTX) peut varier en fonction de la présence ou de l'absence de la protéine Tos3 (ou Lkb1 chez les mammifères).

3.3.3 Cible(s) potentielle(s) de carba1

Nous nous sommes particulièrement intéressés aux gènes impliqués dans la régulation de l'attachement KT/MTs. En effet, l'inhibition de Dsn1 dans les cellules fait apparaître un phénotype mitotique très similaire à celui de carba1 (Kline *et al.*, 2006). Une autre protéine, CENP-E, bien qu'absente chez *S.c.* a retenu notre attention. Cette kinésine est en effet essentielle lors de l'alignement des chromosomes (Barisic *et al.*, 2014) et son inhibition par la molécule GSK923295 provoque un retard en prométaphase avec un phénotype identique à celui provoqué par carba1 (Iemura and Tanaka, 2015). Nous avons donc testé la localisation de cette protéine dans les cellules en mitose, après un traitement au carba1 (**Fig.64**).

Lors de la prométaphase, la kinésine CENP-E attache les KT des chromosomes présents au niveau des pôles afin de les amener au centre de la cellule. C'est pourquoi, en conditions contrôles, on observe une colocalisation des centromères et de CENP-E au niveau de la plaque équatoriale. En présence de carba1, CENP-E est localisée uniquement au niveau des pôles du fuseau. Cette localisation spécifique est similaire à celle observée en cas de traitement avec GSK923295, un inhibiteur de CENP-E. Ces résultats laissent supposer que carba1 pourrait être un inhibiteur de l'activité de la kinésine CENP-E.

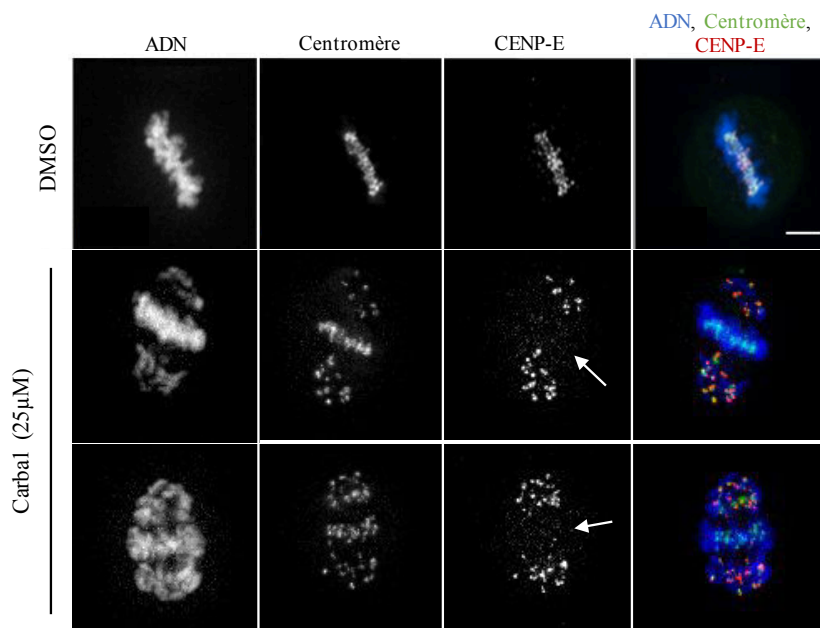


Figure 64. Localisation de CENP-E en présence de carba1.

Les cellules HeLa ont été traitées ou non avec carba1 à 25µM pendant 5 heures, fixées puis marquées avec un anti-CENP-E (rouge) et un anti-centromère CREST (vert). L'ADN est marqué au DAPI (bleu). L'absence de CENP-E au niveau des chromosomes alignés est indiquée par une flèche. Échelle : 5µM.

L'analyse de la littérature concernant l'effet d'agents potentiellement inhibiteurs de CENP-E nous a amené à approfondir l'analyse de l'effet de carba1 sur la tubuline. En effet, la molécule UA62784, identifiée dans un premier temps comme étant un inhibiteur de CENP-E (Henderson *et al.*, 2010) s'est avérée être un agent ciblant les MTs (Tcherniuk *et al.*, 2011). Nous avons donc testé l'hypothèse, écartée précédemment, d'une interaction directe de carba1 avec la tubuline.

3.4 Effets de carba1 sur la tubuline *in vitro*

3.4.1 Carba1 est un agent dépolymérisant les microtubules

Afin de tester si carba1 interagit directement avec la tubuline, nous avons étudié dans un premier temps, son effet sur l'assemblage de tubuline pure *in vitro*. Nous avons pour cela suivi la polymérisation des MTs en présence ou non de carba1, par turbidimétrie (**Fig.65A**). Les résultats obtenus montrent que carba1 inhibe la polymérisation de la tubuline en MTs de manière dose-dépendante. En effet, nous observons une diminution de la vitesse de polymérisation ainsi qu'un retard de la nucléation et une réduction de la quantité totale de MTs assemblés, attestée par le niveau plus bas du plateau à l'équilibre.

Dans les conditions que nous avons utilisées, c'est à dire 30 μ M de tubuline pure dans un tampon à base de Pipes, la concentration de carba1 nécessaire pour inhiber de 50% la polymérisation de la tubuline en MTs est de 6,9 μ M (**Fig.65B**).

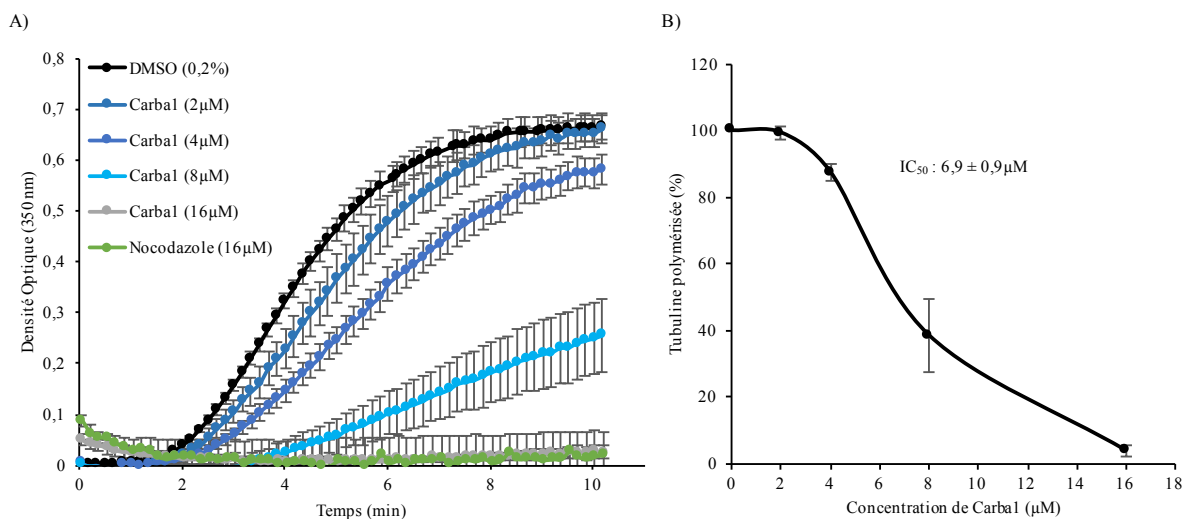


Figure 65. Carba1 inhibe la polymérisation des microtubules.

(A) Courbes de polymérisation de la tubuline pure (30 μ M) à 37 ° C en présence de concentrations croissantes de carba1 ou de nocodazole à 16 μ M. L'absorbance a été mesurée à 350 nm. (B) La quantité de MTs polymérisés en fonction des doses croissantes de carba1 a été déterminée après 10 minutes de polymérisation. Barres = SEM, n=3.

3.4.2 Carba1 se fixe sur ou à proximité du site colchicine

Nous avons recherché le site de fixation du composé carba1 sur la tubuline. Sur celle-ci, il a été décrit six sites de liaison aux molécules, dont quatre sont connus comme étant des sites de fixation d'agents déstabilisant les MTs (MDAs) (voir la partie III.2, p57). Le site de fixation le plus fréquent des MDA décrit dans la littérature est le site colchicine (Steinmetz and Prota, 2018). Nous avons donc commencé par tester la fixation de carba1 sur le site de la colchicine. Pour cela, nous avons utilisé un test de compétition mettant en jeu la capacité de la colchicine tritiée ([H³]-colchicine) à se fixer sur son site en présence de carba1.

Comme le montre la **figure 66**, le composé carba1 impacte la fixation de la [H³]-colchicine sur la tubuline, comme c'est le cas pour le nocodazole (connu pour se fixer sur le site colchicine). En revanche, la vinblastine qui ne se fixe pas sur le site colchicine n'empêche pas la fixation de la [H³]-colchicine. Ce résultat indique que carba1 se lie à la tubuline sur ou à proximité du site colchicine. Toutefois, il n'empêche pas complètement la colchicine de se fixer. On peut supposer que son affinité pour ce site est plus faible que celle de la colchicine.

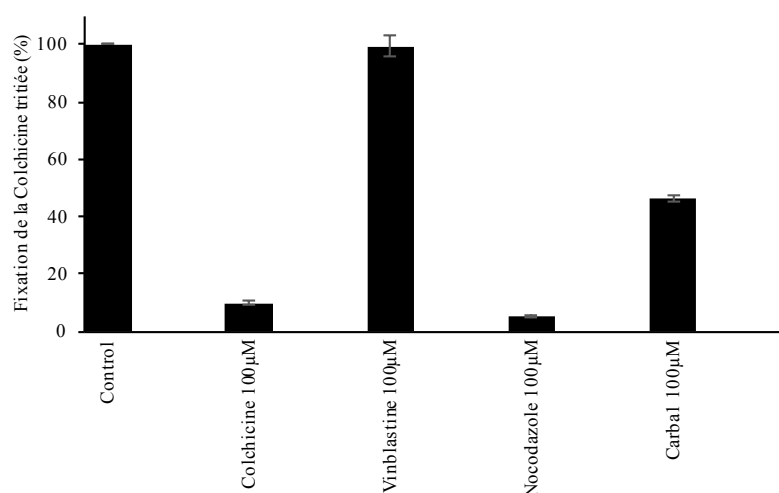


Figure 66. Carba1 se fixe sur ou à proximité du site colchicine.

La tubuline pure (3µM) a été incubée avec de la [H^3]-colchicine (50nM) seule (control) ou en présence de différentes molécules (100µM). La radioactivité de la tubuline liée à la [H^3]-colchicine a été mesurée en utilisant un compteur à scintillation. Barres = SEM, n=3.

3.4.3 Carba1 diminue la vitesse de croissance des microtubules

Nous avons ensuite analysé *in vitro* les modifications de la dynamique des MTs en présence de carba1. Pour cela nous avons utilisé la technique de TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) où la polymérisation des MTs à partir d'amorces stable est directement observée en vidéomicroscopie au microscope à fluorescence (voir la partie II.2.1 d, p40-41).

Pour ces expériences il a fallu déterminer la concentration optimale de carba1 à utiliser. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur les résultats des expériences de turbidimétrie (voir **Fig.65A**) montrant que des concentrations de carba1 comprises entre 8 et 16µM causent une forte inhibition de la polymérisation des MTs. Nous avons décidé de nous placer à une concentration de 10µM qui correspond à un rapport tubuline/carba1 de 3 (30/10). En effet, la concentration de la tubuline utilisée pour cette étude était de 30µM. Nous avons ensuite rapporté ce ratio dans nos expériences de TIRF.

La concentration de tubuline pure utilisée pour cette expérience étant de 12µM, nous nous sommes donc placé à une concentration de carba1 à 4µM (12/3). La **figure 67A** représente le résultat de 30 minutes de polymérisation des MTs en présence ou non de carba1. On observe qu'en condition contrôle, les MTs sont plus longs qu'en condition de traitement. Nous avons tracé ensuite, pour chaque MT étudié, un kymographe qui représente la distance parcourue par le MT en abscisse et le temps en ordonnée (**Fig.67B**). Le tableau de la **figure 67C** présente les

données obtenues à partir de ces kymographes. Carba1 réduit fortement la vitesse de croissance des MTs et diminue de manière moins drastique le temps que les MTs passent en croissance. Il est également à l'origine d'une augmentation du temps avant une nouvelle polymérisation à la suite d'une catastrophe. L'ensemble de ces effets conduit à un ralentissement global de la dynamique des MTs.

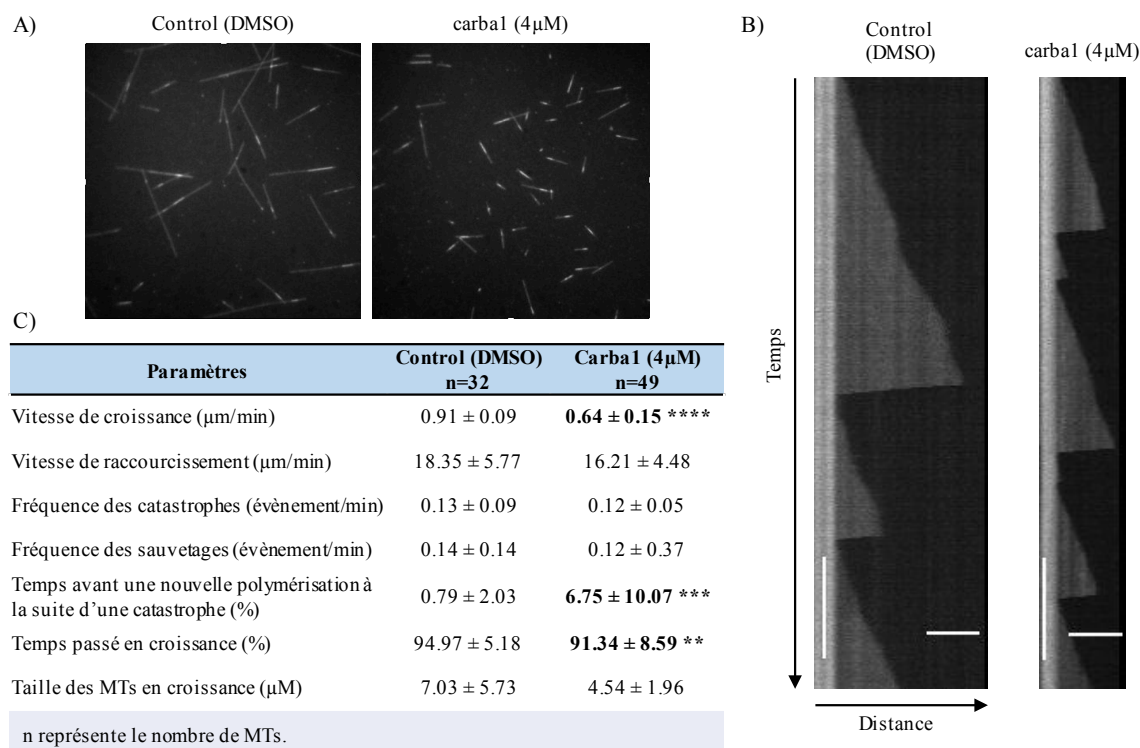


Figure 67. Effets de carba1 sur les paramètres d'instabilité dynamique *in vitro*.

(A) Photos de MTs après 30 minutes de polymérisation en présence ou non du composé carba1. Les parties plus brillantes des MTs correspondent aux amorces. (B) Représentation sous forme de kymographe. Barre verticale, 5 minutes ; barre horizontale, 5 μ m. (C) Tableau récapitulatif des paramètres d'instabilité dynamique calculés à partir des kymographes. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$, test de Mann-Whitney.

L'ensemble de ces résultats indique clairement que carba1 inhibe la polymérisation de la tubuline, en se fixant sur le site colchicine. Toutefois, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse que le composé carba1 puisse avoir d'autres cibles cellulaires.

4. Analyse du mécanisme d'action de la combinaison carba1/PTX

À la suite des études menées sur l'effet de Carba1 sur la tubuline et les MTs, nous avons voulu comprendre les mécanismes de la potentialisation du PTX par carba1. Comment deux molécules, (aux modes d'actions opposés sur la tubuline), utilisées individuellement à des concentrations peu toxiques, peuvent agir de façon synergique et causer une diminution de la viabilité cellulaire. Nous nous sommes alors demandés si l'effet toxique de la combinaison carba1/PTX résultait ou non des effets mutuels des molécules seules sur la tubuline.

4.1 Analyse des effets de carba1/PTX sur l'instabilité dynamique des microtubules dans les cellules

L'analyse des paramètres d'instabilité dynamique des MTs dans les cellules traitées avec carba1 et PTX séparément ou en combinaison peut apporter des informations sur l'existence d'un effet synergique de carba1 et du PTX sur la dynamique des MTs. Cette analyse a été réalisée par la technique de plus end tracking (voir la partie II.2.2 c, p44-45). Des cellules HeLa transfectées avec un plasmide EB3-GFP ont été traitées avec différentes concentrations de molécules, administrées séparément ou en combinaison, puis analysées en vidéomicroscopie (**Fig.68**). Cette analyse, antérieure à mes travaux, a été réalisée par Anne Martinez, pour une combinaison carba1/PTX à des doses différentes des concentrations optimales déterminées plus haut.

La vitesse de croissance des MTs dans les cellules traitées avec carba1 est significativement réduite même à faible concentration. À des doses élevées de traitement, on observe également une augmentation des temps de pause et une diminution du temps que les MTs passent en croissance. Un traitement par le PTX à 1nM ne modifie pas les paramètres d'instabilité dynamique, qui sont similaires à ceux mesurés dans les conditions contrôles.

De même, la combinaison carba1(5 μ M)/PTX(1nM) ne cause aucune altération des paramètres d'instabilité dynamique. En revanche, l'association carba1(25 μ M)/PTX(1nM) cause une augmentation des temps de pause, significativement différente des conditions "drogues seules". Nous observons également que cette association est à l'origine d'une réduction de la vitesse de croissance des MTs et du temps que les MTs passent en croissance. Bien que les résultats obtenus dans ces conditions soient significativement différents d'un traitement au PTX à 1nM, ils ne diffèrent pas des paramètres observés en condition carba1 25 μ M. Il est

possible que les anomalies de la dynamique microtubulaire obtenus à la suite d'un traitement avec carba1(25µM)/PTX(1nM) soient principalement dues à l'effet de carba1.

Ces résultats indiquent clairement que carba1 seul, à 25µM, ralentit globalement la dynamique des MTs. Cet effet sur la dynamique n'est toutefois pas détectable par une analyse en IF, où les cellules en interphase ne présentent aucune anomalie notable du réseau de MTs (Fig.61).

A)	Paramètres	Control (DMSO)	Carba1 (5µM)	Carba1 (25µM)	PTX (1nM)
	Vitesse de croissance (µm/min)	14,65 ± 0,10	12,89 ± 0,42 **	10,20 ± 0,15 ***	13,62 ± 0,51
	Fréquence des catastrophes (événement/µm)	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,46 ± 0,03	0,27 ± 0,02
	Temps de pause (min)	0,063 ± 0,01	0,07 ± 0,003	0,09 ± 0,004 ***	0,07 ± 0,004
	Temps passé en croissance (%)	84,19 ± 0,20	80,39 ± 0,17	60,40 ± 0,25 ***	80,08 ± 2,24

B)	Paramètres	Carba1 (5µM) PTX (1nM)	Carba1 (25µM) PTX (1nM)
	Vitesse de croissance (µm/min)	12,71 ± 0,54	10,19 ± 0,35 (***)
	Fréquence des catastrophes (événement/µm)	0,28 ± 0,02	0,28 ± 0,05
	Temps de pause (min)	0,07 ± 0,004	0,11 ± 0,007 (***, **)
	Temps passé en croissance (%)	79,48 ± 2,9	53,71 ± 3,06 (***)

Figure 68. Effets de carba1/PTX sur les paramètres d'instabilité dynamique dans les cellules.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec un plasmide EB3-GFP, traitées ou non par différentes concentrations de molécules seules (A) ou en combinaison (B), comme indiqué, puis suivies en vidéo-microscopie. Tableau récapitulatif des paramètres d'instabilité dynamique. * P < 0,05 ; ** P < 0,01 ; *** P < 0,001 ; test de Tukey (Par rapport au DMSO : étoiles noires ; par rapport au PTX seul : étoiles vertes ; par rapport à PTX et carba1 seuls : étoiles rouges). Études réalisées par Anne Martinez.

4.2 Analyse des effets de carba1/PTX sur la cinétique d'assemblage de la tubuline *in vitro*

Afin de savoir si le composé carba1 est capable d'accentuer les effets du PTX sur l'assemblage des MTs *in vitro*, nous avons analysé l'effet de l'association carba1/PTX sur l'assemblage de tubuline pure *in vitro*. Pour cela, nous avons suivi la polymérisation des MTs par turbidimétrie, en présence ou non de différentes combinaisons de molécules.

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet de concentrations croissantes de PTX sur l'assemblage de la tubuline, afin de déterminer la concentration optimale permettant d'observer une synergie éventuelle. Nous avons finalement comparé deux concentrations de PTX différentes, une ayant peu d'effet sur la polymérisation des MTs (50nM) et une dose plus élevée (500nM), à l'origine d'une augmentation de la vitesse d'assemblage et du nombre de

MTs totaux formés, indiquée par la hauteur du plateau atteint à l'équilibre. En ce qui concerne la concentration du composé carba1, nous avons choisi une concentration de 4 μ M, concentration à laquelle son effet dépolymérisant sur l'assemblage de la tubuline est faible. La **figure 69** représente le résultat de l'une des expériences que nous avons menées.

En présence de la combinaison carba1(4 μ M)/PTX(50nM), la cinétique d'assemblage de la tubuline est presque similaire à celle observée après ajout de carba1 4 μ M, à la différence qu'on observe une petite réduction du temps de nucléation. La courbe d'assemblage après une exposition à la combinaison carba1(4 μ M)/PTX(500nM) est superposable à celle lors de l'ajout du seul PTX à 500nM.

Nous avons également testé des concentrations plus faibles de carba1, allant jusqu'à des conditions équimolaires avec le PTX et avons obtenu des résultats similaires à ceux présentés sur la **figure 69**.

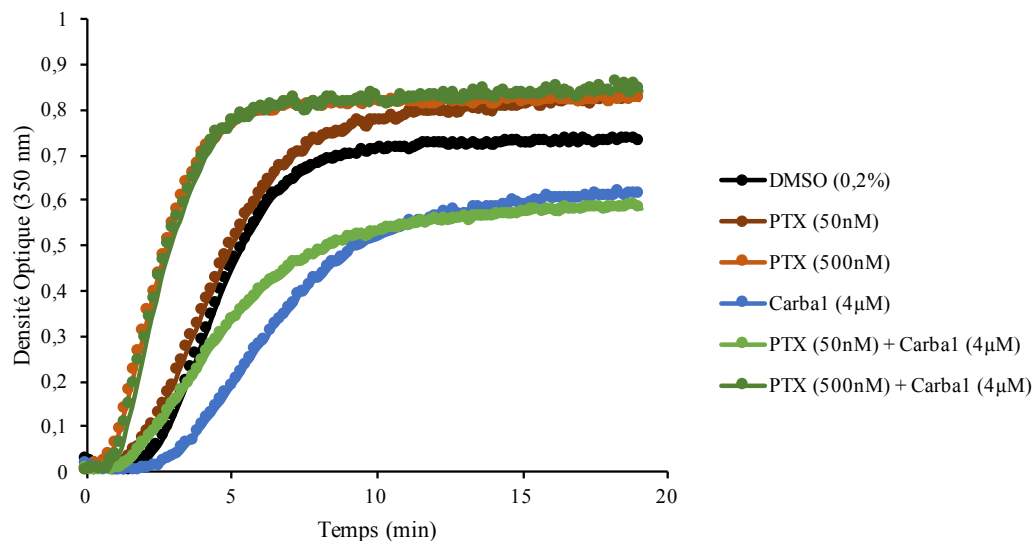


Figure 69. Effets de carba1/PTX sur l'assemblage des microtubules *in vitro*.

Courbes de polymérisation de la tubuline pure (40 μ M) à 37°C en présence de DMSO ou de différentes concentrations et combinaisons de molécules. L'absorbance a été mesurée à 350nm.

Ces résultats indiquent que, dans les conditions de combinaisons utilisées, l'une des molécules "prend le dessus" et nous observons ainsi soit un ralentissement, soit une accélération de la polymérisation des MTs. Ainsi, ces expériences ne mettent pas en évidence un effet potentialisateur de carba1 sur l'effet du PTX sur l'assemblage MTs *in vitro*.

5. Analyse de l'efficacité thérapeutique de la combinaison carba1/PTX

Nous avons vu précédemment que le composé carba1 était capable de potentialiser les effets cytotoxiques du PTX dans les cellules. Nous avons recherché ensuite, sur modèles animaux, si cet effet était également observable et donc si l'association carba1/PTX possédait une activité anti-tumorale plus forte que celle du PTX.

5.1 Analyse de la toxicité de carba1

Dans un premier temps, nous avons testé la toxicité de carba1 sur différentes lignées cellulaires et sur différents modèles animaux. La connaissance de la toxicité d'un composé est en effet un préalable nécessaire à l'analyse de son effet thérapeutique.

5.1.1 Analyse de la cytotoxicité de carba1 sur différentes lignées cancéreuses humaines

Nous avons profité du service offert par le NCI (National Cancer Institute) pour tester la toxicité du composé carba1 sur un grand nombre de lignées cellulaires cancéreuses. Le NCI propose ce service pour déterminer quel type de cancer pourrait être plus particulièrement ciblé par une nouvelle drogue. Dans notre cas, nous avons utilisé cette opportunité pour avoir une large analyse de la toxicité de carba1. Cette information peut être utile pour déterminer le type de cancer à cibler préférentiellement pour tester l'effet thérapeutique d'une administration en combinaison avec le PTX. Par ailleurs, une faible toxicité du composé carba1 sur un ensemble de types cellulaires cancéreux pourrait être indicative d'une faible toxicité de carba1 sur d'autres types cellulaires, cancéreux ou non. Ceci est intéressant d'un point de vue thérapeutique, car dans le cas de son administration en combinaison avec le PTX, on éviterait ainsi des problèmes de toxicités additives.

Nous avons donc transmis carba1 au NCI qui a testé l'effet de l'application de 10 μ M de carba1 pendant 48 heures sur la croissance de 60 lignées cancéreuses humaines grâce à un test de cytotoxicité cellulaire à la Sulforhodamine B. Il s'agit de l'une des méthodes les plus largement utilisées pour détecter la viabilité cellulaire ou la cytotoxicité des médicaments. La procédure utilisée pour ce test est un protocole standard mis en place par le NCI.

Comme l'indique la **figure 70**, aucune diminution importante de la croissance des cellules cancéreuses traitées par carba1 n'a été observée, conduisant le NCI à ne pas retenir le composé pour des études de cytotoxicité plus approfondies. Ces résultats confirment la faible cytotoxicité de Carba1.

Type de Cancer	Lignée cellulaire	Croissance (%)	Type de Cancer	Lignée cellulaire	Croissance (%)
Leucémie	CCRF-CEM	85,38	Mélanome	LOX IMVI	98,67
	HL-60 (TB)	133,20		MALME-3M	106,66
	K-562	49,55		M14	88,27
	MOLT-4	77,21		MDA-MB-435	78,54
	RPMI-8226	85,20		SK-MEL-2	95,08
SR	52,83	SK-MEL-28		96,41	
Cancer du poumon non à petites cellules	A549/ATCC	88,35		SK-MEL-5	97,77
	EKVX	92,80		UACC-257	97,82
	HOP-62	90,90		UACC-62	74,41
	HOP-92	100,86		Cancer des ovaires	IGROVI
	NCI-H226	122,19	OVCAR-3		99,28
	NCI-H23	98,27	OVCAR-4		90,68
	NCI-H322M	92,42	OVCAR-5		101,61
	NCI-H460	95,18	OVCAR-8		98,92
NCI-H522	62,95	NCI/ADR-RES	90,34		
SK-OV-3	91,11	SK-OV-3	91,11		
Cancer du colon	COLO 205	104,78	Cancer du rein	786-0	96,62
	HCC-2998	107,35		A498	75,30
	HCT-116	92,42		ACHN	95,42
	HCT-15	75,26		CAKI-1	79,35
	HT29	91,81		RXF 393	104,77
	KM12	79,44		SN12C	86,04
	SW-620	87,14		TK-10	115,87
Cancer du système nerveux central	SF-268	104,08	UO-31	88,88	
	SF-295	99,71	Cancer du sein	MCF7	84,88
	SF-539	103,31		MDA-MB-231/ATCC	100,33
	SNB-19	97,88		HS 578T	87,42
	SNB-75	87,02		BT-549	101,13
U251	94,87	T-47D		63,68	
Cancer de la prostate	PC-3	101,48	MDA-MB-468	106,51	
	DU-145	90,74			

Figure 70. Cytotoxicité de carba1 sur des lignées cancéreuses humaines.

5.1.2 Analyse de la toxicité de carba1 sur modèle animal

Afin d'obtenir des informations sur la toxicité du composé dans un organisme ainsi que sur son efficacité thérapeutique potentielle, nous avons utilisé dans un premier temps, le modèle de xénogreffes sur membrane chorio-allantoïdienne (CAM) de l'embryon de poulet. Ce modèle récapitule, de manière fiable et dans un temps réduit, certaines des caractéristiques du développement de la tumeur chez l'Homme. Les caractéristiques histologiques et moléculaires des tumeurs solides obtenues après greffe de cellules cancéreuses sur la CAM sont celles d'une tumeur solide humaine. Ce modèle permet aussi, en seulement quelques jours, d'évaluer *in vivo* l'efficacité de nouvelles molécules. Il permet également d'évaluer la toxicité de molécules sur l'embryon de poulet, un organisme en développement particulièrement susceptible aux éventuels effets toxiques d'un composé.

Ce modèle a été utilisé pour tester la toxicité du composé carba1 et son effet sur les processus de croissance tumorale et d'invasion métastatique (xénogreffes de cellules HeLa déficientes pour le gène *LKB1*), quand il est administré à dose élevée.

Les expériences ont été réalisées par InOvation, Grenoble. Les cellules cancéreuses ont été déposées sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet, puis le traitement administré tous les deux jours, comme indiqué sur la **figure 71A**.

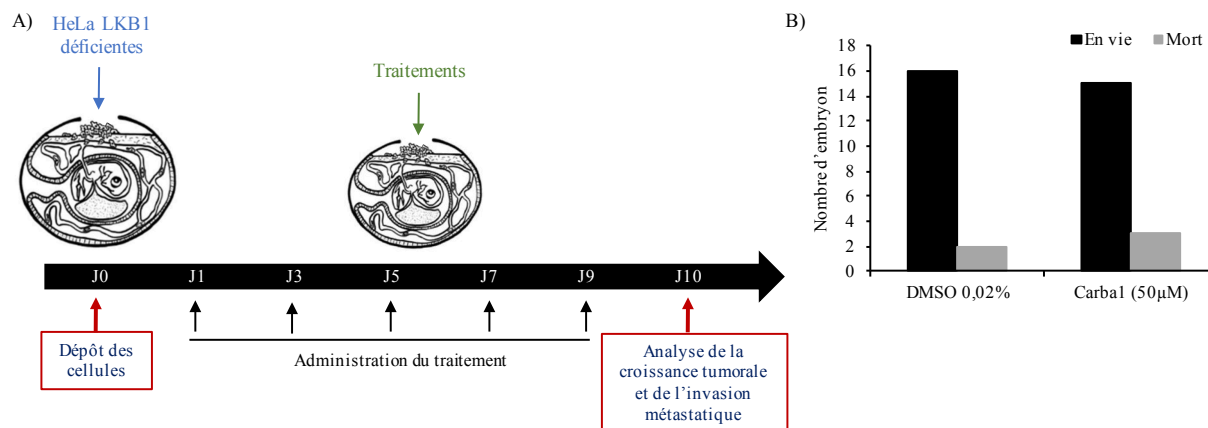


Figure 71. Analyse de la toxicité de carba1 grâce à un modèle de xénogreffes sur membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet. (A) Schéma expérimental du modèle de xénogreffes sur membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet. (B) Nombre d'embryon mort ou en vie au cours de l'expérience.

L'analyse de la croissance tumorale, de l'invasion métastatique et de la toxicité se fait à 10 jours. Sur 18 embryons, 15 sont encore en vie à la suite d'un traitement avec carba1 à 50µM contre 16 dans les conditions contrôles (**Fig.71B**). Ces résultats suggèrent donc que le composé carba1 est bien toléré dans ce type d'organisme.

Les résultats de cette expérience, analysant l'effet anti-tumoral de carba1 sur des tumeurs formées à partir de cellules HeLa déficientes pour le gène *LKB1*, sont présentés en **annexe 1**.

Une étude préliminaire de toxicité aiguë sur modèle murin, réalisée en collaboration avec la plateforme Optimal, a montré que le composé carba1 était également bien toléré quand injecté en intraveineux (i.v.) à une concentration de 3mM (dans de l'acide citrique pH7 125µM, Glycérol 12.5%, 100µL). 24 heures après cette injection unique de composé carba1, les animaux se portent bien. À la suite du sacrifice et de la dissection des organes, aucune variation significative de poids des organes, ni aucune anomalie de l'aspect des organes n'a pu être détectée par rapport aux souris exposées au véhicule.

5.2 Analyse de l'efficacité anti-tumorale de la combinaison carba1/PTX dans un modèle murin

Forts des résultats encourageants obtenus indiquant une faible toxicité de carba1 sur l'embryon de poulet et dans les souris, nous avons testé l'effet de la combinaison carba1/PTX sur un modèle de cancer mammaire murin agressif. Ce modèle est proposé par la plateforme Optimal et consiste en l'injection de cellules 4T1rluc2 (exprimant la luciférase) en orthotopique au niveau du coussinet adipeux de la mamelle.

5.2.1 Description et caractéristiques du modèle animal utilisé

Les cellules 4T1 sont issues d'un carcinome mammaire hautement tumorigène et invasif. Contrairement à la plupart des modèles tumoraux, les tumeurs formées à partir de cellules 4T1 font des métastases à de multiples sites distants. Ainsi ces cellules envahissent notamment les ganglions lymphatiques et les poumons. Les tumeurs formées à partir de cellules 4T1 greffées en orthotopique présentent donc plusieurs caractéristiques qui en font un modèle animal expérimental approprié pour le cancer mammaire humain (Prudent et al., 2012). Nous avons choisi de travailler sur ce modèle, non seulement pour les caractéristiques décrites ci-dessus mais également pour la rapidité de ces cellules à établir une tumeur primaire et à former des métastases. En effet, les études menées à partir de ce modèle ont une durée totale de 4 semaines.

L'activité luciférase des cellules cancéreuses 4T1rvluc2 permet le suivi de l'évolution de la tumeur primaire ainsi que de la charge métastatique, après injection de luciférine, en imagerie sur l'animal entier. La production de bioluminescence nécessite de l'ATP et de l'oxygène. En effet l'activation de la luciférine par la luciférase nécessite de l'ATP et des ions magnésium, pour former de la luciférine adénylate. Ensuite, la luciférine adénylate est oxydée (oxyluciférine) et se sépare de la luciférase. L'oxyluciférine est alors dans un état excité. Elle retourne à l'état stable avec émission de lumière (photon) que l'on mesure grâce à une caméra. *In vivo*, si la tumeur est bien vascularisée, la mesure de bioluminescence est donc un bon reflet de la taille de la tumeur. Cette mesure peut toutefois être impactée par la profondeur du tissu. C'est pourquoi il peut être utile de valider les derniers résultats obtenus *in vivo* par une analyse de la bioluminescence *ex vivo*. Cette dernière mesure reste indicative. En effet, elle est soumise aux variations résultant de la durée entre l'exérèse et la mesure et également du fait que le tissu analysé n'est plus vascularisé.

Avant de démarrer les expériences sur modèle animal, nous avons vérifié que la combinaison carba1 exerçait également une synergie avec le PTX sur les cellules de la lignée 4T1rvluc2 en culture (**Fig.72**). L'IC₅₀ du PTX seul dans ces cellules est de 90nM et diminue de 1,8 fois en présence de carba1 à 12µM et de 9 fois en combinaison avec carba1 à 25µM. Toutefois, contrairement aux cellules HeLa, l'administration de drogues ne permet jamais d'affecter la totalité de la viabilité des cellules. On observe ainsi que la viabilité des cellules ne diminue pas en dessous de 35%, quel que soit le traitement.

Ceci pourrait indiquer qu'une partie des cellules présente, ou développe, une résistance aux traitements.

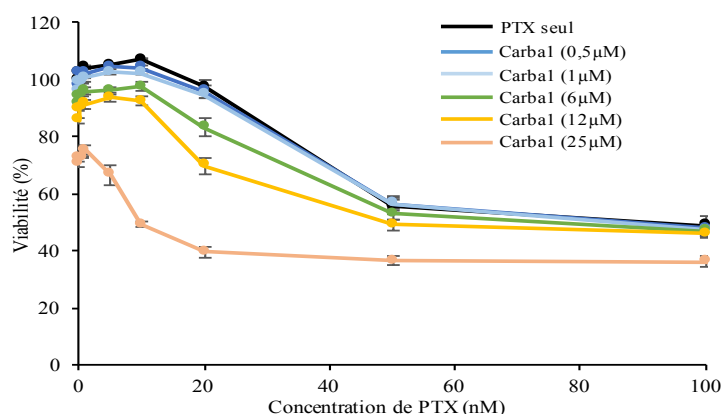


Figure 72. Sensibilisation des cellules 4T1rvluc2 au paclitaxel par carba1.

Les cellules 4T1rvluc2 ont été traitées pendant 72 heures avec différentes combinaisons de PTX et carba1. La viabilité des cellules est déterminée par un test au Prestoblue. Barres = SEM, n=3.

5.2.2 Posologie de carba1 et du paclitaxel *in vivo*

Puisque nous envisageons une fréquence de traitement quotidienne, il était plus commode de choisir un mode d'administration intrapéritonéale (i.p.), plutôt qu'intraveineux. Nous avons utilisé le même véhicule pour chacune des deux molécules et pour leur combinaison : 5% éthanol, 5% crémophore, 90% NaCl.

La dose de PTX a été choisie de manière assez empirique pour cette étude exploratoire. En effet, nous ne disposons pas d'informations concernant la dose minimum de PTX capable d'induire un effet anti-tumoral dans ce modèle, avec ce schéma expérimental. Selon la littérature, l'application quotidienne d'une dose de 1,3 mg/kg induit un effet tumoral aussi important, voire plus fort qu'une dose de 20mg/kg par semaine (Jiang *et al.*, 2010). Une dose faible de PTX a donc été choisie (0,75 mg/kg), pour limiter les effets secondaires potentiels et pour maximiser les chances d'observer une synergie avec carba1. Concernant la dose de carba1, nous nous sommes appuyés sur une étude préliminaire réalisée sur ce modèle et une concentration expérimentale de 20mg/kg a été décidée (**Fig.85 annexe 2**, p170).

5.2.3 Effets de carba1/PTX sur un modèle de cancer mammaire murin agressif, essai 1

Nous avons analysé l'effet anti-tumoral de l'association carba1/PTX sur des modèles d'allogreffes de cancers mammaires, selon le schéma expérimental ci-dessous (**Fig.73**).

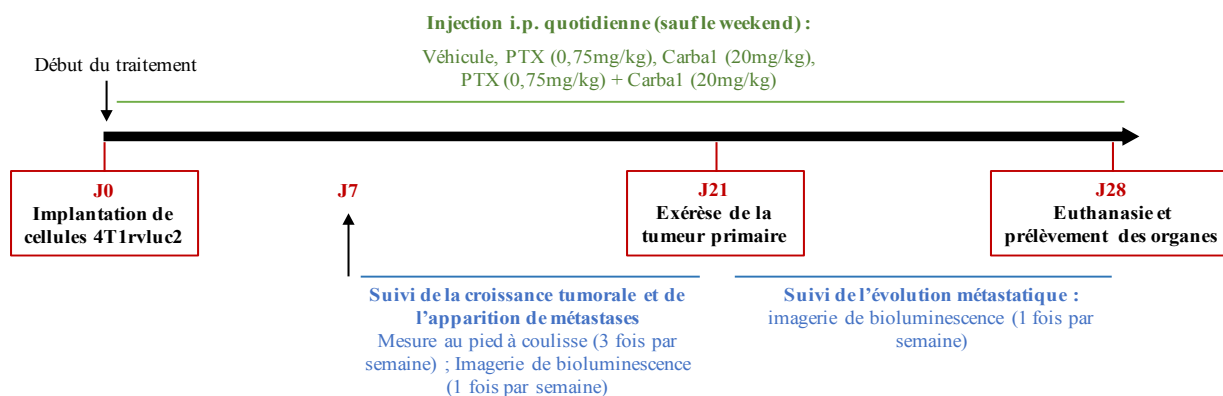


Figure 73. Schéma expérimental du modèle d'allogreffes de cellules 4T1rvluc2, utilisé pour tester l'efficacité anti-tumorale de carba1/PTX, lors du premier essai.

L'étude a consisté à injecter les cellules 4T1rvluc2 dans le coussinet adipeux de la mamelle et à suivre, la croissance tumorale ainsi que l'apparition des métastases, en présence ou non d'un traitement quotidien (sauf le week-end) de PTX, de carba1 ou de l'association carba1/PTX. En raison de la croissance rapide des cellules 4T1, le traitement a été commencé à J0. Le poids des animaux a été évalué 3 fois par semaine.

La croissance tumorale a été suivie par mesure au pied à coulisse de la taille des tumeurs primaires à raison 3 fois par semaine et également en imagerie de bioluminescence réalisée une fois par semaine. Après 3 semaines de traitement, les tumeurs primaires ont été chirurgicalement excisées, pesées et conservées, puis l'expérience s'est poursuivie une semaine supplémentaire afin de suivre l'évolution des métastases.

Quel que soit le traitement, le poids des animaux n'est pas modifié (**Fig.86 annexe 2**, p170). Ce résultat, couplé à l'observation des animaux, qui n'ont jamais montré de signe d'inconfort tout au long de l'expérience, indique que le PTX, carba1 ou leur combinaison sont bien tolérés, aux concentrations utilisées au cours de cette étude.

La **figure 74** présente les résultats obtenus, en fin d'étude, sur la croissance de la tumeur primaire. Les résultats varient en fonction du type de mesure utilisé. En effet, en imagerie de bioluminescence, on observe que l'injection de drogues (seules ou en combinaison) provoque, de manière surprenante, une augmentation de la taille des tumeurs, par rapport aux contrôles (**Fig.74A**). La **figure 87 en annexe 2** (p171) regroupe les images de bioluminescence, représentatives pour chaque groupe de souris. Cette augmentation est détectable mais moins importante lorsque la taille des tumeurs est évaluée par la mesure au pied à coulisse. De plus, cette mesure indique que l'administration de la combinaison carba1/PTX réduit la taille des tumeurs de manière significative par rapport à la seule administration de PTX ou de carba1

(Fig.74B). Par rapport aux contrôles, cette réduction de la taille des tumeurs n'est pas significative. La mesure du poids des tumeurs après exérèse ne montre, elle, aucune différence significative, quel que soit le traitement (Fig.74C). Il est à noter que cette mesure dépend de la qualité de la dissection et du degré d'hydratation des tumeurs, qui évolue rapidement après le prélèvement. Ainsi, la plateforme Optimal (imagerie du petit animal) avec laquelle nous réalisons ces expérimentations a observé que cette mesure était souvent un moins bon indicateur des effets des traitements que la mesure au pied à coulisse ou celle de la bioluminescence.

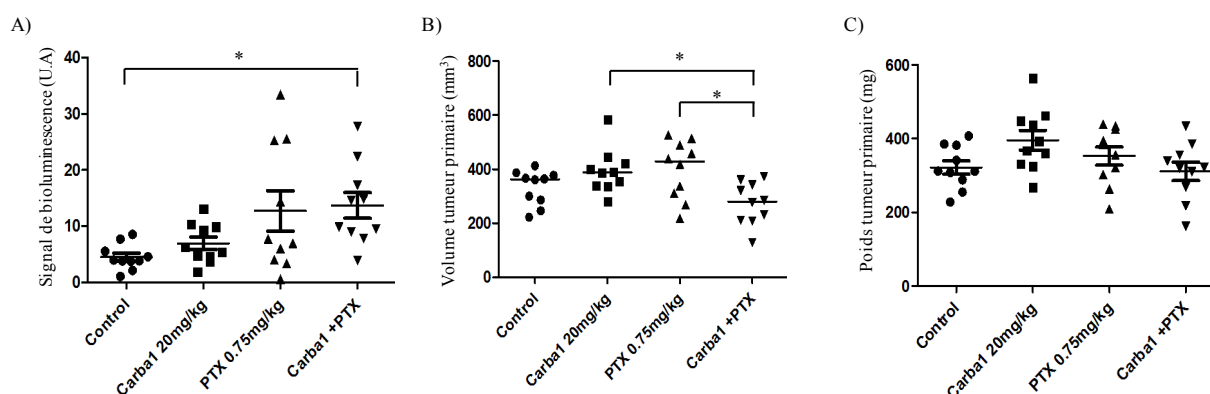


Figure 74. Effets de carba1/PTX sur la croissance tumorale, essai 1.

Mesure de la taille des tumeurs primaires par bioluminescence (A) ou au pied à coulisse (B). (C) Mesure du poids des tumeurs primaire après exérèse. Les mesures sont présentées pour chaque groupe de souris, $n=10$, après 28 jours de traitement. Barres = SEM. * $P < 0,05$, test de Tukey.

Les cellules 4T1 sont très invasives et causent l'apparition de métastases ganglionnaires et pulmonaires. Au cours de cette étude, l'évolution métastatique a été suivie par imagerie de bioluminescence *in vivo* sur l'animal endormi, à raison d'une fois par semaine. Les animaux ont été sacrifiés après 4 semaines de traitement. Les poumons, sites majeurs de métastases, ont été prélevés, pesés et l'invasion métastatique a été évaluée en imagerie de bioluminescence *ex vivo*, comme pour les ganglions axillaires et brachiaux.

Les analyses de bioluminescence réalisées sur l'animal entier, *in vivo*, montre que l'apparition des métastases est étroitement corrélée avec l'évolution des tumeurs primaires. En effet, bien que les différences ne soient pas significatives, on observe plus de métastases dans les groupes traités par PTX ou carba1. Le niveau de bioluminescence de la combinaison carba1/PTX est similaire à celui des contrôles (Fig.75A). Cette même tendance est observée lorsqu'on compare le poids des poumons et la bioluminescence *ex vivo*, à la fin de l'expérience (Fig.75B et C).

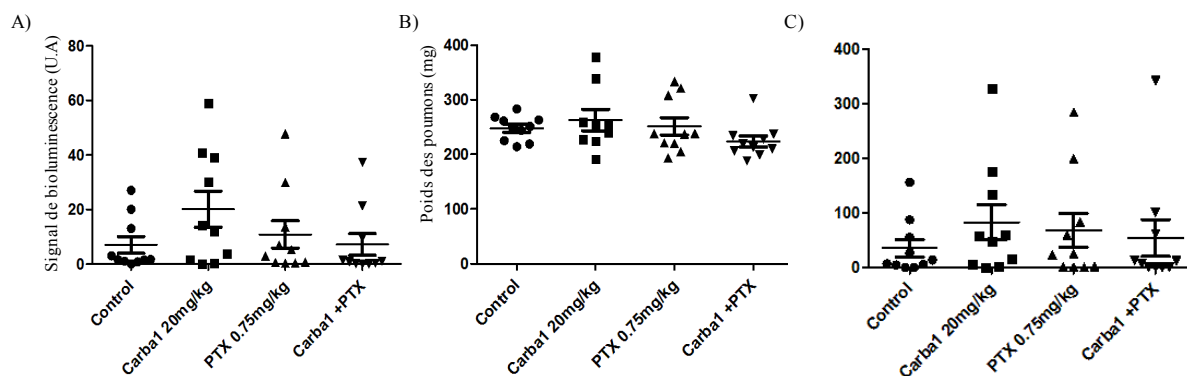


Figure 75. Effets de carba1/PTX sur l'évolution métastatique.

(A) Mesure de l'évolution des métastases par bioluminescence. (B) Mesure du poids des poumons après exérèse. (C) Mesure de l'invasion métastatique des poumons ex vivo. Les mesures sont présentées pour chaque groupe de souris, n=10, après 28 jours de traitement. Barres = SEM.

Les analyses de l'envahissement ganglionnaire à la suite des 28 jours de traitement, ont révélé qu'aucune souris parmi les contrôles ne montrait de présence de cellules cancéreuses au niveau des ganglions axillaires et brachiaux. En revanche, 4 souris sur 7 et 6/7 souris ont présenté des ganglions envahis après un traitement carba1 et PTX, respectivement, contre 3/7 après un traitement carba1/PTX (**Fig.88A, annexe 2, p171**). L'analyse du nombre de ganglions envahis en fonction des traitements indique une tendance similaire. En effet, nous avons trouvé au total 6 ganglions envahis chez les souris traitées par carba1, 15 chez les souris traitées par le PTX et 3 chez les souris exposées à la combinaison carba1/PTX (**Fig.88B, annexe 2, p171**).

L'ensemble de ces résultats indique que :

- De manière inattendue, l'application de PTX ou de carba1 aux doses choisies ainsi que leur combinaison, induit une faible augmentation de la taille des tumeurs, surtout lorsqu'elle est évaluée en imagerie de bioluminescence *in vivo* ;
- Les résultats diffèrent en fonction du type de mesure et une analyse au pied à coulisse indique une réduction de la taille des tumeurs après un traitement carba1/PTX, significative par rapport aux molécules seules mais non par rapport aux contrôles ;
- L'apparition des métastases thoraciques et ganglionnaires en fonction des différents traitements est corrélée à ce qui a été observé pour les tumeurs primaires.

Cette étude ne nous a pas permis de savoir si carba1 potentialise l'effet du PTX sur ce type de modèle de cancer mammaire murin. Aux doses choisies, aucun effet indésirable n'a été observé (perte de poids, prostration, signe de souffrance) lors de l'expérience et l'autopsie post-mortem n'a révélé aucun signe de toxicité.

5.2.4 Effets de carba1/PTX sur un modèle de cancer mammaire murin agressif, essai 2

Nous avons conclu de l'expérience précédente que les doses de PTX ou de carba1 utilisées étaient trop faibles pour observer une efficacité thérapeutique et, a fortiori, une potentialisation de l'effet thérapeutique du PTX par carba1. Nous avons donc mis en place une seconde étude et testé des concentrations de molécules plus importantes. Nous avons choisi une concentration de carba1 de 30mg/kg et une concentration de PTX de 2mg/kg, administrés séparément ou en combinaison. Nous avons également testé une dose de 8mg/kg de PTX, administré séparément, afin de connaître l'efficacité thérapeutique maximale du PTX dans ce modèle. Enfin, les injections ont été prolongées le weekend, selon le schéma expérimental suivant (**Fig.76**). À la différence de l'expérience précédente, et pour limiter les coûts, une seule mesure de bioluminescence a été prévue à la fin de l'étude.

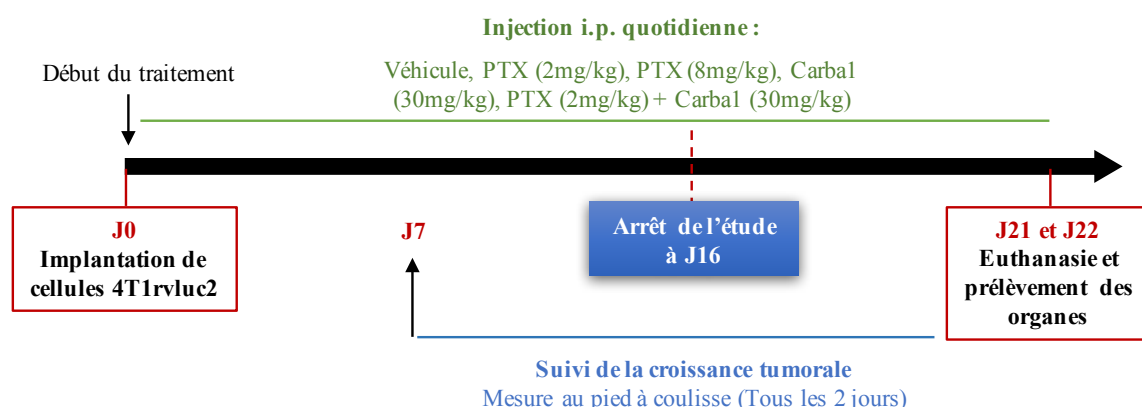


Figure 76. Schéma expérimental du modèle d'allogreffes de cellules 4T1rvluc2, utilisé pour tester l'efficacité anti-tumorale de carba1/PTX, lors du deuxième essai.

Au cours de cette étude, certaines souris, notamment celles traitées par le PTX à 8mg/kg, ont montré des signes de souffrance (prostration, occlusion intestinale, maigreur) et certaines sont décédées (ou ont dû être sacrifiées) à J13, J14 et J15. La courbe de poids des animaux (**Fig.89 annexe 2**, p172) ne montre pas de variation majeure et ne rend pas compte de ces signes de souffrance. Afin de respecter des critères d'éthique, nous avons décidé de stopper l'étude à 16 jours. L'analyse des courbes de survie des souris en fonction des différents traitements indique que carba1 à 30mg/kg et la combinaison carba1/PTX, dont les courbes se superposent à celle des contrôles, semblent mieux tolérés que les traitements au PTX (**Fig.77**).

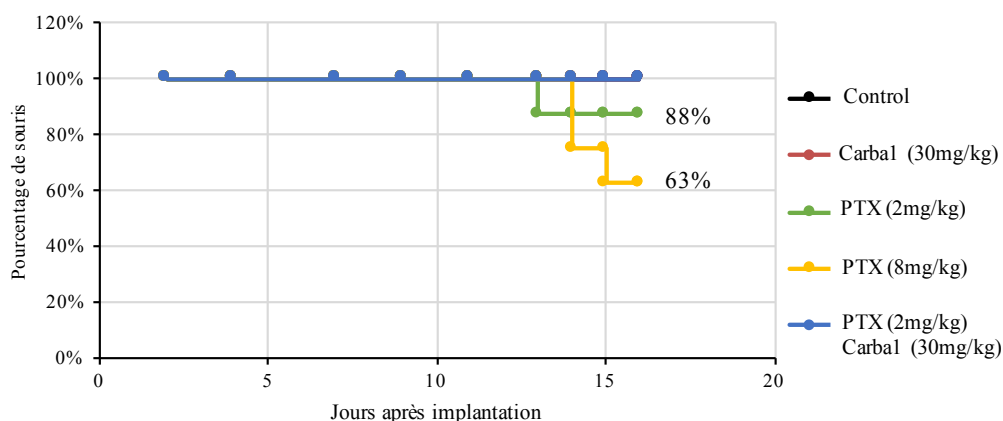
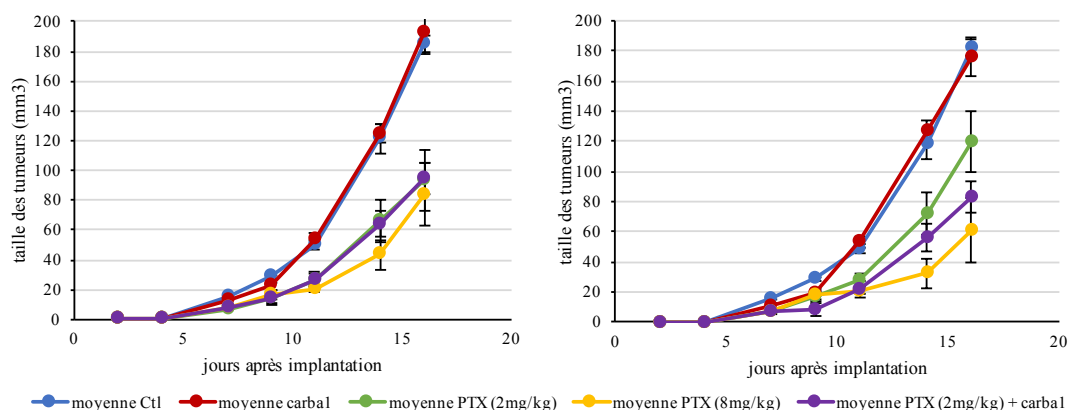


Figure 77. Courbe de survie des souris traitées ou non au cours de la seconde étude sur modèle animal.

L'évolution du volume des tumeurs évalué par la mesure au pied à coulisse est présentée **figure 78**. Si l'on considère la moyenne des valeurs (**Fig.78A**), on observe que le composé carbal ne présente pas, à lui seul, d'efficacité thérapeutique et que le PTX à 2 mg/kg est aussi efficace que le PTX à 8 mg/kg. De plus, dans ces conditions, il est difficile d'observer un effet de potentialisation du PTX par carbal. Il semble donc que la dose de PTX à 2mg/kg soit trop forte et pas adaptée pour tester une synergie.

Toutefois, l'analyse des résultats souris par souris (**Fig.90A-E, annexe 2, p172**) montre que les courbes de croissance tumorale des animaux traités par le PTX à 2mg/kg sont dispersées (**Fig.90C, annexe 2, p172**). En revanche, celles des souris exposées au traitement carbal/PTX sont regroupées, à l'exception d'une souris pour laquelle la croissance de la tumeur reste élevée (**Fig.90E, annexe 2, p172**). Afin de mieux rendre compte de la dispersion des données, nous avons représenté les valeurs médianes des volumes des tumeurs (**Fig.78B**). Le tableau de la **figure 78C** présente les résultats de l'analyse statistique réalisée à partir du test de Kruskal-Wallis, adapté à la comparaison des médianes. Nous remarquons alors une différence significative entre les traitements PTX (2mg/kg), PTX (8mg/kg), carbal/PTX et les contrôles. Cependant bien que nous observions, dans ces conditions, une réduction de la croissance tumorale plus forte après un traitement carbal/PTX qu'une exposition au PTX à 2mg/kg, cette différence reste non significative.



C)

Ctrl vs. Carbal	ns
Ctrl vs. PTX (2mg/kg)	*
Ctrl vs. PTX8	*
Ctrl vs. PTX (2mg/kg) + Carbal	**
Carbal vs. PTX (2mg/kg)	*
Carbal vs. PTX (8mg/kg)	*
Carbal vs. PTX (2mg/kg) + Carbal	**
PTX (2mg/kg) vs. PTX (8mg/kg)	ns
PTX (2mg/kg) vs. PTX (2mg/kg) + Carbal	ns
PTX (8mg/kg) vs. PTX (2mg/kg) + Carbal	ns

Figure 78. Effets de carba1/PTX sur la croissance tumorale par mesure au pied à coulisse, essai 2. Évolution de la croissance des tumeurs de souris traitées ou non, au cours de la seconde étude, à la suite d'une analyse au pied à coulisse. La taille de la tumeur primaire a été évaluée tous les 2 jours. (A) Courbes réalisées à partir des valeurs moyennes de taille tumorale pour chaque groupe de souris. (B) Courbes réalisées à partir des valeurs médianes de taille tumorale pour chaque groupe de souris. (C) Analyse statistique par test de Kruskal-Wallis à partir des valeurs médianes à J16. Barres = SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. $n=8$ pour les groupes Ctrl, carbal et carba1/PTX ; $n=7$ pour le groupe PTX 2mg/kg ; $n=5$ pour le groupe PTX 8mg/kg.

En ce qui concerne l'évaluation du volume des tumeurs en imagerie de bioluminescence, nous observons la même dispersion des données (Fig.79).

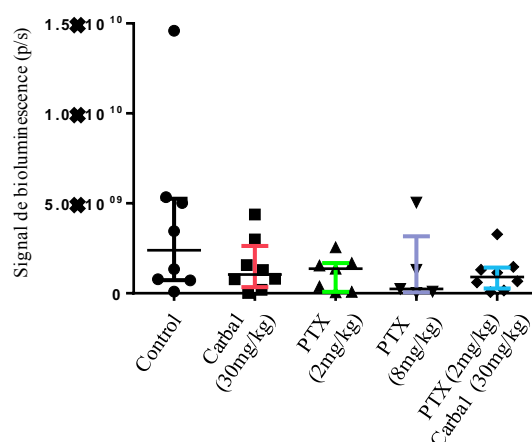


Figure 79. Effets de carba1/PTX sur la croissance tumorale par imagerie de bioluminescence, essai 2. Les mesures sont présentées pour chaque groupe, après 16 jours de traitement. Barres = SEM. $n=8$ pour les groupes Ctrl, carbal et carba1/PTX ; $n=7$ pour le groupe PTX 2mg/kg ; $n=5$ pour le groupe PTX 8mg/kg.

De même que lors de la première étude, nous remarquons que les mesures de bioluminescence diffèrent de celles obtenues au pied à coulisse. Bien que nous observions une légère potentialisation de PTX à 2mg/kg par carba1, l'analyse statistique ne montre pas différence significative, quel que soit le traitement. Enfin, l'arrêt de l'expérience à 16 jours n'a pas permis aux métastases de se développer suffisamment pour conduire une analyse comparative.

En conclusion, la dose de PTX de 2mg/kg que nous avons choisie est probablement un peu trop forte pour permettre la mise en évidence d'une synergie induite par le composé carba1. Toutefois, l'analyse approfondie des résultats suggère l'existence de cette synergie. Ceci nous encourage à réaliser prochainement une expérience similaire, mais avec une dose de PTX comprise entre 0,75 et 2 mg/kg.

Discussion et perspectives

Au cours des études que nous avons menées, nous avons mis en évidence un effet synergique entre le PTX et une nouvelle molécule, carba1, sélectionnée à l'issue d'un criblage de collections chimiques. Comprendre pourquoi il existe une synergie entre carba1 et le PTX implique non seulement de bien connaître le mécanisme d'action de chacune de ces molécules, mais aussi de connaître leur(s) cible(s). Nous nous sommes donc intéressés aux cibles potentielles de carba1 et à son effet sur les cellules, lorsqu'il est appliqué isolément ou en combinaison avec le PTX. Les résultats obtenus sont discutés dans cette partie. Nous discuterons également des études menées sur l'efficacité thérapeutique de l'association carba1/PTX dans des modèles murins.

1. Carba1 cible la tubuline *in vitro*

Nos expériences ont montré que le composé carba1 interfère avec la polymérisation de la tubuline pure *in vitro*. Il cause en effet un retard de polymérisation ainsi qu'une réduction de la vitesse d'assemblage et du nombre total de MTs formés. Nous avons montré également que le composé carba1 se fixe sur la tubuline, probablement sur le site colchicine, puisque nous observons une réduction de la liaison de la colchicine tritiée à la tubuline en présence de carba1. Cette compétition n'est cependant pas aussi importante que celle observée pour le nocodazole ou la colchicine elle-même. Cela peut être dû au fait que carba1 se fixe à proximité du site colchicine ou que son affinité pour la tubuline est plus faible. Il peut s'agir également, de manière plus triviale, d'un problème de solubilité de carba1 que nous n'aurions pas repéré. Enfin, même si nous ne l'avons pas testé, on ne peut pas écarter l'hypothèse que carba1 se fixe aussi sur d'autres sites que le site colchicine.

Des travaux publiés récemment, portant sur des dérivés de carbazole, ont rapporté la fixation de ces dérivés au niveau du site colchicine et en ont décrit la localisation précise (Diaz *et al.*, 2018). La structure chimique d'un des carbazoles utilisés pour cette analyse est présentée ci-dessous (**Fig.80A**). La molécule est constituée d'un hétérocycle entouré de deux cycles aromatiques, structure retrouvée pour carba1 et caractéristique des dérivés de carbazole. La fixation de ce dérivé sur la tubuline fait intervenir les acides aminés Asn-B258, Leu-B242 et Cys-B241 (**Fig.80B**). Il est probable que la fixation du composé carba1 au niveau du site colchicine se rapproche de ce modèle. Cependant, la structure de carba1 est tout de même différente, avec des substitutions distinctes. Il n'est donc pas à exclure qu'il se fixe autrement, en faisant intervenir d'autres acides aminés.

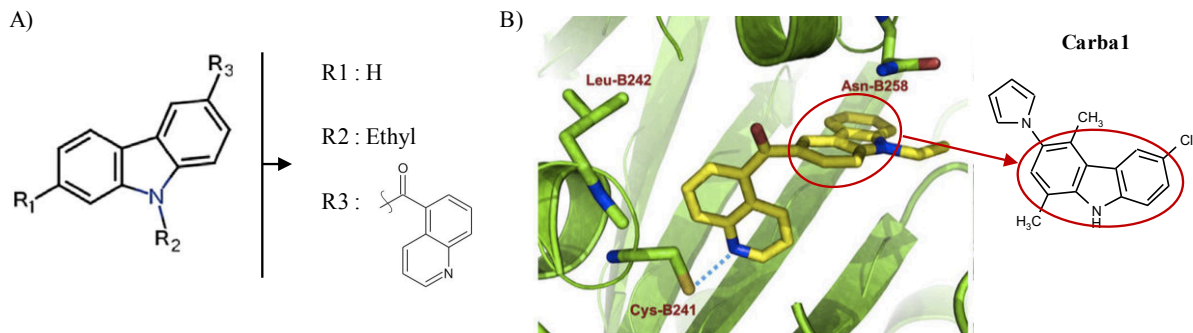


Figure 80. Fixation d'un dérivé de carbazole sur le site colchicine.

(A) Structure chimique du dérivé de carbazole décrit dans Diaz et al., 2018. (B) Interaction entre ce dérivé de carbazole (jaune) et la tubuline β au niveau du site colchicine (Diaz et al., 2018). Le cercle rouge représente la partie carbazole commune au composé carba1.

Le groupe de Fernando Diaz à Madrid, avec lequel nous collaborons, analyse actuellement de manière approfondie la liaison de carba1 sur la tubuline. Les premières expériences, basées sur l'analyse du déplacement d'un composé fluorescent se fixant sur le site colchicine confirment nos résultats. Elles mettent aussi en évidence un problème de solubilité du composé, ce qui complique la mesure de la constante d'affinité. Ce même groupe réalise actuellement des co-cristaux carba1/tubuline. L'analyse structurale qui sera prochainement réalisée au synchrotron devrait permettre de savoir précisément comment carba1 se fixe sur la tubuline, de préciser les acides aminés mis en jeu dans cette liaison et d'apprécier les conséquences de cette fixation sur la morphologie (droite ou courbée) du dimère de tubuline.

2. Carba1 cible la tubuline dans les cellules

Le traitement des cellules par carba1 à forte concentration (25μM) provoque un ralentissement global de la dynamique des MTs. Cependant, de manière inattendue et contrairement à la plupart des agents déstabilisant les MTs connus, carba1 ne cause pas une dépolymérisation des MTs dans les cellules, même à cette concentration. Plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer cet effet.

Tout d'abord, la faible affinité de carba1 pour la tubuline pourrait être à l'origine de ces observations.

Il est possible que carba1 altère certains paramètres d'instabilité dynamique protégeant de la dépolymérisation complète des MTs, notamment la fréquence des sauvetages. C'est par exemple le cas de la molécule DZ-2384 (Wieczorek *et al.*, 2016). Celle-ci est capable de se fixer sur le site vinblastine, de réduire la vitesse de croissance des MTs *in vitro*, mais comme carba1, elle ne provoque pas de dépolymérisation des MTs dans les cellules. Contrairement à

la vinblastine, cette molécule augmente la fréquence des sauvetages *in vitro* et dans les cellules, pouvant aider à la repolymérisation des MTs et expliquer la persistance des MTs en interphase (Wieczorek *et al.*, 2016). Ainsi, un mécanisme similaire, produisant une modification des paramètres d'instabilité dynamique dans les cellules, pourrait être envisagé pour carba1. Bien que nous n'ayons observé aucune différence significative quant à la fréquence des sauvetages entre les conditions contrôles et carba1 lors des études en TIRF, il est possible que les conditions utilisées ne soient pas optimales. En effet, carba1 a été testé uniquement à 4 μ M. Les études menées sur la molécule DZ-2384 révèlent que la fréquence de sauvetages varie en fonction de la concentration de la molécule. Afin de vérifier si carba1 peut induire une augmentation du nombre de sauvetages, des tests supplémentaires seraient nécessaires à la fois dans les cellules mais également en TIRF, avec des doses croissantes de carba1.

Une dernière hypothèse concerne le fait que dans les cellules, l'altération de la dynamique des MTs par carba1 observée par la technique de plus end tracking, puisse être principalement provoquée via la fixation de MAPs. Ces protéines sont en effet sensibles aux courbures spécifiques des MTs ou des hétérodimères de tubuline $\alpha\beta$ (Brouhard and Rice, 2014) pouvant être causées par des MTAs (Steinmetz and Prota, 2018). La colchicine, par exemple, est connue pour piéger des dimères de tubuline individuels à l'état incurvé. Quant aux alcaloïdes de la Pervenche, leur liaison à l'interface longitudinale entre deux dimères de tubuline, force les MTs à adopter une conformation incurvée.

3. Carba1 peut avoir d'autres cibles cellulaires

Bien que le composé carba1 cible de manière certaine la tubuline, ses effets sur les cellules, notamment l'absence de dépolymérisation des MTs et les mitoses anormales, suggèrent la possibilité d'une autre cible cellulaire. De plus, de par sa structure, carba1 est susceptible d'être un inhibiteur de kinases. Ce ne serait d'ailleurs pas la première fois qu'un MTA possède une autre cible que la tubuline. En plus de la tubuline, le PTX par exemple, interagit avec la protéine Bcl-2, facteur apoptotique (Ferlini *et al.*, 2009; Rodi and Makowski, 1999).

Carba1, inhibiteur potentiel de kinases

Les MTAs sont très diversifiés en termes de structures chimiques et de poids moléculaires. Certains sites de liaison à la tubuline, telles que les sites de la colchicine et du taxane, sont assez profonds, de grande taille et de nature principalement hydrophobe (Steinmetz and Prota,

2018). Plusieurs types de médicaments anticancéreux initialement développés contre d'autres protéines cibles, comme par exemple les kinases, se sont avérés être aussi des ligands de la tubuline. C'est par exemple le cas du composé BKM120 (buparlisib, NVP-BKM120). Initialement utilisé comme inhibiteur de la phosphoinositide-3-kinase (PI3K), il a fait l'objet de plus de 80 études cliniques en tant que médicament unique ou en association de chimiothérapies. Cependant, en plus d'inhiber les PI3K, il a récemment été rapporté que BKM120 interagissait avec la tubuline au niveau du site colchicine et déstabilisait les MTs *in vitro* et dans les cellules (Steinmetz and Prota, 2018). On peut donc se demander si carbal, qui se lie au site colchicine, pourrait à son tour, cibler une kinase. Bien que l'étude des effets inhibiteurs potentiels de carbal sur un ensemble de kinases, menée par le prestataire Merck-Millipore, n'a révélé aucune réduction significative de l'activité des kinases testées, nous ne pouvons pas exclure totalement que carbal puisse cibler une kinase. Non seulement l'ensemble du kinome n'a pas été analysé mais le test mené par Merck-Millipore reste indicatif. Les conditions enzymatiques, notamment l'unique dose de carbal utilisée pour cette étude, peuvent ne pas être optimales.

Cibles potentielles de carbal par criblage génétique chez la levure

Nous avons également étudié la possibilité que carbal puisse cibler d'autres protéines que la tubuline dans un modèle de levure, *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons tiré parti de l'effet toxique de la combinaison carbal/PTX chez la levure afin de cribler une banque génomique et déterminer les gènes dont la surexpression permettait la survie de *S. c.* sur ce milieu. Ainsi les protéines dont le gène a été surexprimé sont des cibles potentielles de carbal (ou du PTX). Nous avons cependant gardé à l'esprit que la surexpression de certains gènes pouvait également être due à une compensation d'un mécanisme altéré à la suite du traitement. Les résultats obtenus nous ont amené à nous intéresser aux protéines impliquées dans la liaison microtubules/kinétochores, en particulier à la kinésine CENP-E mais également à stu2 (MAPs) et à des protéines régulatrices de l'actine.

CENP-E

La kinésine CENP-E est à l'origine de la migration des chromosomes des pôles du fuseau vers le centre de la cellule. Une inhibition de CENP-E par un inhibiteur spécifique (GSK923295) provoque l'apparition de phénotypes mitotiques anormaux et un blocage des cellules en prométaphase. Ces événements sont similaires à ceux provoqués par le composé carbal (**Fig.81A**). De plus, nous avons observé une localisation anormale de CENP-E, conduisant à

l'absence de la kinésine sur la plaque équatoriale, dans les cellules traitées par carbal. Nos résultats suggèrent deux explications possibles pour cette localisation anormale de CENP-E.

Tout d'abord, la délocalisation de CENP-E peut résulter de l'effet de carbal sur la tubuline. Le composé UA62784, dont la structure ressemble à celle de carbal (**Fig.81B**), provoque lui-aussi une localisation anormale de CENP-E (Henderson *et al.*, 2010) (**Fig.81A**). Initialement décrit comme un inhibiteur spécifique de CENP-E, ce composé s'est avéré être un agent dépolymérisant les MTs (Tcherniuk *et al.*, 2011). De plus, nous avons observé que d'autres agents ciblant la tubuline comme le nocodazole ou la vinblastine provoquent parfois une mauvaise localisation de CENP-E. Toutefois, les modifications de localisation de CENP-E observées dans les cellules traitées par ces différentes molécules semblent moins systématiques et précises que celles observées dans les cellules traitées par carbal.

Alternativement, nous pouvons supposer que carbal inhibe directement l'activité de la kinésine CENP-E. L'inhibiteur spécifique de CENP-E, GSK923295, induit le même phénotype que carbal en ce qui concerne la localisation de CENP-E (**Fig.81A**). Cette hypothèse semble donc probable mais des analyses complémentaires, notamment une quantification de la "délocalisation" de CENP-E, sont cependant nécessaires afin d'assurer ces conclusions. Enfin, cette hypothèse pourra également être validée directement en testant *in vitro* l'impact de carbal sur l'activité de la kinésine CENP-E (Tcherniuk *et al.*, 2011).

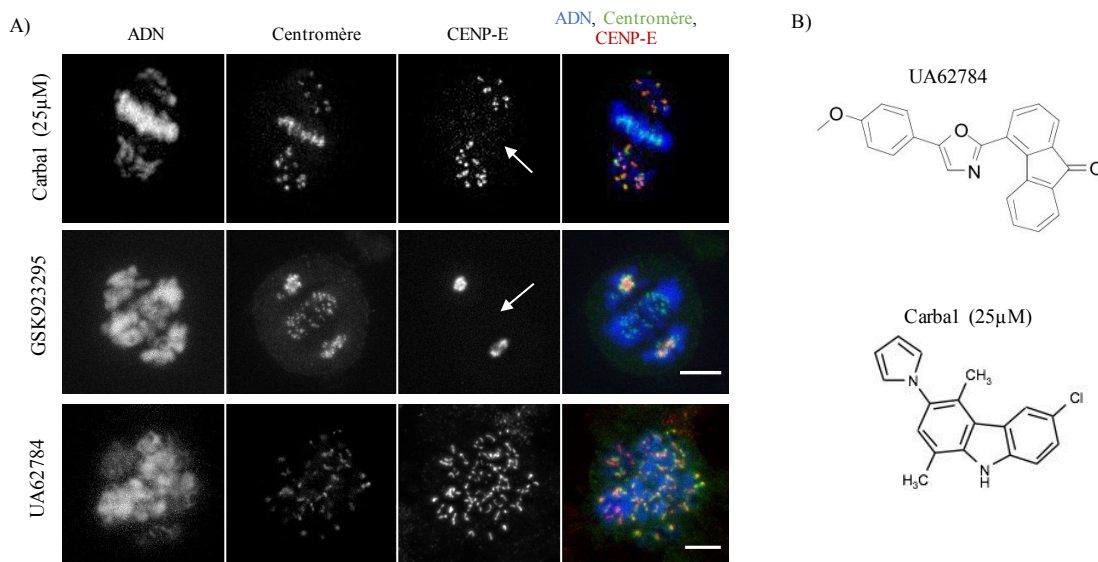


Figure 81. Comparaison des effets de carbal, UA62784 et GSK923295 sur la localisation de CENP-E au cours de la mitose.

Les cellules HeLa sont traitées pendant 5 heures avec carbal à 25 μ M, UA62784 et GSK923295 à 1 μ M. (A) Localisation de CENP-E. Les cellules ont été marquées avec un anti-CENP-E (rouge) et un anti-centromère CREST (vert). L'ADN est marqué au DAPI (bleu). L'absence de CENP-E au niveau des chromosomes alignés est indiquée par une flèche. Échelle : 5 μ m. (B) Structure des molécules UA62784 et carbal.

Stu2

La surexpression de la protéine associée aux MTs stu2 (orthologue de ch-TOG chez les mammifères) pourrait être la conséquence de la fixation de carba1 sur la tubuline. En effet, des études ont révélé qu'à faible concentration, la fixation de l'éribuline sur le site vinblastine, perturbe la localisation de la tubuline polymérase ch-TOG à l'extrémité (+) des MTs. Cette délocalisation réduit la vitesse de croissance des MTs et affecte ainsi leur capture au niveau du cortex cellulaire à l'origine de la perturbation de la migration des cellules cancéreuses (Chanez *et al.*, 2015). De même que l'éribuline, carba1 pourrait empêcher la fixation correcte de stu2 sur les MTs dans les levures, qui en contrepartie, ont tenté de contrecarrer cette altération par la surexpression de stu2.

Protéines régulatrices de l'actine

Au cours de ce criblage, nous avons également identifié de nombreux gènes en relation avec la régulation du cytosquelette d'actine, notamment Cdc42, la Tropomyosine 2 et différentes sous-unités du complexe Arp2/3. Le cytosquelette d'actine et les MTs sont en étroite collaboration dans les cellules. Il est envisageable que carba1 cible un acteur majeur de la dynamique de l'actine, à l'origine de la potentialisation du PTX observée dans les cellules. Une étude récente a en effet montré que des petites molécules ciblant le cytosquelette d'actine via la Tropomyosine étaient capables de sensibiliser les cellules cancéreuses aux agents anti-microtubulaires (Currier *et al.*, 2017). Des études approfondies quant à l'action possible de carba1 sur le cytosquelette d'actine seraient cependant nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

D'une manière générale, il ne faut pas perdre de vue que le criblage génétique de la levure a été réalisé sur un milieu toxique carba1/PTX. Il faut envisager que les gènes identifiés puissent non seulement être en lien avec le traitement au carba1, mais également avec le PTX et/ou la combinaison de ces molécules.

4. Mécanisme impliqué dans la synergie carba1/PTX

Par définition, la synergie est obtenue lorsque l'effet combiné de deux molécules est supérieur à la somme de leurs effets pris séparément. C'est dans le but de trouver de nouvelles molécules capables d'agir en synergie avec le PTX que nous avons réalisé un criblage chimique mimant le concept de la létalité synthétique. Ce criblage, réalisé à partir d'une collection de 8000 composés, a permis de mettre en évidence la molécule carba1, dérivé de carbazole.

Effet synergique entre carba1 et PTX

Des analyses menées sur la viabilité des cellules HeLa ont révélé que l'association carba1(12 μ M)/PTX(1nM) a un effet supérieur à la somme des effets de ces molécules pris séparément aux mêmes concentrations, suggérant fortement un effet synergique. Cette conclusion est confirmée par le calcul de l'indice de combinaison, inférieur à 1 dans ces conditions. Cet indice, mis en place par le Professeur Paul Talalay et Ting-Chao Chou (Chou, 2010) permet de décrire de manière quantitative la synergie (CI<1), l'additivité (CI=1) et l'effet antagoniste entre deux molécules (CI>1).

Bien que carba1 et le PTX partagent à priori la même cible cellulaire, à savoir la tubuline, ils ont des sites de liaison distincts et des modes d'action différents. Il a en effet été démontré que le PTX se fixe sur le site taxane, stabilise les MTs et favorise leur assemblage, alors que carba1 se lie au niveau du site colchicine et ralentit la polymérisation des MTs *in vitro*.

D'après plusieurs études réalisées *in vitro*, il semblerait que l'existence d'une synergie entre deux MTAs soit non seulement dépendante des concentrations des molécules mais également de leur site de fixation à la tubuline et de leurs effets seuls sur l'assemblage des MTs (Dabydeen *et al.*, 2004; Gapud, 2004). De manière plus précise, ces études indiquent que les molécules ayant le même effet sur l'assemblage de la tubuline peuvent agir en synergie uniquement dans le cas où les drogues se fixent sur deux sites distincts au niveau de la tubuline. Il semblerait également que les effets causés par la combinaison de deux molécules ayant des effets contraires sur l'assemblage des MTs, comme c'est le cas pour carba1 et le PTX, soient plutôt antagonistes que synergiques.

Dans le cas précis de notre étude et compte tenu des analyses menées sur l'association de MTAs, comment se fait-il qu'une drogue qui se fixe sur le site colchicine et qui a une action dépolymérisante puisse exercer une synergie avec une drogue qui stabilise les MTs et qui se fixe sur le site taxane ? Quel est le mécanisme responsable de cette synergie ? S'agit-il d'une réponse, à l'échelle de la cellule, à un effet conjugué de carba1 et du PTX sur la tubuline ? La synergie observée à l'échelle cellulaire peut-elle résulter d'une accentuation des effets du PTX par carba1 ?

A ce stade de mes travaux, il n'y a pas encore de réponse claire à ces questions, mais nous disposons d'éléments permettant d'émettre différentes hypothèses.

La synergie résulterait d'un effet conjugué de carba1 et du PTX sur la tubuline

In vitro, le composé carba1 présente les aspects d'un agent dépolymérisant les MTs. Cependant, il est possible que dans les cellules, à une concentration de 12 μ M, carba1

supprime la dynamique des MTs comme l'ensemble des MTAs à faibles doses (Jordan and Wilson, 2004, 1998). Dans ces conditions, nous pouvons envisager que l'association d'un MSA et d'un MDA puisse être à l'origine d'un effet additif ou synergique.

Accentuation des effets du PTX par carba1 dans les cellules

Nous avons montré que l'action toxique du PTX, dans les cellules en culture, résulte d'un ralentissement des cellules en mitose, provoqué par la formation de fuseaux mitotiques anormaux conduisant à une division anormale des cellules. Une dose cytotoxique du composé carba1 provoque un arrêt en mitose beaucoup plus long que dans le cas du PTX, suivi, dans la majorité des cas par la mort des cellules directement en mitose. La combinaison de carba1 et de PTX cause un ralentissement mitotique beaucoup plus long qu'une exposition aux molécules seules, suivi par une division anormale des cellules, tout comme le PTX à forte dose. Ces observations indiquent une accentuation des effets du PTX par carba1, dans les cellules. Cette potentialisation peut avoir pour origine les effets mutuels des deux molécules pour la tubuline. Il est également envisageable qu'un autre mécanisme, via une ou d'autre(s) cible(s) soit mis en jeu dans ce processus de potentialisation.

Accentuation des effets du PTX par carba1 dans les cellules, via la tubuline

Une possibilité est que la liaison de carba1 sur le site colchicine de la tubuline, facilite et/ou favorise, par un effet allostérique, la fixation du PTX. Le site de liaison du PTX est situé sur la face interne du MT polymérisé, replié dans une courbure formée par les hélices H6 et H7 près de l'extrémité (+) du MT et adjacente au brin de feuillet β , S7. La fixation de la colchicine sur la tubuline provoque un changement de conformation caractérisé par le mouvement sur les hétérodimères α et β , de deux brins de feuillet β S8-S9 du domaine intermédiaire, vers l'hélice H8 qui s'accompagne d'une rotation de l'hélice H7 (hélice intervenant dans la fixation du PTX). L'interaction entre les domaines étant très étroite (Bombuwala *et al.*, 2006; Field *et al.*, 2018), il est donc possible que la fixation de carba1 augmente l'affinité du PTX pour la tubuline. Nous avons testé cette hypothèse *in vitro*, en étudiant les effets de l'association carba1/PTX sur la cinétique d'assemblage des de la tubuline pure en microtubules. Cependant, ces expériences n'ont pas permis de mettre en évidence une potentialisation des effets polymérisants du PTX par carba1. Il est cependant envisageable que les conditions expérimentales ainsi que les concentrations de drogues utilisées pour ces études n'aient pas été optimales. De plus, cette méthode qui mesure le comportement moyen d'une population de MTs, n'est pas la plus adéquate pour tester cette hypothèse. L'analyse structurale de la conformation du site taxane après liaison de carba1 sur

le site colchicine devrait apporter des éléments de réponse. Comme précisé plus haut, la cristallisation du composé avec la tubuline est en cours.

Alternativement nous pouvons supposer que la fixation de carba1 sur la tubuline favorise l'entrée du PTX dans le MT. Des études récentes (non publiées mais présentées lors d'une session Poster à l'EMBL à Heidelberg, Allemagne, Mai 2018) menées par l'équipe de Anna Akmanova, ont montré par des expériences de TIRF, que la fixation de la vinblastine à l'extrémité (+) des MTs, pouvait faciliter la pénétration du PTX fluorescent au niveau de la face interne du MT. En collaboration avec cette équipe, des études similaires sont actuellement en cours afin de déterminer si, tout comme la vinblastine, le composé carba1 est capable de faciliter l'entrée du PTX dans les MTs, pouvant être à l'origine de la synergie observée dans les cellules.

Accentuation des effets du PTX par carba1 dans les cellules, via d'autres cibles cellulaires

L'effet synergique entre carba1 et le PTX observé dans les cellules peut également faire intervenir d'autres cibles ou voies de signalisation. C'est le cas de la synergie observée entre le docétaxel et la céramide, molécule de signalisation intracellulaire jouant un rôle important dans l'apoptose. Il a été démontré que le docétaxel pouvait, de manière synergique, promouvoir l'effet apoptotique de la céramide ou qu'inversement, la céramide pouvait promouvoir l'effet du docétaxel, contribuant à l'arrêt synergique des cellules en phase G2/M (Feng *et al.*, 2014). Compte tenu du fait que le PTX peut interagir avec la protéine Bcl-2, facteur apoptotique (Ferlini *et al.*, 2009; Rodi and Makowski, 1999) et/ou que le composé carba1 peut avoir également une autre cible cellulaire, nous pouvons envisager que la synergie carba1/PTX ne résulte pas forcément des effets mutuels des molécules sur la tubuline, mais mette en jeu d'autres cibles.

5. Effet thérapeutique de carba1/PTX sur modèles animaux

Les modèles animaux sont couramment utilisés en biologie pour refléter des pathologies humaines et tester l'efficacité de nouvelles molécules pharmacologiques. Bien que l'expérimentation animale soit une étape nécessaire à l'étude thérapeutique d'une nouvelle molécule, les modèles animaux sont loin de représenter la complexité des pathologies chez l'Homme. De plus, ces modèles précliniques ont été « profilés » de manière à ce que les expérimentateurs puissent conduire les expériences assez rapidement et ne reflètent pas exactement ce qui est observé chez les patients (Komlodi-Pasztor *et al.*, 2012),

notamment en terme de division cellulaire. Enfin, le schéma expérimental que nous avons utilisé ne mesure pas la régression tumorale mais un effet sur la croissance des tumeurs, ne représentant donc pas la réalité. Conscients de ces limites, nous avons utilisé un modèle de cancer mammaire murin agressif afin de tester la combinaison carba1/PTX sur la croissance tumorale et sur la dispersion et la croissance des métastases.

Les cellules 4T1 sont issues d'un carcinome mammaire hautement tumorigène et invasif qui peut spontanément se métastaser de la tumeur primitive à de multiples sites distants, notamment les ganglions lymphatiques et les poumons. Ces cellules ont été injectées en orthotopique au niveau du coussinet adipeux de la mamelle des souris.

La première étude a révélé que la combinaison carba1(20mg/kg)/PTX(0,75mg/kg) ne causait pas de réduction significative de la taille des tumeurs par rapport aux souris non traitées. Au contraire, les mesures en bioluminescence révélaient une tendance des traitements à augmenter la taille des tumeurs, en particulier en présence de PTX et de la combinaison carba1/PTX. Nous suspectons que ces effets inattendus puissent être dus à de l'inflammation. De nombreuses études attestent que les effets du PTX sur le système immunitaire peuvent conduire à une régression tumorale (Javeed *et al.*, 2009). Cependant, il a récemment été montré que le PTX à faibles doses favorisait l'inflammation, ce qui faciliterait la migration et l'invasion des cellules tumorales (Li *et al.*, 2016). Il a également été montré que le PTX serait à l'origine d'une infiltration de macrophages dans les tumeurs de cancers mammaires (Shree *et al.*, 2011). Ces cellules contrecarrent l'efficacité anti-tumorale des drogues via plusieurs mécanismes tels que l'inhibition des cellules T CD8⁺ ou encore par la sécrétion de signaux protégeant le tissu tumoral (cathepsine) (Coffelt and de Visser, 2015). Afin de vérifier si l'augmentation de la taille des tumeurs primaires en présence de PTX dans notre étude est due à de l'inflammation, nous projetons de vérifier la présence de macrophages sur les coupes de tumeurs primaires grâce au marqueur iba1 (Shree *et al.*, 2011). L'augmentation du volume des tumeurs primaires à la suite d'un traitement est également détectable, mais moins importante, lorsque la taille des tumeurs a été évaluée par la mesure au pied à coulisse. Cette mesure indique également que l'administration de la combinaison carba1/PTX réduit la taille des tumeurs de manière significative par rapport à la seule administration de PTX ou de carba1. Une augmentation des doses de PTX, de carba1 et de la fréquence d'administration (injection quotidienne weekends inclus), lors de la deuxième étude, n'a révélé aucune diminution de la taille des tumeurs en présence de traitement, en bioluminescence. En revanche, l'analyse des valeurs médianes des volumes des tumeurs, mesurées au pied à

coulisse, révèlent une réduction significative de la taille des tumeurs à la suite des différents traitements. De plus, bien que non significatives, ces mesures montrent une réduction de la croissance tumorale plus forte après un traitement carba1/PTX qu'une exposition au PTX seul.

Les deux expériences que nous avons menées sur modèles animaux ne nous ont pas permis de déterminer clairement l'efficacité relative de la combinaison carba1/PTX. En effet, lors de la première étude, les doses de PTX administrées étaient trop faibles et elles se sont avérées, au contraire, trop fortes lors de la deuxième étude.

D'après les études menées sur cellules en culture, la potentialisation du PTX par carba1 est la plus élevée dans le cas où les deux molécules seules n'ont pas un effet toxique trop important dans les cellules. En effet, si l'efficacité toxique du PTX dans les cellules est trop faible ou trop forte, sa potentialisation par carba1 ne peut pas être mise en évidence. Il est possible que nous soyons dans l'un de ces deux cas pour les études que nous avons menées dans les modèles animaux. Il est également envisageable que la population de cellules que nous avons utilisée soit hétérogène, comme le suggère les expériences *in vitro* qui ont révélé la présence possible, parmi les cellules 4T1rvluc2, d'une sous population de cellules résistantes au PTX et à la combinaison carba1/PTX. Nous avons en effet observé une forte réduction (60%) de la viabilité cellulaire à la suite d'un traitement carba1(25µM)/PTX(20nM), puis la viabilité des cellules ne diminue quasiment plus et reste à 35%, même à la suite d'un traitement carba1(25µM)/PTX(100nM). Ainsi, une sous population résistante continuerait de croître aux dépens de la population sensible, empêchant la détection de l'effet thérapeutique.

L'ensemble de ces résultats nous encourage à poursuivre les études menées sur ce modèle animal et nous envisageons prochainement une expérience similaire, avec une dose de PTX comprise entre 0,75 et 2mg/kg. Des études de pharmacocinétique et pharmacodynamique sont également à prévoir pour le composé carba1 afin d'améliorer au maximum la posologie de cette molécule seule ou en combinaison avec le PTX.

6. Combinaison et toxicité additive

Lors de la deuxième étude menée sur modèles animaux, des signes de souffrances, notamment chez les animaux traités au PTX, ont été observés et nous avons été contraints de stopper l'expérience. L'apparition de ces effets secondaires importants peut être due à la pharmacocinétique complexe du PTX. La pharmacocinétique étudie le devenir des médicaments dans l'organisme et prend en compte un ensemble de paramètres tels que

l'absorption de la molécule, sa distribution, son métabolisme et son élimination. Elle joue un rôle essentiel dans le choix des modalités d'utilisation des médicaments à savoir la voie d'administration, le rythme des injections, *etc.* Dans le cas du PTX, la pharmacocinétique n'est pas linéaire, c'est à dire qu'une augmentation de la dose conduit à une augmentation plus rapide du pic de concentration plasmatique (Robert, 2015). Cette non-linéarité est due à l'utilisation du crémophore comme excipient qui emprisonne le PTX dans des micelles et permet d'augmenter sa solubilité. Des études ont montré que lors d'une injection intrapéritonéale (IP), la capture du PTX par le crémophore était à l'origine d'une réduction de l'élimination de la molécule. En effet, la présence de PTX a été détectée, à des taux significatifs, même une semaine après l'administration initiale de la molécule en IP, ce qui conduit à une exposition continue de la cavité péritonéale à des concentrations actives de PTX (Gelderblom *et al.*, 2002). Dans le cas de notre étude, une administration quotidienne de PTX a pu provoquer une forte accumulation de la molécule au niveau péritonéal pouvant être à l'origine de la toxicité intestinale observée.

En plus des effets secondaires que nous avons observé sur les intestins des souris lors de traitements au PTX, nous pouvons également nous attendre à d'autres types d'effets néfastes. Les MTAs sont majoritairement connus pour leur toxicité sur le système nerveux périphérique. Les neuropathies induites par ces agents sont directement liées à leur impact sur les MTs axonaux (Argyriou *et al.*, 2012). Une étude récente a mis en évidence un nouveau composé ciblant les MTs au niveau du site vinblastine, capable de réduire le volume des tumeurs dans un modèle animal sans induire de neurotoxicité (Wieczorek *et al.*, 2016). De la même manière que carba1 et contrairement à la majorité des MTAs, cette molécule induit un arrêt de la mitose et déclenche l'apoptose sans affecter le réseau de MTs en interphase. Cette particularité pourrait être à l'origine de la réduction des effets délétères sur le système nerveux. Compte tenu des effets similaires observés entre cette nouvelle molécule et carba1, il serait intéressant de caractériser plus précisément les effets de carba1 seul et en combinaison avec le PTX sur le système nerveux périphérique. Ces expériences étant difficiles à mettre en place sur l'animal, nous envisageons dans un premier temps, de tester l'effet de carba1 et de la combinaison carba1/PTX sur le réseau microtubulaire de neurones en culture et sur leur viabilité.

L'un des principaux risques de l'utilisation de molécules en combinaison est l'addition potentielle des effets néfastes de chacune des drogues. L'ensemble des études que nous avons menées, à la fois sur un modèle de xénogreffes sur membrane chorio-allantoïdienne de poulet

mais également sur un modèle murin, ne montre aucune toxicité détectable de carba1 seul dans le cadre du schéma expérimental utilisé et compte tenu du temps d'application de la molécule. La probabilité que carba1 induise une toxicité additionnelle est donc réduite.

7. Utilisation de carba1 dans des modèles cancéreux *LKBI* déficients

Initialement, des mutations de *Lkb1* ont été identifiées comme étant causales dans le syndrome de Peutz-Jeghers, une maladie rare autosomique dominante héréditaire caractérisée par le développement de polypes hamartomateux gastro-intestinaux bénins et l'apparition précoce d'un cancer. Plus de dix ans plus tard, le gène *LKBI* est considéré comme un gène suppresseur de tumeurs essentiel, fréquemment muté dans un large spectre de cancers humains (Momcilovic and Shackelford, 2015). *Lkb1* est une master kinase impliquée dans de nombreuses voies de signalisation et régule un large spectre de fonctions cellulaires, notamment la croissance, le métabolisme, l'autophagie et la polarité cellulaire. Les nombreuses fonctions de cette kinase au sein des cellules compliquent la mise en place de traitements.

En l'absence de cible claire, une approche en létalité synthétique est nécessaire afin d'identifier les éléments responsables des voies de croissance et de survie afin de dégager les points faibles des tumeurs mutées pour ce gène *LKBI*, susceptibles d'être exploitées de manière thérapeutique. De plus, une compréhension claire de la dérégulation des voies clés en aval de *Lkb1* et de ses substrats sera probablement la clé du développement de traitements efficaces pour le traitement des cancers du mutant *LKBI*.

Le criblage mené sur les cellules déficientes ou non pour le gène *LKBI*, a ainsi permis de découvrir une sensibilité accrue des cellules déficientes pour le composé carba1. Les études supplémentaires réalisées en culture cellulaire ont confirmé le criblage et montré qu'une dose de carba1 de 40µM provoquait une réduction de la viabilité cellulaire de plus de 80% pour les cellules *LKBI* déficientes contre 50% pour les cellules *LKBI* "rescue". Des analyses ont également révélé une sensibilité accrue des cellules *LKBI* déficientes pour le PTX.

Bien que le composé carba1 seul n'ait montré aucune efficacité thérapeutique dans le modèle de cancer murin agressif (cellules 4T1) que nous avons utilisé, il a révélé une forte activité anti-tumorale dans le modèle de xénogreffes de cellules HeLa *LKBI* déficientes, sur membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet. Il est à noter que nous n'avons pas d'information concernant l'activité de *Lkb1* dans les cellules 4T1. Dans le modèle de greffe de cellules HeLa sur membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet, un traitement par

carba1 a en effet permis de réduire de 3 fois le poids des tumeurs primaires et de diminuer significativement le nombre de métastases. De manière intéressante, le criblage mené chez *S.c.* nous a permis de montrer que la surexpression du gène *TOS3*, équivalent de *LKB1* chez les mammifères, permettait la survie des levures sur un milieu toxique carba1/PTX.

Lkb1 est un régulateur majeur de la polarité cellulaire et à ce titre régule l'activité de nombreux acteurs du cytosquelette. Une dérégulation de ces acteurs pourrait provoquer l'altération de l'organisation et de la dynamique des MTs, modifiant alors la sensibilité de la cellule aux agents ciblant les MTs. Il se peut également que la sensibilité des cellules *LKB1* déficientes pour le PTX et/ou le composé carba1 vienne du fait que ces molécules ciblent une autre protéine que la tubuline, probablement en relation avec les voies de régulations dépendante de la kinase *LKB1*.

L'ensemble de ces résultats laissent supposer une utilisation thérapeutique des MTAs dans les cancers *LKB1* déficients

Conclusion

Voilà plus de cinquante ans que les premiers médicaments anticancéreux ont été utilisés dans le traitement des leucémies et des lymphomes. Pouvant être utilisée seule, dans le cas de tumeurs dites « chimiocurables », ou en association avec la chirurgie et la radiothérapie, la chimiothérapie est devenue une arme thérapeutique majeure. Les médicaments anticancéreux sont nombreux et leurs mécanismes d'action variés. Une grande majorité d'entre eux, appelés « médicaments cytotoxiques », a pour objectif de détruire les cellules tumorales en ciblant les mécanismes de division cellulaire. Ces médicaments sont, par conséquent, toxiques pour d'autres cellules de l'organisme à division rapide. L'une des voies importantes de la recherche consiste à optimiser l'utilisation de molécules déjà existantes. C'est dans cette voie que nous nous sommes engagés. Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence un effet cytotoxique synergique entre le paclitaxel et une nouvelle molécule, carba1. J'ai pu montrer que cette molécule cible la tubuline en se fixant sur ou à proximité du site colchicine et ralentit la polymérisation des microtubules *in vitro*. Il reste toutefois de nombreuses questions concernant la ou les cible(s) de carba1 et les mécanismes mis en jeu dans son effet synergique avec le PTX. Les collaborations que nous avons mises en place devraient permettre de lever en partie le voile sur ces mécanismes, dans les prochains mois.

L'absence de dépolymérisation complète des microtubules dans les cellules indique que carba1 est moins puissant que les agents connus ciblant les microtubules. Cette particularité pourrait limiter l'apparition d'effets secondaires et serait alors un avantage, notamment dans le cas de combinaisons de molécules. L'analyse de l'effet de carba1 sur la formule sanguine des animaux et sur les neurones devrait permettre de conforter cette hypothèse.

Enfin, bien que la synergie soit difficile à reproduire chez l'animal, les résultats des études que j'ai menées sur modèles animaux sont encourageants et nous sommes proches de trouver la posologie adéquate.

Carba1 est une molécule nouvelle, avec des applications jusque-là inconnues. C'est pourquoi une déclaration d'invention, en vue d'un dépôt de brevet, a été soumise au CNRS.

Annexe 1

Carba1 et son utilisation dans des modèles cancéreux *LKB1* déficient.

Un autre objectif de l'équipe était de mieux comprendre comment la perte de polarité pouvait contribuer à la progression tumorale et d'exploiter certaines altérations moléculaires spécifiques de la progression tumorale comme bases de nouvelles stratégies pharmacologiques. Plus particulièrement, l'objectif était de cibler sélectivement les cellules tumorales déficientes pour le gène suppresseur de tumeur, *LKB1*. Ainsi, parallèlement au criblage réalisé afin de trouver des agents potentialisant le PTX, un second criblage visant à identifier des composés ciblant sélectivement des cellules déficientes pour le gène suppresseur de tumeur *LKB1* a été réalisé. La même collection de composés chimiques a été criblée. À l'issue de ce deuxième criblage, il s'est avéré que le composé carba1 faisait aussi partie des touches, c'est à dire qu'il montre une toxicité sélective pour les cellules déficientes en *LKB1*.

1. Le gène suppresseur de tumeur *LKB1*

Le gène suppresseur de tumeur *LKB1* (aussi appelé *STK11*) code pour une sérine/thréonine kinase. Des mutations germinales de ce gène sont responsables de la grande majorité des cas du syndrome de Peutz-Jeghers, une pathologie héréditaire avec un mode de transmission autosomique dominant. Celle-ci se caractérise par la présence de polypes hamartomateux, essentiellement intestinaux, et par une incidence élevée de tumeurs malignes, notamment digestives et mammaires (Forcet *et al.*, 2005). *Lkb1* est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation et régule un large spectre de fonctions cellulaires, notamment la croissance, le métabolisme, l'autophagie et la polarité cellulaire (Momcilovic and Shackelford, 2015). Ces multiples rôles de *Lkb1* ont des implications cliniques importantes. Ainsi, des études réalisées sur des modèles murins ont montré que l'inactivation de ce gène promeut l'apparition de tumeurs ainsi que leur dispersion métastatique (Ji *et al.*, 2007). De plus, des mutations somatiques de *Lkb1* sont fréquemment retrouvées dans les adénocarcinomes pulmonaires et les tumeurs utérines humaines. La fréquence de ces mutations/délétions est élevée et représente 20 à 25%. Au vu de la prévalence élevée des mutations de *LKB1* dans ces cancers, notre équipe a recherché de nouvelles molécules ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses *LKB1* déficientes afin de proposer de nouvelles options thérapeutiques.

2. Sélection de composés ciblant spécifiquement les cellules *LKB1* déficientes

Afin de cibler spécifiquement les cellules *LKB1* déficientes, l'équipe a procédé à un criblage similaire, dans son principe, à celui décrit précédemment dans la partie résultats. Ainsi, la même chimiothèque de molécules a été employée lors de ce criblage. L'unique différence étant les lignées employées qui étaient soit des MEF KO *LKB1* (fibroblastes embryonnaires de souris) soit les mêmes cellules dans lesquelles *LKB1* a été réintroduit (MEF *LKB1* Rescue). A la suite d'un test de viabilité, seuls les composés capables de diminuer la viabilité des cellules *LKB1* déficientes de manière plus importante que celle des cellules possédant *LKB1*, ont été sélectionnés. Parmi les composés identifiés se trouvait le composé carba1.

Lkb1 est un régulateur majeur de la polarité cellulaire et à ce titre régule l'activité de nombreux régulateurs du cytosquelette (protéine-kinase MARK, SAD, *etc.*) (Momcilovic and Shackelford, 2015; Yoo *et al.*, 2002). Une dérégulation de ces acteurs résultant de la perte de *LKB1*, pourrait provoquer l'altération de l'organisation et de la dynamique des MTs, modifiant alors la sensibilité de la cellule aux agents ciblant les MTs.

3. Les cellules cancéreuses *LKB1* déficientes sont plus sensibles à carba1

La présence ou l'absence de *Lkb1* dans les MEF a dans un premier temps été vérifiée par western blot (**Fig.82A**). Comme lors du précédent criblage, les molécules de la banque ont été utilisées à deux concentrations différentes. Afin de vérifier la sensibilité des cellules cancéreuses *LKB1* déficientes au composé carba1, les cellules ont ensuite été exposées à un plus large spectre de concentrations.

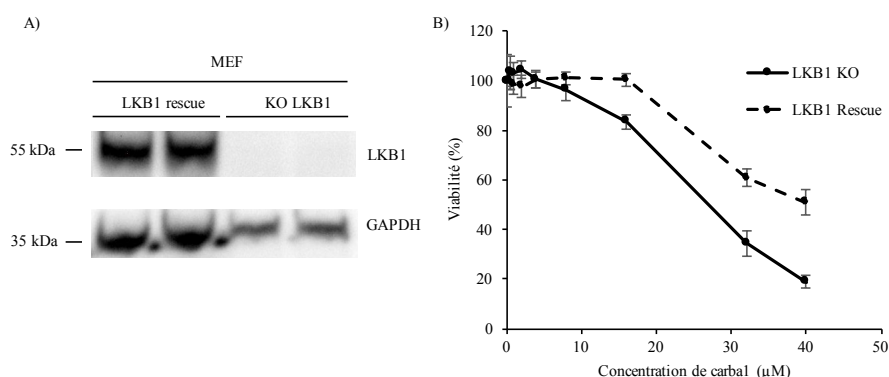


Figure 82. Sensibilité des MEF *LKB1* déficientes au composé carba1.

A) Analyse par Western blot de l'expression de *LKB1* dans les MEF *LKB1* déficientes (notées *LKB1* KO) et les MEF KO où *LKB1* a été réintroduit (notées *LKB1* rescue). B) Mesure de la viabilité (par prestoblue) des MEF *LKB1* KO et rescue à la suite d'une exposition de 72 heures à des concentrations croissantes de carba1. Barres = SEM, n=3.

La concentration de carba1 nécessaire pour inhiber la croissance des cellules *LKB1* déficientes est de 27 μ M contre 40 μ M pour les cellules où *LKB1* a été réintroduit, soit 1,5 fois plus faible. Les cellules cancéreuses *LKB1* déficientes sont donc plus sensibles au composé carba1 (**Fig.82B**).

4. Analyse de l'efficacité thérapeutique de carba1 sur un modèle de xénogreffes de cellules LKB1 déficientes sur membrane chorio-allantoïdienne de poulet

Afin de confirmer les effets anticancéreux de carba1 *in vivo* observés *in vitro* dans des cultures de cellules *LKB1* déficientes, un modèle de xénogreffes sur membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet a été utilisé. De telles expériences *in ovo* sont acceptées comme alternatives potentielles aux modèles de mammifères pour l'évaluation *in vivo* de la toxicité des médicaments et de la pharmacocinétique. Ce modèle permet également d'évaluer l'invasion métastatique de la tumeur en raison de la vascularisation intense de l'œuf. Comme nous l'avons présenté dans la partie 5.1.2 (p133), carba1 est peu toxique sur l'embryon de poulet. Ainsi, carba1 à 50 μ M n'augmente pas significativement la mortalité des embryons de poulet. La **figure 83A** rappelle les différentes étapes de l'expérience. Cette expérience a montré que carba1 inhibe de manière efficace la croissance tumorale et réduit de manière significative la dissémination des cellules tumorales, ce qui suggère des effets anti-métastatiques potentiels (**Fig.83B**).

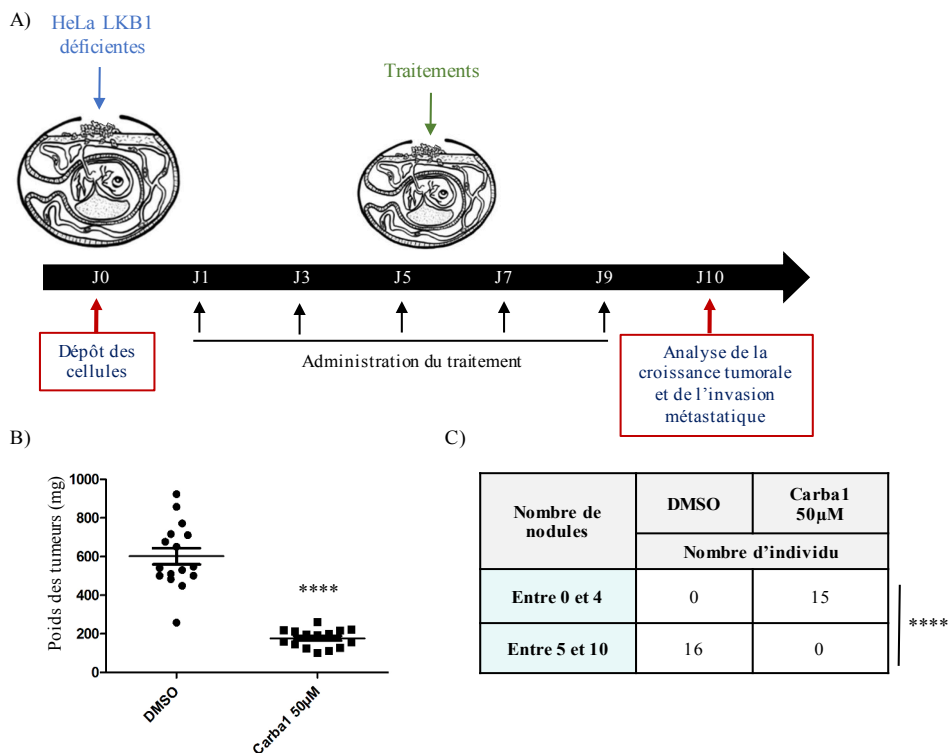


Figure 83. Effets anti-tumoral de carba1 sur un modèle d'embryon de poulet.

(A) Schéma expérimental du modèle de xénogreffes sur membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet (CAM), utilisé afin de mesurer l'activité anti-tumorale de carba1 sur des cellules HeLa LKB1 déficientes (B) A la suite d'un traitement avec le véhicule (DMSO) ou avec carba1 à 50µM, les tumeurs ont été excisées et pesées. Le graphique représente les effets des différents traitements sur le poids des tumeurs. (C) Le nombre de nodules a été quantifié pour chaque embryon de poulet traités ou non avec carba1. **** $P < 0,0001$, test de Turkey par rapport aux conditions contrôles.

5. Effets de carba1/PTX sur les cellules LKB1 déficientes

Les résultats obtenus précédemment ont clairement montré une efficacité anti-tumorale de carba1 sur les cellules LKB1 déficientes. Lors du criblage que nous avons réalisé chez la levure (voir la partie résultats), nous avons remarqué que la surexpression du gène *TOS3* permet la survie des levures sur un milieu toxique carba1/PTX. Ces résultats nous ont conduit à nous intéresser à la sensibilité des cellules LKB1 déficientes pour la combinaison carba1/PTX.

Tout comme le composé carba1, l'effet cytotoxique du PTX est accru dans les cellules LKB1 déficientes (Fig.84A). La combinaison carba1/PTX est un peu plus toxique que le PTX, que les cellules soient ou non déficientes pour le gène LKB1 (Fig.84B).

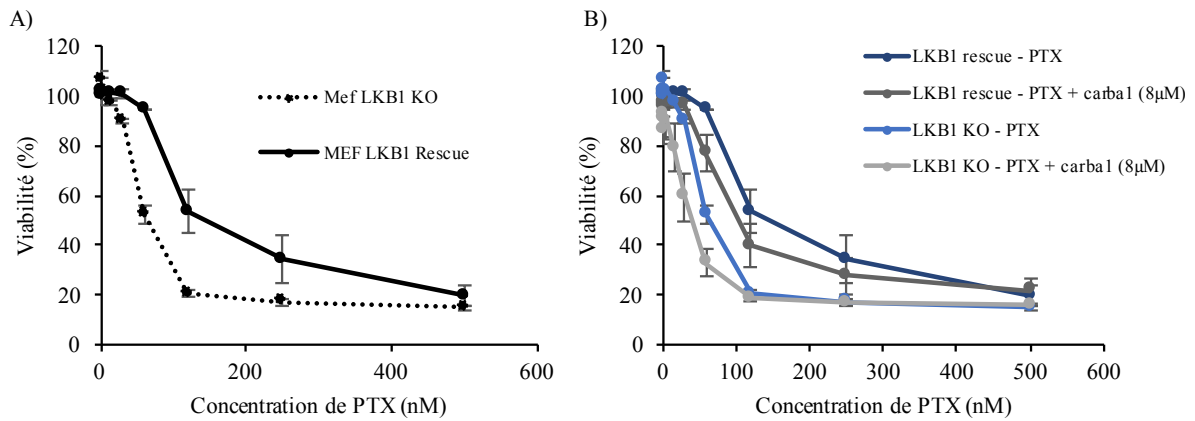


Figure 84. Sensibilité des MEF *LKB1* déficientes pour la combinaison carba1/PTX

Mesure de la viabilité (par prestoblue) des MEF *LKB1* KO et rescue à la suite d'une exposition de 72 heures à des concentrations croissantes de PTX (A) ou à des combinaisons de carba1/PTX. Barres = SEM, $n=3$.

L'ensemble de ces résultats indiquent que carba1 seul pourrait être utilisé dans le traitement de cancer déficient pour le gène *LKB1* et que ce traitement pourrait gagner en efficacité s'il est associé à une faible dose de PTX.

Annexe 2

Dans cette annexe sont présentés des résultats supplémentaires cités dans le manuscrit.

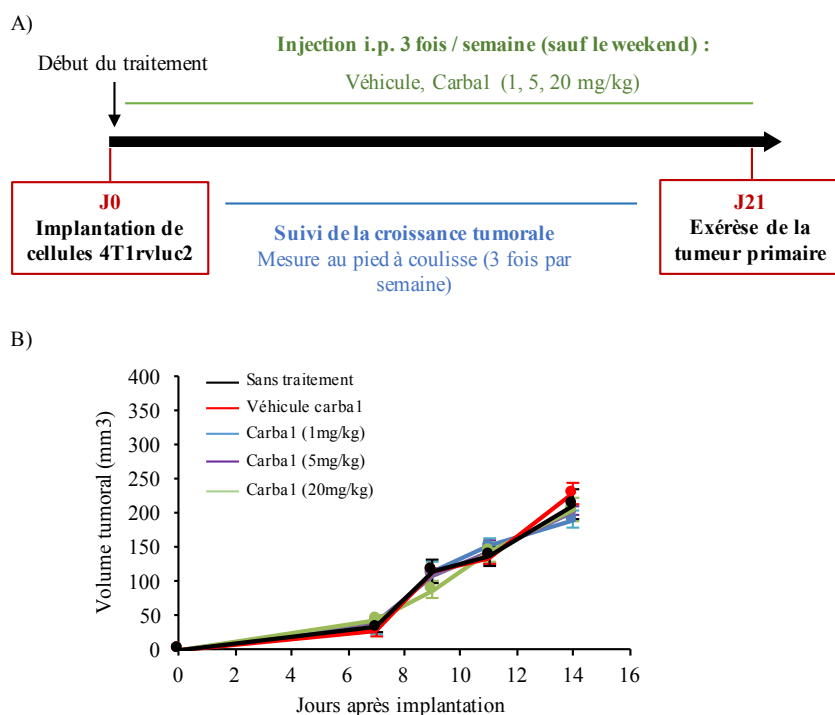


Figure 85. Effets de carba1 seul sur la croissance tumorale des allogreffes 4T1rvluc2.

(A) Schéma expérimental utilisé pour tester l'efficacité anti-tumorale de carba1, sur un modèle d'allogreffe de cellules 4T1rvluc2 chez la souris. (B) Mesure du volume de la tumeur au pied à coulisse, en fonction du temps, de souris traitées avec des concentrations croissantes de carba1. Le composé ne cause aucune réduction de la taille des tumeurs, même à forte concentration. Barres = SEM, n=4 souris par groupe.

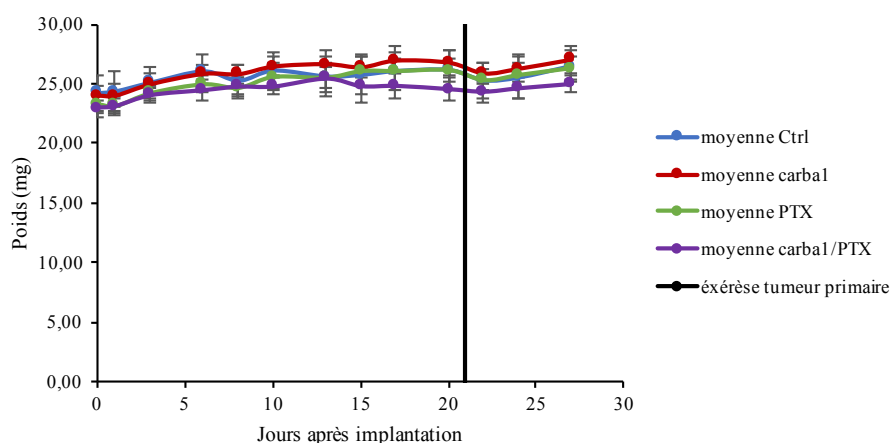


Figure 86. Évolution du poids des souris au cours de la première étude de l'effet anti-tumoral de la combinaison carba1/PTX sur modèle murin.

Ctrl (5% éthanol, 5% cremophor, 90% NaCl) ; Carba1 (20mg/kg) ; PTX (0,75mg/kg). Barres = SEM, n=10 souris par groupe.

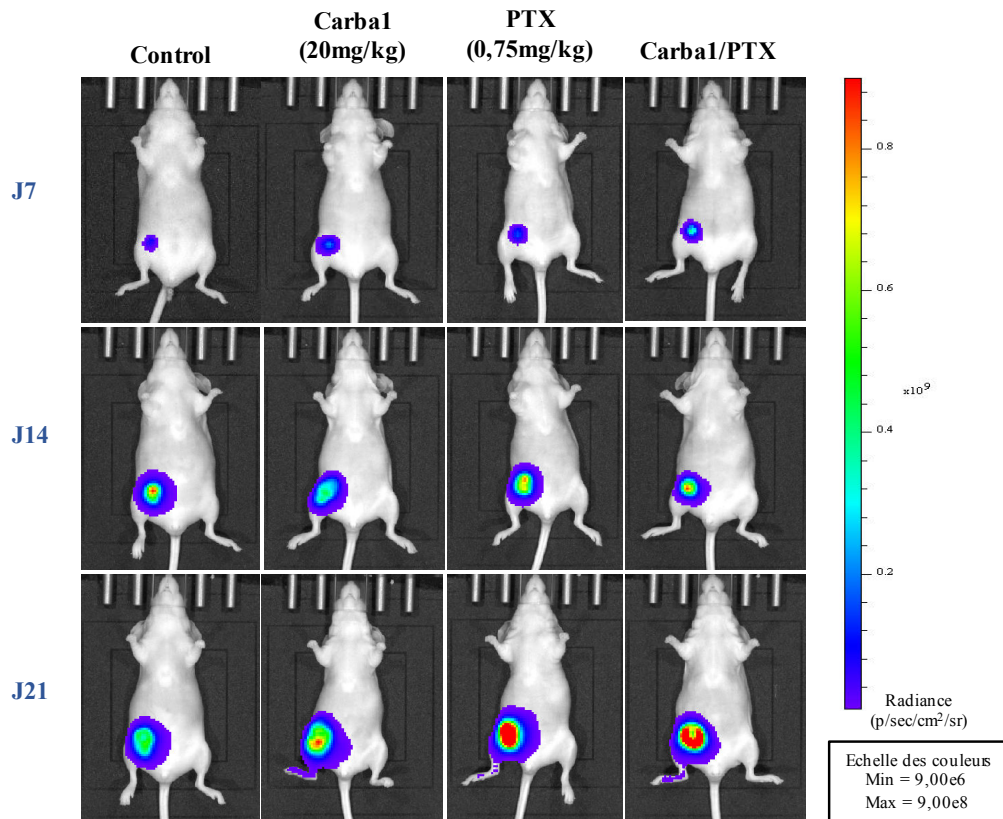


Figure 87. Analyse en bioluminescence de la croissance tumorale (première étude sur modèle murin).

Évaluation au cours du temps, de la croissance des tumeurs primaires par imagerie en bioluminescence des souris traitées ou non par carba1, PTX ou la combinaison de ces molécules, aux doses indiquées. Les images sont représentatives de chaque groupe.

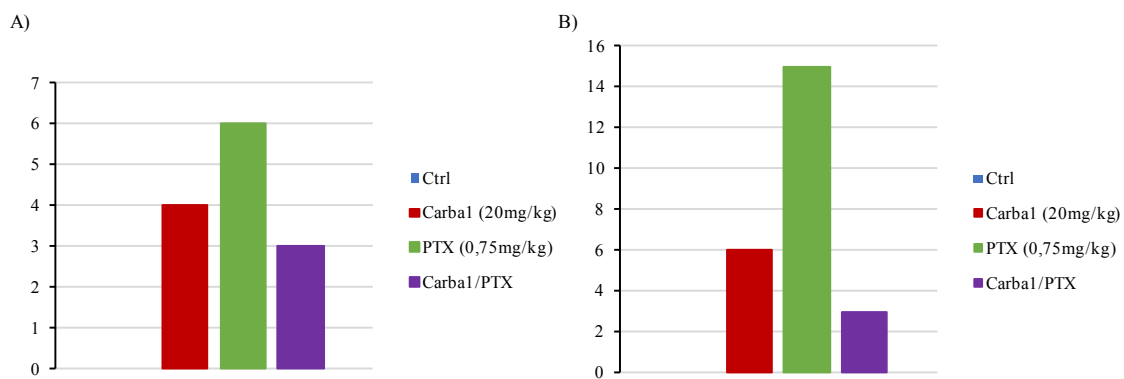


Figure 88. Analyse de l'envahissement ganglionnaire des souris après 28 jours de traitement.

A J28, les souris sont euthanasiées. Les ganglions axillaires et brachiaux sont prélevés et la présence de cellules cancéreuses 4T1 est évaluée en imagerie de bioluminescence. (A) Nombre de souris présentant des ganglions envahis. (B) Nombre de ganglions envahis par groupe de souris.

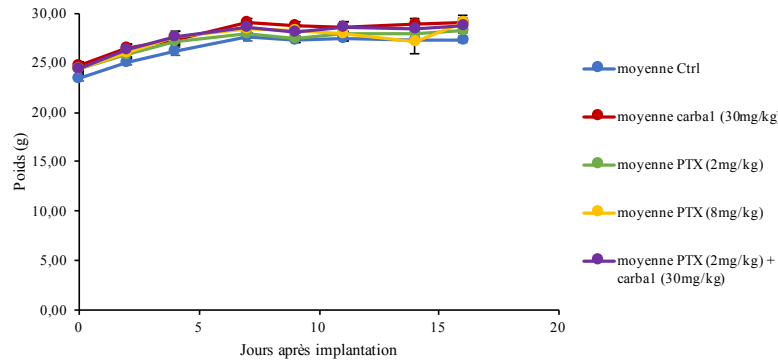


Figure 89. Évolution du poids des souris (seconde étude de l'effet anti-tumoral de la combinaison carba1/PTX sur modèle murin).

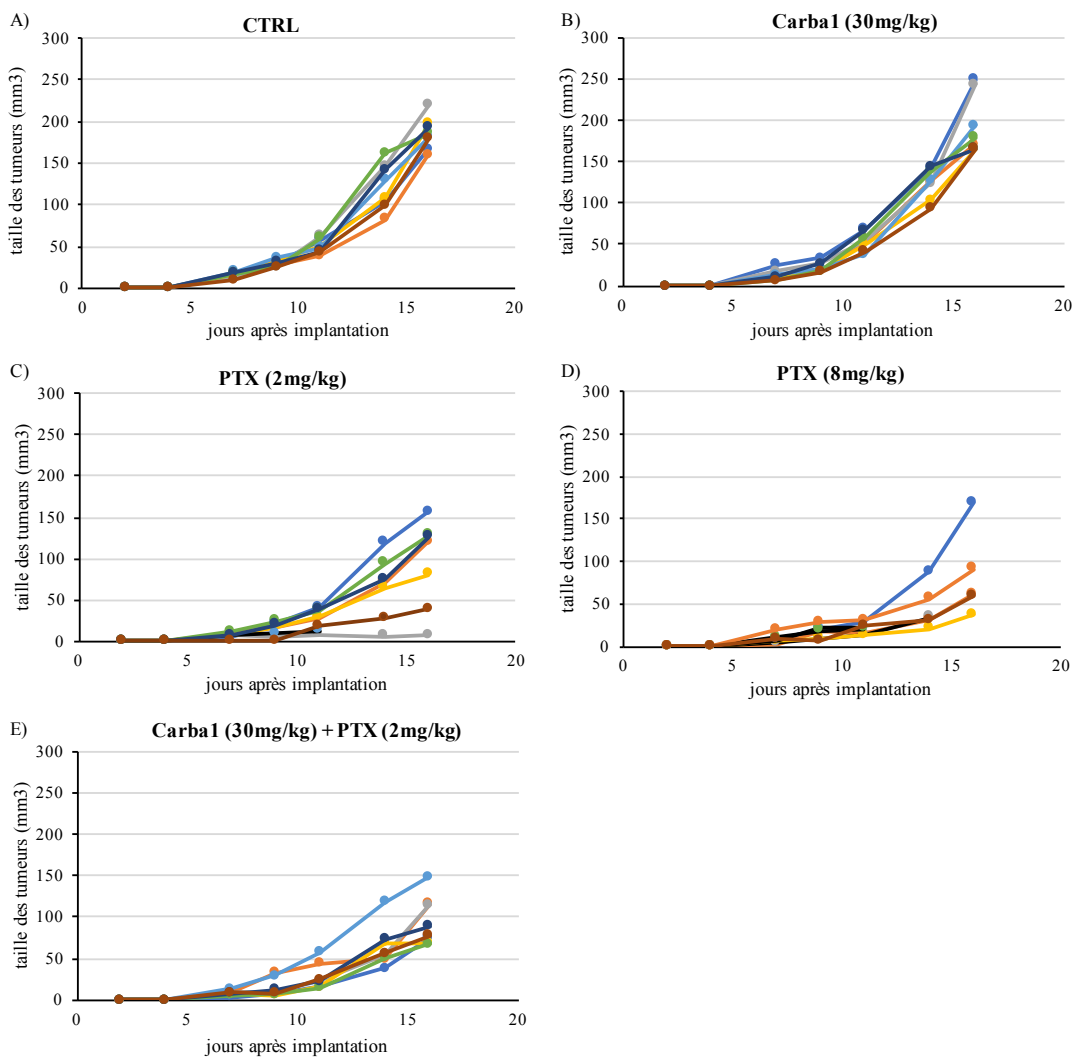


Figure 90. Évolution de la croissance des tumeurs primaires pour chaque souris de chaque groupe (seconde étude de l'effet anti-tumoral de la combinaison carba1/PTX sur modèle murin). La taille des tumeurs a été mesurée tous les 2 jours au pied à coulisse, chez les souris contrôles (A) et celles traitées avec carba1 (30mg/kg) (B), PTX (2mg/kg) (C), PTX (8mg/kg) (D), carba1 (30mg/kg) + PTX (2mg/kg) (E). Chaque courbe représente la croissance de la tumeur primaire pour une souris.

Références bibliographiques

- Aillaud, C., Bosc, C., Peris, L., Bosson, A., Heemeryck, P., Dijk, J. Van, Fric, J. Le, Boulan, B., Vossier, F., Sanman, L.E., Syed, S., Amara, N., Couté, Y., Lafanechère, L., Denarier, E., Delphin, C., Pelletier, L., Humbert, S., Bogyo, M., Andrieux, A., 2017. Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation. *Science*.
- Aillaud, C., Bosc, C., Saoudi, Y., Denarier, E., Peris, L., Sago, L., Taulet, N., Cieren, A., Tort, O., Magiera, M.M., Janke, C., Redeker, V., Andrieux, A., Moutin, M.-J., 2016. Evidence for new C-terminally truncated variants of alpha- and beta-tubulins. *Mol. Biol. Cell*.
- Akhmanova, A., Steinmetz, M.O., 2015. Control of microtubule organization and dynamics: Two ends in the limelight. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Akhmanova, A., Steinmetz, M.O., 2010. Microtubule +TIPs at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 3415–3419.
- Akhmanova, A., Steinmetz, M.O., 2008. Tracking the ends: A dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. The Self-Assembly and Dynamic Structure of Cytoskeletal Filaments. New York Garl. Sci.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. How Cells Regulate Their Cytoskeletal Filaments, New York Garl. Sci.
- Aldaz, H., Rice, L.M., Stearns, T., Agard, D.A., 2005. Insights into microtubule nucleation from the crystal structure of human γ -tubulin. *Nature*.
- Amos, L.A., Löwe, J., 1999. How Taxol® stabilises microtubule structure. *Chem. Biol.*
- Anne, D.D., Agnes, D.G., Susanne, L., Alexia, S., 2009. Les traitements médicamenteux des cancers. La ligue contre le cancer. Destin aux personnes concernées, à leurs proches.
- Arce, C.A., Rodriguez, J.A., Barra, H.S., Caputto, R., 1975. Incorporation of L. tyrosine, L. phenylalanine and L. 3,4-dihydroxyphenylalanine as single units into rat brain tubulin. *Eur. J. Biochem.*
- Argyriou, A.A., Bruna, J., Marmioli, P., Cavaletti, G., 2012. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity (CIPN): An update. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*
- Arnal, I., Heichette, C., Chrétien, D., 2004. CLIP-170/Tubulin-Curved Oligomers Coassemble at Microtubule Ends and Promote Rescues. *Curr. Biol.*
- Auckland, P., McAinsh, A.D., 2015. Building an integrated model of chromosome congression. *J. Cell Sci.*
- Ayeni, J.O., Campbell, S.D., 2014. “Ready, set, go”: Checkpoint regulation by cdk1 inhibitory phosphorylation. *Fly (Austin)*.
- Azimzadeh, J., Bornens, M., 2007. Structure and duplication of the centrosome. *J. Cell Sci.*
- Bardeesy, N., Sinha, M., Hezel, A.F., Signoretti, S., Carrasco, D.R., Depinho, R.A., 2002. Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature*.

- Barisic, M., Aguiar, P., Geley, S., Maiato, H., 2014. Kinetochore motors drive congression of peripheral polar chromosomes by overcoming random arm-ejection forces. *Nat. Cell Biol.*
- Barisic, M., Maiato, H., 2016. The Tubulin Code: A Navigation System for Chromosomes during Mitosis. *Trends Cell Biol.*
- Bartolini, F., Gundersen, G.G., 2010. Formins and Microtubules. *Biochim. Biophys.*
- Bechstedt, S., Brouhard, G.J., 2013. Motors and MAPs Collaborate to Size Up Microtubules. *Dev. Cell.*
- Bhalla, K.N., 2003. Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene.*
- Bocci, G., Di Paolo, A., Danesi, R., 2013. The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of paclitaxel. *Angiogenesis.*
- Bombuwala, K., Kinstle, T., Popik, V., Uppal, S.O., Olesen, J.B., Viña, J., Heckman, C.A., 2006. Colchitaxel, a coupled compound made from microtubule inhibitors colchicine and paclitaxel. *Beilstein J. Org. Chem.*
- Brouhard, G.J., Rice, L.M., 2014. The contribution of $\alpha\beta$ -tubulin curvature to microtubule dynamics. *J. Cell Biol.*
- Cancer Info, 2009. Comprendre la radiothérapie. INCa - Inst. Natl. du Cancer.
- Chan, S., Worth, R., Ochs, S., 1980. Block of Axoplasmic Transport in vitro by Vinca Alkaloids. *J. Neurobiol.*
- Chanez, B., Gonçalves, A., Badache, A., Verdier-Pinard, P., 2015. Eribulin targets a ch-TOG-dependent directed migration of cancer cells. *Oncotarget.*
- Chen, J., Yang, C.H., Cammer, M., Horwitz, S.B., 2003. Gene Expression and Mitotic Exit Induced by Microtubule-Stabilizing Drugs. *Cancer. Res.*
- Chen, Y., Hancock, W.O., 2015. Kinesin-5 is a microtubule polymerase. *Nat. Commun.*
- Chen, Z., Shi, T., Zhang, L., Zhu, P., Deng, M., 2016. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance : A review of the past decade. *Cancer Lett.*
- Chircop, M., 2014. Rho GTPases as regulators of mitosis and cytokinesis in mammalian cells. *Landes Biosci.*
- Chou, T.C., 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the choutalalay method. *Cancer Res.*
- Chrétien, D., Fuller, S.D., Karsenti, E., 1995. Structure of growing microtubule ends: Two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J. Cell Biol.*
- Chretien, D., Metoz, F., Verde, F., Karsenti, E., Wade, R.H., 1992. Lattice defects in microtubules: Protofilament numbers vary within individual microtubules. *J. Cell Biol.*
- Cleveland, D.W., Sullivan, K.F., 1985. Molecular Biology and Genetics of Tubulin. *Annu. Rev. Biochem.*

- Coffelt, S.B., de Visser, K.E., 2015. Immune-mediated mechanisms influencing the efficacy of anticancer therapies. *Trends Immunol.*
- Cooper, G.M., 2000. *The Cell : a molecular approach*. 2nd Edition Microtubule Motors and Movements.
- Correia, J.J., Beth, A.H., Williams, R.C., 1988. Tubulin exchanges divalent cations at both guanine nucleotide-binding sites. *J. Biol. Chem.*
- Currier, M.A., Stehn, J.R., Swain, A., Chen, D., Hook, J., Eiffe, E., Heaton, A., Brown, D., Nartker, B., Eaves, D.W., Kloss, N., Treutlein, H., Zeng, J., Alieva, I.B., Dugina, V.B., Hardeman, E.C., Gunning, P.W., Cripe, T.P., 2017. Identification of Cancer-Targeted Tropomyosin Inhibitors and Their Synergy With Microtubule Drugs. *Mol. Cancer Ther.*
- Dabydeen, D.A., Florence, G.J., Paterson, I., Hamel, E., 2004. A quantitative evaluation of the effects of inhibitors of tubulin assembly on polymerization induced by discodermolide, epothilone B, and paclitaxel. *Cancer Chemother. Pharmacol.*
- Dammermann, A., Desai, A., Oegema, K., 2003. The Minus End in Sight. *Curr Biol.*
- Danhier, F., Feron, O., Pr at, V., 2010. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J. Control. Release.*
- Danowski, B.A., 1988. Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors. *J. Cell. Sci.*
- David-Pfeuty, T., Erickson, H.P., Pantaloni, D., 1977. Guanosinetriphosphatase activity of tubulin associated with microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Dehmelt, L., Halpain, S., 2005. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.*
- Desai, A., Mitchison, T.J., 1997. Microtubule Polymerization Dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*
- Diaz, P., Horne, E., Xu, C., Hamel, E., Wagenbach, M., Petrov, R.R., Uhlenbruck, B., Haas, B., Hothi, P., Wordeman, L., Gussio, R., Stella, N., 2018. Modified carbazoles destabilize microtubules and kill glioblastoma multiform cells. *Eur. J. Med. Chem.*
- Dimitrov, A., Quesnoit, M., Moutel, S., Cantaloube, I., Po s, C., Perez, F., 2008. Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science.*
- Don, S., Verrills, N.M., Liaw, T.Y.E., Liu, M.L.M., Norris, M.D., Haber, M., Kavallaris, M., 2004. Neuronal-associated microtubule proteins class III b ta-tubulin and MAP2c in neuroblastoma : Role in resistance to microtubule-targeted drugs. *Mol. Cancer Ther.*
- Dor e, M., Galas, S., 1994. The cyclin-dependent protein kinases and the control of cell division. *Faseb J.*
- Downing, K.H., Nogales, E., 1999. Crystallographic structure of tubulin: implications for dynamics and drug binding. *Cell Struct. Funct.*
- Downing, K.H., Nogales, E., 1998a. Tubulin and microtubule structure. *Curr. Opin. Cell Biol.*

- Downing, K.H., Nogales, E., 1998b. Tubulin structure: Insights into microtubule properties and functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.*
- Drees, B., Brown, C., Barrell, B.G., Bretscher, A., 1995. Tropomyosin is essential in yeast, yet the TPM1 and TPM2 products perform distinct functions. *J. Cell Biol.*
- Dumontet, C., Jordan, M.A., 2010. Microtubule-binding agents: A dynamic field of cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*
- Dutcher, S.K., 2003. Long-lost relatives reappear: Identification of new members of the tubulin superfamily. *Curr. Opin. Microbiol.*
- Feng, L.X., Li, M., Liu, Y.J., Yang, S.M., Zhang, N., 2014. Synergistic enhancement of cancer therapy using a combination of ceramide and docetaxel. *Int. J. Mol. Sci.*
- Ferez, N.P., Gable, A., Wadsworth, P., 2010. Mitotic Functions of Kinesin-5. *Cell.*
- Ferlini, C., Cicchillitti, L., Raspaglio, G., Bartollino, S., Cimitan, S., Bertucci, C., Mozzetti, S., Gallo, D., Persico, M., Fattorusso, C., Campiani, G., Scambia, G., 2009. Paclitaxel directly binds to Bcl-2 and functionally mimics activity of Nur77. *Cancer Res.*
- Ferreira, J.G., Pereira, A.L., Maiato, H., 2014. Microtubule Plus-End Tracking Proteins and Their Roles in Cell Division, 1st ed, International Review of Cell and Molecular Biology. Elsevier Inc.
- Field, J.J., Pera, B., Gallego, J.E., Calvo, E., Rodríguez-Salarichs, J., Sáez-Calvo, G., Zuwerra, D., Jordi, M., Andreu, J.M., Prota, A.E., Ménchon, G., Miller, J.H., Altmann, K.H., Díaz, J.F., 2018. Zampanolide Binding to Tubulin Indicates Cross-Talk of Taxane Site with Colchicine and Nucleotide Sites. *J. Nat. Prod.*
- Fisher, R.P., 2005. Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *J. Cell Sci.*
- Foland, T.B., Dentler, W.L., Suprenant, K.A., Gupta, M.L., Himes, R.H., 2005. Paclitaxel-induced microtubule stabilization causes mitotic block and apoptotic-like cell death in a paclitaxel-sensitive strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.*
- Forcet, C., Etienne-Manneville, S., Gaude, H., Fournier, L., Debilly, S., Salmi, M., Baas, A., Olschwang, S., Clevers, H., Billaud, M., 2005. Functional analysis of Peutz-Jeghers mutations reveals that the LKB1 C-terminal region exerts a crucial role in regulating both the AMPK pathway and the cell polarity. *Hum. Mol. Genet.*
- Gapud, E.J., 2004. Laulimalide and Paclitaxel: A Comparison of Their Effects on Tubulin Assembly and Their Synergistic Action When Present Simultaneously. *Mol. Pharmacol.*
- Gelderblom, H., Verweij, J., Van Zomeren, D.M., Buijs, D., Ouwens, L., Nooter, K., Stoter, G., Sparreboom, A., 2002. Influence of cremophor EL on the bioavailability of intraperitoneal paclitaxel. *Clin. Cancer Res.*
- Giannakakou, P., Nakano, M., Nicolaou, K.C., O'Brate, A., Yu, J., Blagosklonny, M. V., Greber, U.F., Fojo, T., 2002. Enhanced microtubule-dependent trafficking and p53 nuclear accumulation by suppression of microtubule dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., 2008. High-efficiency yeast transformation using the LiAc / SS carrier DNA / PEG method. *Nat. Protoc.*

- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., 2007. Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.*
- Gigant, B., Martin-Barbey, C., Curmi, P., Sobel, A., Knossow, M., 2003. The stathmin–tubulin interaction and the regulation of the microtubule assembly. *Pathol. Biol.*
- Gigant, B., Wang, C., Ravelli, R.B.G., Roussi, F., Steinmetz, M.O., Curmi, P.A., Sobel, A., Knossow, M., 2005. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature.*
- Green, S., Holton, A., 2016. Drug-induced peripheral neuropathy. *Br. Med. J.*
- Grunwald, D., Mayol, J., Ronot, X., 2010. Cycle cellulaire et cytométrie en flux. *Book.*
- Guillaud, L., Bosc, C., Fourest-Lieuvain, A., Denarier, E., Pirollet, F., Lafanechère, L., Job, D., 1998. STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *J. Cell Biol.*
- Hainaut, P., Hollstein, M., 1999. p53 and Human Cancer: The First Ten Thousand Mutations. *Adv. Cancer Res.*
- Hallak, M.E., Rodriguez, J.A., Barra, H.S., Caputto, R., 1976. Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. *Febs. Lett.*
- Halpain, S., Dehmelt, L., 2006. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.*
- Haren, L., Gnadt, N., Wright, M., Merdes, A., 2009. NuMA is required for proper spindle assembly and chromosome alignment in prometaphase. *BMC Res.*
- Hasasna, H. El, Saleh, A., Samri, H. Al, Athamneh, K., Attoub, S., Arafat, K., Benhalilou, N., Alyan, S., Viallet, J., 2016. Rhus coriaria suppresses angiogenesis, metastasis and tumor growth of breast cancer through inhibition of STAT3, NF κ B and nitric oxide pathways. *Nat. Publ.*
- Helmke, K.J., Heald, R., Wilbur, J.D., 2013. Interplay Between Spindle Architecture and Function, 1st ed, *International Review of Cell and Molecular Biology.* Elsevier Inc.
- Henderson, M.C., Shaw, Y.Y., Wang, H., Han, H., Laurence, H., Flynn, G., Dorr, R.T., Hoff, D.D. Von, 2010. UA62784; a novel inhibitor of CENP-E kinesin-like protein. *Mol. Cancer Biol.*
- Huang, G.S., Lopez-Barcons, L., Freeze, B.S., Smith, A.B., Goldberg, G.L., Horwitz, S.B., McDaid, H.M., 2006. Potentiation of taxol efficacy and by discodermolide in ovarian carcinoma xenograft-bearing mice. *Clin. Cancer Res.*
- Iemura, K., Tanaka, K., 2015. Chromokinesin Kid and kinetochore kinesin CENP-E differentially support chromosome congression without end-on attachment to microtubules. *Nat. Commun.*
- Institut National du Cancer, 2017. Les cancers en France en 2016 : L'essentiel des faits et chiffres.
- Institut National du Cancer, 2008. Comprendre la chimiothérapie.
- Janke, C., 2014. The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, functions. *J. Cell Biol.*

- Janke, C., Bulinski, J.C., 2011. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: Mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Javeed, A., Ashraf, M., Riaz, A., Ghafoor, A., Afzal, S., Mukhtar, M.M., 2009. Paclitaxel and immune system. *Eur. J. Pharm. Sci.*
- Ji, H., Ramsey, M.R., Hayes, D.N., Fan, C., McNamara, K., Kozlowski, P., Torrice, C., Wu, M.C., Shimamura, T., Perera, S.A., Liang, M.C., Cai, D., Naumov, G.N., Bao, L., Contreras, C.M., Li, D., Chen, L., Krishnamurthy, J., Koivunen, J., Chiriac, L.R., Padera, R.F., Bronson, R.T., Lindeman, N.I., Christiani, D.C., Lin, X., Shapiro, G.I., Jänne, P.A., Johnson, B.E., Meyerson, M., Kwiatkowski, D.J., Castrillon, D.H., Bardeesy, N., Sharpless, N.E., Wong, K.K., 2007. LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature.*
- Jiang, H., Tao, W., Zhang, M., Pan, S., Kanwar, J.R., Sun, X., 2010. Low-dose metronomic paclitaxel chemotherapy suppresses breast tumors and metastases in mice. *Cancer Invest.*
- Jordan, M., 2012. Mechanism of Action of Antitumor Drugs that Interact with Microtubules and Tubulin. *Curr. Med. Chem. Agents*
- Jordan, M. a, Thrower, D., Wilson, L., 1992. Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J. Cell Sci.*
- Jordan, M.A., Toso, R.J., Thrower, D., Wilson, L., 1993. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Jordan, M.A., Wilson, L., 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer.*
- Jordan, M.A., Wilson, L., 1998. Use of drugs to study role of microtubule assembly dynamics in living cells. *Methods Enzymol.*
- Jue Shi, Mitchison, T.J., 2015. Cell Death Response to Anti-mitotic Drug Treatment in Cell culture, Mouse Tumor Model and the Clinic.
- Kanthou, C., Tozer, G.M., 2018. The tumor vascular targeting agent combretastatin A-4-phosphate induces reorganization of the actin cytoskeleton and early membrane blebbing in human endothelial cells. *Blood.*
- Karess, R., 2005. Rod-Zw10-Zwilch: A key player in the spindle checkpoint. *Trends Cell Biol.*
- Kastan, M.B., Bartek, J., 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature.*
- Kavallaris, M., 2010. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat. Rev. Cancer.*
- Kellogg, E.H., Hejab, N.M.A., Howes, S., Northcote, P., John, H., Díaz, J.F., Downing, K.H., Nogales, E., 2017. Insights into the distinct mechanisms of action of taxane and non-taxane microtubule stabilizers from cryo-EM structures. *J. Mol. Biol.*
- Keskin, O., Durell, S.R., Bahar, I., Jernigan, R.L., Covell, D.G., 2002. Relating molecular flexibility to function: A case study of tubulin. *Biophys. J.*

- Kita, K., Wittmann, T., Nathke, I.S., Waterman-Storer, C.M., 2006. Adenomatous Polyposis Coli on Microtubule Plus Ends in Cell Extensions Can Promote Microtubule Net Growth with or without EB1. *Mol. Biol. Cell*.
- Kline, S.L., Cheeseman, I.M., Hori, T., Fukagawa, T., Desai, A., 2006. The human Mis12 complex is required for kinetochore assembly and proper chromosome segregation. *J. Cell Biol.*
- Kobayashi, S., Tsuchiya, K., Kurokawa, T., Nakagawa, T., Shimada, N., Iitaka, Y., 1994. Pironetin, a novel plant growth regulator produced by *Streptomyces* sp. Structural elucidation. *J. Antibiot.*
- Kodama, A., Karakesisoglou, I., Wong, E., Vaezi, A., Fuchs, E., 2003. ACF7: An essential integrator of microtubule dynamics. *Cell*.
- Kollman, J.M., Merdes, A., Mourey, L., Agard, D.A., 2011. Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Komiya, Y., Tashiro, T., 1988. Effects of taxol on slow and fast axonal transport. *Cell Motil. Cytosk.*
- Komlodi-Pasztor, E., Sackett, D., Wilkerson, J., Fojo, T., 2011. Mitosis is not a key target of microtubule agents in patient tumors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*
- Komlodi-Pasztor, E., Sackett, D.L., Fojo, A.T., 2012. Inhibitors targeting mitosis: Tales of how great drugs against a promising target were brought down by a flawed rationale. *Clin. Cancer Res.*
- Kondoh, M., Usui, T., Kobayashi, S., Tsuchiya, K., Nishikawa, K., Nishikiori, T., Mayumi, T., Osada, H., 1998. Cell cycle arrest and antitumor activity of pironetin and its derivatives. *Cancer Lett.*
- Kondoh, M., Usui, T., Nishikiori, T., Mayumi, T., Osada, H., 1999. Apoptosis induction via microtubule disassembly by an antitumour compound, pironetin. *Biochem. J.*
- Kroon, J., Kooijman, S., Cho, N.J., Storm, G., Van Der Pluijm, G., 2016. Improving Taxane-Based Chemotherapy in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Trends Pharmacol. Sci.*
- Kumar, N., 1981. Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action. *J. Biol. Chem.*
- Kuznetsov, G., TenDyke, K., Towle, M.J., Cheng, H., Liu, J., Marsh, J.P., Schiller, S.E.R., Spyvee, M.R., Yang, H., Seletsky, B.M., Shaffer, C.J., Marceau, V., Yao, Y., Suh, E.M., Campagna, S., Fang, F.G., Kowalczyk, J.J., Littlefield, B.A., 2009. Tubulin-based antimetabolic mechanism of E7974, a novel analogue of the marine sponge natural product hemiasterlin. *Mol. Cancer Ther.*
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F.G., Taylor, S.S., 2012. The spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol.*
- Lens, S.M., Voest, E.E., Medema, R.H., 2010. Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. *Nat Rev Cancer.*
- Li, C., Zhang, Y., Yang, Q., Ye, F., Sun, S.Y., Chen, E.S., Liou, Y.C., 2016. NuSAP modulates the dynamics of kinetochore microtubules by attenuating MCAK depolymerisation activity. *Sci. Rep.*

- Li, Q., Ma, Z., Liu, Y., Kan, X., Wang, C., Su, B., Li, Y., Zhang, Y., Wang, P., Luo, Y., Na, D., Wang, L., Zhang, G., Zhu, X., Wang, L., 2016. Low doses of paclitaxel enhance liver metastasis of breast cancer cells in the mouse model. *Febs J.*
- Little, J.B., 2006. Cellular radiation effects and the bystander response. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*
- London, N., Biggins, S., 2014. Signaling dynamics in the spindle checkpoint response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Lord, C.J., Ashworth, A., 2010. Biology-driven cancer drug development: Back to the future. *BMC Biol.* 8. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-38>
- Lovly, C.M., Shaw, A.T., 2014. Molecular pathways: Resistance to kinase inhibitors and implications for therapeutic strategies. *Clin. Cancer Res.*
- Löwe, J., Li, H., Downing, K.H., Nogales, E., 2001. Refined structure of $\alpha\beta$ -tubulin at 3.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.*
- Lowery, L.A., Vactor, D. Van, 2009. The trip of the tip: Understanding the growth cone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Lu, Y., Chen, J., Xiao, M., Li, W., Miller, D.D., 2013. An Overview of Tubulin Inhibitors That Interact with the Colchicine Binding Site. *Pharm. Res.*
- Lv, X., He, C., Huang, C., Hua, G., Wang, Z., Remmenga, S.W., Rodabough, K.J., Karpf, A.R., Dong, J., Davis, J.S., Wang, C., 2017. G-1 Inhibits Breast Cancer Cell Growth via Targeting Colchicine-Binding Site of Tubulin to Interfere with Microtubule Assembly. *Mol. Cancer Ther.*
- Malumbres, M., Barbacid, M., 2001. Milestones in cell division: To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer.*
- Margolis, R.L., Wilson, L., 1981. Microtubule treadmills--possible molecular machinery. *Nature.*
- Martello, L. a, Mcdaid, H.M., Regl, D.L., Yang, C.H., Meng, D., Pettus, T.R.R., Kaufman, M.D., Arimoto, H., Danishefsky, S.J., Iii, A.B.S., 2000. Taxol and Discodermolide represent a synergistic drug combination in Human Carcinoma Cell Lines. *Clin. Cancer Res.*
- Martí, J., Bueso, P., Mayordomo, J., Isla, M., Saenz, A., Escudero, P., Murillo, L., Filipovich, E., Andres, R., Tres, A., 2001. Combination chemotherapy with docetaxel plus vinorelbine in metastatic breast cancer patients with prior exposure to anthracyclines. *Ann. Oncol.*
- McEwen, B.F., Heagle, A.B., Cassels, G.O., Buttle, K.F., Rieder, C.L., 1997. Kinetochore fiber maturation in PtK1 cells and its implications for the mechanisms of chromosome congression and anaphase onset. *J. Cell Biol.*
- Mcintosh, J.R., 2018. Mitosis.
- Merlo, L.M.F., Pepper, J.W., Reid, B.J., Maley, C.C., 2006. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat. Rev. Cancer.*

- Metoz, F., Arnal, I., Wade, R.H., 1997. Tomography without tilt: Three-dimensional imaging of microtubule/motor complexes. *J. Struct. Biol.*
- Miller, M.P., Asbury, C.L., Biggins, S., 2016. A TOG Protein Confers Tension Sensitivity to Kinetochore- Microtubule Attachments. *Cell.*
- Miltenburg, N.C., Boogerd, W., 2014. Chemotherapy-induced neuropathy: A comprehensive survey. *Cancer Treat. Rev.*
- Mistry, S.J., Oh, W.K., 2013. New Paradigms in Microtubule-Mediated Endocrine Signaling in Prostate Cancer. *Mol. Cancer Ther.*
- Mitchison, T.J., 2012. The proliferation rate paradox in antimetabolic chemotherapy. *Mol. Biol. Cell.*
- Mitchison, T.J., 1993. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science.*
- Mitchison, T.J., Pineda, J., Shi, J., Florian, S., 2017. Is inflammatory micronucleation the key to a successful anti-mitotic cancer drug ? *Open Biol.*
- Mohan, R., Katrukha, E.A., Doodhi, H., Smal, I., Meijering, E., Kapitein, L.C., Steinmetz, M.O., Akhmanova, A., 2013. End-binding proteins sensitize microtubules to the action of microtubule-targeting agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Moisoi, N., Erent, M., Whyte, S., Martin, S., Bayley, P.M., 2002. Calmodulin-containing substructures of the centrosomal matrix released by microtubule perturbation. *J Cell Sci.*
- Momcilovic, M., Shackelford, D.B., 2015. Targeting LKB1 in cancer – exposing and exploiting vulnerabilities. *Br. J. Cancer.*
- Mori, T., Kinoshita, Y., Watanabe, A., Yamaguchi, T., Hosokawa, K., Honjo, H., 2006. Retention of paclitaxel in cancer cells for 1 week in vivo and in vitro. *Cancer Chemother. Pharmacol.*
- Mostowy, S., Cossart, P., 2012. Septins: The fourth component of the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Mukhtar, E., Adhami, V.M., Mukhtar, H., 2014. Targeting Microtubules by Natural Agents for Cancer Therapy. *Mol. Cancer Ther.*
- Natarajan, K., Gadadhar, S., Souphron, J., Magiera, M.M., Janke, C., 2017. Molecular interactions between tubulin tails and glutamylases reveal determinants of glutamylation patterns. *EMBO Rep.*
- Nehlig, A., Molina, A., Rodrigues-Ferreira, S., Honoré, S., Nahmias, C., 2017. Regulation of end-binding protein EB1 in the control of microtubule dynamics. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Neukirchen, D., Bradke, F., 2011. Neuronal polarization and the cytoskeleton. *Semin. Cell Dev. Biol.*
- Nishita, M., Satake, T., Minami, Y., Suzuki, A., 2017. Regulatory mechanisms and cellular functions of non-centrosomal microtubules. *J. Biochem.*
- Nogales, E., 2000. Structural insights into microtubule function. *Annu. Rev. Biochem.*

- Nogales, E., Downing, K.H., Amos, L.A., Lowe, J., 1998. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat. Struct. Biol.*
- Nogales, E., Grayer Wolf, S., Khan, I.A., Ludueña, R.F., Downing, K.H., 1995. Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. *Nature.*
- Nogales, E., Wolf, S.G., Downing, K.H., 1998. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature.*
- Oakley, B.R., 2000. An abundance of tubulins. *Trends Cell Biol.*
- Oakley, B.R., Akkari, Y.N., 1999. Gamma-tubulin at ten: progress and prospects. *Cell Struct. Funct.*
- Oakley, C.E., Oakley, B.R., 1989. Identification of γ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature.*
- Obaya, a J., Sedivy, J.M., 2002. Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Orth, J.D., Kohler, R.H., Foijer, F., Sorger, P.K., Weissleder, R., Mitchison, T.J., 2011. Analysis of mitosis and antimitotic drug responses in tumors by In Vivo microscopy and single-cell pharmacodynamics. *Cancer Res.*
- Panda, D., Miller, H.P., Banerjee, a, Ludueña, R.F., Wilson, L., 1994. Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Parker, A.L., Teo, W.S., McCarroll, J.A., Kavallaris, M., 2017. An emerging role for tubulin isotypes in modulating cancer biology and chemotherapy resistance. *Int. J. Mol. Sci.*
- Pasquier, E., Honore, S., Pourroy, B., Jordan, M.A., Lehmann, M., Briand, C., Braguer, D., 2005. Concentrations of Paclitaxel Induce an Increase in Microtubule Dynamics in Endothelial Cells but Not in Cancer Cells. *Antiangiogenic.*
- Paturle-Lafanechère, L., Eddé, B., Denoulet, P., Van Dorselaer, A., Mazarguil, H., Le Caer, J.P., Wehland, J., Job, D., 1991. Characterisation of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry.*
- Paturle-Lafanechère, L., Manier, M., Trigault, N., Pirollet, F., Mazarguil, H., Job, D., 1994. Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J. Cell Sci.*
- Perez, E.A., 2009. Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. *Mol. Cancer Ther.*
- Peris, L., Bisbal, M., Martinez-Hernandez, J., Saudi, Y., Jonckheere, J., Rolland, M., Sebastien, M., Brocard, J., Denarier, E., Bosc, C., Guerin, C., Gory-Fauré, S., Deloulme, J.C., Lanté, F., Arnal, I., Buisson, A., Goldberg, Y., Blanchoin, L., Delphin, C., Andrieux, A., 2018. A key function for microtubule-associated-protein 6 in activity-dependent stabilisation of actin filaments in dendritic spines. *Nat. Commun.*
- Peris, L., They, M., Fauré, J., Saudi, Y., Lafanechère, L., Chilton, J.K., Gordon-Weeks, P., Galjart, N., Bornens, M., Wordeman, L., Wehland, J., Andrieux, A., Job, D., 2006. Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J. Cell Biol.*

- Peris, L., Wagenbach, M., Lafanechère, L., Brocard, J., Moore, A.T., Kozielski, F., Job, D., Wordeman, L., Andrieux, A., 2009. Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J. Cell Biol.*
- Peterson, J.R., Mitchison, T.J., 2002. Small molecules, big impact: A history of chemical inhibitors and the cytoskeleton. *Chem. Biol.*
- Prosser, S.L., Pelletier, L., 2017. Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Prota, A.E., Bargsten, K., Diaz, J.F., Marsh, M., Cuevas, C., Liniger, M., Neuhaus, C., Andreu, J.M., Altmann, K.-H., Steinmetz, M.O., 2014. A new tubulin-binding site and pharmacophore for microtubule-destabilizing anticancer drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Prota, A.E., Bargsten, K., Zurwerra, D., Field, J.J., Díaz, J.F., Altmann, K.-H., Steinmetz, M.O., 2013. Molecular Mechanism of Action of Microtubule-Stabilizing Anticancer Agents. *Sci.*
- Prota, A.E., Bargstena, K., Redondoc, M., Smith, A.B., Yange, C.-P.H., McDaide, H.M., Paterson, I., Horwitz, S.B., Díaz, J.F., Steinmetz, M.O., 2017. Structural Basis of Microtubule Stabilization by Discodermolide. *Chembiochem.*
- Prota, A.E., Setter, J., Waight, A.B., Bargsten, K., Murga, J., Diaz, J.F., Steinmetz, M.O., 2016. Pironetin Binds Covalently to α Cys316 and Perturbs a Major Loop and Helix of α -Tubulin to Inhibit Microtubule Formation. *J. Mol. Biol.*
- Prudent, R., Vassal-Stermann, E., Nguyen, C., Mollaret, M., Viallet, J., Desroches-Castan, A., Martinez, A., Barette, C., Pillet, C., Valdameri, G., Soleilhac, E., Di Pietro, A., Feige, J., Billaud, M., Florent, J., Lafanechère, L., 2012. Azaindole derivatives are inhibitors of microtubule dynamics, with anti-cancer and anti-angiogenic activities. *Br. J. pharmacology.*
- Pusztai, L., 2007. microtubule-targeting agents.
- Raimond, B., Gigant, B., Curmi, P.A., Jourdain, I., Lachkar, S., Sobel, A., Knossow, M., 1European, 2004. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature.*
- Ramirez-Rios, S., Serre, L., Stoppin-Mellet, V., Prezel, E., Vinit, A., Courriol, E., Fourest-Lieuvin, A., Delaroche, J., Denarier, E., Arnal, I., 2017. A TIRF microscopy assay to decode how tau regulates EB's tracking at microtubule ends. *Methods Cell Biol.*
- Rice, L.M., Montabana, E.A., Agard, D.A., 2008. The lattice as allosteric effector: Structural studies of β - and β -tubulin clarify the role of GTP in microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Rieder, C.L., 1981. The structure of the cold stable kinetochore fiber in metaphase PtK1 cells. *Chromosoma.*
- Robert, J., 2015. Pharmacologie des Cancers, Lavoisier Medecine Sciences.
- Robert, J., 2010. Hormonothérapie des cancers du sein et pharmacogénétique. Breast cancer hormone therapy and pharmacogenetics.
- Rodi, D.J., Makowski, L.E.E., 1999. Similarity between the sequences of taxol-selected peptides and the disordered loop of the anti-apoptotic protein, Bcl-2. *Pac Symp Biocomput.*

- Rodionov, V.I., Borisy, G.G., 1997. Microtubule treadmilling in vivo. *Science*.
- Rodrigues-Ferreira, S., Di Tommasso, A., Dimitrov, A., Cazaubon, S., Gruel, N., Colasson, H., Nicolas, A., Chaverot, N., Molinié, V., Reyal, F., Sigal-Zafrani, B., Terris, B., Delattre, O., Radvanyi, F., Rerez, F., Vincent-Salomon, A., Nahmias, C., 2009. 8p22 MTUS1 gene product ATIP3 is a novel anti-mitotic protein underexpressed in invasive breast carcinoma of poor prognosis. *PLoS One*.
- Rusan, N.M., Fagerstrom, C.J., Yvon, A.M., Wadsworth, P., 2001. Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin. *Mol. Biol. Cell*.
- Sadoul, K., Joubert, C., Michallet, S., Nolte, E., Peronne, L., Ramirez-Rios, S., Ribba, A.-S., Lafanechère, L., 2018. On the road to deciphering the tubulin code - focus on acetylation and deetyrosination. *Medecine/Sciences*.
- Santamaria, D., Ortega, S., 2006. Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice. *Front. Biosci*.
- Sarangapani, K.K., Asbury, C.L., 2014. Catch and release: How do kinetochores hook the right microtubules during mitosis ? *Trends Genet*.
- Saturnino, C., Iacopetta, D., Sinicropi, M.S., Rosano, C., Caruso, A., Caporale, A., Marra, N., Marengo, B., Pronzato, M.A., Parisi, O.I., Longo, P., Ricciarelli, R., 2014. N- Alkyl carbazole derivatives as new tools for alzheimer's disease: Preliminary studies. *Molecules*.
- Schiff, P.B., Fant, J., Horwitz, S.B., 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*.
- Selimovic, D., Hassan, M., Haikel, Y., Hengge, U.R., 2008. Taxol-induced mitochondrial stress in melanoma cells is mediated by activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 pathways via uncoupling protein 2. *Cell. Signal*.
- Shree, T., Olson, O.C., Elie, B.T., Kester, J.C., Garfall, A.L., Simpson, K., Bell-Mcguinn, K.M., Zabor, E.C., Brogi, E., Joyce, J.A., 2011. Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev*.
- Smith, J.A., Slusher, B.S., Wozniak, K.M., Farah, M.H., Smiyun, G., Wilson, L., Feinstein, S., Jordan, M.A., 2016. Structural basis for induction of peripheral neuropathy by microtubule-targeting cancer drugs. *Cancer Res*.
- Steinmetz, M.O., Prota, A.E., 2018. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends Cell Biol*.
- Sulimenko, V., Hájková, Z., Klebanovych, A., Dráber, P., 2017. Regulation of microtubule nucleation mediated by γ -tubulin complexes. *Protoplasma*.
- Sur, S., Agrawal, D.K., 2015. Phosphatases and Kinases Regulating CDC25 Activity in the Cell Cycle: Clinical Implications of CDC25 Overexpression and Potential Treatment Strategies.
- Tanaka, S., Nohara, T., Iwamoto, M., Sumiyoshi, K., Kimura, K., Takahashi, Y., 2009. Tau expression and efficacy of paclitaxel treatment in metastatic breast cancer.
- Tcherniuk, S., Deshayes, S., Sarli, V., Divita, G., Abrieu, A., 2011. UA62784 is a cytotoxic inhibitor of microtubules, not CENP-E. *Chem. Biol*.

- Ulitzur, N., Humbert, M., Pfeffer, S.R., 1997. Mapmodulin: A possible modulator of the interaction of microtubule-associated proteins with microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Valenzuela, P., Quiroga, M., Zaldivar, J., Rutter, W.J., Kirschner, M.W., Cleveland, D.W., 1981. Nucleotide and corresponding amino acid sequences encoded by α and β tubulin mRNAs. *Nature*.
- Verde, F., Berrez, J.-M., Antony, C., Karsenti, E., 1991. Taxol-induced Microtubule Asters in Mitotic Extracts of *Xenopus* Eggs. *J. Cell Biol.*
- Verrills, N.M., Walsh, B.J., Cobon, G.S., Hains, P.G., Kavallaris, M., 2003. Proteome Analysis of Vinca Alkaloid Response and Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia Reveals Novel Cytoskeletal Alterations.
- Vicente, J.J., Wordeman, L., 2016. Mitosis, Microtubule Dynamics and the Evolution of Kinesins. *Mitosis*.
- Vidal, A., Koff, A., 2000. Cell-cycle inhibitors: Three families united by a common cause. *Gene*.
- Vigne, E., Sassoon, I., 2014. La montée en puissance des immunoconjugués en oncologie. *Medecine/Sciences*.
- Wade, M., Li, Y.-C., M. Wahl, G., 2013. High resolution microtubule structures reveal the structural transitions in $\alpha\beta$ -tubulin upon GTP hydrolysis. *Nat. Rev. Cancer*.
- Wadsworth, P., 2015. TPX2. *Curr. Biol.*
- Walker, R.A., Inoue, S., Salmon, E.D., 1989. Asymmetric behavior of severed microtubule ends after ultraviolet-microbeam irradiation of individual microtubules in vitro. *J. Cell Biol.*
- Wang, Y., Yin, S., Blade, K., Cooper, G., Menick, D.R., Cabral, F., 2006. Mutations at leucine 215 of β -tubulin affect paclitaxel sensitivity by two distinct mechanisms. *Biochemistry*.
- Weaver, B.A., 2014. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol. Biol.*
- Wieczorek, M., Tcherkezian, J., Bernier, C., Prota, A.E., Chaaban, S., Rolland, Y., Godbout, C., Hancock, M.A., Arezzo, J.C., Ocal, O., Rocha, C., Olieric, N., Hall, A., Ding, H., Bramoullé, A., Annis, M.G., Zogopoulos, G., Harran, P.G., Wilkie, T.M., Brekken, R.A., Siegel, P.M., Steinmetz, M.O., Shore, G.C., Brouhard, G.J., Roulston, A., 2016. The synthetic diazamide DZ-2384 has distinct effects on microtubule curvature and dynamics without neurotoxicity.
- Wirtz, D., Konstantopoulos, K., Searson, P.P.C., 2011a. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat. Rev. Cancer*.
- Wirtz, D., Konstantopoulos, K., Searson, P.P.C., 2011b. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat. Rev. Cancer*.
- Yang, C.P.H., Horwitz, S.B., 2017. Taxol®: The first microtubule stabilizing agent. *Int. J. Mol. Sci.*
- Yang, J., Wang, Y., Wang, T., Jiang, J., Botting, C.H., Liu, H., Chen, Q., Yang, J., Naismith, J.H., Zhu, X., Chen, L., 2016. Pironetin reacts covalently with cysteine-316 of α -tubulin to destabilize microtubule. *Nat. Commun.*

- Yoo, L.I., Chung, D.C., Yuan, J., 2002. LKB1- A master tumour suppressor of the small intestine and beyond. *Nat. Rev. Cancer*.
- Zasadil, L.M., Andersen, K.A., Yeum, D., Rocque, G.B., Lee, G., Tevaarwerk, A.J., Raines, R.T., Burkard, M.E., Beth, A., 2014. Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles.
- Zelter, A., Bonomi, M., Kim, J. ook, Umbreit, N.T., Hoopmann, M.R., Johnson, R., Riffle, M., Jaschob, D., MacCoss, M.J., Moritz, R.L., Davis, T.N., 2015. The molecular architecture of the Dam1 kinetochore complex is defined by cross-linking based structural modelling. *Nat Commun*.
- Zhou, B.B.S., Bartek, J., 2004. Targeting the checkpoint kinases: Chemosensitization versus chemoprotection. *Nat. Rev. Cancer*.

RESUME

Les agents pharmacologiques ciblant la dynamique des microtubules (MTs) sont très utilisés en chimiothérapie des cancers agressifs. Le paclitaxel (PTX) est utilisé depuis des décennies et donne de bons résultats pour le traitement des tumeurs solides. Plusieurs inconvénients, notamment ses effets secondaires et la résistance de certains cancers limitent cependant l'efficacité de ce médicament. Dans le but d'identifier de nouveaux composés pharmacologiques qui sensibilisent les cellules au PTX, nous avons recherché, parmi une collection de 8000 molécules, celles capables de sensibiliser des cellules cancéreuses à une dose non toxique de PTX. Nous avons ainsi sélectionné un composé de la famille des carbazoles : Carba1. Dans les cellules, l'association carba1/PTX a un effet cytotoxique supérieur à la somme des effets de carba1 et de PTX, quand ces molécules sont appliquées séparément, indiquant un effet synergique. De plus, des analyses approfondies de différents phénotypes ont permis de montrer que l'administration de carba1 avait pour conséquence d'amplifier des effets du PTX.

À fortes doses, carba1 entraîne un blocage des cellules en prométaphase mais n'altère pas le réseau microtubulaire, ni en interphase ni en mitose. En revanche, *in vitro*, carba1 cible la tubuline en se fixant sur le site colchicine, provoquant un retard et une diminution de la polymérisation des MTs. En plus de la tubuline, des études génétiques réalisées sur la levure suggèrent que carba1 a d'autres cibles dont CENP-E, kinésine essentielle à l'alignement des chromosomes au cours de la mitose.

Des études menées sur un modèle de cancer mammaire murin agressif (allogreffes) ont révélé que carba1 seul et carba1/PTX ne présentaient aucune toxicité. De plus, les effets anti-tumoraux et anti-métastatiques de la combinaison carba1/PTX sur ces modèles se sont montrés encourageants, bien que des mises au point, notamment sur la posologie sont encore à prévoir. Carba1 est une molécule nouvelle, avec des applications jusque-là inconnues. C'est pourquoi une déclaration d'invention, en vue d'un dépôt de brevet, a été soumise au CNRS.

MOTS CLES : cancer, microtubules, thérapie anticancéreuse, agents ciblant les microtubules, synergie

SUMMARY

Microtubules (MTs) targeting agents are a powerful weapon in the war against aggressive cancers. Paclitaxel (PTX) has been used successfully for the treatment of solid tumors for decades. Several features, including side-effects and resistance of some cancers make this drug not always effective. With the aim to identify new chemical compounds that sensitize cells to paclitaxel we screened a library of 8,000 compounds, to select those not toxic for cell cultures when applied alone, that become toxic when applied in combination with a non-toxic dose of paclitaxel. This led to the selection of a carbazole derivative: carba1. In cells, the carba1/PTX combination has a greater cytotoxic effect than the addition of the effects of each drug assayed separately, indicating a synergistic effect. In addition, in-depth phenotypic analyzes indicate that the administration of carba1 amplifies the effects of PTX.

High doses of carba1 induce a cell blockade in prometaphase, but do not alter the MT network in interphase or mitosis. In contrast, *in vitro*, carba1 targets the tubulin colchicine binding site, causing a delay and a decrease in MT polymerization. Genetic studies conducted on yeast indicated other potential additional targets including CENP-E, an essential kinesin for chromosome alignment during mitosis.

Studies conducted on a preclinical mouse model of aggressive breast cancer (orthotopic grafts) revealed that carba1 alone and carba1/PTX showed no toxicity. In addition, the anti-tumor and anti-metastatic effects of the carba1/PTX combination on these models have been encouraging, but an optimization of the posology is still needed. Carba1 is a new molecule, with previously unknown applications. This is why a declaration of invention, with a view to filing a patent, has been submitted to the CNRS.

KEY WORDS : cancer, microtubules, therapy, microtubule targeting agents, synergy