



HAL
open science

Caractérisation *in vitro* et *in vivo* de nouveaux agents pyrrolo-pyrimidine ciblant les microtubules pour le traitement des cancers

Pauline Gilson

► **To cite this version:**

Pauline Gilson. Caractérisation *in vitro* et *in vivo* de nouveaux agents pyrrolo-pyrimidine ciblant les microtubules pour le traitement des cancers. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV037 . tel-03847726

HAL Id: tel-03847726

<https://theses.hal.science/tel-03847726v1>

Submitted on 10 Nov 2022

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 COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Pauline GILSON

Thèse dirigée par le **Dr Amandine HURBIN**, CR1, Institut pour
l'Avancée des Biosciences,
et par le **Dr Benoit BUSSER**, MCU-PH, CHU Grenoble

préparée au sein de l'**Institut pour l'Avancée des Biosciences**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant (EDCSV)**

Caractérisation *in vitro* et *in vivo* de nouveaux agents pyrrolo-pyrimidine ciblant les microtubules pour le traitement des cancers

Thèse soutenue publiquement le 30 octobre 2017

devant le jury composé de :

Mme Laurence LAFANECHERE

Directeur de recherche, Grenoble, Présidente

Mr Jean-Louis MERLIN

PU-PH, Nancy, Rapporteur

Mr Stéphane HONORE

PU-PH, Marseille, Rapporteur

Mr Charles DUMONTET

PU-PH, Lyon, Membre

Mme Amandine HURBIN

Chargé de recherche, Grenoble, Directeur de thèse

Mr Benoit BUSSER

MCU-PH, Grenoble, Directeur de Thèse



REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de mon jury :

Au président de thèse

Madame le Professeur Laurence Lafanechère

Je suis sensible à l'honneur que vous me faites de présider mon jury de thèse. Je vous remercie également pour tous les conseils que vous m'avez prodigués dans le cadre de mon comité de suivi de thèse et pour ces 4 années de collaboration fructueuses qui nous ont permis de publier un premier article. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A mes directeurs de thèse et membres du jury :

Madame le Docteur Amandine Hurbin

Je te remercie d'avoir accepté de m'encadrer pour ma thèse. Merci pour tout le temps que tu m'as consacré, pour ta patience, tes conseils avisés et ton écoute. J'ai beaucoup appris du métier de chercheur en t'observant et ai pu progresser grâce à toi sur la méthodologie et la rigueur scientifiques. Je suis très heureuse de t'avoir rencontré sur le plan professionnel mais aussi personnel.

Monsieur le Docteur Benoit Busser

Merci beaucoup pour ton soutien, tes encouragements, ta bonne humeur et pour m'avoir laissé de l'autonomie. Merci également pour tes critiques scientifiques très constructives et pour tous les conseils que tu m'as donné pour l'après-thèse. Tu as été mon mentor tout au long de mon internat et je ne l'oublierai pas.

Aux rapporteurs:

Monsieur le Professeur Jean-Louis Merlin

Je tiens sincèrement à vous remercier d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Merci également pour votre gentillesse et pour le temps que vous avez consacré à la lecture critique de mon travail. Veuillez trouver ici l'assurance de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Stéphane Honoré

Je vous remercie d'avoir accepté avec tant d'enthousiasme de participer à l'évaluation de ce travail de thèse. Un grand merci pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.

Monsieur le Professeur Charles Dumontet

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de faire partie de mon jury en tant qu'examineur et de me faire l'honneur de juger mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

Merci également à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ces travaux de thèse :

Je remercie sincèrement le Professeur Benoit Polack de m'avoir accueillie au sein de l'Institut de Biologie et Pathologie du CHU de Grenoble. Soyez assuré de ma profonde considération.

Au Professeur Pierre Hainaut, je suis très honorée de préparer ma thèse d'Université au sein de l'Institut pour l'Avancée des Biosciences (IAB) que vous dirigez. Je vous prie d'accepter mes remerciements respectueux.

Je souhaite adresser mes remerciements au Pr Patrice Faure pour m'avoir accueillie au sein du Département de Biochimie Toxicologie et Pharmacologie et pour son investissement dans la filière IPR en tant que coordinateur local.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance envers le Docteur Jean-Luc Coll pour son accueil au sein de l'équipe 5, ses encouragements, ses questions toujours pertinentes et son grand soutien.

Au Dr Isabelle Arnal, je tiens à vous exprimer mes sincères remerciements d'avoir accepté de participer à mes comités de suivi de thèse. Merci pour vos conseils scientifiques avisés et votre disponibilité.

Je souhaiterais exprimer ma gratitude à tous les membres de l'équipes 5 : Yoon, Estelle, Jonathan, Morgane, Mélanie, Maxime, Thibault, Véronique, Xavier, Annie, Lucie, Julien, Laetitia, et à tous les anciens membres pour leur accueil, leur gentillesse, leurs conseils et leur bonne humeur.

Je remercie également toute l'équipe 2 : Béatrice, Sylvie, Marie, Anne-Sophie, Céline, Pascal.

Une pensée pour tous les membres de l'Unité Médicale de Biochimie des Cancers et
Biothérapies du CHU de Grenoble.

Je remercie chaleureusement les Docteurs Fernando Josa-Prado et Jose Fernando Diaz
Pereira, le Docteur Pierre Falson et Alexis Moreno pour leurs collaborations et leurs
remarques précieuses.

Merci également à Mylène Pezet, Alexei Grichine et Jacques Mazzega pour leur aide
précieuse en microscopie.

Merci à tous mes amis pour les bons moments de détente lors de ces années de doctorat.

A la famille Blanquiot pour son accueil et sa gentillesse.

A toute ma famille, qui m'a toujours soutenue pendant toutes ces années, m'a aidée lors des
grandes décisions à prendre, et m'a fait décompresser les week-ends.

A toi, mon Max, qui malgré l'éloignement a toujours été là au quotidien pour m'écouter et me
soutenir tout au long de ces quatre années de thèse. Merci pour toute l'aide que tu m'as
apporté pour la finalisation de cette thèse.

A tous ceux qui vont se chercher dans ces lignes et que j'ai involontairement oublié de citer.

AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé lors de mes 3 dernières années d'internat en pharmacie et de mon Année Recherche à l'Institut pour l'Avancée des Biosciences (IAB, CRI UGA/Inserm U1209-CNRS UMR 5309), au sein de l'équipe COLL "Thérapie ciblée, diagnostic précoce et imagerie du cancer". Les expérimentations décrites dans ce manuscrit ont été financées par l'INSERM, le CNRS, l'Université Grenoble Alpes et par les bourses La Fondation de France, La Ligue contre le Cancer (comité de l'Isère), le Cancéropôle CLARA (Lyon Auvergne Rhône-Alpes) et BFU2016-75319-R (AEI/FEDER, UE) du Ministerio de Economía y Competitividad.

Ce travail a donné lieu aux publications et communications suivantes :

Publications :

Articles dans des revues internationales à comité de lecture

Gilson P, Josa-Prado F, Beauvineau C, Naud-Martin D, Vanwonderghem L, Mahuteau-Betzer F, Moreno A, Falson P, Lafanechère L, Frachet V, Coll JL, Díaz JF, Hurbin A, Busser B. Identification of a pyrrolopyrimidine derivative PP-13 as a novel microtubule-destabilizing agent with promising anticancer properties. **Sci. Rep.**, accepté juil 2017, sous presse. DOI:10.1038/s41598-017-09491-9 (cf Article 1).

Gilson P, Mediouni L, Couvet M, Vanwonderghem L, Henry M, Vollaire J, Josserand V, Mahuteau-Betzer F, Lafanechère L, Coll JL, Busser B, Hurbin A. PP-13, a new colchicine-binding site agent with *in vitro* and *in vivo* antimigration and antiangiogenic activities. En préparation (cf Article 2).

Gilson P, Coll JL, Busser B, Hurbin A. Microtubule-targeting agents in NSCLC therapy. Revue en préparation.

Livres

Bourgoin-Voillard S, Rachidi W, Sève M *et al.* Introduction aux biotechnologies en santé - Tome 1. **Edition Lavoisier**, décembre 2015 (participation à la rédaction du chapitre de biologie moléculaire).

Communications orales :

Identification d'un dérivé pyrrolo-pyrimidine pour contourner la résistance à l'apoptose des cancers pulmonaires non-à-petites cellules. **Congrès « Journée de la Recherche Médicale » (JRM)**, juin 2016, Grenoble.

Identification de dérivés pyrrolo-pyrimidine pour contourner la résistance à l'apoptose des cancers pulmonaires non-à-petites cellules : apport de la microscopie confocale. **II^{ème} journée scientifique de l'Association des internes en pharmacie et biologie de Grenoble (AAIPBG)**, sept 2016, Grenoble.

Communications affichées :

Gilson P, Josa-Prado F, Beauvineau C, Naud-Martin D, Vanwonderghem L, Mahuteau-Betzer F, Moreno A, Falson P, Lafanechère L, Frachet V, Coll JL, Díaz JF, Hurbin A, Busser B. The pyrrolopyrimidine derivative PP-13 is a novel tubulin-binding agent with promising anticancer and antimetastatic properties. **Forum de la Recherche en Cancérologie Auvergne-Rhône-Alpes (CLARA)**, avril 2017, Lyon.

Gilson P, Josa-Prado F, Beauvineau C, Mahuteau-Betzer F, Moreno A, Falson P, Lafanechère L, Frachet V, Coll JL, Díaz JF, Hurbin A, Busser B. A new pyrrolo-pyrimidin derivative (PP13) as a potent anti-cancer agent for the treatment of resistant Non-small Cell Lung Cancers. **Les 12^{èmes} Journées de la Recherche Respiratoire (J2R)**, octobre 2016, Nice.

Gilson P, Mahuteau-Betzer F, Beauvineau C, Coll JL, Hurbin A, Busser B. Identification of a pyrrolo-pyrimidin derivative to overcome the resistance to apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer cells. **European Association for Cancer Research (EACR)**, juillet 2016, Manchester (Royaume-Uni).

Gilson P, Mahuteau-Betzer F, Beauvineau C, Coll JL, Hurbin A, Busser B. Identification d'un dérivé pyrrolo-pyrimidine pour contourner la résistance à l'apoptose des cancers pulmonaires non-à-petites cellules. **Journée de la Recherche Médicale (JRM)**, juin 2016, Grenoble.

Gilson P, Mahuteau-Betzer F, Beauvineau C, Coll JL, Hurbin A, Busser B. Identification of a pyrrolo-pyrimidin derivative to overcome the resistance to apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer cells. **Symposium EMBL Microtubules**, mai 2016, Heidelberg (Allemagne).

Gilson P, Mahuteau-Betzer F, Beauvineau C, Coll JL, Hurbin A, Busser B. Pyrrolo-pyrimidin derivatives obtained from a cell-based screening with antiproliferative and proapoptotic activities in resistant non-small cell lung cancer cells. **Les 11èmes Journées de la Recherche Respiratoire (J2R)**, octobre 2015, Dijon.

Gilson P, Vanwonderghem L, Mahuteau-Betzer F, Beauvineau C, Coll JL, Hurbin A, Busser B. New compounds from a high throughput cell-based screening restoring apoptosis in resistant lung cancer cells. **International symposium of the Cancer research Center of Lyon (CRCL)**, sept 2015, Lyon.

Gilson P, Vanwonderghem L, Mahuteau-Betzer F, Beauvineau C, Coll JL, Hurbin A, Busser B. New compounds from a high throughput cell-based screening to overcome the resistance to apoptosis and current cancer therapies in non-small cell lung cancers. **Oncoriales**, juil 2015, Andrézieux.

Gilson P, Vanwonderghem L, Mahuteau-Betzer F, Beauvineau C, Coll JL, Hurbin A, Busser B. Identification de nouvelles molécules (issues d'un criblage cellulaire à haut débit) capables de restaurer l'apoptose dans des cellules résistantes de CPNPC. **Journée de la Recherche Médicale (JRM)**, mai 2015, Grenoble.

Gilson P, Vanwonderghem L, Mahuteau-Betzer F, Beauvineau C, Coll JL, Hurbin A, Busser B. New compounds (from a high throughput cell-based screening) are able to restore apoptosis in resistant lung cancer cells. **Congrès de l'école doctorale Chimie et Sciences du vivant (EDCSV)**, mai 2015, Grenoble.

Gilson P, Vanwonderghem L, Mahuteau-Betzer F, Beauvineau C, Coll JL, Hurbin A, Busser B. New compounds (from a high throughput cell-based screening) are able to restore apoptosis in resistant NCLC cells. **Forum de la Recherche en Cancérologie Auvergne-Rhône-Alpes (CLARA)**, avril 2015, Lyon.

Gilson P, Vanwonderghem L, Mahuteau-Betzer F, Piguel S, Coll JL, Hurbin A, Busser B. High throughput screening to identify new compounds with proapoptotic activity in resistant lung cancer cells. **Les 10èmes Journées de la Recherche Respiratoire (J2R)**, octobre 2014, Bordeaux.

Prix et distinctions honorifiques :

Lauréate du prix du poster lors du congrès « Journée de la Recherche Respiratoire (J2R) », octobre 2016, Nice.

Lauréate du Prix Jacques Rocipon, septembre 2015, Grenoble.

Lauréate de la bourse « Année Recherche » des internes de la région Rhône Alpes Auvergne, juillet 2015, Grenoble.

Résumé vulgarisé en français

CARACTERISATION *IN VITRO* ET *IN VIVO* DE NOUVEAUX AGENTS PYRROLO-PYRIMIDINE CIBLANT LES MICROTUBULES POUR LE TRAITEMENT DES CANCERS

Actuellement, les chimiothérapies restent un gold-standard pour le traitement de nombreux cancers et parmi celles-ci, les agents ciblant les microtubules sont très largement utilisés. Cependant, leurs effets indésirables et l'émergence de chimiorésistance limitent leur efficacité et soulignent la nécessité d'identifier de nouveaux traitements.

Notre équipe a identifié de nouveaux agents pyrrolo-pyrimidine (PP-2 et PP-13) interférant avec les microtubules. Notre objectif est de caractériser *in vitro* et *in vivo* ces molécules afin d'identifier à terme un potentiel candidat-médicament pour le traitement des cancers résistants. Comparativement aux antimétabolites utilisés en clinique, PP-2 et PP-13 ne sont pas sensibles aux principaux mécanismes de chimiorésistance et semblent peu toxiques. L'ensemble de nos résultats suggèrent que ces composés pourraient être une alternative intéressante pour le traitement de nombreux cancers y compris des cancers chimiorésistants.

Résumé vulgarisé en anglais

CHARACTERIZATION OF NEW MICROTUBULE-TARGETING AGENTS WITH A PYRROLOPYRIMIDINE STRUCTURE FOR THE TREATMENT OF CANCERS

Currently, chemotherapies remain a gold standard for the treatment of many cancers and among them, microtubule-targeting agents are widely used. However, their troublesome side-effects and the emergence of resistance highlight the need for identifying alternative agents. Our team identified new pyrrolopyrimidine-based agents interfering with microtubules dynamics (PP-2 and PP-13). Our goal was to characterize *in vitro* and *in vivo* these molecules in order to identify a potential candidate-drug for the treatment of resistant cancers. Compared to antimetabolic agents used in clinic, PP-2 and PP-13 are not sensitive to the main mechanisms of chemoresistance and seem to be less toxic. Our results suggest that these compounds could be interesting alternative for the treatment of many cancers including chemoresistant cancers.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	5
AVANT-PROPOS	11
TABLE DES MATIERES	19
TABLE DES FIGURES	25
LISTE DES TABLEAUX.....	33
ABREVIATIONS	37
1 INTRODUCTION.....	43
1.1 Les cancers	43
1.1.1 Généralités.....	43
1.1.2 Données épidémiologiques des cancers	43
1.1.3 Facteurs étiologiques et facteurs de risque.....	45
1.1.3.1 Le tabagisme	45
1.1.3.2 L'alcool.....	46
1.1.3.3 Les infections chroniques	47
1.1.3.4 Les habitudes alimentaires et les conditions de vie	48
1.1.3.5 Les expositions professionnelles.....	48
1.1.3.6 La pollution de l'environnement.....	50
1.1.3.7 L'exposition aux rayonnements ultraviolets.....	50
1.1.3.8 La Prédisposition génétique	50
1.1.4 Classification des cancers.....	52
1.1.4.1 Classification histologique.....	52
1.1.4.1.1 Les cancers broncho-pulmonaires à petites cellules.....	52
1.1.4.1.2 Les cancers broncho-pulmonaires non-à-petites cellules	52
1.1.4.2 Classification TNM (UICC)	53
1.1.5 Physiopathologie	55
1.1.6 Caractéristiques moléculaires des cancers	58
1.1.6.1 Les (proto-)oncogènes	59
1.1.6.1.1 ras.....	59
1.1.6.1.2 EGFR.....	61
1.1.6.1.3 HER2	61
1.1.6.1.4 ALK.....	61

1.1.6.1.5	BRAF.....	61
1.1.6.1.6	MET.....	61
1.1.6.1.7	FGFR1 et FGFR2	62
1.1.6.1.8	PI3KCA	62
1.1.6.1.9	c-KIT	62
1.1.6.2	Les gènes suppresseurs de tumeurs (ou anti-oncogènes).....	62
1.1.6.2.1	p53	63
1.1.6.2.2	p14 ^{ARF}	63
1.1.6.2.3	p16 ^{Ink4a}	64
1.1.6.2.4	RB.....	64
1.1.6.2.5	PTEN	64
1.1.6.2.6	LKB1	64
1.1.6.2.7	BRCA1 et BRCA2.....	64
1.1.7	Prise en charge thérapeutique des cancers	65
1.1.7.1	Diagnostic	65
1.1.7.2	Pronostic	69
1.1.7.3	Thérapeutique	72
1.1.7.3.1	La chirurgie.....	72
1.1.7.3.2	La radiothérapie	73
1.1.7.3.3	La chimiothérapie	75
1.1.7.3.4	L'hormonothérapie	79
1.1.7.3.5	L'immunothérapie	79
1.1.7.3.6	Les thérapies ciblées	81
1.1.7.4	Suivi des patients	89
1.2	Microtubules.....	93
1.2.1	Structure des microtubules	93
1.2.1.1	Structure générale	93
1.2.1.2	La tubuline	94
1.2.1.2.1	Les tubulines α et β	95
1.2.1.2.2	La tubuline γ	97
1.2.1.2.3	Les isotypes de tubuline	97
1.2.1.2.4	Les modifications post-traductionnelles de la tubuline	97
1.2.2	Dynamique des microtubules	99

1.2.2.1	Cinétique d'assemblage/désassemblage des microtubules <i>in vitro</i>	99
1.2.2.2	Dynamique des microtubules <i>in vivo</i>	104
1.2.2.2.1	Les centres organisateurs de microtubules (COMT)	104
1.2.2.2.2	Les protéines régulatrices de la dynamique des microtubules	109
1.2.3	Fonctions des microtubules	117
1.2.3.1	Rôles des microtubules dans les cellules en interphase	117
1.2.3.2	Rôles des microtubules dans les cellules en mitose	118
1.2.3.2.1	Le fuseau microtubulaire mitotique	120
1.2.3.2.2	Attachement des chromosomes au fuseau mitotique et point de contrôle mitotique	121
1.2.4	Les agents ciblant les microtubules	122
1.2.4.1	Les agents stabilisateurs de microtubules	123
1.2.4.1.1	Domaine de liaison des taxanes	123
1.2.4.1.2	Domaine de liaison du laulimalide et du péloruside A	124
1.2.4.2	Les agents déstabilisateurs de microtubules	125
1.2.4.2.1	Domaine de liaison des colchicinoïdes	125
1.2.4.2.2	Domaine de liaison des vinca-alcaloïdes ou domaine vinca	127
1.2.4.2.3	Autres domaines de liaison des MDA	129
1.2.5	Résistances aux agents ciblant les microtubules	130
1.2.5.1	La surexpression de pompes membranaires d'efflux	131
1.2.5.2	L'altération qualitative ou quantitative des microtubules ou des protéines associées	132
1.2.5.3	L'altération des interactions entre les microtubules et les autres membres du cytosquelette	132
1.2.5.4	L'altération des processus apoptotiques	133
2	OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	137
3	RESULTATS	141
3.1	Le criblage cellulaire	141
3.2	Caractérisation biologique et biochimique de PP-13	143
3.2.1	Article 1 :	143
3.2.1.1	Présentation de l'étude	143
3.2.1.2	Méthodes	143
3.2.1.3	Résultats	144
3.2.1.4	Conclusions	168

3.2.2	Résultats complémentaires : Caractérisation biologique et biochimique de PP-2.....	169
3.2.2.1	Efficacité anticancéreuse et toxicité de PP-2 <i>in vitro</i>	170
3.2.2.2	Mécanisme d'action de PP-2	171
3.2.3	Article 2.....	175
3.2.3.1	Présentation de l'étude.....	175
3.2.3.2	Méthodes.....	175
3.2.3.3	Résultats.....	176
3.2.3.4	Conclusions.....	214
3.2.4	Résultats complémentaires.....	215
4	DISCUSSION	219
4.1	PP-13 : un nouvel agent poison du fuseau	219
4.2	Activité antitumorale de PP-13 <i>in vitro</i>	221
4.3	Activité anti-tumorale de PP-13 <i>in vivo</i>	223
4.4	Evaluation toxicologique de PP-13	225
4.5	Intérêt de PP-13 comparativement aux autres agents ciblant les microtubules	226
5	BIBLIOGRAPHIE	231

TABLE DES FIGURES

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1. ESTIMATION DU NOMBRE DE CAS ET DE DECES PAR LOCALISATION EN 2012 EN FRANCE, CHEZ L'HOMME ET LA FEMME	44
FIGURE 2. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PROCESSUS PHYSIOPATHOLOGIQUES IMPLIQUES DANS LA SURVENUE D'UNE TUMEUR	56
FIGURE 3. LES CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES (OU HALLMARKS) D'UNE CELLULE CANCEREUSE, SELON D. HANAHAN ET R.A.WEINBERG	57
FIGURE 4. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES VOIES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRES ALTEREES LORS DE LA TUMORIGENESE	58
FIGURE 5. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PRINCIPAUX ACTEURS DES VOIES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRES ALTERES DANS LES CANCERS.	60
FIGURE 6. LES VOIES P16 ^{INK4A} /RB ET P14 ^{ARF} /P53 IMPLIQUEES DANS LA REGULATION DU CYCLE CELLULAIRE.....	63
FIGURE 7. SURVIE RELATIVE A 5 ANS DE 25 LOCALISATIONS DE CANCER EN FONCTION DE LEUR INCIDENCE ANNUELLE.....	70
FIGURE 8. PART DES DIFFERENTES OPTIONS MEDICAMENTEUSES DANS LA PRISE EN CHARGE DES CANCERS.....	75
FIGURE 9. THERAPIES CIBLANT LES HALLMARKS DU CANCER	81
FIGURE 10. MECANISME D'ACTION DES INHIBITEURS DE PROTEINES KINASES	83
FIGURE 11. PRINCIPALES MUTATIONS DE L'EGFR CONFERANT UNE SENSIBILITE OU UNE RESISTANCE AUX EGFR-TKI	84
FIGURE 12. LES PRINCIPAUX COMPOSANTS DU CYTOSQUELETTE DANS LES CELLULES EUCARYOTES.....	93
FIGURE 13. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MICROTUBULES.....	94
FIGURE 14. STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE L'HETERODIMERE D' A/B TUBULINE (DIAGRAMME RIBBON).	95
FIGURE 15. LES DOMAINES FONCTIONNELS DE L'HETERODIMERE DE TUBULINE.....	96
FIGURE 16. LOCALISATION DES PRINCIPALES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES.	99
FIGURE 17. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ASSEMBLAGE DES MICROTUBULES IN VITRO PAR SUIVI TURBIDIMETRIQUE A 350 NM.	100
FIGURE 18. REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN MICROTUBULE EN COURS D'ELONGATION.....	101

FIGURE 19.	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PHENOMENE DE TAPIS ROULANT.	102
FIGURE 20.	L'INSTABILITE DYNAMIQUE DES MICROTUBULES. REPRESENTATION SCHEMATIQUE ILLUSTRANT L'ALTERNANCE DES PHASES DE CROISSANCE ET DE DESASSEMBLAGE DES MICROTUBULES.....	103
FIGURE 21.	L'INSTABILITE DYNAMIQUE DES MICROTUBULES : IMAGES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	103
FIGURE 22.	L'INSTABILITE DYNAMIQUE DES MICROTUBULES : KYMOGRAPHE.....	104
FIGURE 23.	STRUCTURE DES CENTROSOMES	105
FIGURE 24.	LES COMPLEXES DE γ -TUBULINE (γ -TURC) SONT DES AGENTS NUCLEATEURS DE MICROTUBULES.....	106
FIGURE 25.	LE CYCLE DE DUPLICATION DES CENTROSOMES.	107
FIGURE 26.	STRUCTURE DES CILS ET DES FLAGELLES.....	108
FIGURE 27.	LES COMT NON CENTROSOMEAUX.....	108
FIGURE 28.	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU RESEAU MICROTUBULAIRE INTERPHASIQUE.	117
FIGURE 29.	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU TRANSPORT INTRACELLULAIRE DES CARGOS PAR LES MAPS MOTRICES LE LONG DES MICROTUBULES	118
FIGURE 30.	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE DANS LES CELLULES EUCARYOTES.....	118
FIGURE 31.	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES 3 TYPES DE MICROTUBULES MITOTIQUES.	120
FIGURE 32.	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES CONFIGURATIONS D'ATTACHEMENT DES KINETOCHORES AU FUSEAU MITOTIQUE	121
FIGURE 33.	MECANISME DU SAC.	122
FIGURE 34.	STRUCTURE ET DOMAINE DE LIAISON DU PACLITAXEL SUR LA TUBULINE	124
FIGURE 35.	STRUCTURE ET DOMAINE DE LIAISON DU PELORUSIDE A SUR LA TUBULINE.....	125
FIGURE 36.	STRUCTURE ET DOMAINE DE LIAISON DE LA COLCHICINE SUR LA TUBULINE.	126
FIGURE 37.	STRUCTURE ET DOMAINE DE LIAISON DE LA VINBLASTINE SUR LA TUBULINE.....	128
FIGURE 38.	STRUCTURE ET DOMAINE DE LIAISON DE LA PIRONETINE SUR LA TUBULINE..	129
FIGURE 39.	STRUCTURE ET DOMAINE DE LIAISON DU PM060184 SUR LA TUBULINE.....	130
FIGURE 40.	PRINCIPAUX MECANISMES DE RESISTANCE AUX AGENTS CIBLANT LES MICROTUBULES	131

FIGURE 41. LE PHARMACOPHORE « 6-METHYL-7H-PYRROLO[2,3-D]PYRIMIDIN-4-AMINE » DES COMPOSES CHIMIQUES ETUDIES.	141
FIGURE 42. EFFETS DES 15 DERIVES PYRROLOPYRIMIDINE (ABREGES 1-15) SUR LA PROLIFERATION D'UNE LIGNEE DE CBNPC H358.....	142
FIGURE 43. STRUCTURE CHIMIQUE DE LA MOLECULE PP-2.....	169
FIGURE 44. PP-2 INHIBE LA PROLIFERATION CELLULAIRE D'UN LARGE PANEL DE LIGNEES CANCEREUSES HUMAINES.....	170
FIGURE 45. PP-2 INTERFERE AVEC LA PROGRESSION DU CYCLE CELLULAIRE.....	171
FIGURE 46. PP-2 PERTURBE L'ORGANISATION DES FUSEAUX MITOTIQUES ET DES CENTRES ORGANISATEURS DE MICROTUBULES. LES CELLULES HELA SONT TRAITEES OU NON PENDANT 24H PAR PP-2 (A L'IC ₅₀) ET SONT ANALYSEES PAR IMMUNOFLUORESCENCE.	172
FIGURE 47. PP-2 EST UN AGENT DEPOLYMERISANT LES MICROTUBULES QUI SE LIE AU SITE COLCHICINE DE LA TUBULINE.....	174
FIGURE 48. EFFETS DE PP-13 SUR LA CROISSANCE TUMORALE DANS UN MODELE DE CANCER MAMMAIRE ORTHOTOPIQUE 4T1-RVLUC2	215
FIGURE 49. INDUCTION DE NECROSE DANS LES TUMEURS PRIMAIRES DANS UN MODELE ORTHOTOPIQUE DE CANCER MAMMAIRE 4T1-RVLUC2 22 JOURS APRES L'IMPLANTATION TUMORALE	216
FIGURE 50. STRUCTURE ET CARACTERISTIQUES CHIMIQUES DES COMPOSES PP-2 ET PP-13.....	220

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.	PRINCIPAUX FACTEURS DE RISQUE RECONNUS ET PRINCIPAUX CANCERS DANS LESQUELS ILS SONT IMPLIQUES	45
TABLEAU 2.	PRINCIPAUX AGENTS INFECTIEUX IMPLIQUES DANS LE DEVELOPPEMENT DE CANCERS.....	47
TABLEAU 3.	PRINCIPAUX CANCERIGENES A USAGE PROFESSIONNEL ET LOCALISATIONS DES CANCERS ASSOCIES..	49
TABLEAU 4.	PRINCIPALES PREDISPOSITIONS GENETIQUES ET PRINCIPAUX GENES ASSOCIES.	51
TABLEAU 5.	EXEMPLE DE CLASSIFICATION TNM : 7 ^{EME} EDITION DE LA CLASSIFICATION POUR LE CANCER PULMONAIRE, ETABLIE EN 2009	54
TABLEAU 6.	INTERET DES PRINCIPAUX MARQUEURS TUMORAUX POUR LE DEPISTAGE, LE DIAGNOSTIC OU LE PRONOSTIC DES TUMEURS SOLIDES.	66
TABLEAU 7.	BIOMARQUEURS PREDICTIFS DE LA REPOSE A UNE THERAPIE CIBLEE EN 2014 VALIDES PAR L'INCA.....	68
TABLEAU 8.	SCORE DE PERFORMANCE ETABLI PAR L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE (OMS) ET L'EASTERN COOPERATIVE ONCOLOGY GROUP (ECOG).....	69
TABLEAU 9.	LA CLASSIFICATION DE D'AMICO	71
TABLEAU 10.	PRINCIPAUX EFFETS INDESIRABLES IMPUTABLES A LA RADIOTHERAPIE.	74
TABLEAU 11.	PRINCIPAUX EFFETS INDESIRABLES COMMUNS AUX AGENTS CHIMIOTHERAPEUTIQUES ET CONDUITES A TENIR	76
TABLEAU 12.	PRINCIPAUX AGENTS CHIMIOTHERAPEUTIQUES, MECANISME D'ACTION ET EFFETS INDESIRABLES SPECIFIQUES ASSOCIES.	77
TABLEAU 13.	LES 43 THERAPIES CIBLEES AUTORISEES (AYANT UNE AMM OU UNE ATU DE COHORTE) POUR LE TRAITEMENT DES CANCERS FIN 2015	82
TABLEAU 14.	PRINCIPAUX EFFETS INDESIRABLES DES THERAPIES CIBLEES.	87
TABLEAU 15.	PRINCIPALES ANOMALIES RECHERCHEES DANS LE CADRE DU PROGRAMME ACSE	88
TABLEAU 16.	INTERET DES PRINCIPAUX MARQUEURS TUMORAUX POUR LE SUIVI THERAPEUTIQUE DES TUMEURS SOLIDES.	89
TABLEAU 17.	LES PRINCIPALES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE LA TUBULINE ET DES MICROTUBULES	98
TABLEAU 18.	PRINCIPAUX CONSTITUANTS ET REGULATEURS DES γ -TURC	106
TABLEAU 19.	LES PRINCIPALES MAPS STABILISATRICES, LEUR LOCALISATION AU NIVEAU DES MICROTUBULES ET LEURS FONCTIONS BIOCHIMIQUES	110
TABLEAU 20.	LES PRINCIPALES MAPS DESTABILISATRICES, LEUR LOCALISATION AU NIVEAU DES MICROTUBULES ET LEURS FONCTIONS BIOCHIMIQUES.....	115
TABLEAU 21.	LES PRINCIPAUX TAXANES ET LEURS INDICATIONS THERAPEUTIQUES	123
TABLEAU 22.	LA COLCHICINE ET SES INDICATIONS THERAPEUTIQUES	125
TABLEAU 23.	LES VINCA-ALCALOÏDES ET LEURS INDICATIONS THERAPEUTIQUES	127
TABLEAU 24.	SENSIBILITE DES AGENTS CIBLANT LES MICROTUBULES AUX DIFFERENTS MECANISMES DE CHIMIORESISTANCE.....	132

ABBREVIATIONS

ABREVIATIONS

γ-TuRC	:	γ -Tubulin Ring Complex
γ-TuSC	:	γ -Tubulin Small Complex
+TIPs	:	Microtubule plus-end Tracking Proteins
-TIPs	:	Microtubule minus-end Tracking Proteins
ABC family	:	ATP Binding Cassette family
ADCC	:	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ACE	:	Antigène carcino-embryonnaire
AcSé	:	Accès Sécurisé à des thérapies ciblées innovantes
ALK	:	Anaplastic Lymphoma Kinase
AMM	:	Autorisation de Mise sur le Marché
APC/C	:	Anaphase Promoting Complex/ Cyclosome
ATP	:	Adénosine Tri-Phosphate
ATU	:	Autorisation Temporaire d'Utilisation
BCRP	:	Breast Cancer Resistance Protein
BRAF	:	v-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRCA1	:	Breast cancer gene 1
BRCA2	:	Breast cancer gene 2
Bub3	:	Budding Uninhibited by Benzimidazoles 3
BubR1	:	Budding Uninhibited by Benzimidazoles Related 1
CA	:	Antigène Carbohydrate
CAMSAPs	:	CAIModulin-regulated Spectrin-Associated Proteins
CAP-Gly domain	:	Cytoskeleton-Associated Protein GLYcine-rich domain
CAR-T cells	:	Chimeric antigen receptors
CBPC	:	Cancers Broncho-pulmonaires à Petites Cellules
CBNPC	:	Cancers Broncho-pulmonaires Non-à-Petites Cellules
Cc	:	Concentration critique d'assemblage des microtubules
CCP	:	Cytoplasmic CarboxyPeptidases
Cdc20	:	Cell-Division Cycle protein 20
Cdk1	:	Cyclin-Dependent Kinase 1
CENP-E	:	CENtromere-associated Protein E
CHU	:	Centre Hospitalo-Universitaire
CLIP-170	:	Cytoplasmic LInker Protein of 170 kDa
COMT	:	Centre Organisateur de MicroTubules
CRMP-2	:	Collapsin Response Mediator Protein-2
CTLA-4	:	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
EGFR	:	Epidermal Growth Factor Receptor
EML4	:	Echinoderm Microtubule Like protein 4
FGFR1	:	Fibroblast-Growth Factor Receptor 1
FISH	:	Fluorescence In Situ Hybridization
GCP	:	γ -tubulin Complex Protein
GDP	:	Guanosine DiPhosphate
GTP	:	Guanosine 5'-TriPhosphate
HAP	:	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HCG	:	Hormone Chorionique Gonadotrope
HER	:	Human Epidermal growth factor Receptor
HGFR	:	Hepatocyte Growth Factor Receptor

IARC	:	International Agency for Research on Cancer
IFNα	:	Interféron α
IL-2	:	Interleukine-2
JAK	:	JANus Kinase
KRAS	:	Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog
L858R	:	Substitution de la Leucine en position 858 en arginine
LDH	:	Lactate déshydrogénase
LKB1	:	Liver Kinase B1
Mad2	:	Mitotic Arrest Deficient-like 2
MAPs	:	Microtubules-Associated Proteins
MAPK	:	Mitogen-Activated Protein Kinases
MCAK	:	Mitotic Centromere-Associated Kinesin
MCC	:	Mitotic Checkpoint Complex
MCRS1	:	MiCRoSpheruleprotein1
MDA	:	Microtubule Destabilizing Agent
MET	:	Mesenchymal-to-Epithelial Transition gene
MDR	:	MultiDrug Resistance
MLH1	:	MLH1 mutL homolog 1
MMP	:	Matrix metalloproteinases
MRP1	:	Multidrug Resistance-associated Protein 1
MSA	:	Microtubule Stabilizing Agent
MSH2	:	MutS protein homolog 2
MSH6	:	MutS protein homolog 6
mTor	:	Mammalian Target Of Rapamycin
NEDD1	:	Neural precursor cell Expressed Developmentally Downregulated 1
NGS	:	Next-Generation Sequencing
NEM2	:	Néoplasie endocrinienne multiple de type 2
NuSAP	:	NUcleolar and Spindle-Associated Protein
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
PCM	:	PeriCentriolar Material
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
PD1	:	Programmed cell death protein-1
PDL-1	:	Programmed cell death ligand-1
PDGFR	:	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
P-gp	:	P-glycoprotein
PI3K	:	PhosphoInositide 3-Kinase
PI3KCA	:	PhosphoInositide-3-Kinase, Catalytic Alpha polypeptide
PMS2	:	PMS1 Homolog 2
PRC1	:	Protein Required for Cytokinesis 1
PTEN	:	Phosphatase and TENsin homolog
RANK	:	Receptor Activator of Nuclear factor-KappaB
RANKL	:	Receptor Activator of Nuclear factor-KappaB Ligand
RB	:	RetinoBlastoma
RCP	:	Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
ROS1	:	C-ROS oncogene 1
SAC	:	Spindle Assembly Checkpoint
SCC	:	Carcinomes à Cellules Squameuses
STAT	:	Signal Transducer and Activator of Transcription

STOP	:	Stable Tubule Only Polypeptide
T790M	:	Substitution de la Thréonine en position 790 en Méthionine
TNM	:	Tumor, Node, Metastasis
TSH	:	Thyréostimuline
TTF-1	:	Thyroid Transcription Factor-1
TTL	:	Tubulin Tyrosine Ligase
TTLL	:	Tubulin Tyrosine Ligase- Like family members
UICC	:	Union for International Cancer Control
UV	:	Les rayonnements ultraviolets
VEGF	:	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	:	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
XMAP215	:	Xenopus Microtubule-Associated Protein

INTRODUCTION

1 INTRODUCTION

1.1 Les cancers

1.1.1 Généralités

Depuis 2004, le cancer est la première cause de décès en France tous âges confondus¹ et représente une priorité nationale de santé publique. Le gouvernement français a établi 3 plans cancers successifs (2003-2007, 2009-2013 et 2014-2019) afin de mobiliser tous les acteurs de santé autour des patients et améliorer leur prise en charge. Le 3^{ème} plan cancer, présenté par François Hollande en 2014, s'organise autour de 4 objectifs principaux²:

- Guérir plus de patients tout en assurant un accès aux soins de même qualité pour tous
- Préserver la qualité de vie des personnes pendant et après leur maladie
- Mettre l'accent sur la prévention afin de réduire l'incidence des cancers aux causes évitables, et financer la recherche contre le cancer
- Améliorer le pilotage des politiques de lutte contre le cancer

1.1.2 Données épidémiologiques des cancers

Responsables de 14.1 millions de nouveaux cas et de 8.2 millions de décès en 2012, les cancers sont une cause majeure de morbi-mortalité dans le monde³. En France, on estime à 385 000 le nombre de nouveaux cancers en 2015⁴. Entre les années 1980 et 2000, l'incidence des cancers (toutes localisations confondues) est en augmentation croissante en raison de l'accroissement et du vieillissement de la population française ainsi que de l'amélioration des outils diagnostiques⁵. Ces dernières années, la diminution du nombre annuel de cancers de la prostate et du sein a inversé la tendance. La proportion de nouveaux cancers chez l'homme a baissé de 1.3 % par an tandis que l'incidence des cancers chez la femme s'est stabilisée⁴.

Le cancer de la prostate est de loin le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez l'homme devant le cancer du poumon et du côlon-rectum (Figure 1). Chez la femme, les 3 cancers les plus représentés sont le cancer du sein, du côlon-rectum et du poumon.

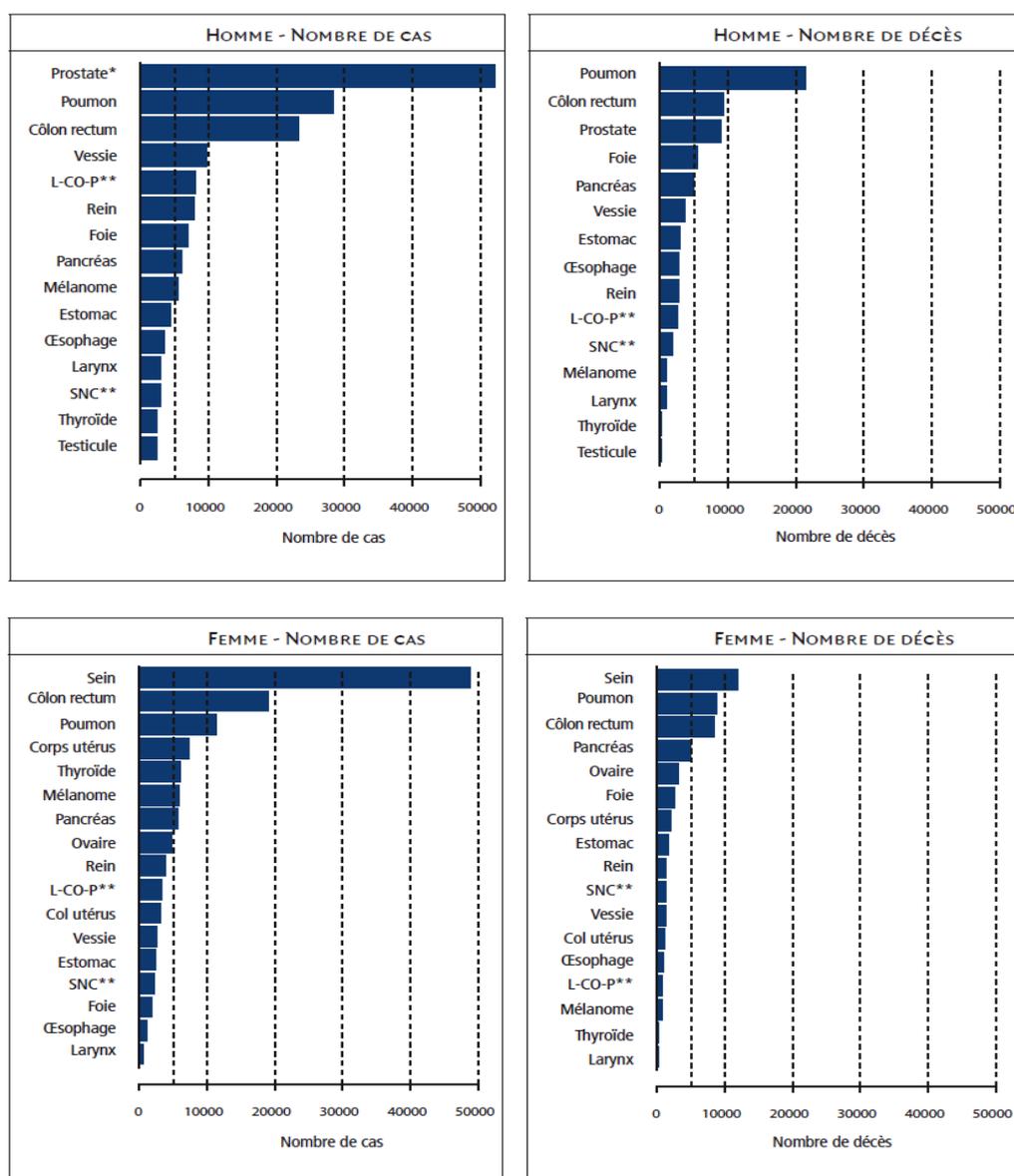


Figure 1. Estimation du nombre de cas et de décès par localisation en 2012 en France, chez l'homme et la femme⁶.

En 2015, 149 500 décès liés au cancer ont été recensés en France⁴. On assiste à une baisse du taux de mortalité de 1.5 % chez les hommes et de 1 % chez les femmes en lien avec l'établissement de diagnostics plus précoces et le développement de nouvelles thérapies plus efficaces⁴. Le cancer du poumon représente le cancer le plus meurtrier chez l'homme, nettement devant les cancers colorectaux et de la prostate (Figure 1). Chez la femme, le cancer du sein se positionne au 1^{er} rang devant les cancers du poumon et du côlon-rectum.

Le cancer est principalement une pathologie du sujet âgé. L'âge médian des patients au moment du diagnostic est de 68 ans chez l'homme et 67 ans chez la femme.

1.1.3 Facteurs étiologiques et facteurs de risque

Le cancer est une maladie multi-causale résultant de l'effet combiné de facteurs génétiques et environnementaux. Dix pourcents des cancers seraient héréditaires tandis que plus d'un tiers des cas de cancer serait lié à des facteurs de risque évitables⁷⁻⁹. La prévention constitue donc une stratégie essentielle pour lutter contre le cancer.

Le Tableau 1 résume les principaux facteurs de risque de cancers reconnus¹⁰. Les facteurs encore controversés ne seront pas mentionnés. Certains facteurs, lorsqu'ils sont associés, majorent le risque de survenue des cancers. C'est le cas notamment du tabagisme et de la consommation importante d'alcool qui ont un effet synergique sur le développement des cancers de la cavité orale, du larynx, et de l'œsophage¹¹.

Tableau 1. Principaux facteurs de risque reconnus et principaux cancers dans lesquels ils sont impliqués¹⁰.

Facteurs de risque	Localisation des cancers	Fraction attribuable
Tabac	Poumon, voies aérodigestives supérieures, rein, vessie, pancréas, estomac colon-rectum, foie, pancréas, tissu hématopoïétique	18-30 %
Alcool	cavité buccale, pharynx, larynx, œsophage, foie, côlon-rectum et sein	9.5 %
Agents infectieux	Foie, utérus, voies aérodigestives supérieures, tissu hématopoïétique, estomac, voies biliaires, vessie	15-18 %
Nutrition et conditions de vie	Endomètre, sein, rein, œsophage, pancréas et côlon-rectum	9.2 %
Expositions professionnelles	Poumons, peau et voies aérodigestives supérieures	4.5-8 %
Pollution environnementale	Poumons	1-4 %
Rayonnements UV naturels et artificiels	peau	2 %
Prédispositions génétiques		10 %

1.1.3.1 Le tabagisme

Le tabac est la première cause évitable de mortalité prématurée dans le monde¹². Au-delà des pathologies cardiovasculaires et respiratoires, le tabac est responsable de 30 % des pathologies malignes¹³. Il représente le principal facteur de risque de développer un cancer du poumon. Il est ainsi à l'origine de 87 % des décès par cancer du poumon¹⁴. De nombreuses études épidémiologiques ont aussi montré que les fumeurs ont 20 fois plus de risque de développer une tumeur pulmonaire que les non-fumeurs¹⁵.

A un moindre degré, le tabac prédispose également à la survenue de cancers des voies aérodigestives supérieures (cavité buccale, cavité nasale et sinus, larynx, pharynx, œsophage), du tractus urinaire bas (rein, vessie), du tractus digestif (pancréas, estomac, colon-rectum), du foie, ainsi que des leucémies¹⁶⁻¹⁸.

A ce jour, l'International Agency for Research on Cancer (IARC) a recensé plus de 60 carcinogènes parmi les 4000 molécules chimiques composant la fumée de cigarette¹⁹. En causant de multiples dommages à l'ADN, ces agents et leurs métabolites sont capables d'induire la cancérogenèse ou d'augmenter l'incidence d'un cancer. Les cancérigènes les plus courants sont : les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les nitrosamines (dans la phase particulaire), l'1,3-butadiène, l'oxyde d'éthylène, le benzène et les aldéhydes (dans la phase gazeuse)²⁰. D'autres substances présentes dans les inhalations de cigarette peuvent favoriser la progression tumorale en accélérant l'activité des cancérogènes (promoteurs de tumeurs, co-carcinogènes) ou en générant des lésions tissulaires (radicaux libres, agents toxiques, pro-inflammatoires ou oxydants).

Le risque de survenue d'un cancer dépend de l'âge de début du tabagisme, du nombre de cigarettes fumées chaque jour, du type de tabac utilisé (cigarettes à filtres, à taux réduit en goudron) et de la durée du tabagisme¹⁵. A l'arrêt du tabac, le risque de cancérogenèse décroît progressivement avec le temps¹⁵. Il restera cependant supérieur à celui des personnes n'ayant jamais fumé¹⁵.

Le tabagisme passif est associé à l'inhalation des principales substances carcinogènes contenues dans les fumées de cigarette²¹. Le tabagisme passif augmente de 1.15-1.2 fois le risque de survenue d'une pathologie maligne toutes localisations confondues et de 20 à 30 % le risque de cancer du poumon par rapport à une personne non exposée²²⁻²⁴. De façon générale, plus la durée et l'intensité de l'exposition aux fumées de tabac sont importantes, plus le risque de cancer est important¹². Une personne n'ayant jamais fumé a par exemple un risque accru de 25 % de développer une néoplasie si son conjoint est fumeur²⁵.

1.1.3.2 L'alcool

Responsable de 9.5 % des décès par cancer en France, l'alcool représente la deuxième cause évitable de morbidité¹⁰. Un lien de causalité a été établi entre la consommation excessive d'alcool et le développement des cancers de la cavité buccale, du pharynx, du larynx, de l'œsophage, du foie, du colon-rectum et du sein^{26,27}. Tous les types de boissons à base d'alcool sont associés au risque de cancer ce qui suggère le rôle prépondérant de l'éthanol dans la cancérogenèse. Le risque augmente de façon proportionnelle à la quantité d'alcool consommée²⁸. Le risque de cancer de la tête et du cou est ainsi 5-10 fois supérieur chez les grands consommateurs d'alcool comparativement aux personnes abstèmes²⁹.

L'effet carcinogène de l'alcool semble médié par^{27,29}:

- L'induction de dommages à l'ADN par l'acétaldéhyde (principal métabolite de l'éthanol)
- La génération d'espèces réactives de l'oxygène
- L'accroissement des taux d'estrogènes impliqué dans la cancérogenèse mammaire
- Son rôle de co-carcinogène (accélération de l'effet d'autres cancérigènes contenus dans le tabac par exemple)
- Une perturbation du métabolisme des folates physiologiquement impliqués dans la réparation de l'ADN
- Carcinogénicité d'autres substances chimiques présentes dans les boissons à bases d'alcool (N-nitrosamines...)
- Son rôle de solvant facilitant l'absorption d'autres carcinogènes

1.1.3.3 Les infections chroniques

Les agents infectieux causent plus de 15 % des cancers, principalement dans les pays en voie de développement^{30,31}. Le Tableau 2 résume les principaux virus, bactéries et parasites responsables de cancers.

Tableau 2. Principaux agents infectieux impliqués dans le développement de cancers.

Agents infectieux		Principaux cancers associés	Pourcentage de cas dans le monde	Références
virus	Virus de l'hépatite B et C	Carcinome hépatocellulaire	4.3 %	32
	Virus du papillome humain	Cancer du col de l'utérus	6.1 %	33
	Virus d'Epstein-Barr	Lymphome et carcinome rhino-pharyngé	1.1 %	34
	Virus de l'immunodéficience humaine	Sarcome de kaposi, lymphome	/	35
	Virus T-lymphotrope humain	leucémie/lymphome T de l'adulte.	0.1 %	35
	Herpes virus humain 8	Sarcome de kaposi	0.6 %	34
bactéries	<i>Helicobacter pylori</i>	Cancer gastrique	5.4 %	36
parasites	<i>Opisthorchis viverrini</i> – douve du foie	Cholangiocarcinome	/	36
	<i>Schistosoma haematobium</i>	Cancer de la vessie	0.1 %	36

1.1.3.4 Les habitudes alimentaires et les conditions de vie

On estime à 9.2 % la proportion de cancers attribuables aux habitudes alimentaires⁹. La consommation excessive de viandes rouges et de charcuteries, le manque de fruits et de légumes, l'insuffisance de fibres alimentaires et l'excès de sel augmentent le risque de développer un cancer (principalement au niveau du côlon-rectum, de l'estomac, du pancréas, du poumon ou du sein)³⁷.

Depuis les années 1990, on observe une nette augmentation de la prévalence du surpoids et de l'obésité en France. L'excès pondéral concerne aujourd'hui près de la moitié des adultes, parmi lesquels 32 % sont en surpoids (indice de masse corporelle comprise entre 25 et 30 kg/m²) et 15 % présentent une obésité (≥ 30 kg/m²)^{38,39}. La surcharge pondérale est associée au développement de 3.6 % des cancers⁴⁰. Les principales localisations de ces néoplasies concernent l'endomètre, le sein (après la ménopause), le rein, l'œsophage, le pancréas et le côlon-rectum³⁷.

Enfin, un lien de causalité est établi entre l'activité physique régulière et la diminution du risque de cancer du côlon, du sein, de l'endomètre et du poumon. L'activité physique pourrait prévenir jusqu'à 25 % des cancers et a également un impact sur la survie et la qualité de vie des patients⁴¹. Elle fait partie intégrante des nouvelles recommandations dans le cadre du plan cancer 2014-2019.

1.1.3.5 Les expositions professionnelles

La part des cancers liés aux expositions professionnelles est estimée à 4.5-8 % selon une étude de l'Institut de Veille Sanitaire⁴². De nombreux groupes et mélanges chimiques associés à une utilisation professionnelle sont reconnus comme cancérigènes chez l'homme et sont référencés dans le cadre de monographies établies par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) (Tableau 3). L'exposition à ces agents est très variable d'un pays à un autre selon le niveau d'industrialisation. Les cancers associés à une exposition chronique sur le lieu de travail concernent majoritairement les poumons, la peau et les voies aérodigestives supérieures (Tableau 3).

Tableau 3. Principaux cancérigènes à usage professionnel (classés en liste 1 par le CIRC) et localisations des cancers associés³¹.

Agent	Localisation anatomique du cancer	Principale industrie/utilisation
Amino-4 biphényle	Vessie	Fabrication du caoutchouc
Arsenic et ses composés*	Poumon, peau	Verres, métaux, pesticides
Amiante	Poumon, plèvre, péritoine	Isolation, filtrage, textiles
Benzène	Leucémie	Solvants, combustibles
Benzidine	Vessie	Fabrication de pigments/colorants
Béryllium et ses composées	Poumon	Industrie aérospatiale/métaux
Bis(chlorométhyl) éther	Poumon	Produits chimiques intermédiaires/sous-produits
Cadmium et ses composés	Poumon	Fabrication de pigments/colorants
Chlorométhyl méthyl éther	Poumon	Produits chimiques
Composés du chrome hexavalent	Cavité nasale, poumon	Revêtements métalliques, fabrication de pigments/colorants
Brais de houille	Peau, poumon, vessie	Matériaux de construction, électrodes
Goudrons de houille	Peau, poumon	Combustibles
Oxyde d'éthylène	Leucémie	Produits chimiques intermédiaires, agents stérilisants
Huiles minérales, peu ou non raffinées	Peau	Lubrifiants
Gaz moutarde (moutarde soufrée)	Pharynx, poumon	Gaz de combat
Naphtylamine-2	Vessie	Fabrication de pigments/colorants
Composés du nickel	Cavité nasale, poumon	Métallurgie, alliages, catalyseurs
Huile de schiste	Peau	Lubrifiants combustibles
Silice cristalline	Poumon	Taille de pierres, exploitations minières, fonderies
Suies	Peau, poumon	Pigments
Brouillards d'acides minéraux forts contenant de l'acide sulfurique	Larynx, poumon	Métal, piles
Talc contenant des fibres asbestiformes	Poumon	Paper, peintures
Tétrachloro-2,3,7,8 dibenzo- <i>para</i> -dioxine (TCDD)	Plusieurs organes	Polluant
Chlorure de vinyle	Foie	Plastiques monomères
Poussière de bois	Cavité nasale	Industrie du bois

1.1.3.6 La pollution de l'environnement

La pollution environnementale est à l'origine de 1-4 % des cancers, principalement de localisation pulmonaire³¹. Les principaux facteurs impliqués dans le développement tumoral sont liés aux habitudes domestiques (les fumées de charbon de bois, les vapeurs d'huiles de cuisson)⁴³, ou issus de la pollution atmosphérique (pots d'échappements de moteurs, polluants industriels)⁴⁴.

1.1.3.7 L'exposition aux rayonnements ultraviolets (UV)

L'exposition au soleil et aux ultraviolets artificiels (à usage médical, professionnel ou liés à l'utilisation de cabines de bronzage) est à l'origine de 2 % des cancers¹⁰. Une exposition intense et intermittente, principalement pendant l'enfance et chez les personnes à peau claire peut conduire au développement de carcinome basocellulaire, de carcinome épidermoïde ou de mélanome⁴⁵.

1.1.3.8 La Prédisposition génétique

Les facteurs héréditaires jouent un rôle non négligeable dans la survenue des cancers. Par exemple, les personnes ayant des antécédents familiaux de cancer bronchique ont entre 1.6 et 3.6 fois plus de risque de développer une tumeur⁴⁶.

Certaines formes de cancer sont associées à une altération génétique constitutionnelle (Tableau 4). C'est notamment le cas du syndrome de Lynch résultant d'une anomalie d'un gène de réparation de l'ADN (MLH1, MSH2, MSH6 ou PMS2) et à l'origine de 3 % des cancers colorectaux⁴⁷. Les patients avec une telle prédisposition ont un risque cumulé de 30-48 % de développer un cancer colorectal, un risque de 30-54 % de développer un cancer de l'endomètre et un risque de 5-10 % de développer un cancer de l'ovaire avant 70 ans⁴⁷.

D'autre part, 5 à 10 % des cas de cancers du sein sont des formes héréditaires liées à une mutation du gène BRCA1 (Breast cancer gene 1) ou BRCA2 (Breast cancer gene 2)⁴⁸. Chez ces patients, le risque de développer un cancer du sein au cours de leur vie est de 46-87 %⁴⁹.

Tableau 4. Principales prédispositions génétiques et principaux gènes associés^{47,50}.

PRÉDISPOSITIONS GÉNÉTIQUES	PRINCIPAUX GÈNES ASSOCIÉS
SYNDROME SEINS-OVAIRES	BRCA1, BRCA2, PALB2, RAD51
SYNDROME DE LYNCH	MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM
ADÉNOMES HYPOPHYSAIRES FAMILIAUX	AIP
ATAXIE-TÉLANGIECTASIE	ATM, MRE11A
CANCER GASTRIQUE DIFFUS FAMILIAL	CDH1
CARCINOME PAPILLAIRE RÉNAL HÉRÉDITAIRE	FH, MET
HYPERPARATHYROÏDISME	CDC73, CASR
MALADIE DE COWDEN	PTEN, PIK3CA, AKT1
MALADIE DE FANCONI	FANC
MALADIE DE VON HIPPEL-LINDAU	VHL
MÉLANOME MALIN FAMILIAL	CDKN2A, MITF, BAP1, CDK4
NÉOPLASIES ENDOCRINIENNES	MEN1, RET, CDKN1B
NEUROFIBROMATOSES	NF1, NF2, LZTR1, SMARCB1, SPRED1
PHÉOCHROMOCYTOME-PARAGANGLIOME HÉRÉDITAIRE	SDH, TMEM127, MAX, EPAS1
POLYPOSES ADÉNOMATEUSES FAMILIALES	APC, MUTYH
RÉTINOBLASTOME	RB1
SYNDROME DE BIRT-HOGG-DUBÉ	FLCN
SYNDROME DE BLOOM	BLM
SYNDROME DE CARNEY	PRKAR1A
SYNDROME DE GORLIN	PTCH1
SYNDROME DE LI-FRAUMENI	TP53, CHEK2
SYNDROME DE NUMEGEN	NBN
SYNDROME DE PEUTZ-JEGHERS	STK11
SYNDROME DE POLYPOSE JUVÉNILE	BMPR1A, SMAD4
XERODERMA PIGMENTOSUM	XP

1.1.4 Classification des cancers

Sous le terme générique de « cancer », on englobe un ensemble de pathologies dont les caractéristiques histologiques, moléculaires, étiologiques, épidémiologiques, comportementales et pronostiques sont très variées.

La classification des tumeurs est aujourd'hui à la base de la prise en charge des patients selon une médecine plus personnalisée. En stratifiant les tumeurs selon des groupes homogènes, les classifications permettent d'estimer plus facilement le pronostic des patients et d'orienter les cliniciens sur la stratégie thérapeutique la plus adaptée au type de cancer. Deux classifications sont actuellement utilisées pour les différencier : la classification histologique proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et la classification TNM définie par l'Union for International Cancer Control (UICC).

Les avancées portant sur la caractérisation des tumeurs, les techniques diagnostiques et les stratégies thérapeutiques conduisent à la révision régulière de ces nomenclatures.

1.1.4.1 Classification histologique (OMS)

La classification établie par l'OMS consiste en la caractérisation des tumeurs selon des critères anatomo-pathologiques. Cette nomenclature intègre parfois les données histochimiques et moléculaires de la tumeur.

Par exemple, dans le cancer du poumon, on différencie 2 catégories histologiques : les cancers broncho-pulmonaires non-à-petites cellules (CBNPC) et les cancers broncho-pulmonaires à petites cellules (CBPC).

1.1.4.1.1 Les cancers broncho-pulmonaires à petites cellules (CBPC) : 15 % des cas de cancer du poumon⁵¹.

Les CBPC se développent à partir des cellules neuro-endocrines tapissant l'épithélium bronchique, le plus souvent au niveau des voies aériennes proximales. A l'examen cytopathologique, les CBPC se composent de petites cellules arrondies à rapport nucléocytoplasmique élevé, en forme de grain d'avoine. Au niveau immunohistochimique, 90 % des CBPC expriment un ou plusieurs marqueurs neuro-endocrines (synaptophysine, chromogranine A et CD56) ainsi que le facteur-1 de transcription de la thyroïde (TTF-1)⁵².

1.1.4.1.2 Les cancers broncho-pulmonaires non-à-petites cellules (CBNPC) : 85 % des cas de cancer pulmonaire⁵¹.

Les CBNPC sont répartis en trois principaux sous-types : les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes à grandes cellules.

1.1.4.1.2.1 Les adénocarcinomes (40 % des CBNPC)

Ce sont des tumeurs épithéliales malignes caractérisées par une différenciation glandulaire ou la sécrétion de mucus⁵³. Ces tumeurs sont majoritairement localisées au niveau des voies aériennes périphériques (80 % des cas)⁵⁴. Sur le plan immunohistochimique, les adénocarcinomes expriment les marqueurs spécifiques CK7 et TTF-1⁵⁵.

1.1.4.1.2.2 Les carcinomes épidermoïdes (30 % de l'ensemble des CBNPC)

Les carcinomes épidermoïdes sont généralement localisés au niveau central dans l'arbre respiratoire, au sein des grosses bronches⁵⁴. Histologiquement, ils se caractérisent par la kératinisation des cellules à l'origine de structures caractéristiques (perles cornées, ponts d'union intercellulaires)⁵⁶. Ces tumeurs sont caractérisées par l'expression notamment des marqueurs P40⁵⁷, P63 et CK5/6⁵⁵.

1.1.4.1.2.3 Les carcinomes à grandes cellules (environ 20 % des CBNPC)

Leur diagnostic est un diagnostic d'exclusion : ils se distinguent principalement des autres formes de cancer bronchique par leur caractère indifférencié. Ce sont des tumeurs périphériques très invasives et volumineuses constituées de grandes cellules polygonales atypiques.

1.1.4.2 Classification TNM (UICC)

La classification TNM (Tumor, Node, Metastasis) décrit l'extension anatomique de la tumeur. Contrairement à la classification de l'OMS, elle prend en compte l'envahissement local mais aussi métastatique. La stratification des cancers repose sur 3 critères majeurs⁵⁸ (Tableau 5 a) :

- T : la **T**aille de la tumeur primitive et envahissement tissulaire local
- N : l'envahissement des ganglions lymphatiques locorégionaux (**N**odes), la taille et le nombre de ganglions atteints
- M : la présence ou l'absence de **M**étastase(s) dans l'organe ou à distance

Les tumeurs sont catégorisées en 5 stades histo-pathologiques reflétant leur état d'avancement et orientant la stratégie thérapeutique à adopter (Tableau 5 b) :

- Stade 0 : Cancer *in situ*, non invasif
- Stade I : Invasion très localisée, sans métastase
- Stade II : Extension limitée localement et/ou atteinte ganglionnaire satellite minime
- Stade III : Atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire satellite majeure
- Stade IV : Tumeur avec métastase(s)

Tableau 5. Exemple de classification TNM : 7^{ème} édition de la classification pour le cancer pulmonaire, établie en 2009⁵⁹.

a Seventh tumour, node, metastasis classification of lung cancer: January 2010

T: Tumour

TX Primary tumour cannot be assessed, or tumour proven by the presence of malignant cells in sputum or bronchial washings but not visualized by imaging or bronchoscopy

T0 No evidence of primary tumour

Tis Carcinoma *in situ*

T1 Tumour < 3 cm in greatest dimension, surrounded by lung or visceral pleura, without bronchoscopic evidence of invasion more proximal than the lobar bronchus (i.e., not in the main bronchus)

T1a Tumour < 2 cm in greatest dimension

T1b Tumour > 2 cm but < 3 cm in greatest dimension

T2 Tumour > 3 cm but < 7 cm or tumour with any of the following features (T2 tumours with these features are classified T2a if < 5 cm):
Involves main bronchus, > 2 cm distal to the carina
Invades visceral pleura
Associated with atelectasis or obstructive pneumonitis that extends to the hilar region but does not involve the entire lung

T2a Tumour > 3 cm but < 5 cm in greatest dimension

T2b Tumour > 5 cm but < 7 cm in greatest dimension

T3 Tumour > 7 cm or one that directly invades any of the following:
Chest wall (including superior sulcus tumours), diaphragm, phrenic nerve, mediastinal pleura, parietal pericardium
Tumour in the main bronchus < 2 cm distal to the carina but without involvement of the carina
Associated atelectasis or obstructive pneumonitis of the entire lung
Separate tumour nodule(s) in the same lobe

T4 Tumour of any size that invades any of the following:
Mediastinum, heart, great vessels, trachea, recurrent laryngeal nerve, esophagus, vertebral body, carina
Separate tumour nodule(s) in a different ipsilateral lobe

N: Nodes

NX Regional lymph nodes cannot be assessed

N0 No regional lymph node metastasis

N1 Metastasis in ipsilateral peribronchial and/or ipsilateral hilar lymph nodes and intrapulmonary nodes, including involvement by direct extension

N2 Metastasis in ipsilateral mediastinal and/or subcarinal lymph node(s)

N3 Metastasis in contralateral mediastinal, contralateral hilar, ipsilateral or contralateral scalene, or supraclavicular lymph node(s)

M: Metastases

MX Distant metastasis cannot be assessed

M0 No distant metastasis

M1 Distant metastasis

M1a Separate tumour nodule(s) in a contralateral lobe
tumour with pleural nodules or malignant pleural/ pericardial effusion

M1b Distant metastasis

b New seventh edition-descriptor

	N0	N1	N2	N3
T1a	I A	II A	III A	III B
T1b	I A	II A	III A	III B
T2a	I B	II A	III A	III B
T2b	II A	II B	III A	III B
T3	II B	III A	III A	III B
T3	II B	III A	III A	III B
T3	II B	III A	III A	III B
T4	III A	III A	III B	III B
T4	III A	III A	III B	III B
M1a	IV	IV	IV	IV
M1a	IV	IV	IV	IV
M1b	IV	IV	IV	IV

1.1.5 Physiopathologie

La cancérogenèse est un long processus multi-étapes aboutissant à la transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale. Elle comprend 3 phases : l'initiation, la promotion et la progression.

L'initiation tumorale consiste en l'apparition d'anomalies génétiques et/ou épigénétiques irréversibles dans une cellule isolée ou un petit groupe de cellules. Ces altérations résultent d'une transmission héréditaire, apparaissent de façon spontanée ou sont induites par des carcinogènes (radiations, agents chimiques, virus...). Si ces lésions concernent un ou plusieurs gènes impliqués dans le maintien de l'homéostasie tissulaire (oncogènes, gènes suppresseurs de tumeurs), l'équilibre entre les signaux intracellulaires prolifératifs et antiprolifératifs est rompu, et les cellules initiées se multiplient de façon continue et incontrôlée (Figure 2). La promotion consiste en l'expansion clonale de ces cellules transformées. Au cours des divisions successives, les anomalies sont transmises à la descendance. De surcroît, les cellules accumulent de nouvelles mutations, leur permettant de toujours plus se diviser tout en échappant aux systèmes de contrôle de l'organisme. Lors de la progression, ces cellules vont perdre peu à peu leurs caractères de différenciation, elles forment alors une grosse masse cellulaire anormale envahissant les tissus voisins. Dans certaines conditions, les cellules peuvent se détacher de la tumeur primitive et migrer dans le reste de l'organisme *via* les voies lymphatiques ou sanguines pour former des métastases à distance.

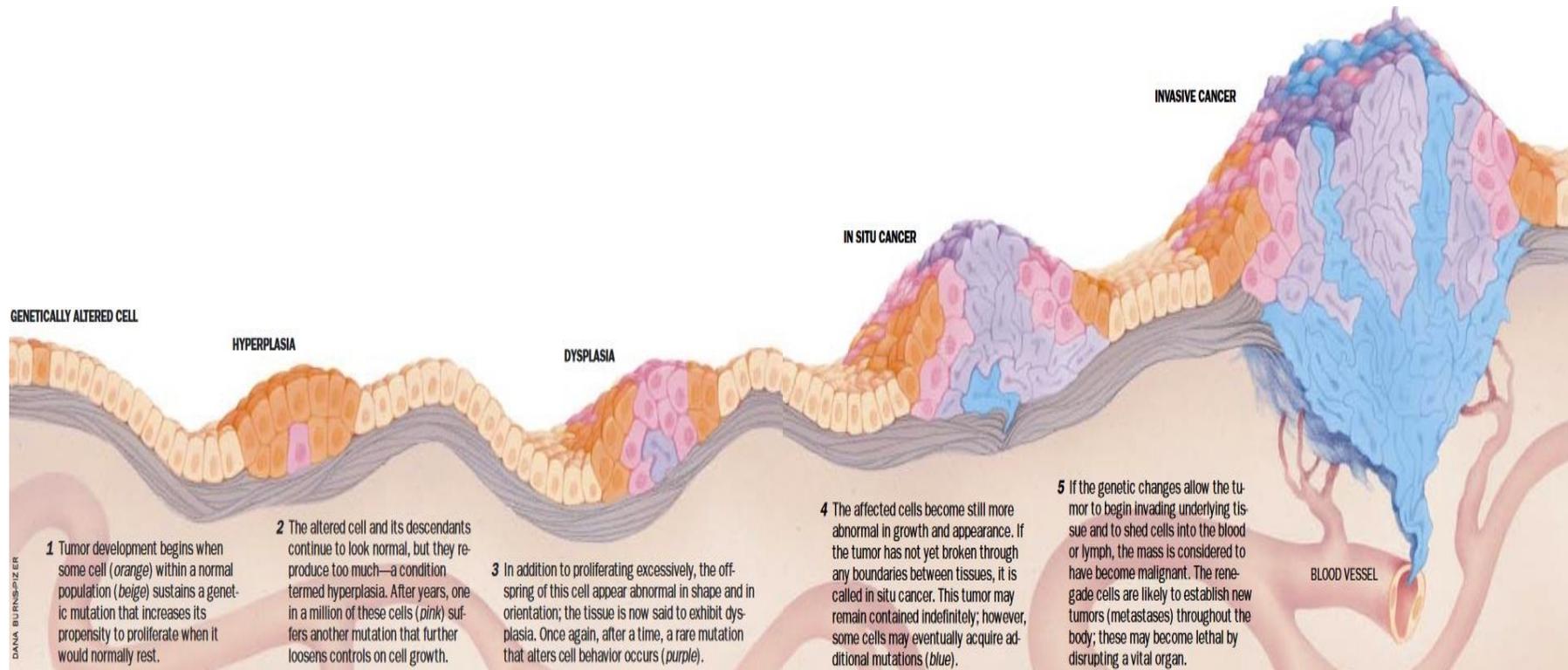


Figure 2. Représentation schématique des processus physiopathologiques impliqués dans la survenue d'une tumeur⁶⁰.

Au terme de cette transformation, la cellule a acquis de nouvelles propriétés biologiques caractéristiques de la cellule cancéreuse (ou « hallmarks »)⁶¹ (Figure 3):

- l'acquisition d'un potentiel de réplication illimité
- le maintien d'un état prolifératif constant, indépendamment de tout facteur de croissance
- une insensibilité aux signaux antiprolifératifs
- la capacité à résister à la mort cellulaire programmée (ou apoptose)
- la capacité à induire la néo-vascularisation (ou néoangiogenèse)
- l'acquisition d'un phénotype invasif et métastasant
- la reprogrammation du métabolisme énergétique cellulaire
- la capacité à échapper au système immunitaire
- l'acquisition d'une instabilité génomique et la forte propension à subir de nouvelles mutations à chaque division cellulaire
- l'induction de l'inflammation

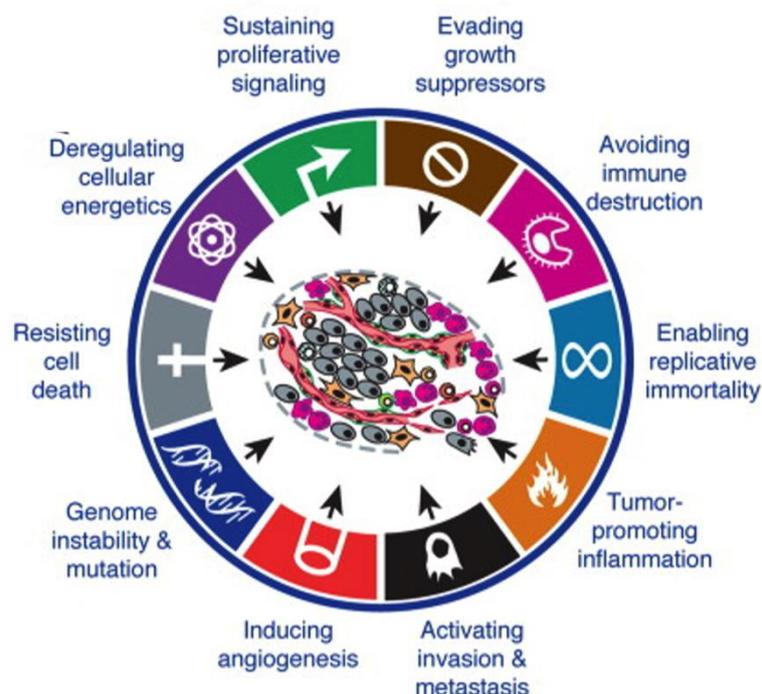


Figure 3. Les caractéristiques biologiques (ou hallmarks) d'une cellule cancéreuse, selon D. Hanahan et R.A.Weinberg⁶¹.

1.1.6 Caractéristiques moléculaires des cancers

Depuis plusieurs décennies, de nombreuses anomalies génétiques ont été mises en évidence dans les cancers. Lors de la tumorigénèse, ces altérations touchent principalement 2 grandes catégories de gènes : les proto-oncogènes qui stimulent la division et la différenciation cellulaires, et les gènes suppresseurs de tumeurs qui freinent la prolifération (Figure 4). Le développement d'un cancer résulte généralement de l'activation d'au moins un proto-oncogène associé à l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur.

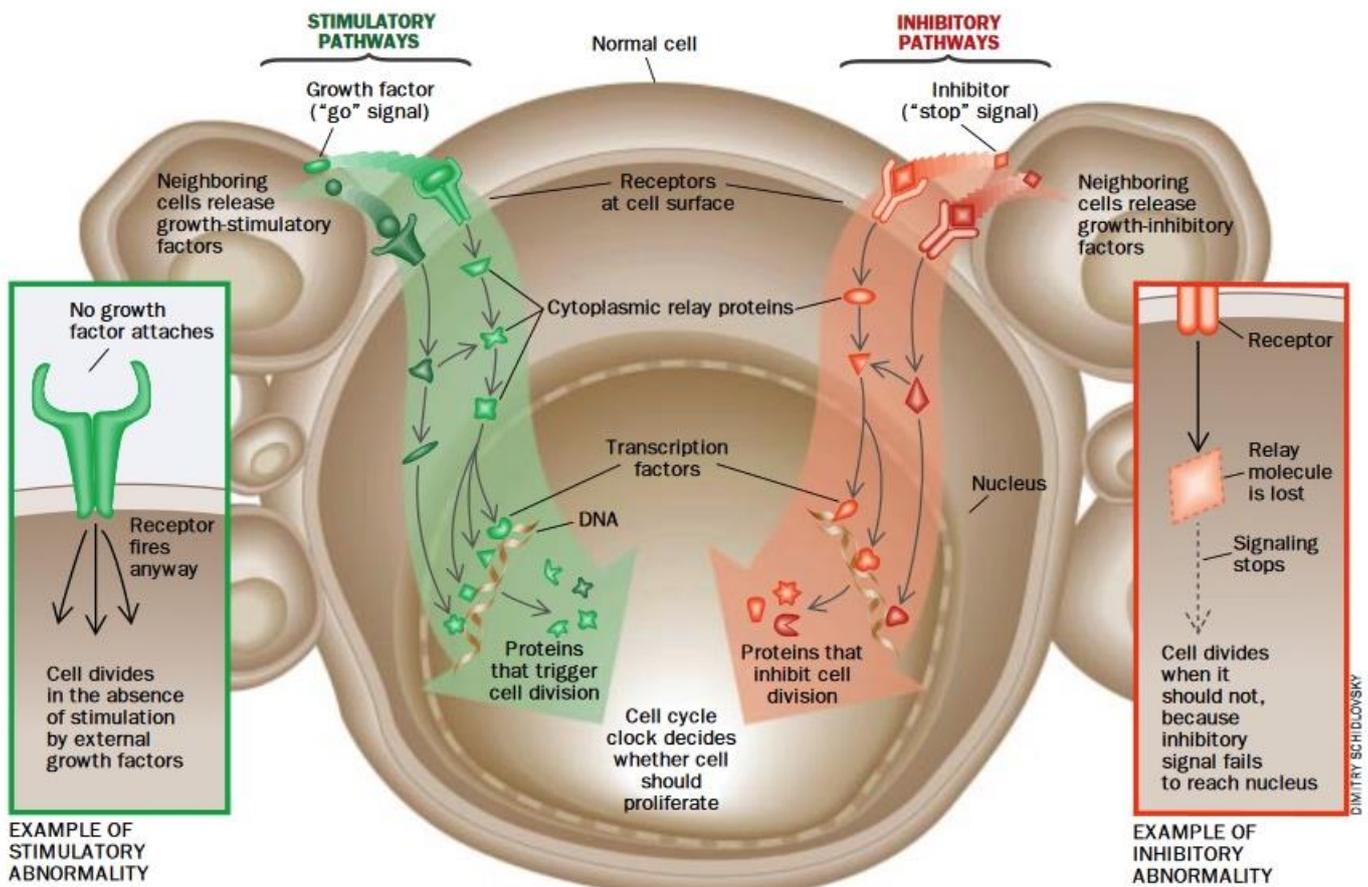


Figure 4. Représentation schématique des voies de signalisation intracellulaires altérées lors de la tumorigénèse⁶⁰.

1.1.6.1 Les (proto-)oncogènes

Les proto-oncogènes codent pour des protéines impliquées dans les voies de signalisation intracellulaire de croissance. Lors de la transformation tumorale, les proto-oncogènes sont activés en oncogènes sous l'effet de mutations ponctuelles, d'amplifications géniques, ou de translocations chromosomiques. Ces gènes s'expriment selon le mode dominant, la mutation d'un seul allèle est suffisante pour induire la conversion. Il en résulte une activation constitutive des protéines qu'ils codent, une surexpression de celles-ci ou l'expression de protéines aberrantes⁶². Nous développerons ci-dessous seulement les oncogènes les plus fréquemment identifiés dans les cancers (ras, EGFR, HER2, ALK, BRAF, MET, FGFR, PIK3CA, C-KIT) (Figure 5).

1.1.6.1.1 *ras (rat sarcoma)*

Les mutations activatrices *ras* ont été identifiées dans près de 30 % des cancers humains⁶³. La famille *ras* comprend 3 principales isoformes: *K-ras* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, 85 %), *N-ras* (Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene, 12 %) et *H-ras* (Harvey rat sarcoma viral oncogene, 3 %)⁶⁴. Les mutations *ras* sont principalement des mutations ponctuelles (mutations faux-sens) affectant les codons 12, 13 et 61 (dans 97-99 % des cas)⁶⁴⁻⁶⁷. Elles entraînent une activation constitutive des protéines G sous-membranaires codées, avec une activation des voies de signalisation MAPK et PI3K en aval. Les anomalies *H-ras* sont plus souvent observées dans les cancers des voies urinaires, *N-ras* dans les mélanomes et les hémopathies et *K-ras* dans les cancers du pancréas, du côlon-rectum, du poumon et des ovaires⁶⁷. Sauf quelques rares exceptions, les mutations de *KRAS* et les mutations de l'*EGFR* et ou/de *BRAF* sont mutuellement exclusives⁶⁸. Les mutations de *KRAS* sont prédictives d'un mauvais pronostic^{69,70} et d'une sensibilité réduite aux thérapies ciblant l'*EGFR*⁷¹⁻⁷³. A ce jour, il n'existe pas de thérapie ciblant spécifiquement cette anomalie.

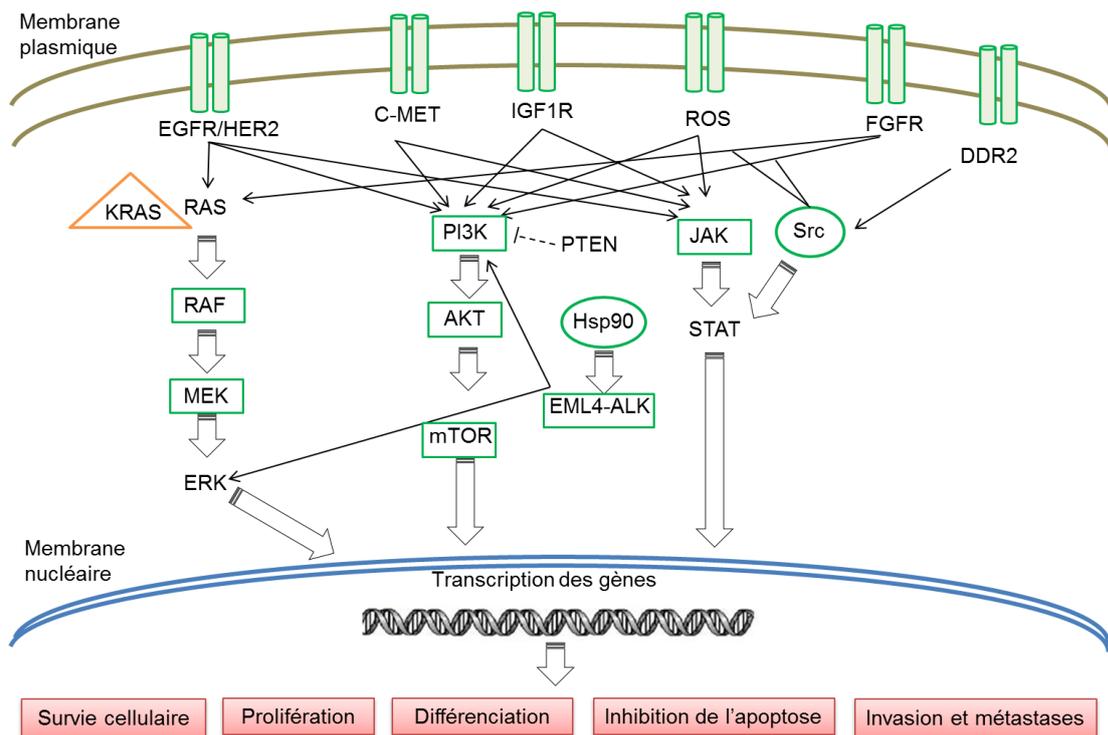


Figure 5. Représentation schématique des principaux acteurs des voies de signalisation intracellulaires (de gauche à droite MAPK/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTor et JAK/STAT) altérés dans les cancers. Adapté de ⁷⁴. Les anomalies moléculaires pour lesquelles il existe une thérapie ciblée approuvée ou en cours d'essai clinique sont en vert. Les anomalies pour lesquelles il n'existe pas actuellement d'inhibiteur disponible sont en orange. Les flèches noires représentent les activations en aval dans les voies de signalisation tandis que les traits pointillés indiquent un effet inhibiteur.

1.1.6.1.2 EGFR (epidermal growth factor receptor)

Le gène de l'*EGFR* code pour un récepteur membranaire à domaine tyrosine kinase de la famille HER (**H**uman **E**pidermal growth factor **R**eceptor), nommé EGFR ou HER1. Dans les néoplasies, l'excès de ligands dans le microenvironnement ou les mutations du gène *EGFR* conduisent à une activation permanente de l'EGFR. Il en résulte une hyperstimulation des voies de signalisation MAPK, PI3K et JAK/STAT en aval, à l'origine de signaux de croissance et d'invasion tumorales⁷⁵.

L'EGFR est surexprimé dans un large panel de cancers, incluant les gliomes, les cancers du poumon, du côlon, de la tête et du cou, des voies aérodigestives supérieures, du pancréas, du sein, de l'ovaire, de la vessie et du rein^{76,77}. Les mutations ponctuelles de l'*EGFR* ont une place très importante dans la carcinogenèse pulmonaire (selon les données de la base COSMIC⁷⁷). Environ 15 % des adénocarcinomes pulmonaires présentent des mutations activatrices de l'*EGFR*, au niveau des exons 19 et 21 (délétion LREA et L858R respectivement)^{78,79}.

1.1.6.1.3 HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2, ou HER-2/neu ou erbB-2)

HER2 code pour un autre récepteur membranaire de la famille HER, en amont des voies MAPK, PI3K et JAK/STAT. La surexpression ou l'amplification de *HER2* concerne 20 % des cancers du sein et est associée à un mauvais pronostic^{80,81}. *HER2* est également surexprimé dans certaines tumeurs de l'ovaire, de l'estomac, de l'endomètre, du côlon, de la vessie, du poumon, de la tête et du cou et de l'œsophage⁸². Des mutations activatrices du domaine tyrosine kinase de *HER2*, par insertion au niveau de l'exon 20, sont observées dans 4 % des CBNPC, et principalement des adénocarcinomes⁶⁶.

1.1.6.1.4 ALK (Anaplastic lymphoma kinase)

ALK est un récepteur à domaine tyrosine kinase localisé à la membrane des cellules. Présent dans 7 % des CBNPC, le réarrangement chromosomique entre les gènes *ALK* et *EML4* (echinoderm microtubule-associated protein-like 4) conduit à l'activation constitutive d'une protéine de fusion *ALK* et à la stimulation des voies de signalisation en aval (PI3K, STAT et JAK)⁵⁴. Cette anomalie, exclusive des mutations de l'*EGFR* ou de *KRAS*, est fréquemment identifiée chez les jeunes patients non-fumeurs⁶⁶.

1.1.6.1.5 BRAF (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)

Le proto-oncogène *BRAF* est un médiateur de la voie de signalisation RAS–RAF–MEK–ERK–MAPK^{83,84}. Des mutations ponctuelles de *BRAF* sont détectées dans 8 % des tumeurs humaines, principalement dans les mélanomes, les cancers du côlon-rectum, de la thyroïde et de l'ovaire^{83,85}. Elles sont localisées au niveau des exons 11 et 15 et le variant V600E représente près de 80 % des anomalies⁸⁶.

1.1.6.1.6 MET (mesenchymal-to-epithelial transition gene ou hepatocyte growth factor receptor, HGFR)

MET code pour le récepteur tyrosine kinase du facteur de croissance des hépatocytes (HGFR ou c-MET). La surexpression de c-MET est observée dans certains cancers du poumon, du sein, de l'ovaire, du rein, du côlon, de la thyroïde, du foie et de l'estomac et conduit à l'activation en aval des voies MAPK, PI3K et STAT⁸⁷.

1.1.6.1.7 *FGFR1* et *FGFR2* (fibroblast-growth factor receptor 1 et 2)

L'amplification du gène *FGFR1* induit la surexpression du récepteur membranaire FGFR1 à activité tyrosine kinase. Cette anomalie est détectée dans 17 % des CBNPC, 6 % des CBPC, 15 % des cancers du sein exprimant des récepteurs hormonaux et 5 % des cancers du sein triple négatif. L'amplification de *FGFR2*, moins fréquente, est observée dans 5-10 % des cancers gastriques et 2 % des cancers du sein. Des mutations somatiques de FGFR ont été identifiées dans les cancers de l'endomètre, de l'estomac, de la vessie et les CBNPC.

1.1.6.1.8 *PI3KCA* (Phosphatidylinositol-3 kinases catalytic alpha polypeptide)

PI3KCA code pour la sous-unité catalytique des protéines phosphoinositide-3-kinases (PI3K) impliquée dans la transduction des signaux de croissance. L'incidence des mutations de *PI3KCA* est d'environ 25-40 % dans les cancers du sein, 32 % dans les cancers du côlon, 36 % dans les cancers de l'endomètre, 4-12 % dans les cancers de l'ovaire, 4-11 % dans les cancers gastriques⁸⁸. Les anomalies de *PI3KCA* ont pour conséquence une hyperstimulation de la voie de signalisation AKT/mTOR en aval.

1.1.6.1.9 *c-KIT*

C-KIT code pour le récepteur tyrosine kinase c-kit. Les mutations *c-KIT* concernent les exons 8, 9, 11 et 17 et sont associées à certaines tumeurs gastro-intestinales, mélanomes et leucémies aiguës myéloïdes^{89,90}.

1.1.6.2 Les gènes suppresseurs de tumeurs (ou anti-oncogènes)

Les gènes suppresseurs de tumeurs codent pour des protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'induction de la mort cellulaire programmée (apoptose) et la réparation de l'ADN lésé. Dans le contexte de la cancérogenèse, les mutations de ces gènes conduisent à une perte de leur fonction favorisant l'hypercroissance cellulaire et l'accumulation d'altérations génétiques (Figure 4). Les anti-oncogènes étant récessifs, leur inactivation résulte de l'altération des deux allèles (par délétion homozygote ou plus fréquemment par perte d'hétérozygotie puis inactivation du second allèle par mutation ou modification épigénétique). Les principaux gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans la carcinogenèse seront détaillés ci-dessous.

1.1.6.2.1 p53

Physiologiquement, le facteur de transcription p53 est un « gardien du génome » : il garantit son intégrité et sa stabilité au cours des divisions cellulaires. En réponse aux signaux de stress aigu (activation d'un oncogène, lésion de l'ADN...), p53 bloque transitoirement le cycle pour permettre une réparation de l'ADN ou induit la mort cellulaire programmée (ou apoptose) si la restauration de l'ADN n'est pas possible⁹¹. P53 joue un rôle critique dans la suppression des processus tumoraux, et l'altération ou la perte d'expression de p53 prédispose au développement de nombreux cancers⁹². Le gène codant pour p53 (*TP53*) est le gène le plus fréquemment muté dans les cancers: il apparaît notamment altéré dans plus de 50 % des CBNPC^{54,93}. Les altérations de *TP53* résultent majoritairement de mutations faux-sens et sont fortement corrélées à la consommation de tabac.

1.1.6.2.2 p14^{ARF}

La perte d'expression de p14^{ARF} (par délétion du locus *INK4-ARF* codant p14), identifiée dans de nombreuses formes de cancers^{93,94}, aboutit à la surexpression de la protéine inhibitrice mdm2 et en conséquence l'inactivation fonctionnelle de p53 (Figure 6).

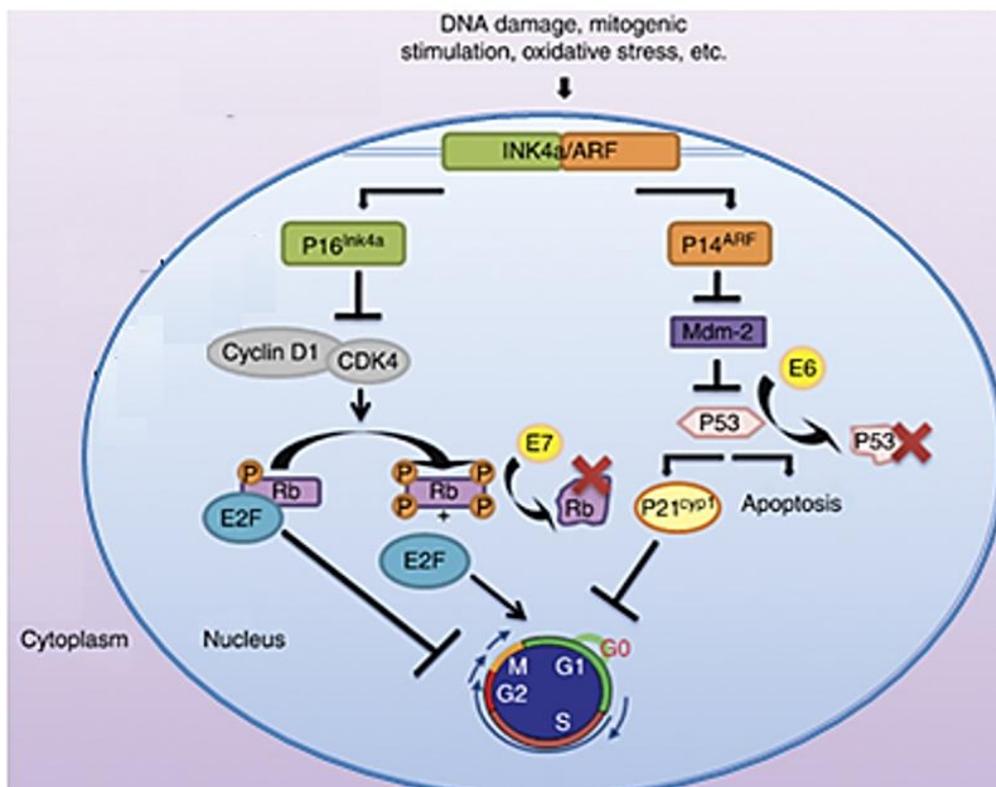


Figure 6. Les voies p16^{Ink4a}/Rb et p14^{ARF}/p53 impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Adapté de ⁹⁵.

1.1.6.2.3 p16^{Ink4a} (cyclin-dependent kinase 4 inhibitor A)

L'inactivation de la protéine p16^{Ink4a} (par délétion homozygote du locus *INK4-ARF* codant p16, perte d'hétérozygotie, mutations ponctuelles ou méthylation du promoteur) conduit à l'accélération de la transition G1/S du cycle *via* l'hyperphosphorylation de la protéine Rb (Figure 6). Près de 50 % de tous les cancers humains présentent une perte de fonction de p16^{Ink4a}. Parmi ceux-ci, on recense les cancers de la tête et du cou, de l'œsophage, du tractus biliaire, du foie, du poumon, de la vessie, du côlon, du sein, du pancréas, les leucémies, les lymphomes et les glioblastomes⁹⁵.

1.1.6.2.4 RB (retinoblastoma)

La protéine Rb peut être altérée (par mutation ou délétion) dans les rétinoblastomes, les ostéosarcomes, les cancers du sein et les CBPC⁹⁶.

1.1.6.2.5 PTEN (Phosphatase and Tensin homolog)

PTEN code pour une tyrosine phosphatase inhibant la voie de signalisation PI3K/Akt/mTor⁹⁷. Son inactivation (par mutations somatiques ou perte d'hétérozygotie) conduit à une hyperactivation de cette voie, indépendamment de la liaison d'un ligand⁹⁸. Les anomalies de *PTEN* sont observées dans certaines formes de cancers de l'endomètre, du système nerveux central, de la peau et de la prostate⁹⁹.

1.1.6.2.6 LKB1 (liver kinase B1 ou serine-threonine kinase 11 (STK11))

LKB1 code pour une sérine/thréonine kinase en amont de la voie des MAPK⁹¹. La perte de *LKB1*, observée dans 30-40 % des CBNPC et majoritairement dans les adénocarcinomes, accélère la progression du cycle cellulaire entre les phases G1 et S¹⁰⁰. L'altération de *LKB1* est également retrouvée dans une variété de cancers, incluant les cancers de l'ovaire, du sein, du col de l'utérus et du pancréas¹⁰¹.

1.1.6.2.7 BRCA1 et BRCA2

Les protéines BRCA1 et BRCA2 sont impliquées dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue. Les patients porteurs de mutations BRCA1 et BRCA2 ont un risque relatif cumulé à l'âge de 70 ans de 60 % et 55 % pour les cancers du sein, de 59 % et 16,5 % pour les cancers de l'ovaire et de 83 % et 62 % pour les cancers du sein controlatéraux¹⁰². Plus récemment, des études ont montré que les mutations BRCA2 prédisposent au cancer du pancréas et au cancer de la prostate (avec respectivement 22 fois et 5 fois plus de risque que dans la population BRCA sauvage)¹⁰³.

1.1.7 Prise en charge thérapeutique des cancers

1.1.7.1 Diagnostic

A ce jour, il existe peu de techniques efficaces pour permettre le dépistage précoce des cancers. Seuls certains cancers font l'objet d'une démarche massive de dépistage, dans le cas où la méthode est suffisamment fiable et le diagnostic précoce améliore significativement le pronostic. Ainsi, le dépistage organisé du cancer du sein est généralisé en France depuis 2004¹⁰⁴. Les femmes âgées de 50 à 74 ans n'ayant ni symptôme apparent ni facteur de risque particulier sont invitées à réaliser tous les deux ans une mammographie et un examen clinique des seins. Les patientes ayant des antécédents ou un risque accru de cancer subissent un examen annuel. Malgré une nette augmentation depuis sa mise en place, la participation au dépistage du cancer du sein est très variable d'une région à l'autre (en moyenne proche de 50 %) et reste inférieure à l'objectif cible de 70 % fixé au niveau européen¹⁰⁴. Dans le cadre du dépistage organisé du cancer colorectal, les hommes et femmes entre 50 et 74 ans sont invités à réaliser un test immunologique tous les 2 ans (nouveau test OC Sensor établi depuis 2015) permettant la détection du sang dans les selles^{105,106}. A terme, ce test devrait permettre de détecter plus précocement les cancers et d'identifier 2.5 fois plus de formes précancéreuses¹⁰⁷. Dans le cas du cancer du col de l'utérus, le frottis cervico-utérin est préconisé tous les 3 ans pour les femmes de 25 à 65 ans¹⁰⁸ et permet de détecter les lésions précancéreuses. Actuellement, près de 40 % des femmes éligibles ne suivent pas ces recommandations¹⁰⁹.

Le manque de sensibilité et de spécificité de la plupart des marqueurs tumoraux ne justifie pas leur utilisation pour l'établissement du diagnostic et à plus forte raison pour le dépistage. Le dosage de certains marqueurs peut cependant être précieux pour le dépistage de populations à risque (Tableau 6) :

- L'alpha foeto-protéine (AFP) est utile pour le dépistage de l'hépatocarcinome chez des malades porteurs du virus de l'hépatite B ou C ou atteints d'une cirrhose du foie^{110,111}.
- La calcitonine peut être utilisée pour le dépistage des formes héréditaires de cancer de la thyroïde (néoplasie endocrinienne multiple de type 2 principalement)¹¹².
- Le dosage de l'Hormone Chorionique Gonadotrope (HCG) et sa sous-unité β libre (β -HCG) est intéressant pour le dépistage du choriocarcinome chez les patients atteints d'une maladie trophoblastique.
- Le dosage de l'antigène prostatique spécifique (PSA) est limité au dépistage individuel du cancer de la prostate¹¹³. Néanmoins, son utilité en tant que marqueur de dépistage est controversée, et son utilisation en France est recommandée pour le diagnostic et/ou le suivi de la maladie prostatique.

Tableau 6. Intérêt des principaux marqueurs tumoraux pour le dépistage, le diagnostic ou le pronostic des tumeurs solides. Adapté de ¹¹⁴. Abréviations : ACE : Antigène carcino-embryonnaire, CA : Antigène Carbohydre, HCG : *Hormone Chorionique Gonadotrope*, LDH : Lactate déshydrogénase, NEM2: néoplasie endocrinienne multiple de type 2, SCC : Squamous cell carcinoma, TSH : thyroïdostimuline.

Organe	Marqueur	Dépistage	Diagnostic	Pronostic
Col de l'utérus	SCC	non	pour les carcinomes épidermoïdes	non
Colon-Rectum	ACE	non	Bilan initial	oui dans les formes métastatiques
Endomètre	CA 125	non	si atteinte ovarienne, suspicion d'extension régionale ou type 2 histologique	non
Foie	Alfa Foeto Protéine	oui	oui	oui
Mélanome	LDH	non	non	oui si forme métastatique
Môle hydatiforme	hCG totale sérique	non	oui	non
Ovaire	CA 125	non	oui	non
	CA 19-9, ACE: si tumeur mucineuse	non	oui	non
Ovaire: tumeur germinale maligne	Alfa Foeto-Protéine, Béta HCG, LDH	non	oui	non
Pancréas	CA 19-9	non	avant chirurgie	non
Prostate	PSA total	Individuel après évaluation du rapport bénéfice risque, annuel	Oui	oui, classification de D'Amico
Sein	CA 15-3	non	à discuter au cas par cas si points d'appels métastatiques	non
Testicule	LDH, Béta HCG, Alfa Foeto Protéine	non	Oui	oui
Nodule thyroïde	Calcitonine, TSH	non	Oui	
Thyroïde, forme médullaire	ACE, Calcitonine	Oui si NEM 2	Oui + métanéphrines urinaires et/ou plasmatiques, calcémie et parathormone à la recherche d'une NEM 2	oui
Thyroïde, forme folliculaire	Thyroglobuline, Anticorps anti-thyroglobuline, TSH, T4, T3 libre	non	non	Thyroglobuline, anticorps anti Tg
Tumeurs trophoblastiques gestationnelles	hCG totale sérique	non	oui	oui (FIGO 2000)
Vessie	PSA total	non	Bilan initial	non

Généralement asymptomatique lors des premiers stades de la maladie, le cancer est souvent diagnostiqué tardivement. Parfois, il est même découvert de manière fortuite lors d'un bilan d'imagerie ou un bilan biologique réalisé pour une autre pathologie. Au-delà des symptômes propres à chaque cancer, certaines manifestations systémiques peu spécifiques amènent parfois le patient à consulter et peuvent être évocatrices de tumeur : altération de l'état général, perte de poids et d'appétit, grande fatigue, adénopathie superficielle, des syndromes paranéoplasiques, des symptômes liés à la compression des tissus par la tumeur (syndrome de la veine cave supérieure) ou aux métastases (douleurs osseuses, atteintes neurologiques, ictère...).

Le diagnostic de cancer peut être évoqué lors de l'examen clinique : le clinicien recherche l'existence de facteurs de risque (consommation tabagique ou de tabac, exposition professionnelle à des carcinogènes, antécédents familiaux de cancers...) à l'interrogatoire, la présence de symptômes évocateurs lors de l'auscultation, et/ou lors d'un bilan d'imagerie anormal.

Généralement, c'est l'examen anatomopathologique qui permet d'établir le diagnostic. Il est réalisé à partir de biopsies du tissu suspecté ou de prélèvements au niveau des adénopathies et des métastases. Des techniques immunochimiques permettent d'affiner le type histologique de certains cancers.

Le dosage des marqueurs tumoraux peut parfois aider au diagnostic, notamment pour localiser le cancer chez les patients symptomatiques. Dans le contexte d'un patient métastatique, la recherche du cancer primitif peut être orientée par l'examen biologique des marqueurs. Cependant, il constitue très rarement un élément de certitude.

Pour les patients potentiellement éligibles à un traitement par thérapies ciblées, la recherche de spécificités moléculaires est systématique (Tableau 7). Ces tests diagnostiques (ou tests compagnons) sont réalisés classiquement par technique d'hybridation de type FISH (pour identifier les translocations chromosomiques et les délétions/amplifications de gènes) et par séquençage (pour identifier les mutations). De nouvelles techniques plus sensibles telles que le séquençage nouvelle génération (NGS) sont utilisées depuis peu en routine dans les plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers. De même, certains laboratoires d'analyses réalisent la caractérisation moléculaire des tumeurs depuis peu sur des échantillons sanguins, qui contiennent des cellules tumorales circulantes ou de l'ADN tumoral circulant (biopsies liquides).

Tableau 7. Biomarqueurs prédictifs de la réponse à une thérapie ciblée en 2014 validés par l'INCa¹¹⁵.

PATHOLOGIE	BIOMARQUEUR	NOMBRE DE PATIENTS TESTÉS	POURCENTAGE DE TESTS POSITIFS ⁶ »	THÉRAPIES CIBLÉES ASSOCIÉES
Cancer du sein	Amplification d' <i>HER2</i>	8 866	18,4 %	Trastuzumab Pertuzumab Lapatinib
Cancer de l'estomac	Amplification d' <i>HER2</i>	814	18,2 %	Trastuzumab
Cancer colorectal	Mutations de <i>KRAS</i>	22 011	44,2 %	Panitumumab Cetuximab
	Mutations de <i>NRAS</i>	18 085	4,7 %	
GIST	Mutations de <i>KIT</i>	1 189	61,6 %	Imatinib
	Mutations de <i>PDGFRA</i>	1 004	17,4 %	
Cancer du poumon	Mutations d' <i>EGFR</i>	24 558	10,5 %	Gefitinib Erlotinib Afatinib Osimertinib
	Translocation d' <i>ALK</i>	21 183	3,2 %	Crizotinib Ceritinib
	Translocation de <i>ROS1</i>	5 414	1,3 %	Crizotinib
Mélanome	Mutation de <i>BRAF V600</i>	5 534	34,8 %	Vemurafenib Dabrafenib Cobimetinib Trametinib
Leucémies	Détection de <i>BCR-ABL</i>	7 453	16,6 %	Imatinib Dasatinib Nilotinib
	Mutations d' <i>ABL</i>	785	21,5 %	Bosutinib Ponatinib

Dans le cas de cancers hormono-dépendants, l'expression de récepteurs hormonaux déterminée par examen anatomopathologique est un critère prédictif majeur de réponse à l'hormonothérapie^{116,117}.

Un bilan d'extension complète le diagnostic et définit le stade de la tumeur : il permet d'apprécier la taille et l'extension locorégionale de la tumeur (T), d'identifier la présence de métastases ganglionnaires lymphatiques (N) et de métastases à distance (M).

Un bilan pré-thérapeutique est systématique afin d'identifier d'éventuelles contre-indications au traitement (âge, évaluation de l'état général par établissement d'un score de performance (PS, Tableau 8), de l'état nutritionnel, des comorbidités, des fonctions respiratoires et cardiovasculaires).

Tableau 8. Score de performance établi par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)

Score	Activité
0	Capable d'une activité identique à celle précédant la maladie, sans aucune restriction
1	Activité physique diminuée mais ambulatoire et capable de mener un travail
2	Ambulatoire et capable de prendre soin de soi-même. Incapable de travailler et alité moins de 50 % du temps
3	Capable seulement de quelques activités. Alité ou en chaise plus de 50 % du temps
4	Incapable de prendre soin de lui-même. Alité ou en chaise en permanence
5*	Décès

* Spécifique du score ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) : Robert Comis M.D., Group Chair. Oken MM, 1982.

1.1.7.2 Pronostic

En France, le taux de survie relative à 5 ans tous cancers confondus est estimé à 53 %¹¹⁸. Cependant, celui-ci est très variable selon la localisation des cancers (de 6 % pour le cancer du pancréas à 95 % pour le cancer des testicules)^{118,119}. A partir de ces données, on peut classer les cancers en 3 catégories (Figure 7):

- Les cancers de bon pronostic (regroupant 42 % des cancers) dont le taux de survie à 5 ans est supérieur ou égal à 80 %.
- Les cancers de pronostic intermédiaire (représentant 33 % de tous les cas de cancer) dont la survie à 5 ans est comprise entre 20 et 80 %.
- Les cancers de mauvais pronostic (17 % des cancers) dont la survie à 5 ans est inférieure ou égale à 20 %.

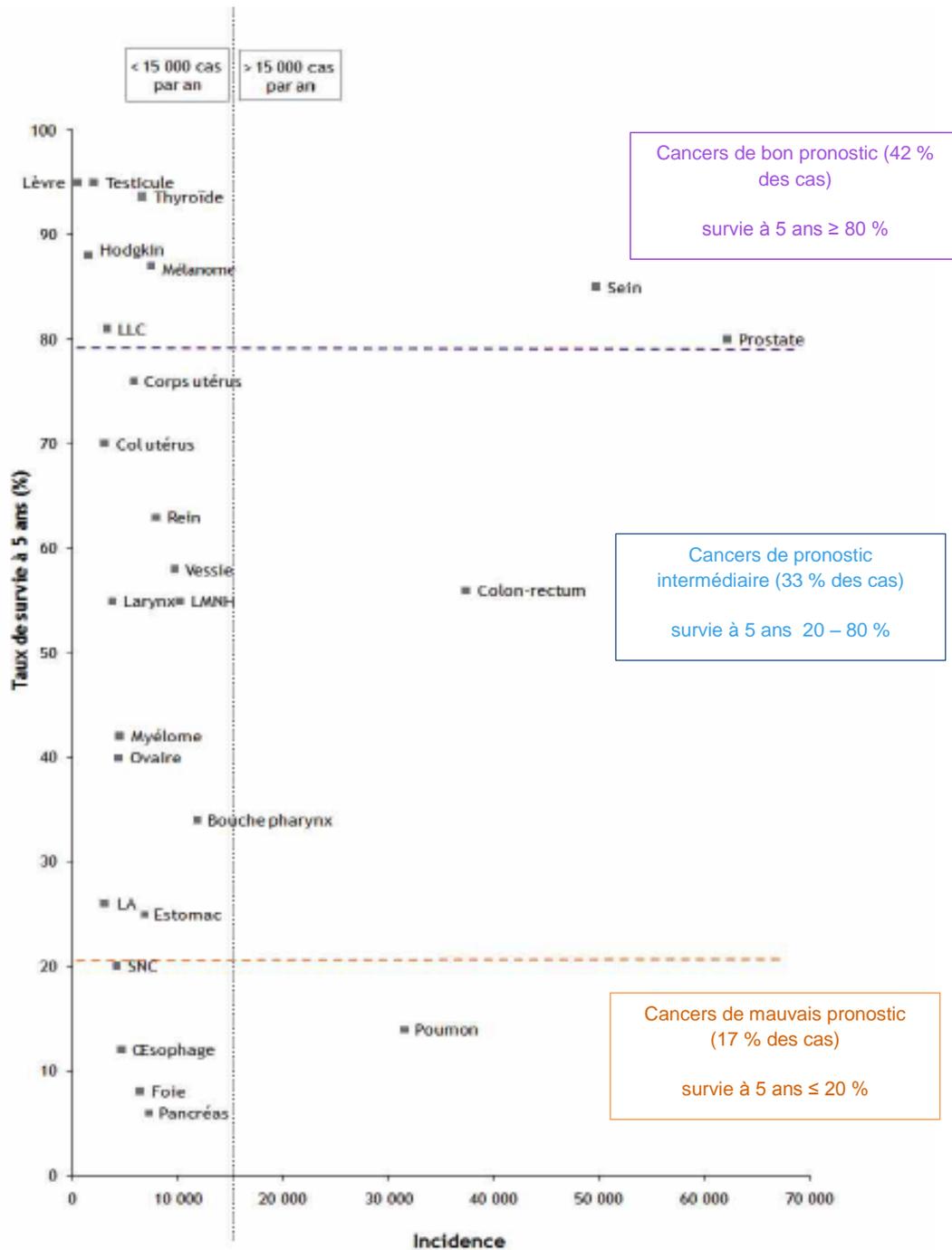


Figure 7. Survie relative à 5 ans de 25 localisations de cancer en fonction de leur incidence annuelle. Adaptée de ¹¹⁸.

Pour une localisation donnée, le stade de la maladie au moment du diagnostic peut largement influencer la survie des patients. C'est notamment le cas des cancers colorectaux qui présentent au stade métastatique un taux de survie moyen de 19 % tandis qu'il est d'environ 87 % pour les formes localisées¹¹⁸. Ceci illustre bien l'intérêt des techniques de dépistage et de diagnostic précoce pour améliorer le pronostic des patients.

Le taux de survie des cancers est également dépendant du type histologique, du sexe et de l'âge du patient au moment du diagnostic. La survie attendue à 5 ans est ainsi inférieure à 7 % dans les cancers broncho-pulmonaires à petites cellules¹²⁰ tandis qu'elle est proche de 17 % dans les adénocarcinomes pulmonaires¹¹⁹. De façon générale, on peut retenir que les femmes porteuses d'un CBNPC ont de meilleures chances de survie (20 %) que les hommes (16 %) ¹¹⁹. De la même façon, les patients de moins de 45 ans ont un taux de survie 2.5 fois plus élevé que les personnes âgées de plus de 75 ans¹¹⁹.

Dans de nombreux cancers, le potentiel évolutif est estimé au moyen de classifications pronostiques. La classification de D'Amico, définie selon des critères histologiques, biochimiques et cliniques, permet par exemple d'évaluer le risque de récurrence du cancer de la prostate à 10 ans après un traitement local (Tableau 9)¹²¹.

Tableau 9. La classification de D'Amico distingue 3 catégories selon les données du toucher rectal, du dosage de PSA et du score de Gleason (établi selon le niveau de différenciation de la tumeur à l'examen anatomo-pathologique)^{121,122}.

	Faible risque (a)	Risque intermédiaire	Haut risque (b)
Stade clinique	≤ T2a	T2b	T2c-T3a
Score de Gleason	et ≤ 6	ou 7	ou > 7
PSA sérique (ng/ml)	et < 10	ou > 10 et < 20	ou > 20

(a) Un faible risque implique la totalité des critères.

(b) Un seul critère présent suffit pour considérer le risque élevé

1.1.7.3 Thérapeutique

La compréhension du rôle physiopathologique des anomalies génétiques dans l'induction et le maintien de la cancérogénèse a totalement révolutionné la prise en charge des patients. En plus des critères histo-pathologiques, cette dernière prend aujourd'hui pleinement en compte le profil moléculaire de la tumeur pour établir le pronostic, et choisir le traitement le plus adapté selon les anomalies identifiées.

La stratégie thérapeutique, adaptée selon chaque patient, est définie en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP). Selon le profil histologique et moléculaire de la tumeur, le stade la maladie et l'extension aux tissus avoisinants et à distance, 3 options peuvent être envisagées :

- La chirurgie
- La radiothérapie
- Un traitement systémique médicamenteux (chimiothérapies / thérapies ciblées / immunothérapies / hormonothérapie).

Selon les cas, ils sont prescrits seuls ou en association.

1.1.7.3.1 La chirurgie

La chirurgie est un traitement local des cancers consistant en l'exérèse de la tumeur primaire, des ganglions associés et/ou des éventuelles métastases. Elle joue également un rôle important dans l'établissement du diagnostic et la stratification des tumeurs.

On distingue plusieurs types de chirurgie :

- La chirurgie curative a pour but la rémission complète du patient et repose sur l'éradication de la tumeur primaire dans son intégralité, associée si besoin à un curage ganglionnaire. C'est le traitement de première intention des tumeurs localisées sans dissémination tumorale. Dans le cas de cancers localement avancés opérables, l'exérèse chirurgicale précédée d'une radiochimiothérapie peut être proposée. Afin d'améliorer la qualité de vie des patients, les actes chirurgicaux sont aujourd'hui plus conservateurs et souvent associés à la radiothérapie et/ou chimiothérapie adjuvante pour limiter le risque de récurrence.
- La chirurgie prophylactique consiste en la résection chirurgicale d'un organe non tumoral chez les patients à haut risque de cancérisation. Cette mesure de prévention vise principalement les patients présentant des formes familiales de cancer du côlon (polypose adénomateuse familiale) ou de cancer du sein ou de l'ovaire avec mutations de BRCA1/2¹²³⁻¹²⁵.
- La chirurgie palliative a pour objectif de réduire les symptômes locaux liés aux cancers (chirurgie décompressive et antalgique par exemple dans le cas de métastases à proximité immédiate de la moelle épinière)^{126,127}.

Les complications associées à la chirurgie oncologique sont principalement¹²⁸ : la survenue d'hémorragies, d'accidents thrombo-emboliques, l'apparition d'une infection ou d'une douleur au niveau de la cicatrice, la formation d'œdèmes lymphatiques et de la fatigue.

1.1.7.3.2 *La radiothérapie*

La radiothérapie est un traitement loco-régional des cancers. Elle consiste en l'utilisation de rayonnements ionisants induisant des lésions de l'ADN et des autres constituants cellulaires et l'apoptose des cellules cibles¹²⁹. Au-delà de l'effet sur les cellules tumorales irradiées, la radiothérapie affecte également les cellules à distance par effet bystander¹²⁹. A ce jour, la radiothérapie est impliquée dans la prise en charge de plus de 50 % des patients atteints d'un cancer¹³⁰⁻¹³². De multiples essais cliniques ont prouvé son efficacité pour prolonger la survie des patients et contrôler localement la progression des tumeurs¹³³. En France, son coût reste très modéré et représente en moyenne 9 % des dépenses en oncologie¹³⁰. Selon les cancers, la radiothérapie peut être utilisée seule, ou associée à la chirurgie et/ou la chimiothérapie¹³³.

Parmi les techniques de radiothérapie, on différencie la radiothérapie externe où la source d'irradiation est à l'extérieur du malade de la curiethérapie où la source radioactive est placée au contact de la tumeur à irradier. Enfin, la radiothérapie métabolique, utilisée pour le traitement de la maladie de Vaquez, certains cancers de la thyroïde et certaines métastases osseuses, consiste en l'administration d'analogues radio-marqués se fixant préférentiellement sur les cellules tumorales grâce à leur métabolisme.

Les objectifs de la radiothérapie sont multiples et modulent le choix de la dose d'irradiation, la durée du traitement et le nombre de cures:

- visée curative¹³⁴ :
 - La radiothérapie d'induction (ou néoadjuvante), en association ou non à la chimiothérapie, a pour but de rendre accessible à la chirurgie les tumeurs initialement inopérables ou de réduire le volume tumoral avant l'exérèse tumorale.
 - La radiothérapie adjuvante consiste à éradiquer les cellules tumorales résiduelles après une résection chirurgicale de la tumeur afin de limiter le risque de récurrence.
 - La radiothérapie exclusive est utilisée dans le cas de tumeurs inopérables, fortement radiosensibles et les tumeurs localisées de faible volume.
- visée palliative¹³¹ : dans ce cas, la radiothérapie constitue un traitement non-invasif permettant de limiter les douleurs et autres symptômes invalidants (fractures, hémorragies, compression) liés aux cancers¹³⁵.
- visée préventive : la radiothérapie préventive est généralement réservée aux patients à haut risque afin de limiter la formation de métastases ou la récurrence du cancer. Le traitement est généralement hypofractionné (la dose est plus élevée mais le nombre de séances est réduit).

Outre les cellules cancéreuses, les tissus sains contenus dans le volume irradié peuvent également être endommagés, ce qui est à l'origine d'effets indésirables (Tableau 10). La toxicité aiguë regroupe l'ensemble des dommages, généralement réversibles, apparaissant lors du traitement ou dans les jours ou mois suivants l'irradiation. Elle résulte d'une atteinte cellulaire importante dans les tissus à renouvellement rapide. Les réactions retardées, peu réversibles, se développent quant à elles à distance de l'irradiation (de 6 mois à plusieurs années après la fin du traitement) et concernent les tissus à renouvellement lent.

Tableau 10. Principaux effets indésirables imputables à la radiothérapie.
Adapté de ¹³⁶.

Localisation	Dommages précoces	Dommages retardés
peau	Radiodermite aiguë (érythème cutané, desquamation)	Radiodermite chronique (dépigmentation, fibrose, télangiectasies)
Voies aérodigestives supérieures	Radiomucite aiguë, œdème laryngé, dysgueusie, hyposialie	Radiomucite chronique, xérostomie, fibrose, reflux, œsophagite
Tube digestif	Nausées vomissements, rectite, iléite, anite	Occlusion, perforations, fistules rectorragies, iléite, rectite
vessie	cystite	Fibrose, cystite, hématurie
poumon	Toux sèche, dyspnée, pneumopathie aiguë	fibrose
gonades		Stérilité chez l'homme, castration et stérilité chez la femme
neurologique	Œdème cérébral, hypertension intracrânienne (céphalées nausées, vomissements)	Troubles cognitifs
Os et cartilages		Ostéoporose, ostéonécrose, complications fracturaires
cœur		Péricardite chronique, insuffisance cardiaque

L'efficacité biologique de la radiothérapie est modulée par¹³⁰ :

- La radiosensibilité intrinsèque de la tumeur et des tissus sains avoisinants.
- Le cycle cellulaire : les cellules en phase G2 et en mitose sont les plus sensibles à l'action des radiations ionisantes.
- Le taux d'oxygène dans les tissus irradiés : l'oxygénation augmente l'effet des radiations ionisantes sur les cellules.
- L'étalement de l'irradiation : la durée totale du traitement a un impact majeur sur la réponse tumorale et l'apparition des effets indésirables précoces.
- Le fractionnement : le nombre de séances de radiothérapie influence le développement de complications retardées.
- La nature du rayonnement : pour une même dose, les ions lourds et les neutrons induisent significativement plus de lésions à l'ADN que les électrons ou les photons.
- L'association concomitante de chimiothérapie et de radiothérapie : certains agents chimio-thérapeutiques sont à l'origine d'une radio-sensibilisation des tumeurs. Basées sur cette constatation, de nouvelles stratégies thérapeutiques de chimio-radiothérapie ont été établies pour chaque type de cancers.
- Le débit de dose : la dose suffisante pour détruire les cellules tumorales est très variable d'un type de cancer à un autre. En théorie, très peu de tumeurs sont radio-résistantes au-delà d'une dose de 90 Gy. Le facteur limitant l'utilisation d'une dose efficace est la radio-tolérance des tissus sains avoisinants (de 1-5 Gy pour les tissus hématopoïétiques et gonadiques à 75 Gy pour le tissu cartilagineux et l'utérus).
- La température : l'hyperthermie augmente l'effet des radiations.

1.1.7.3.3 *La chimiothérapie*

L'ère de la chimiothérapie est née lors de la première guerre mondiale, après la découverte de l'effet antitumoral des gaz moutardes¹³⁷. Elle est encore aujourd'hui un gold-standard pour le traitement des cancers solides et hématologiques (Figure 8)¹³⁸⁻¹⁴³.

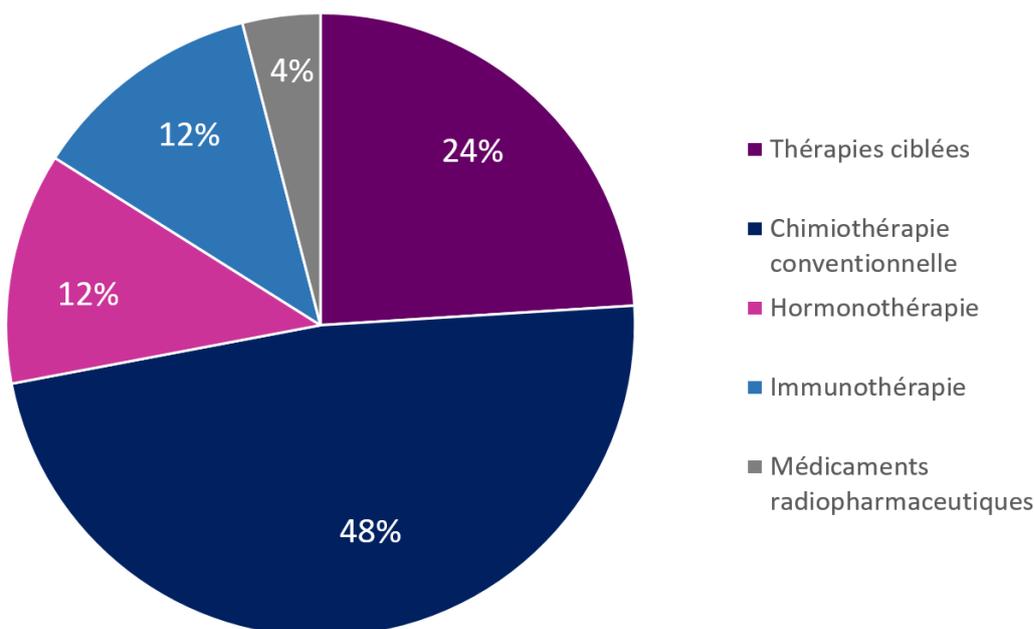


Figure 8. Part des différentes options médicamenteuses dans la prise en charge des cancers. Adapté de¹¹⁵.

La chimiothérapie est un traitement systémique induisant de façon directe ou indirecte des lésions de l'ADN aboutissant au blocage de la division et à l'apoptose cellulaire. En raison de leur mode d'action, les chimiothérapies ont une activité sur toutes les cellules, qu'elles soient tumorales ou saines, et *a fortiori* sur les tissus à renouvellement rapide. Il en résulte de nombreuses complications communes à tous les cytotoxiques (Tableau 11) au-delà des effets indésirables spécifiques de chaque agent (Tableau 12).

Tableau 11. Principaux effets indésirables communs aux agents chimiothérapeutiques et conduites à tenir¹⁴⁴.

Effets indésirables	Conduite à tenir
Nausées Vomissements, constipation	<ul style="list-style-type: none"> • Prescription systématique d'antiémétiques. • Conseils alimentaires, laxatifs
Myélotoxicité: <ul style="list-style-type: none"> • Anémie • Neutropénie fébrile • Thrombopénie 	<ul style="list-style-type: none"> • Prescription de facteurs de croissance à discuter selon les cas • Si T° > 38,5 °C: recherche d'un foyer infectieux, hémogramme et prescription d'une antibiothérapie probabiliste à large spectre si PNN <0,5 G/l. • Hospitalisation à discuter au cas par cas
Alopécie réversible	Prévention par casque réfrigéré à 4°C, Prescription d'une prothèse capillaire
Anorexie	Conseils diététiques, compléments nutritifs oraux
Asthénie	
Mucite	Soins locaux, antalgiques, nutrition, bonne hygiène dentaire, bains de bouche ou bicarbonate de sodium substitués salivaires

La chimiothérapie anticancéreuse a plusieurs objectifs :

- La chimiothérapie curative vise la guérison complète du patient en éliminant toutes les cellules tumorales.
- La chimiothérapie adjuvante est prescrite après un traitement loco-régional afin d'éradiquer les cellules tumorales non éliminées pour limiter le risque de récidives.
- La chimiothérapie néoadjuvante est administrée en préopératoire pour les tumeurs volumineuses afin de les rendre opérables ou de réaliser une chirurgie moins invasive.
- La chimiothérapie palliative ralentit la progression tumorale ou diminue les symptômes liés au cancer pour améliorer la qualité de vie des patients¹⁴⁵.

Les agents cytotoxiques sont administrés sous forme de cures successives dont le nombre est défini par le cancérologue selon la localisation tumorale, le stade de la maladie et l'état général du patient. Le concept de polychimiothérapie s'est très largement généralisé depuis les années 1960 et repose sur l'association de cytotoxiques de mécanisme d'action différents¹⁴⁶. Les anticancéreux utilisés en combinaison permettent d'obtenir un effet additif voire synergique, de réduire le risque de résistance au traitement et de diminuer la dose de chaque agent, limitant la toxicité générale¹⁴⁷. Dans certains cas, la chimiothérapie est également administrée de façon concomitante à la radiothérapie afin de potentialiser l'activité anticancéreuse.

Tableau 12. Principaux agents chimiothérapeutiques, mécanisme d'action et effets indésirables spécifiques associés. Données extraites du Vidal et de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé.

	Classe	Spécificité	Famille	Principaux agents	Mécanisme d'action	Effets indésirables spécifiques
Interaction directe avec l'ADN	Alkylants et assimilés	Spécifique du cycle	Moutardes à l'Azote et apparentés	Cyclophosphamide ENDOXAN® Ifosfamide HOLOXAN® Chlorméthine CARYOLYSINE® Chlorambucil CHLORAMINOPHENE® Melphalan ALKERAN® Estramustin ESTRACYT®	Liaison covalente aux bases azotées de l'ADN	<ul style="list-style-type: none"> • Néphrotoxicité et ototoxicité (cisplatine) • Toxicité vésicale (cyclophosphamid, ifosfamide) • Neurotoxicité périphérique (dérivés du platine)
			Nitroso-urées	Carmustine BICNU® Lomustine BELUSTINE® Fotémustine MUPHORAN® Streptozocine ZANOSAR®		
			Dérivés du platine	Cisplatine CISPLATYL® Carboplatine CARBOPLATINE® Oxaplatine ELOXATINE®		
			Tétrazines	Dacarbazine DETICENE® Procarbazine NATULAN® Témozolomide TEMODAL®		
			Autres	Mitomycine CAMETYCINE® Busulfan MYLERAN® Pipobroman VERCYTE®		
	Intercalant	Spécifique du cycle	Anthracyclines	Doxorubicine ARIBLASTINE® Doxorubicine liposomale CAEFLYX® MYOCET® Epirubicine FARMORUBICINE® Daunorubicine CERUBIDINE® Daunorubicine liposomale DAUNOXOME® Idarubicine ZAVEDOS® Pirarubicine THEPUBRICINE®	Intercalement dans la double hélice d'ADN empêchant la transcription et la réplication	<ul style="list-style-type: none"> • Toxicité cardiaque dose dépendante et cumulative • Syndrome mains-pieds (doxorubine liposomale)
			Anthracènediones	Mitoxantrone NOVANTRONE®		
			Autres	Plicamycine MITHRACINE®		

Scindants	Cycle indépendant		Bléomycine BLEOMYCINE®	Induction de fragmentations mono ou bicaténaire de l'ADN (radiomimétique)	<ul style="list-style-type: none"> Toxicité pulmonaire Pigmentation de la peau et des ongles
Inhibiteurs de topoisomérases	Spécifique du cycle	Inhibiteurs de topoisomérases I	Irinotécan CAMPTO® Topotécan HYCAMTIN®	Stabilisation des coupures de l'ADN créées par les topoisomérases	Diarrhées
		Inhibiteurs de topoisomérases II	Etoposide CELLTOP®, VEPESIDE®		
Antimétabolites	Spécifique de la phase S du cycle	Antifoliques	Méthotrexate METHOTREXATE® LEDERTREXATE® Ralitrexed TOMUDEX® Pemetrexed ALIMITA®	Interférence avec la synthèse des bases puriques et pyrimidiques	<ul style="list-style-type: none"> Diarrhées (5-fluorouracile, capécitabine) Toxicité rénale neurologique et hépatique (méthotrexate) Hyperuricémie (hydroxyurée) Syndrome mains-pieds (5-fluorouracile, capécitabine)
		Antiprimidiques	5-fluorouracile FLURO-URACILE® Tegafur-uracile UFT® Capécitabine XELODA® Cyratabine ARACYTINE® Cyratabine liposomale DEPOCYTE® Azacytidine VIDAZA® Gemcitabine GEMZAR® Hydroxyurée HYDREA®		
		Antipuriques	6-mercaptopurine PURINETHOL® 6-thioguanine LANVIS® Fludarabine FLUDARA® Pentostatine NIPENT® Claribine LEUSTATINE®		
Agents ciblant les microtubules	Spécifique de la phase M du cycle	Alcaloïdes de la pervenche	Vinorelbine NAVELBINE® Vindésine ELDISINE® Vincristine ONCOVIN® Vinblastine VELBE®	Inhibition du fuseau mitotique impliqué dans la migration chromosomique en mitose	<ul style="list-style-type: none"> Constipation Neurotoxicité périphérique
		Taxanes	Paclitaxel TAXOL® Docétaxel TAXOTERE®		<ul style="list-style-type: none"> Constipation Neurotoxicité périphérique Entérocolite neutropénique (docétaxel)

1.1.7.3.4 L'hormonothérapie

La progression de certains cancers est dépendante des hormones. C'est le cas principalement de certains cancers du sein, de l'endomètre et de la prostate, selon leur niveau de différenciation tumorale et l'expression de récepteurs hormonaux spécifiques (des estrogènes, des androgènes ou de la progestérone) à leur surface.

L'hormonothérapie est un traitement systémique qui bloque l'activité des hormones entretenant la survie et la prolifération des cellules cancéreuses^{116,117,122}. Elle représente près de 12 % des stratégies médicamenteuses pour le traitement des cancers (Figure 8). Les traitements hormono-modulateurs reposent sur 2 stratégies principales^{148,149} :

- Les méthodes additives bloquent l'action des hormones au niveau des cellules tumorales par inhibition compétitive des récepteurs aux estrogènes (antiestrogènes, tels que le tamoxifène NOLVADEX®) ou aux androgènes (antiandrogènes, tels que l'acétate de cyprotérone ANDROCUR®) ou par inhibition de la transformation périphérique des androgènes en estrogènes (antiaromatases, comme l'anastrozole ARIMIDEX®).
- Les méthodes suppressives bloquent la sécrétion hormonale des gonades par castration chimique réversible : l'administration d'analogues de la LH-RH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone) induit un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypophysio-gonadique.

Ces traitements sont indiqués dans le cas de cancers hormono-sensibles à un stade avancé ou métastatique^{116,117,122}, en association ou non à la chimio/radiothérapie. L'expression de récepteurs hormonaux par les tumeurs constitue un facteur prédictif de réponse à l'hormonothérapie.

Les principaux effets indésirables de l'hormonothérapie sont d'ordre métabolique, en lien avec la privation hormonale (bouffées de chaleur, dérèglement du cycle menstruel, pertes vaginales, ostéoporose et phlébite chez la femme, troubles de la libido, prise de poids et bouffées de chaleur chez l'homme....)^{116,117,122}.

1.1.7.3.5 L'immunothérapie

Depuis quelques années, l'échappement immunitaire est reconnu comme une caractéristique des cancers⁶¹. La compréhension de ce mécanisme a récemment mené au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur la stimulation des défenses immunitaires du patient pour lutter contre le cancer. Plusieurs études ont démontré l'intérêt de l'immunothérapie antitumorale dans l'amélioration de la survie pour de nombreux cancers, incluant les cancers digestifs, génito-urinaires et les CBNPC¹⁵⁰⁻¹⁵². L'immunothérapie a même révolutionné la prise en charge de certains cancers jugés réfractaires aux traitements conventionnels tels que les gliomes et les mélanomes^{153,154}.

A ce jour, plusieurs stratégies ont été développées :

- L'immunothérapie active consiste en l'administration de substances mobilisant le système immunitaire du patient afin d'induire une réponse antitumorale. Parmi les thérapies non spécifiques, les cytokines IFN α (interféron α) et IL-2 (interleukine-2) ont notamment montré un intérêt clinique pour le traitement des mélanomes et des cancers rénaux¹⁵⁵⁻¹⁵⁸. Les vaccins autologues de cellules tumorales sont quant à eux un exemple de thérapie spécifique des antigènes tumoraux activant les lymphocytes T cytotoxiques¹⁵⁹. Enfin, le blocage des points de contrôle immunitaire des lymphocytes T (PD1/PDL-1 (Programmed cell death protein-1/programmed cell death ligand-1), CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)) permet de restaurer efficacement la réponse immunitaire antitumorale¹⁶⁰⁻¹⁶³.
- L'immunothérapie adoptive est une technique visant à extraire des cellules immunologiques du patient, les rendre compétentes en laboratoire et dirigées contre un antigène tumoral spécifique avant leur réinjection. Les CAR T-cells (chimeric antigen receptors), des lymphocytes T modifiés génétiquement pour exprimer un récepteur chimérique d'antigène tumoral illustrent parfaitement cette technique¹⁶⁴⁻¹⁶⁶.
- Contrairement aux 2 techniques précédentes, l'immunothérapie passive repose sur l'injection d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes tumoraux spécifiques. De ce fait, elle ne mobilise pas les défenses immunitaires du patient et n'induit pas de mémoire immunitaire. Ces molécules font aujourd'hui partie d'une classe à part, les thérapies ciblées (cf partie 1.1.7.3.6 thérapeutique, les thérapies ciblées).

Les effets indésirables associés à l'immunothérapie sont liés¹⁶⁷⁻¹⁶⁹:

- à l'activation du système immunitaire dirigé contre les tissus sains : il s'agit d'une toxicité auto-immune à l'origine de rash, prurit, diarrhées, colites, hépatites auto-immunes et endocrinopathies.
- au syndrome de libération des cytokines : c'est une réaction inflammatoire systémique causant fièvre, frissons, hypotension et tachycardie principalement.

1.1.7.3.6 Les thérapies ciblées

La compréhension des acteurs moléculaires et des voies intracellulaires de signalisation impliqués dans la tumorigenèse a permis l'avènement des thérapies ciblées dans les années 1990 (Figure 9). En s'adaptant aux spécificités moléculaires de la tumeur, ces thérapies sont au cœur d'une médecine plus personnalisée et font aujourd'hui partie intégrante de l'arsenal thérapeutique à disposition des oncologues (au 2^{ème} rang des options médicamenteuses les plus utilisées, derrière les chimiothérapies) (Figure 8). Ces nouvelles molécules ont permis d'améliorer la spécificité d'action envers les cellules tumorales et ainsi de réduire la toxicité des traitements¹⁷⁰.

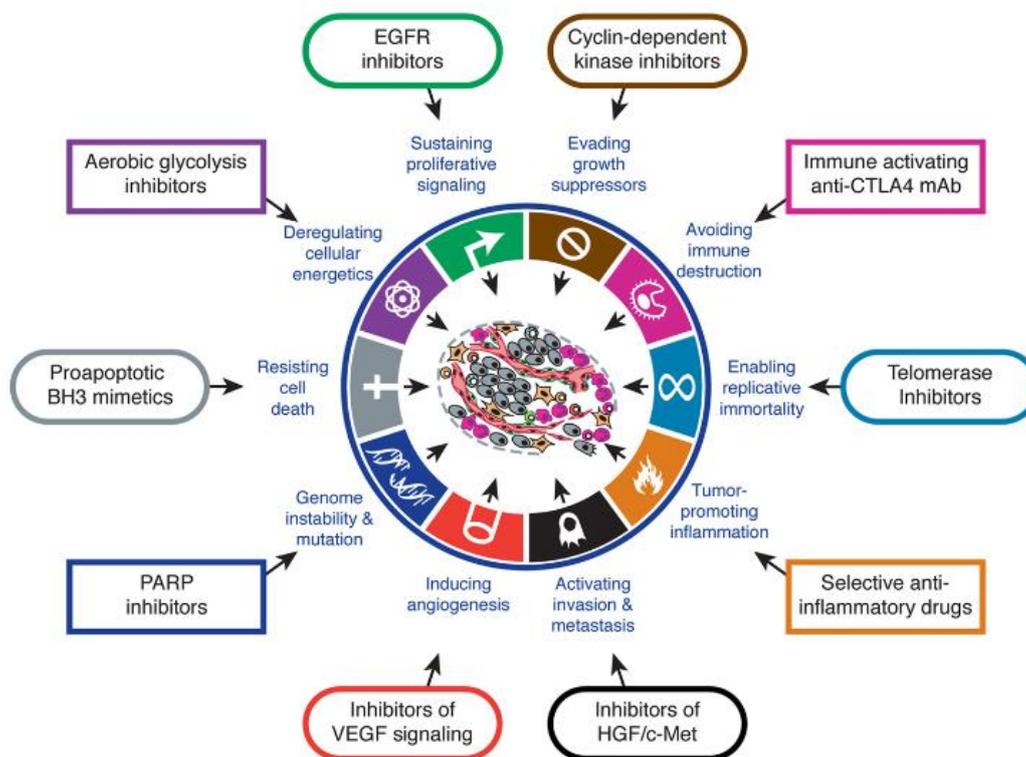


Figure 9. Thérapies ciblant les hallmarks du cancer⁶¹.

A ce jour, 43 thérapies ciblées font l'objet d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) ou d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU de cohorte) pour le traitement des cancers avec une altération génétique spécifique (Tableau 13). Ces molécules sont classées en deux grandes catégories :

Tableau 13. Les 43 thérapies ciblées autorisées (ayant une AMM ou une ATU de cohorte) pour le traitement des cancers fin 2015¹⁷¹.

Mécanismes d'action	Voies oncogéniques	Thérapies ciblées		Biomarqueurs
		Inhibiteurs intracellulaires	Inhibiteurs extracellulaires	
Inhibition de la cascade de signalisation intracellulaire	ALK	Crizotinib, céritinib		Translocation d'ALK
	BCR-ABL	Imatinib, bosutinib, dasatinib, nilotinib, ponatinib		Détection de BCR-ABL/ mutations d'ABL
	BTK	Ibrutinib		
	KIT	Imatinib, sunitinib, régorafénib (bosutinib, dasatinib, nilotinib, ponatinib, sorafénib, pazopanib, lenvatinib, cabozantinib)		Mutation de KIT
	EGFR	Erlotinib, géfinitib, afatinib, osimertinib (vandétanib)	Cétuximab, panitumumab	Mutations d'EGFR
	Mutations de KRAS et NRAS			
	Hedgehog	Vismodégib		
	HER	Lapatinib (afatinib)	Trastuzumab, trastuzumab emtansine, pertuzumab	Amplification d'HER2
	JAK	Ruxolitinib		
	MEK	Tramétinib, cobimétinib		
	m-TOR	Temozolomide, everolimus		
	PDGFR	Imatinib, bosutinib, dasatinib, nilotinib, ponatinib, sorafénib, sunitinib, régorafénib, pazopanib, lenvatinib, nintédanib		Mutation de PDGFRA
	PI3K	Idélalisib		
	BRAF	Vémurafénib, dabrafénib (sorafénib, régorafénib)		Mutation de BRAF V600
	RET	Ponatinib, sunitinib, régorafénib, lenvatinib, vantédanib, cabozantinib		
	MET	Cabozantinib (crizotinib)		
	ROS1	Crizotinib		Translocation de ROS1
Inhibition de l'angiogenèse	VEGF/VEGFR	Axitinib, sorafénib, sunitinib, pazopanib, nintédanib, régorafénib, lenvatinib, vantédanib, cabozantinib (ponatinib)	Bévacizumab, aflibercept, ramucirumab	

1.1.7.3.6.1 Les inhibiteurs intracellulaires (petites molécules)

1.1.7.3.6.1.1 Les inhibiteurs de protéines kinases

Parmi les inhibiteurs intracellulaires, les inhibiteurs de protéines kinases sont les thérapies les plus développées. Les protéines kinases rassemblent l'ensemble des enzymes cytosoliques ou sous-membranaires intervenant dans la transduction intracellulaire des signaux en aval des facteurs de croissance. Leur surexpression ou leur dérégulation est observée dans de nombreux cancers à l'origine d'une hyperactivation des voies de survie, de prolifération cellulaire, d'angiogenèse et d'invasion tumorale. Ceci explique leur intérêt potentiel comme cibles thérapeutiques (Figure 10).

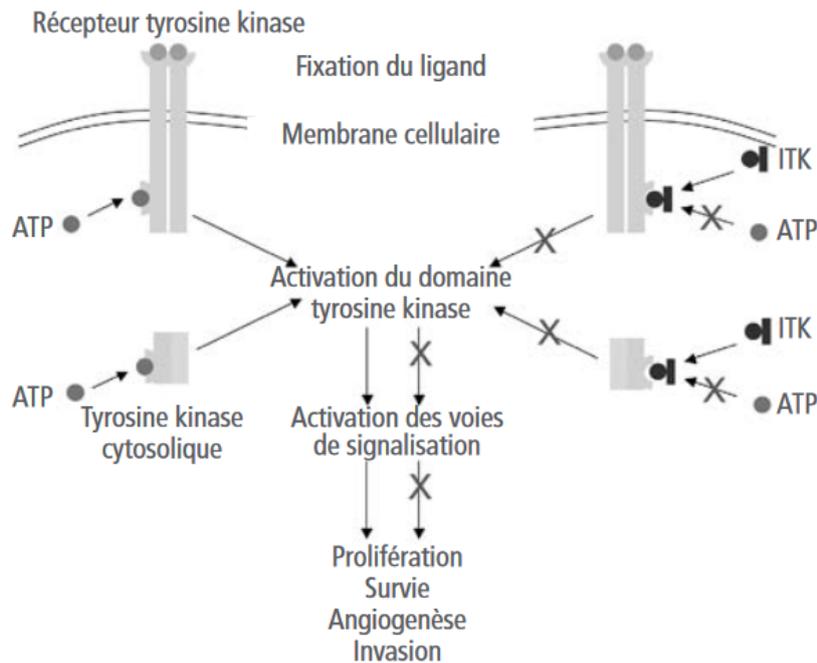


Figure 10. Mécanisme d'action des inhibiteurs de protéines kinases¹⁷².

Les principales protéines kinases ciblées sont:

- La protéine kinase bcr-abl dont l'activation constitutive est observée dans 95 % des leucémies myéloïdes chroniques et près de 30 % des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'adulte. Cette enzyme est codée par le gène de fusion BCR-ABL issu de la translocation t(9;22) et conduit à la prolifération exacerbée des cellules hématopoïétiques, principalement de la lignée granuleuse¹⁷². Parmi les thérapies ciblant bcr-abl, on peut citer l'imatinib GLIVEC® (inhibiteur de première génération), le nilotinib TASIGNA® et le dasatinib SPRYCEL® (thérapies de 2^{ème} génération en cas de résistance à l'imatinib), le ponatinib ICLUSIG® et le bosutinib BOSULIF® (thérapies de 3^{ème} génération en cas de résistance aux molécules précédentes). Elles sont toutes administrées par voie orale¹⁷³.
- La tyrosine kinase de Bruton (BTK), en aval des récepteurs de surface des cellules B, impliquée dans l'activation des voies nécessaires à la circulation, au chimiotactisme et à l'adhésion des cellules B. Cette voie joue un rôle important dans les hémopathies

malignes à cellules B, incluant le lymphome à cellules du manteau, le lymphome diffus à grandes cellules B, le lymphome folliculaire et la leucémie lymphoïde chronique. L'ibrutinib IMBRUVICA® est la seule thérapie ciblée autorisée ciblant la BTK.

- Les protéines kinases associées au récepteur HER (Human epidermal growth factor Receptors : l'EGFR ou HER1, HER2, HER3, HER4). La surexpression ou l'activation des récepteurs HER est observée dans un très grand nombre de néoplasies, incluant les cancers du poumon, du sein, de l'ovaire ou du rein¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Les stratégies thérapeutiques visant à inhiber la protéine kinase en aval permettent de rétablir le contrôle de cette voie de signalisation en cascade. Les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI) de première ou deuxième génération (gefitinib IRESSA®, erlotinib TARCEVA® ou afatinib GIOTRIF®) constituent le traitement de première intention des CBNPC avec mutations activatrices de l'EGFR (10 à 30 % des CBNPC)⁷⁹. Ces mutations activatrices sont présentes au niveau des exons 18, 19, 20 et 21 et sont principalement représentées par la délétion LREA (45 % de toutes les mutations *EGFR*) et la mutation L858R (40 %) (Figure 11). Chez ces patients, les EGFR-TKI ont montré un taux de réponse et une survie sans progression supérieurs aux chimiothérapies⁷⁸. Cependant, de nombreux mécanismes de résistances innée et acquise limitent l'efficacité des EGFR-TKI. La mutation T790M de l'exon 20 est notamment à l'origine de 5 % des cas de résistances innées et de 55-60 % des cas de résistance acquise¹⁷⁷.

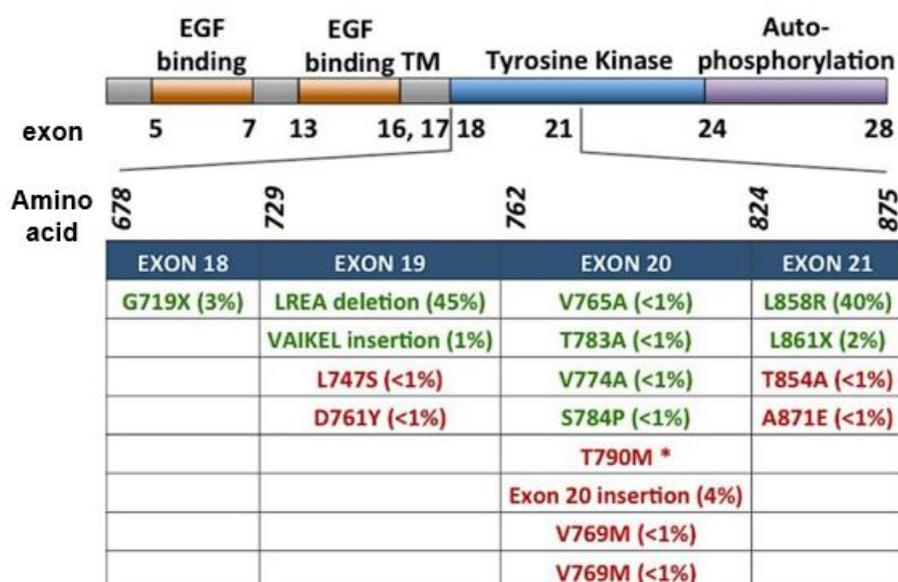


Figure 11. Principales mutations de l'EGFR conférant une sensibilité (en vert) ou une résistance (en rouge) aux EGFR-TKI. Adapté de ⁷⁹.

Les mutations faux-sens sont représentées par l'acide aminé de référence suivi par le numéro d'acide aminé muté et l'acide aminé de substitution. La fréquence de chaque mutation chez les patients avec CBNPC figure entre parenthèses. * La mutation T790M est observé chez ~5 % des patients avant traitement par EGFR-TKI et chez ~60 % des patients après traitement par EGFR-TKI. X indique quand un acide aminé peut être remplacé par différents acides aminés. Dans les délétions et insertions, l'enchaînement des acides aminés délétés/insérés est indiqué. Abréviation : TM, domaine transmembranaire.

- Les protéines kinases associées au récepteur VEGFR (Vascular endothelial growth factor Receptor). L'inhibition de ces protéines kinases interrompt la voie du VEGFR impliquée dans les processus d'angiogenèse¹⁷². Un grand nombre de thérapies ciblant le VEGFR ont été développées parmi lesquels l'axatinib INLYTA®, le sorafenib NEXAVAR® et le sunitinib SUTENT®. Elles sont indiquées pour des cancers très variés tels que les cancers rénaux, hépatocellulaires ou gastrointestinaux.
 - Les protéines kinases associées au récepteur PDGFR (Vascular endothelial growth factor Receptor). Les inhibiteurs de ces protéines kinases bloquent la voie du PDGF, impliquée dans la croissance, la prolifération et la différenciation tumorales¹⁷². Le lenvatinib LENVIMA® est un inhibiteur multikinase ciblant notamment PDGFR et indiqué dans les cancers thyroïdiens.
 - Les protéines kinases cytosoliques RAF, MEK, PI3K, JAK et mTOR, impliquées dans l'activation en cascade des voies de signalisation MAPK, PI3K, JAK/STAT respectivement. Le vemurafenib ZELBORAF® est un inhibiteur de la sérine-thréonine kinase BRAF indiqué en monothérapie pour le traitement des mélanomes malins métastatiques avec mutation de *BRAF* en position V600. Des inhibiteurs de MEK, le trametinib MEKINIST® et le cobimétinib COTELLIC®, peuvent être utilisés dans cette même indication en association avec un inhibiteur de BRAF (le dabrafinib TAFINLAR® et le vemurafenib ZELBORAF® respectivement).

1.1.7.3.6.1.2 L'inhibition d'enzymes

L'olaparib LYNPARZA® est le seul inhibiteur des enzymes poly (ADP-ribose) polymérase humaines (PARP-1, -2 et -3) impliquées dans les processus de réparation de l'ADN. La liaison de l'olaparib au complexe PARP-ADN induit des cassures double brin de l'ADN. En l'absence de gènes BRCA1 et 2 fonctionnels, ces cassures ne peuvent pas être réparés par recombinaison homologue et conduisent à la mort cellulaire¹⁷⁸. L'olaparib bénéficie d'une AMM européenne depuis 2014 pour le traitement d'entretien en monothérapie des femmes atteintes d'un cancer sévère de l'ovaire, des trompes de Fallope ou péritonéal primitif avec une mutation germinale et/ou somatique du gène BRCA¹⁷⁹. A ce jour, la détection de BRCA est réalisée seulement chez les patientes avec des antécédents familiaux ou personnels de cancer de l'ovaire ou du sein. Or, 40 % des patientes avec un cancer sévère de haut grade de l'ovaire et une mutation BRCA n'ont aucune histoire familiale de cancer, suggérant l'intérêt de généraliser la détection des mutations BRCA dans les années à venir¹⁸⁰.

1.1.7.3.6.2 Les inhibiteurs extracellulaires (biomédicaments)

Les inhibiteurs extracellulaires sont principalement représentés par les anticorps monoclonaux. Ils sont classés en 2 catégories selon leur mécanisme d'action principal :

- Les anticorps monoclonaux qui sont dirigés contre un récepteur tyrosine kinase membranaire (action directe) :

Le trastuzumab HERCEPTIN® est par exemple un anticorps monoclonal humanisé se liant au domaine extracellulaire de HER2 et empêche ainsi l'activation des voies de signalisation HER2 indépendamment d'un ligand. Il stimule également la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), principalement dans les cellules surexprimant HER2. Le pertuzumab PERJETA® cible quant à lui le domaine de dimérisation de HER2 et empêche ainsi le couplage de HER2 à un autre récepteur de la famille HER¹⁸¹. Il en résulte une inhibition des voies d'activation en aval MAPK et PI3K ligand-dépendante. Tout comme le trastuzumab, le pertuzumab stimule l'ADCC. Ces 2 molécules sont indiquées dans la prise en charge des cancers du sein HER2 positifs^{181,182}.

Le cetuximab ERBITUX® et le panitumumab VECTIBIX® entrent en compétition de façon spécifique avec les ligands de l'EGFR et favorisent l'internalisation du récepteur aboutissant à la régulation négative de l'activité de l'EGFR¹⁸³. Dans le cas des cancers colorectaux métastatiques, la présence de mutations du gène *KRAS* est corrélée à l'activation de la voie MAPK indépendamment de l'EGFR. Dans ce contexte, il est préconisé de déterminer le statut mutationnel *KRAS* avant d'utiliser un anticorps ciblant l'EGFR afin de prédire la réponse au traitement^{183,184} (Tableau 13).

Enfin, le ramucirumab CYRAMZA® est un anticorps humain qui se fixe sur le récepteur VEGFR2 et bloque ainsi son activité. Son activité antiangiogénique est mise à profit dans les CBNPC, les cancers gastriques, et les cancers colorectaux métastatiques¹⁸⁵.

- Les anticorps monoclonaux qui se lient au ligand pour empêcher la liaison de celui-ci à son récepteur (action indirecte) :

Le bevacizumab AVASTIN® limite le processus d'angiogenèse en bloquant la liaison du VEGF. Son indication est large et concerne les CBNPC, les cancers du col de l'utérus, de l'ovaire et les cancers du rein, du sein et du côlon-rectum au stade métastatique¹⁸⁶. L'aflibercept EYLEA® utilisé dans les cancers colorectaux métastatiques est un récepteur soluble du VEGF. Le dénsumab PROLIA® inhibe la résorption osseuse secondaire à certains cancers en inhibant spécifiquement la liaison du ligand RANKL à son récepteur RANK à la surface des ostéoclastes.

Malgré leur action spécifique en théorie, les thérapies ciblées ne sont pas dépourvues d'effets indésirables et leur degré de sévérité est très variable d'une molécule à l'autre (Tableau 14). Certaines complications sont communes aux thérapies d'une même classe pharmacologique, d'autres sont plus spécifiques d'un agent thérapeutique¹¹⁵.

Tableau 14. Principaux effets indésirables des thérapies ciblées¹⁷¹.

Toxicité	Voie Impliquée	Médicaments	Effets Indésirables
Cardiaque	HER2	Trastuzumab	Altération de la fonction ventriculaire gauche
	VEGF	Bévacizumab, sunitinib, sorafénib...	Hypertension artérielle, événement thromboembolique, cardiomyopathie
	ABL, c-KIT, PDGFR	Dasatinib	Hypertension pulmonaire, allongement du QT
	ABL, ABL2, c-KIT, DDR1	Nilotinib	Accidents coronariens, incidents vasculaires, allongement du QT
	ABL, ABL mutant, FGFR, VEGFR, PDGFR	Ponatinib	Accidents coronariens, incidents vasculaires
	MEK1, MEK2	Tramétinib	Cardiomyopathie
Cutanée	EGFR	Cétuximab, panitumumab, erlotinib, géfitinib	Éruption acnéiforme, folliculite, xérose cutanée
	ABL, c-KIT, PDGFR	Imatinib	Éruption maculo-papuleuse, érythrodermie, prurit
	VEGF, PDGF	Sunitinib, sorafénib	Syndrome main-pied, hémorragies sous-unguéales, blanchiment des phanères, mucites
Ophthalmique		Géfitinib	Conjonctivite, blépharite, sécheresse oculaire, perturbation de la vision
	EGFR	Erlotinib	Conjonctivite, trichomégalie
		Cétuximab	Blépharite, conjonctivite, dermite de la paupière
	ABL, c-KIT	Imatinib	Cedème périorbitaire
	CTL-A4	Ipilimumab	Uvéite, papillite, inflammation de l'iris
	VEGF	Bévacizumab, sorafénib, sunitinib	Rétinopathie hypertensive, neuropathie optique, embolie rétinienne
	MEK	Tramétinib	Altération de la perception de la lumière, vision floue, œdème périorbitaire
	ALK, c-MET	Crizotinib	Altération de la vision transitoire
Digestive	VEGF	Sunitinib, sorafénib	Diarrhée, mucite
	EGFR	Erlotinib, géfitinib	Diarrhée
	m-TOR	Évérolimus	Diarrhée
Pulmonaire	EGFR	Erlotinib, géfitinib	Pneumopathie interstitielle
		Cétuximab, panitumumab	Fibrose pulmonaire, bronchiolite

Dans le cas de cancers localement avancés ou métastatiques avec une altération génétique sans option thérapeutique validée, une inclusion au programme AcSé (Accès sécurisé à des thérapies ciblées innovantes) peut être proposée. Le programme AcSé, mis en place à l'initiative de l'INCa, a débuté en 2013 et a pour objectif de permettre un accès équitable à l'innovation thérapeutique en France. Il consiste à évaluer l'efficacité antitumorale d'une thérapie ciblée ayant l'AMM pour une autre localisation que l'organe concerné.

L'essai clinique AcSé crizotinib est le 1^{er} essai développé dans le cadre du programme AcSé. Il met à disposition la thérapie ciblée crizotinib aux patients en situation d'échec thérapeutique et avec une anomalie de ALK, MET ou ROS1 quelle que soit la localisation tumorale (Tableau 15).

L'essai AcSé vemurafenib permet l'accès au vemurafenib pour tous les patients atteints d'un cancer avec mutation du gène *BRAF* en position V600 (Tableau 15).

Tableau 15. Principales anomalies recherchées dans le cadre du programme AcSé¹⁸⁷.

Essais AcSé	Localisations	Anomalies recherchées	Etat au 15/03/2015	
Crizotinib	Cancer colorectal	Translocation ALK	Arrêt	
		Mutation ALK	En cours	
		Translocation MET	Suspendu	
	Cancer du sein	Translocation et amplification ALK	Suspendu	
	Cancer du foie	Amplification et mutation* de MET (* seulement pour les cancers du foie pédiatriques)	En cours	
	Cancer gastrique	Amplification de MET	En cours	
	Glioblastome	Amplification de MET	En cours	
	Neuroblastome	Amplification et mutation ALK Analyses centralisées à L'IGR/ Curie / Centre Léon Bérard	En cours	
	Cancer du rein	Translocation et amplification ALK et mutation de MET	En cours	
	Lymphomes anaplasiques GC	Translocation ALK	En cours	
	Mélanome acro-lentigineux Tumeur spitzoïde	Translocation ALK et Ros	En cours	
	Crizotinib- Vemurafenib	CPNPC	Translocation (AMM) et amplification ALK, amplification de MET et translocation de ROS	En cours
		Cholangiocarcinome	Translocation de ROS	En cours
Cancer de l'ovaire		Amplification de MET	En cours	
Cancer de la thyroïde		Cancer anaplasique de la thyroïde Adultes Mutation et translocation ALK Cancer de la thyroïde (folliculaire + médullaire + papillaire) Adultes – Mutation MET	En cours	
T myofibroblastique Inflammatoire		Translocation ALK	En cours	
Rhabdomyosarcome	Amplification ALK	En cours		
Vemurafenib	Cancer de la prostate	Mutation V600 du gène BRAF	En cours	
	Cancer de la vessie	Mutation V600 du gène BRAF	En cours	
	Sarcomes	Mutation V600 du gène BRAF	En cours	
	GIST	Mutation V600 du gène BRAF	En cours	

1.1.7.4 Suivi des patients

La surveillance post-thérapeutique a pour objectifs :

- D'estimer la progression et la réponse au traitement
- De détecter précocement les récurrences locales ou à distance
- De prendre en charge les effets indésirables liés au traitement
- D'organiser les soins de support

L'efficacité du traitement est généralement appréciée par un examen d'imagerie, par un examen clinique et/ou par le dosage des marqueurs tumoraux sériques (Tableau 16). La fréquence du suivi dépend du stade de la maladie et du traitement adopté.

Tableau 16. Intérêt des principaux marqueurs tumoraux pour le suivi thérapeutique des tumeurs solides. Abréviations : ACE : Antigène carcino-embryonnaire, CA : Antigène Carbohydre, HCG : *Hormone Chorionique Gonadotrope*, LDH : Lactate déshydrogénase, NEM2: néoplasie endocrinienne multiple de type 2, SCC : Squamous cell carcinoma, TSH : thyroïdostimuline. Adapté de ¹¹⁴.

Organe	Marqueur	Surveillance en cours de traitement/Efficacité	Suivi après traitement/Récidive
Col de l'utérus	SCC	non	oui, si initialement élevé: tous les 4 mois pendant 2 ans puis tous les 6 mois pendant 3 ans puis annuelle
Colon-Rectum	ACE	oui	Optionnel: tous les 3 mois pendant 3 ans
Endomètre	CA 125	Oui	non
Foie	Alfa Foeto Protéine	oui	si initialement élevé: tous les 3 mois pendant 1 an, puis tous les 4-6 mois
Mélanome	LDH	non	non
Môle hydatiforme	hCG totale sérique	jusqu'à négativation confirmée sur 3 dosages successifs	Dosage mensuel: pendant 6 mois si môle hydatiforme partielle; pendant 12 mois si môle hydatiforme complète; pendant 6 mois si MHC avec négativation d'hCG en moins de 8 semaines
Ovaire	CA 125	Oui	oui, si initialement élevé: tous les 4 mois pendant 2 ans puis tous les 6 mois pendant 3 ans puis annuelle. Si point d'appel clinique
	CA 19-9, ACE: si tumeur mucineuse	non	oui, si initialement élevé: tous les 4 mois pendant 2 ans puis tous les 6 mois pendant 3 ans puis annuelle. Si point d'appel clinique
Ovaire: tumeur germinale maligne	Alfa Foeto-Protéine, Béta HCG, LDH	non	oui, si initialement élevé: tous les 4 mois pendant 2 ans puis tous les 6 mois pendant 3 ans puis annuelle. Si point d'appel clinique
Pancréas	CA 19-9	non	tous les 3 mois pendant 2 ans
Prostate	PSA total	Oui: 6 semaines à 3 mois après initiation du traitement; puis tous les 6 mois	Oui: tous les 6 mois pendant 3 à 5 ans puis annuellement pendant 15 ans
Sein	CA 15-3	non	non
Testicule	LDH, Béta HCG, Alfa Foeto Protéine	Oui: avant chaque cure de chimiothérapie et à la fin du traitement pour les TGNS	Pour les TGNS stade I : tous les 3 mois pendant 2 ans, puis tous les 6 mois pendant 3ans, puis annuelle. Si point d'appel clinique
			Pour les TGS stade I : tous les 4 mois pendant 2 ans, puis tous les 6 mois pendant 3 ans, puis annuelle. Si point d'appel clinique
			Pour les tumeurs métastatiques: tous les 3 mois pendant 2 ans, puis tous les 6 mois pendant 3 ans puis annuelle. Si point d'appel clinique
Thyroïde, forme médullaire	ACE, Calcitonine	Oui + THS	Oui + TSH
Thyroïde, forme folliculaire	Thyroglobuline, Anticorps anti-thyroglobuline, TSH, T4, T3 libre	THS, Anticorps anti Tg	THS, Anticorps anti Tg
Tumeurs trophoblastiques gestationnelles	hCG totale sérique	non	Après chimiothérapie: dosage hebdomadaire pendant 8 semaines, puis tous les 15 jours pendant 8 semaines, puis tous les mois pendant 12 mois si tumeur à bas risque, pendant 18 mois si haut risque.
Vessie	PSA total	non	oui

La réapparition de la mutation cible ou l'apparition d'une mutation de résistance dans l'ADN tumoral circulant ou dans les cellules tumorales circulantes pourrait à l'avenir permettre la détection précoce des rechutes¹⁸⁸.

Le clinicien conseille systématiquement un sevrage tabagique et alcoolique afin de limiter le risque de récurrence et de survenue de seconds cancers^{13,189,190}. En cas de rechute ou de récurrence, un nouveau bilan diagnostique est réalisé et la stratégie thérapeutique à adopter est discutée en RCP.

Conclusion

- Le cancer est la principale cause de mortalité en France.
- Le cancer est une pathologie multifactorielle, résultant de l'effet combiné de facteurs génétiques et environnementaux.
- La prise en charge des cancers est variable selon le stade de la maladie, les caractéristiques moléculaires de la tumeur et l'état du patient. Trois options thérapeutiques peuvent être envisagées : la chirurgie, la radiothérapie et/ou un traitement systémique médicamenteux (hormonothérapie, immunothérapie, chimiothérapies, thérapies ciblées).
- Le traitement par chimiothérapie reste encore un gold-standard pour de nombreux cancers (cancer du sein, du poumon, de l'ovaire, de la prostate, digestif...). Dans le cadre des associations chimiothérapeutiques, les agents ciblant les microtubules sont très largement utilisés. Les microtubules constituent une cible privilégiée des cancers en raison de leur rôle essentiel dans la division cellulaire.

1.2 Microtubules

Les microtubules constituent, avec les filaments d'actine et les filaments intermédiaires, les composants majeurs du cytosquelette des cellules eucaryotes (Figure 12). Tous sont en étroite coopération afin d'assurer l'intégrité cellulaire.

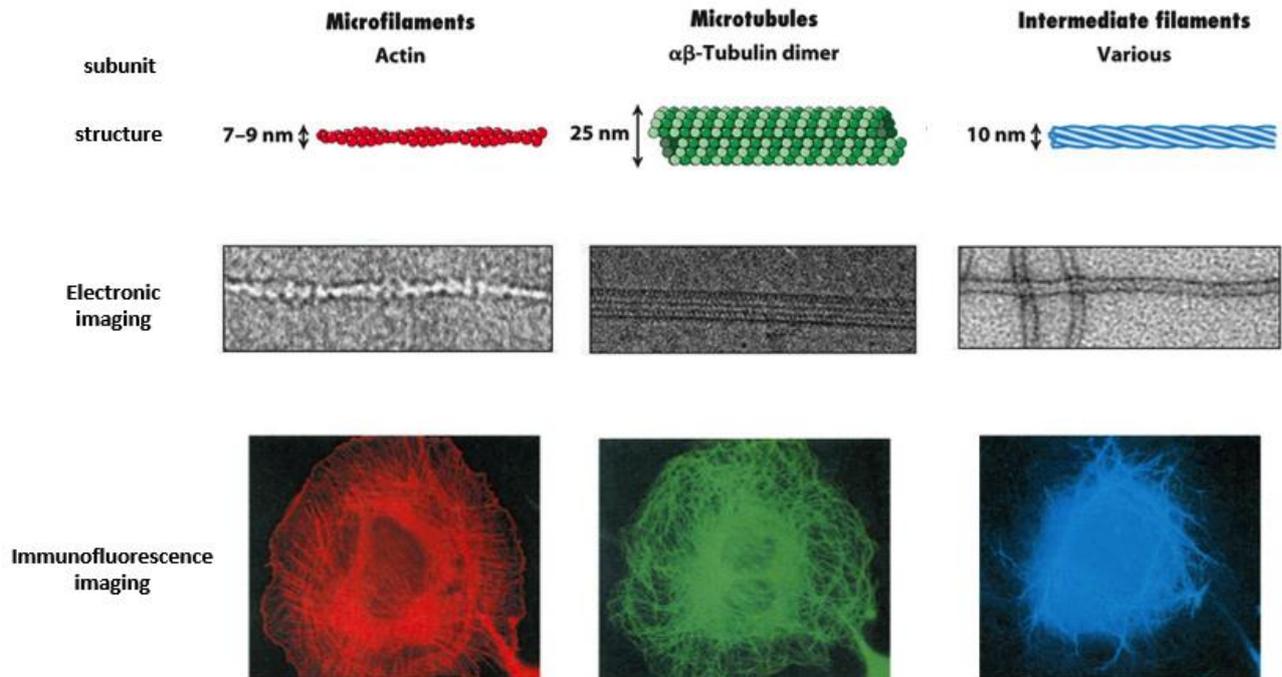


Figure 12. Les principaux composants du cytosquelette dans les cellules eucaryotes.
Adapté de ¹⁹¹.

1.2.1 Structure des microtubules

1.2.1.1 Structure générale

L'unité structurale de base des microtubules est constituée d'un hétérodimère de tubuline (Figure 13). Chaque hétérodimère est constitué de 2 sous-unités d' α - et de β -tubuline liées de façon non covalente. Ces dimères de 8 nm de longueur sont capables de s'auto-assembler longitudinalement, selon une conformation en tête-à-queue, pour former des protofilaments linéaires. Enfin, ces protofilaments s'associent latéralement en feuillets plans se repliant pour former la paroi des microtubules. Le nombre de protofilaments inclus dans la structure microtubulaire est variable (entre 10 et 18), on retrouve cependant majoritairement 13 protofilaments par microtubule *in vivo*¹⁹². Au final, les microtubules forment des structures rigides en forme de cylindre creux de 25 nm de diamètre.

Les protofilaments voisins sont décalés axialement de telle sorte que l'arrangement des monomères de tubuline adjacents décrit une structure en hélice avec un pas de 12 nm¹⁹³. Dans cette configuration, 3 hélices parallèles sont nécessaires pour reconstituer le microtubule en entier : on parle « d'hélice à 3 départs ». Selon le nombre de protofilaments, il peut exister le long du microtubule une discontinuité dans l'enchaînement latéral des sous-unités, appelée « ligne de suture »¹⁹⁴. Cette ligne de suture provient du repliement du feuillet de tubuline lors

de la formation du microtubule¹⁹⁵. A ce niveau, les contacts latéraux entre protofilaments sont établis entre les monomères α et β tandis que dans le reste du microtubule, les interactions se font préférentiellement entre tubulines de même isotype (α - α , β - β)¹⁹⁶.

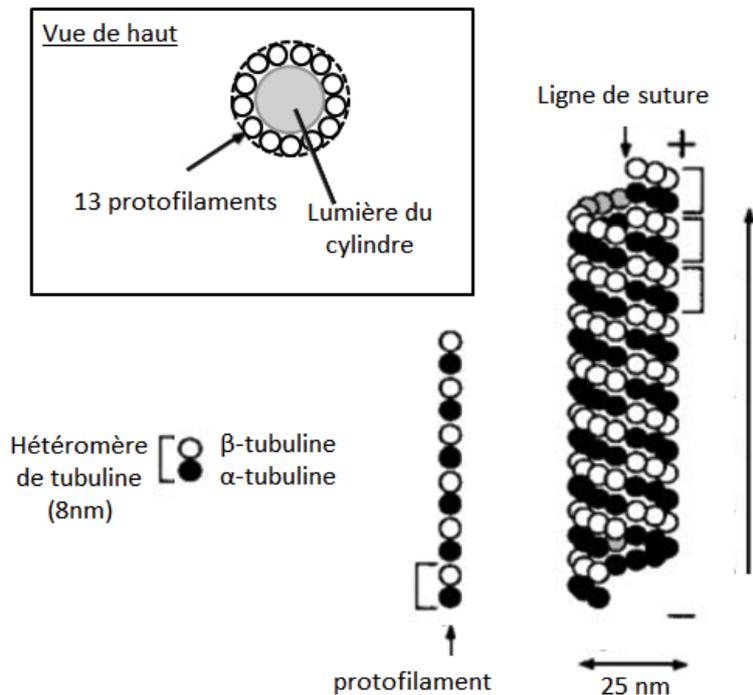


Figure 13. Représentation schématique des microtubules adaptée de ¹⁹⁷.

L'orientation des dimères dans les protofilaments (avec alternance des sous-unités α et β) est à l'origine de la polarité structurale des microtubules : l'une des extrémités du microtubule nommée « bout plus » expose les monomères de β -tubuline tandis que l'autre côté dit « bout moins » présente à sa surface les sous-unités α ¹⁹⁸.

1.2.1.2 La tubuline

La tubuline est une des protéines les plus abondantes dans les cellules eucaryotes. En 1968, Weisenberg *et al.* identifient pour la première fois les tubulines α et β dans les microtubules grâce à des techniques biochimiques¹⁹⁹. Pendant plus de 20 ans, elles sont considérées comme les seules formes de tubuline existantes jusqu'à ce que la tubuline γ soit découverte lors d'un crible génétique réalisé chez *Aspergillus nidulans*²⁰⁰. Depuis la fin des années 1990, de nombreuses études génétiques et analyses de bases de données ont permis d'agrandir cette superfamille de tubulines. A ce jour, on recense 6 grandes familles de tubuline chez les eucaryotes (α , β , γ , δ ²⁰¹, ϵ ²⁰², ζ ²⁰³)²⁰⁴.

Seules les tubulines α , β et γ sont présentes chez tous les organismes eucaryotes. Les autres familles de tubuline n'ont à ce jour été identifiées que chez certaines espèces. Elles sont encore peu documentées et ne seront pas développées ici.

1.2.1.2.1 *Les tubulines α et β*

Les tubulines α et β sont des protéines globulaires d'environ 450 acides aminés ayant chacune un poids moléculaire de 55 kDA. Ces 2 protéines présentent une forte homologie structurale (40-50 % d'identité en acides aminés)^{205,206}. Dans les cellules, ces protéines n'existent pas sous forme isolée, elles sont exclusivement sous forme d'un hétérodimère de tubuline constituant l'élément de base des microtubules. Nogales *et al.* établissent pour la première fois la structure tridimensionnelle du dimère de tubuline par cristallographie électronique des feuillettes de tubuline en présence d'ions zinc et de paclitaxel (un agent anticancéreux stabilisateur de microtubules) à une résolution de 3,7 Å²⁰⁷ (Figure 14). Concernant la structure secondaire, chaque monomère possède deux feuillettes β centraux entourés de 12 hélices α .

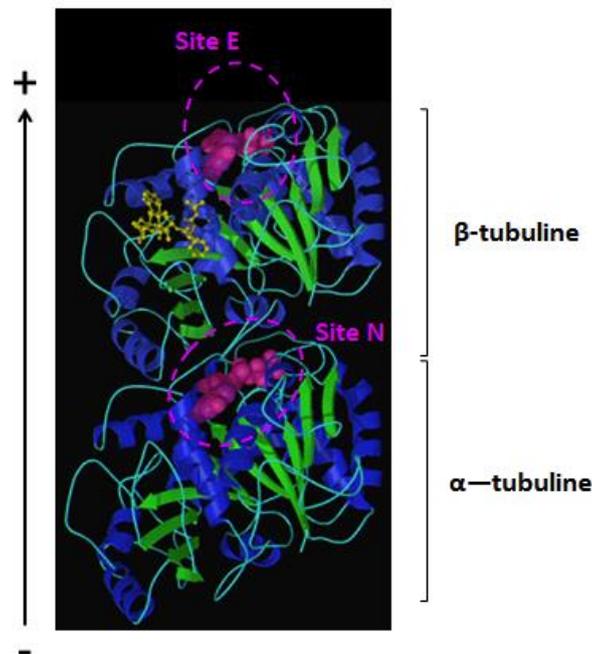


Figure 14. Structure tridimensionnelle de l'hétérodimère d' α/β tubuline (diagramme Ribbon). Adapté de ²⁰⁸. La structure secondaire figure sur la représentation schématique : les feuillettes β sont en vert et les hélices α en bleu. Le nucléotide guanosine se liant à chaque monomère est représenté en rose tandis que le paclitaxel apparaît en jaune.

Chaque sous-unité est structurée en 3 domaines fonctionnels (Figure 15) :

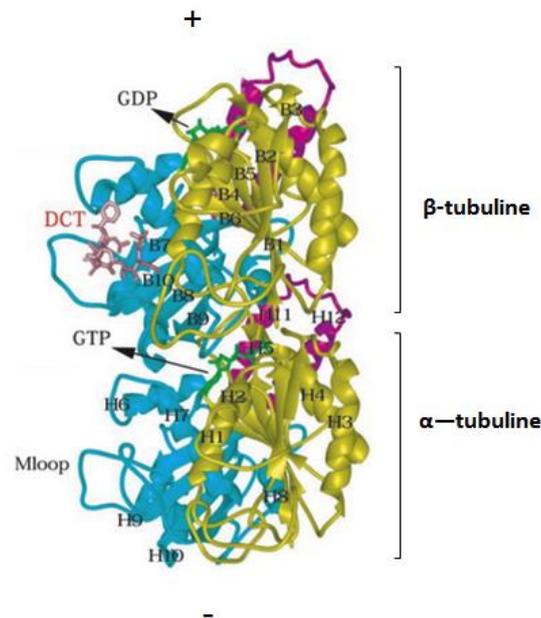


Figure 15. Les domaines fonctionnels de l'hétérodimère de tubuline : le domaine N-terminal (en jaune), le domaine intermédiaire (en bleu) et le domaine C-terminal (en fuschia). Le paclitaxel (DCT) se fixe au domaine intermédiaire du monomère β (en rose). Les nucléotides GTP et GDP apparaissent en vert. Adapté de ²⁰⁹.

- Un domaine N-terminal : l'extrémité N-terminale forme un pli de Rossman permettant la liaison de nucléotides GTP (guanosine 5'-triphosphate)²¹⁰. Un cation magnésium Mg^{2+} est impliqué dans la liaison du GTP au niveau de chaque monomère²¹¹. Dans la sous-unité α , le nucléotide, enfoui à l'interface entre les 2 monomères de tubuline, est non échangeable (site N)²¹². Le GTP associé à la tubuline β est quant à lui à l'interface inter-dimère et est hydrolysable en GDP (guanosine diphosphate) et en phosphate inorganique (site E, échangeable). L'hydrolyse du GTP au niveau du site E est à l'origine de l'instabilité dynamique des microtubules.
- Un domaine intermédiaire : c'est le site de liaison du paclitaxel au niveau du monomère β . La boucle M est impliquée dans les interactions latérales entre les protofilaments. Très flexible, elle joue le rôle de charnière lors de l'assemblage des microtubules pour former une structure cohésive quel que soit le nombre de protofilaments²⁰⁶. Au sein de la sous-unité α , un ion zinc Zn^{2+} permet de stabiliser la boucle.
- Un domaine C-terminal : Lors de l'assemblage des microtubules, le domaine C-terminal des monomères est exposé à la surface des microtubules. Il constitue le site de liaison de nombreuses protéines associées aux microtubules (MAPs). Cette extrémité est souvent sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles (tyrosination, polyglutamylation, polyglycylation).

1.2.1.2.2 La tubuline γ

La tubuline γ possède une structure très proche de celle des tubulines α et β . Elle présente 29-35 % d'acides aminés en commun avec celles-ci²¹³ et possède elle-aussi un site de liaison du GTP. Malgré une conformation incurvée, la tubuline γ est capable de s'auto-assembler latéralement pour former une structure complexe stable : les γ -TuRC (γ -Tubulin Ring Complexes)²¹⁴. La tubuline γ est principalement localisée au niveau des centres organisateurs de microtubules (COMT) et est impliquée dans l'initiation de l'assemblage des microtubules (nucléation). La tubuline γ a également d'autres fonctions dans la cellule : elle régule la dynamique des microtubules et la progression du cycle cellulaire²¹⁵.

1.2.1.2.3 Les isotypes de tubuline

Chez les vertébrés, chaque tubuline est représentée par un ensemble de variants qui diffèrent selon leur séquence en acides aminés et le gène codant ces protéines. Chez l'homme, plus de 15 isotypes de tubuline α , 21 isotypes de tubuline β et 3 isotypes de tubuline γ ont été identifiés²¹⁶. En raison de leur rôle majeur dans l'assemblage des microtubules, les domaines N-terminal et intermédiaires des tubulines sont généralement conservés d'un isotype à l'autre tandis que la partie C-terminale est variable. Les isotypes de tubuline sont souvent exprimés par différents tissus ou types cellulaires et la conservation de cette diversité de tubuline au cours de l'évolution suggèrent l'importance des différents isotypes sur le plan fonctionnel. Cependant, plusieurs études ont montré que les isotypes sont souvent fonctionnellement interchangeable^{217,218} et, à ce jour, seul le rôle spécifique d'un petit nombre d'isotypes a pu être établi²¹⁹⁻²²².

La composition isotypique des microtubules influence les modifications post-traductionnelles survenant sur ceux-ci. Par exemple, les isotypes de tubuline humaine TUBA4A et TUBA8 caractérisés par l'absence de résidu tyrosine C-terminal ne peuvent pas subir de détyrosination²²². Ce polymorphisme génétique de la tubuline affecte également le comportement dynamique des microtubules. Des essais *in vitro* ont ainsi montré que les microtubules assemblés à partir de dimères de tubuline $\alpha\beta$ (III) sont significativement plus dynamiques que ceux formés à partir d'autres isotypes $\alpha\beta$ (II) et $\alpha\beta$ (IV)²²³. Enfin, l'expression différentielle d'isotypes module la sensibilité de la cellule vis-à-vis des agents ciblant les microtubules^{224,225}.

1.2.1.2.4 Les modifications post-traductionnelles de la tubuline

En plus du polymorphisme génétique, de nombreuses modifications post-traductionnelles (PTM) contribuent à la grande diversité des tubulines (Tableau 17). A ce jour, seules les modifications affectant les monomères α et β ont été décrites. Ces PTM peuvent survenir sur les dimères solubles de tubuline ou après l'assemblage des microtubules et affectent principalement l'extrémité C-terminale des monomères α et β (Figure 16). Elles régulent les interactions des protéines associées aux microtubules (MAPs) et des protéines motrices avec les microtubules et ainsi coordonnent la dynamique et les différentes fonctions des microtubules²²⁶.

Par exemple, les processus de détyrosination/tyrosination régulent l'organisation neuronale^{226,227}. Ce cycle de détyrosination/tyrosination permet le recrutement différentiel de 2 types de protéines associées aux microtubules : les protéines de bout plus (+TIPs) et les protéines motrices. Au niveau axonal, les microtubules accumulent la tubuline détyrosinée qui constitue le site préférentiel de liaison de la protéine KIF5 (une protéine motrice impliquée

dans le transport intracellulaire). Au niveau des cônes de croissance, la majorité des microtubules est tyrosinée ce qui favorise la liaison et l'activité d'une protéine associée au bout plus (CLIP170). L'inactivation du gène de la TTL chez la souris (enzyme induisant la tyrosination de la tubuline) induit l'accumulation de tubuline détyrosinée majoritairement dans les cellules neuronales. Il en résulte une différenciation axonale prématurée en raison de la suractivation de KiF5 et un défaut de développement des cônes de croissance traduisant la délocalisation de CLIP170 à ce niveau^{228,229}. Cette étude montre l'importance de la compartimentation des microtubules tyrosinés/détyrosinés pour moduler les différentes fonctions des microtubules au sein d'une même cellule.

Tableau 17. Les principales modifications post-traductionnelles de la tubuline et des microtubules²²⁷. Abréviations: Tubulin tyrosine ligase (TTL), cytoplasmic carboxypeptidases (CCP), tubulin tyrosine ligase- like family members (TTLL).

Modification	α/β	Site	Enzyme
Acetylation	α	Lys40	TAT (MEC17)
Deacetylation	α		HDAC6, SIRT2, HDAC5
Detyrosination	α	C-terminal Tyr	Unknown
Tyrosination	α	Add to C-terminal	TTL
$\Delta 2$ deglutamylation	α	Removal of C-terminal Glu of detyrosinated MTs	CCP1, CCP2, CCP3, CCP4, CCP5, and CCP6
Glutamylolation	α/β	Various C-terminal Glu	TTLL4, 5, and 7
De glutamylation of branch point Glu	α/β		CCP5 and CCP1, CCP4, CCP6
Polyglutamylolation	α/β	Add γ -linked Glu to C-terminal	TTLL1, 6, 11, and 13 CCP1, CCP4, CCP6
De glutamylation to shorten polyGlu side chain			
Glycylation	α/β	Add γ -linked Gly to C-terminal Glu	TTLL3 and 8
Polyglycylation		Addition to γ -linked Gly C-terminal	TTLL10
Deglycylation			Unknown
Polyamination	α/β	β tubulins Q15, others	Transglutaminase
Glycosylation	α/β	various	Unknown
Glycation	α/β	various	Nonenzymatic
Palmitoylation	α	Cys376	Unknown
Phosphorylation	α/β	β tubulin Ser172, others	Various
Sumoylation	α	multiple	Unknown
Ubiquitylation	α	multiple	Parkin

*Blue, modifications on tubulin in MTs; red, modifications restricted to soluble tubulin dimers; and black, modifications that are either undetermined or occur on both.

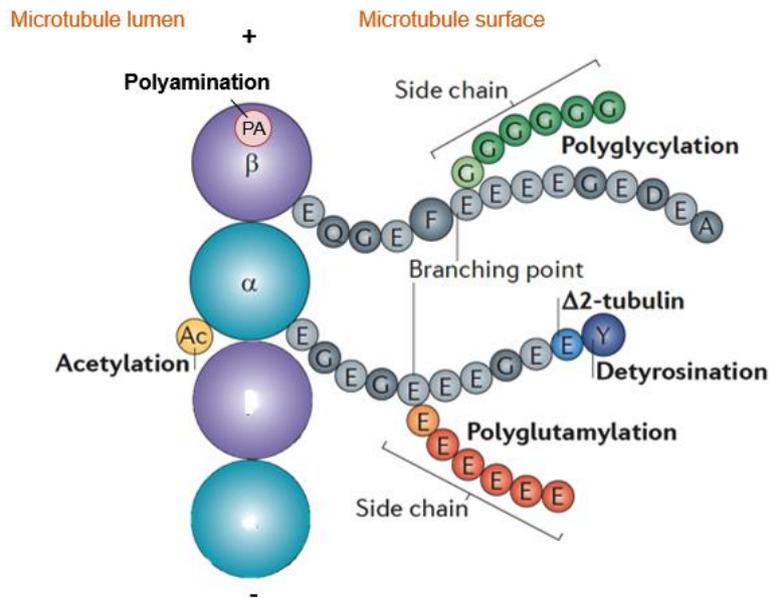


Figure 16. Localisation des principales modifications post-traductionnelles. Adapté de ²²⁶.

1.2.2 Dynamique des microtubules

Les microtubules sont des structures polymérisées dynamiques dont la longueur varie de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs centaines de micromètres. Le comportement dynamique des microtubules est en lien direct avec les propriétés intrinsèques de la tubuline ; il repose principalement sur la capacité de liaison de la guanosine 5'-triphosphate (GTP)²³¹ sur le monomère β et son hydrolyse.

1.2.2.1 Cinétique d'assemblage/désassemblage des microtubules *in vitro*

L'assemblage des microtubules consiste en l'incorporation de dimères libres de tubuline-GTP (tubuline avec nucléotide GTP lié à la sous-unité β). Les dimères de tubuline-GDP peuvent également être ajoutés au microtubule en formation à condition d'être associés à des dimères de tubuline-GTP²³². L'addition d'un nouvel hétérodimère permet la mise en contact de la sous-unité α du dimère libre (associée à des protéines activant la GTPase) avec le monomère β du dernier dimère de tubuline-GTP intégré au microtubule (ayant une activité GTPase). Ce rapprochement entre les 2 dimères induit l'hydrolyse du nucléotide GTP du site E²³³ qui devient alors non échangeable. L'hydrolyse de la GTP n'est pas nécessaire pour l'assemblage des dimères de tubuline, elle est en revanche essentielle pour réguler la dynamique des microtubules.

La polymérisation des microtubules décrit plusieurs phases : la nucléation, l'élongation et l'état d'équilibre (Figure 17Figure 18).

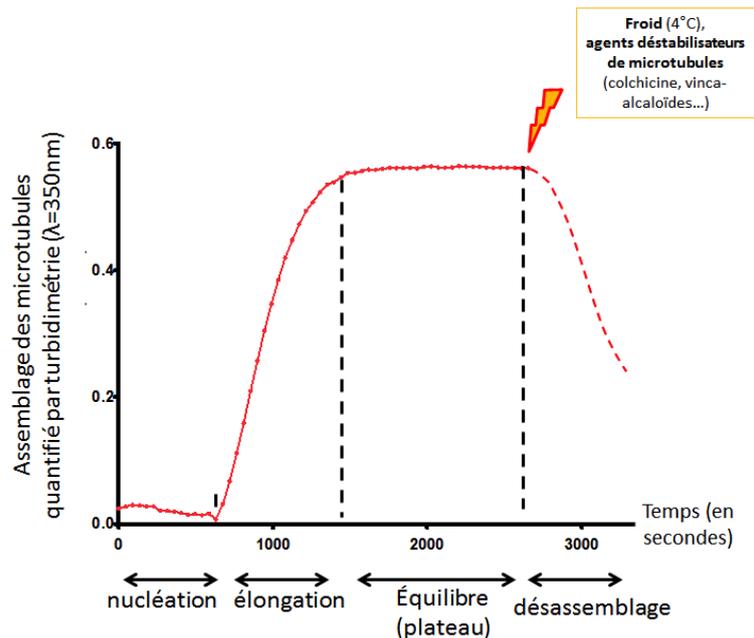


Figure 17. Représentation schématique de l'assemblage des microtubules *in vitro* par suivi turbidimétrique à 350 nm.

La nucléation est l'étape initiale de formation des microtubules. Elle consiste en la formation *de novo* de multimères de tubuline constituant des amorces de microtubules²³⁴. *In vitro*, cette étape est initiée à 37°C et en présence de GTP lorsque la concentration en tubuline atteint une concentration critique d'assemblage (C_c , d'environ 25 μM). C'est un processus lent et défavorable sur le plan énergétique à l'origine d'un temps de latence dans l'assemblage des microtubules.

L'élongation repose sur l'allongement progressif du microtubule suite à l'addition séquentielle à ses extrémités de dimères de tubuline, préalablement assemblés en oligomères (Figure 18)²³⁵. *In vitro*, les microtubules présentent une polarité fonctionnelle : l'addition des dimères de tubuline se fait préférentiellement à l'extrémité plus du microtubule qui possède une cinétique d'assemblage nette élevée tandis qu'au bout moins, la majorité des événements consiste en un désassemblage des dimères. Lors de l'élongation, les protofilaments s'étendent par addition de nouveaux dimères à leur extrémité et s'associent latéralement pour former un feuillet plan. Lorsque ce dernier est suffisamment grand, il se replie sur lui-même le long de la ligne de suture pour former un tube creux de microtubule. La vitesse d'élongation dépend de la concentration locale en tubuline-GTP²³⁶.

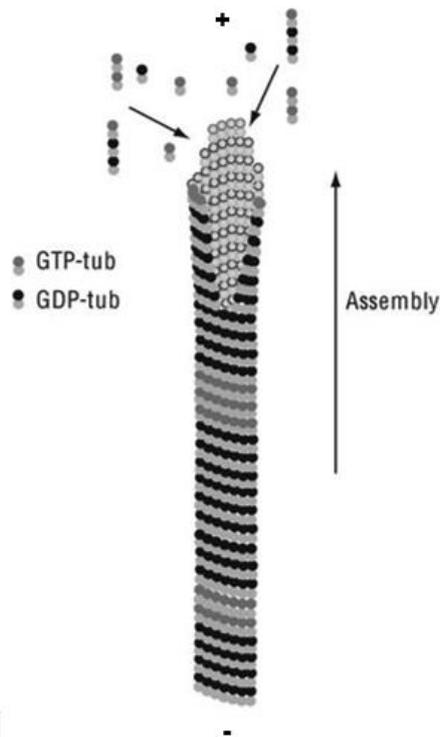


Figure 18. Représentation schématique d'un microtubule en cours d'élongation²³⁷.

A l'état stationnaire, la masse de tubuline polymérisée est constante bien que les microtubules restent dynamiques et échangent en permanence des dimères de tubuline à leurs deux extrémités. Deux processus contribuent à cet état d'équilibre :

- le phénomène de tapis roulant ou « treadmilling » (Figure 19) : en raison de la polarité fonctionnelle des microtubules, on observe à l'état d'équilibre l'incorporation des dimères de tubuline à l'extrémité plus dans les mêmes proportions que le désassemblage de ceux-ci à l'extrémité moins. Il en résulte un flux de tubuline dans le microtubule de l'extrémité plus vers l'extrémité moins, mimant l'effet d'un tapis roulant²³⁸.

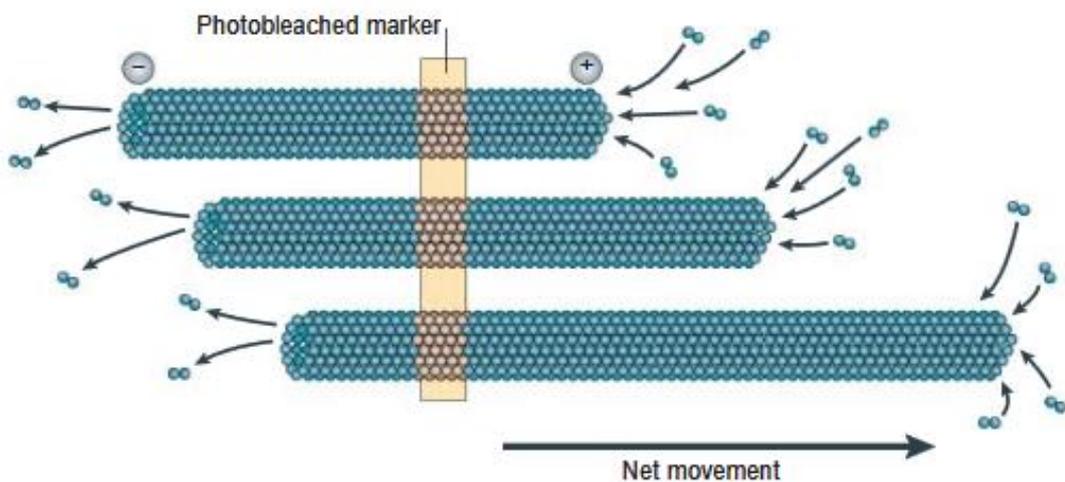


Figure 19. Représentation schématique du phénomène de tapis roulant²³⁹.

- la forte instabilité dynamique des microtubules²³⁰: les microtubules alternent des phases de croissance lente, de pause et de désassemblage rapide de façon totalement aléatoire (Figure 20, Figure 21, Figure 22)^{230,240}. La transition entre les phases d'assemblage et de désassemblage est appelée catastrophe, le processus inverse est nommé sauvetage. Cette instabilité dynamique est essentielle pour leurs fonctions dans les processus biologiques car elle permet une adaptation rapide de l'organisation microtubulaire²⁴¹. Cette instabilité est en lien avec l'hydrolyse de la GTP qui induit un changement conformationnel des dimères (passage d'une configuration droite de la tubuline-GTP à une forme plus recourbée de la tubuline-GDP)²⁴². Il en résulte une plus faible cohésion entre les dimères de tubuline-GDP adjacents à l'origine de l'incurvation des protofilaments et un risque accru de dépolymérisation du microtubule²⁴³. L'hydrolyse de la GTP étant plus lente que l'incorporation des dimères, une coiffe de tubuline-GTP persiste à l'extrémité plus du microtubule et stabilise le microtubule²⁴⁴. En cas de perte de cette coiffe, le microtubule se dépolymérise très rapidement (phénomène de catastrophe)²⁴⁵, les dimères de tubuline-GDP sont alors libérés dans le cytosol et peuvent échanger le GDP avec une unité de GTP pour être à nouveau intégrés dans un cycle de polymérisation. La coiffe de tubuline-GTP peut dans certains cas être récupérée par le microtubule et permettre sa repolymérisation rapide et sa stabilisation (sauvetage).

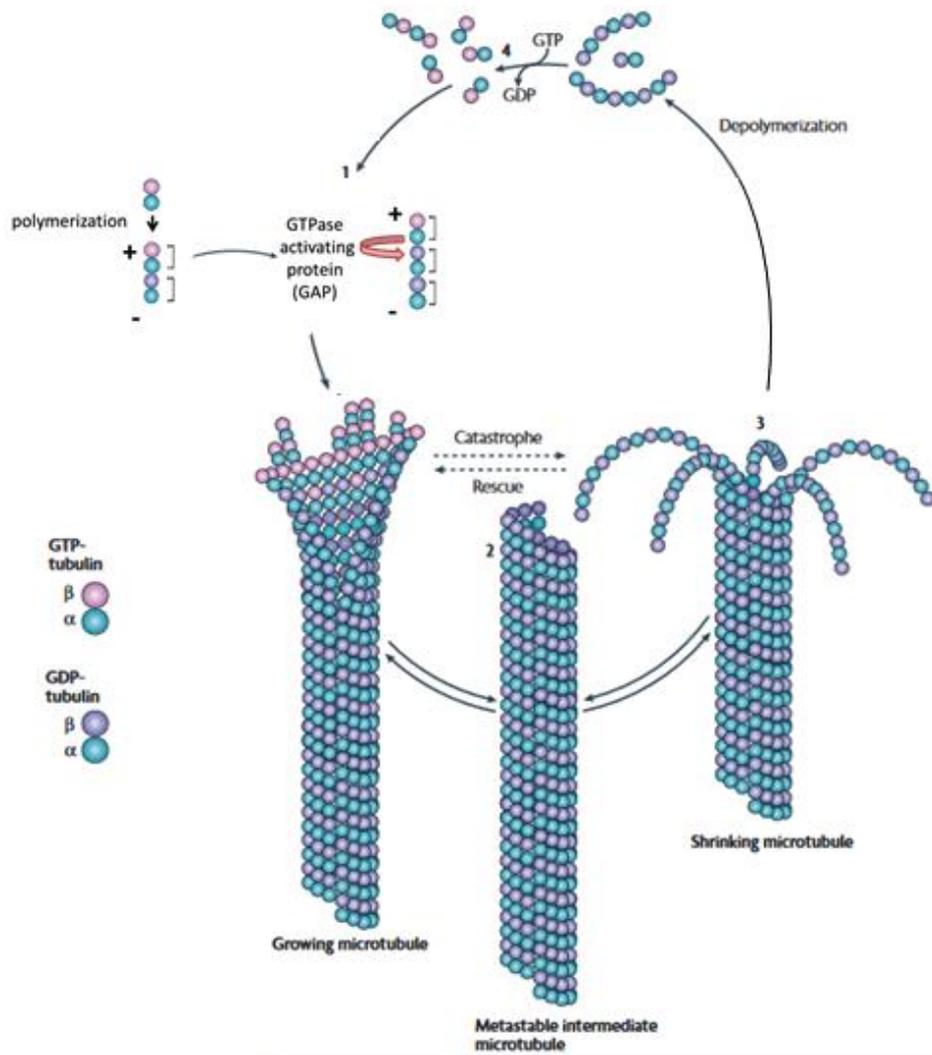


Figure 20. L'instabilité dynamique des microtubules. Représentation schématique illustrant l'alternance des phases de croissance et de désassemblage des microtubules. Adaptée de ²⁰⁷.

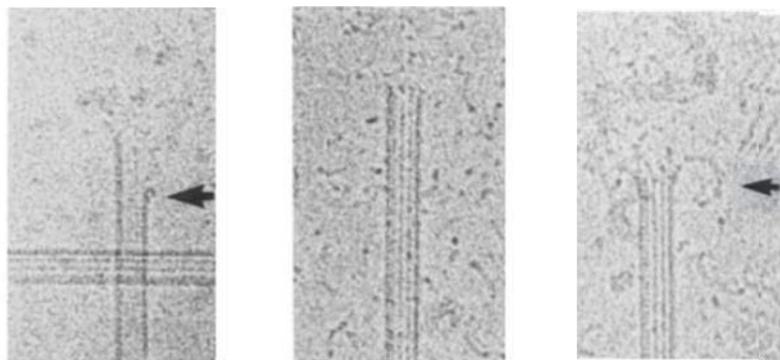


Figure 21. L'instabilité dynamique des microtubules : Images de microscopie électronique représentant (de gauche à droite) un microtubule en cours d'élongation avec un feuillet à son extrémité, un microtubule en pause avec une extrémité franche et un microtubule en phase de dépolymérisation avec à son extrémité des protofilaments courbes qui se dissocient du microtubule. Adapté de ²⁴⁶.

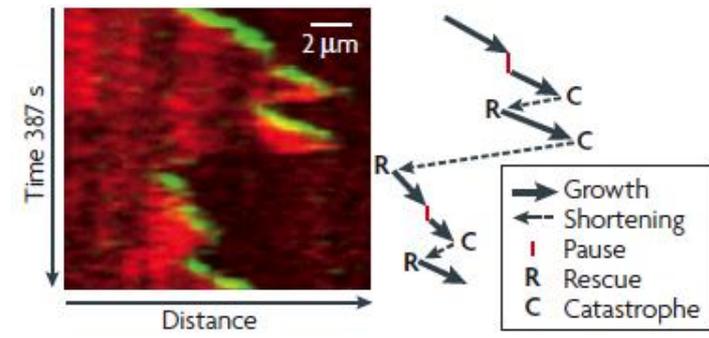


Figure 22. L'instabilité dynamique des microtubules : Kymographe montrant les différentes phases de l'instabilité dynamique d'un microtubule. L'axe spatial montre un microtubule visualisé par l' α -tubuline-mCherry (en rouge) et son extrémité plus terminale visualisée par la protéine EB3-GFP (en vert).

Sous l'action du froid (4°C) ou d'agents déstabilisateurs de microtubules, on peut observer une dépolymérisation massive des microtubules.

1.2.2.2 Dynamique des microtubules *in vivo*

Les caractéristiques dynamiques des microtubules observées *in vitro* sont majoritairement retrouvées *in vivo*. Cependant, dans les cellules, la vitesse d'assemblage des microtubules est en moyenne 5 fois plus élevée²⁴⁷, les microtubules sont plus souvent à l'état de pause (état métastable durant lequel il n'y a ni croissance ni désassemblage)²⁴⁸ et les phénomènes de transition (catastrophe et sauvetage) sont plus fréquemment observés²³⁶. Ceci suggère qu'au-delà des caractéristiques intrinsèques des microtubules, l'environnement cellulaire contribue à réguler le comportement dynamique des microtubules. *In vivo*, les paramètres dynamiques des microtubules sont influencés par le type cellulaire²⁴⁹ et la phase du cycle cellulaire (la demi-vie des microtubules en interphase et en mitose étant respectivement de 15 minutes et 30-90 secondes)^{197,250}.

1.2.2.2.1 Les centres organisateurs de microtubules (COMT)

In vivo, les **centres organisateurs de microtubules** (COMT) constituent le principal site de nucléation et d'ancrage des microtubules. Les COMT ont des structures très variables selon les organismes, mais ils sont dans tous les cas composés de tubuline γ . Les mieux caractérisés sont les centrosomes dans les cellules animales et les spindle pole bodies chez les levures.

1.2.2.2.1.1 Les centrosomes

Les centrosomes représentent le principal COMT des cellules animales. Ils sont composés d'une paire de centrioles orthogonaux (un centriole-père et un centriole-fils) entourés d'une matrice protéique appelée matériel péri-centriolaire (pericentriolar material ou PCM) (Figure 23). Les centrioles sont des structures hélicoïdales d'environ 400nm de long dont la paroi est constituée de 9 triplets de microtubules. Chaque triplet est constitué d'un microtubule « complet » à 13 protofilaments (tubule A) auquel s'associent 2 autres microtubules de 10 protofilaments chacun (tubules B et C). Les tubules B et C partagent 3 protofilaments avec le tubule précédent afin de former une structure à 13 protofilaments.

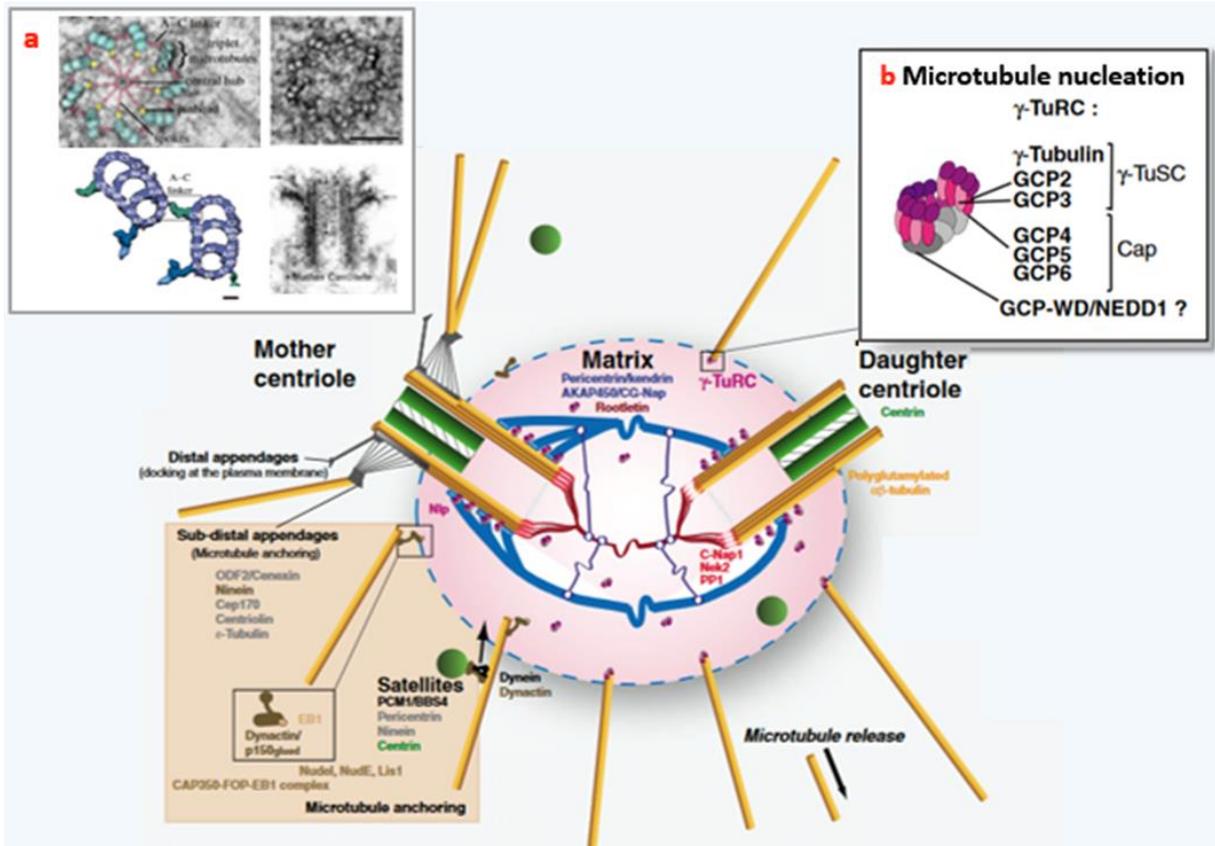


Figure 23. Structure des centrosomes, adapté de ²⁵¹. Les centrosomes sont composés de 2 centrioles (un centriole père et un centriole fils) entourés de matériel péri-centriolaire (en rose). **a** coupe transversale de centriole. **b** Structure des γ -TuRC. Les γ -TuSC (γ -tubulin small complex) sont l'unité structurale de base des γ -TuRC : ils sont composés de 2 unités de γ -tubuline associées aux protéines GCP-2 et GCP-3. Selon les organismes, les protéines associées à la γ -tubuline diffèrent.

Les 2 centrioles sont reliés entre eux à leur extrémité proximale par une matrice (composée notamment de péricentrine/kendrine, AKAP450,...). Les satellites centriolaires, des gros granules de 100 nm de diamètre dispersés au sein du PCM, sont impliqués dans le recrutement des protéines centrosomales (centrine, péricentrine, ninéine, ...).

La concentration cellulaire de tubuline étant souvent inférieure à la concentration critique nécessaire pour une nucléation spontanée, des complexes de γ -tubuline (γ -tubulin ring

complex ou γ -TuRC) situés au niveau du PCM favorisent *in vivo* la nucléation et accélèrent la formation des microtubules (Figure 24).

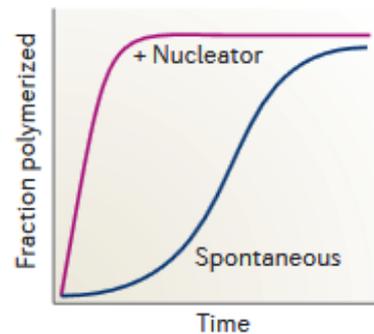


Figure 24. Les complexes de γ -tubuline (γ -TuRC) sont des agents nucléateurs de microtubules : ils ne sont pas indispensables pour la nucléation des microtubules mais ils accélèrent de façon très significative le processus.

Les γ -TuRC sont de gros complexes protéiques de 2 MDa constitués de 13 molécules de γ -tubuline associées avec différentes protéines (tels que GCP2 (γ -tubulin complex protein 2), GCP3, GCP4, GCP5, GCP6, NEDD1) et organisées en forme d'anneau ouvert d'environ 25 nm de diamètre (Tableau 18).

Tableau 18. Principaux constituants et régulateurs des γ -TuRC²⁵².

	Protein family	Biochemical functions	H. sapiens representative proteins
Microtubule Nucleators	γ -tubulin	γ -TuSC provides primary nucleation site	TUBG1
			TUBG2
	γ -tubulin complex proteins (GCPs)	contribute to nucleation	GCP2
			GCP3
		contribute to nucleation, γ -TuRC integrity and assembly	GCP4
			GCP5
	GCP6		
γ -TuRC Regulators	Augmin	recruits γ -TuRC to spindle microtubules	hDgt6
	Cep192	recruits NEDD1 to centrosome	Cep192
	NEDD1	recruits γ -TuRC to centrosome	NEDD1

Les γ -TuRC constituent une amorce préexistante (nucleus) pour l'assemblage des dimères d' α/β -tubuline formant les microtubules. Ils représentent également un site d'ancrage pour l'extrémité moins des microtubules afin de la stabiliser et limiter sa dépolymérisation, tandis

que le bout plus dynamique est libre dans le cytoplasme de la cellule. Une fois nucléés au niveau des γ -TuRC, les microtubules sont soit libérés dans le cytoplasme soit ancrés *via* leur extrémité moins au niveau des appendices subdistaux présents à l'extrémité distale du centriole-père. La ninéine serait une des principales protéines impliquées dans la capture et l'ancrage centriolaire des microtubules.

A l'interphase, le réseau microtubulaire forme un aster polarisé autour du centrosome. Le bout moins des microtubules est stabilisé au niveau du centrosome tandis que l'extrémité plus irradie dans tout le cytoplasme, s'attache à certaines structures cellulaires (organelles, membrane) et, en alternant des phases de croissance et de désassemblage, les tire et les pousse dans la cellule.

Avant la mitose cellulaire, le centrosome est dupliqué (Figure 25). Les 2 centrosomes ainsi formés sont responsables de l'assemblage, l'organisation et l'orientation du fuseau mitotique permettant la séparation des chromosomes en deux lots homologues.

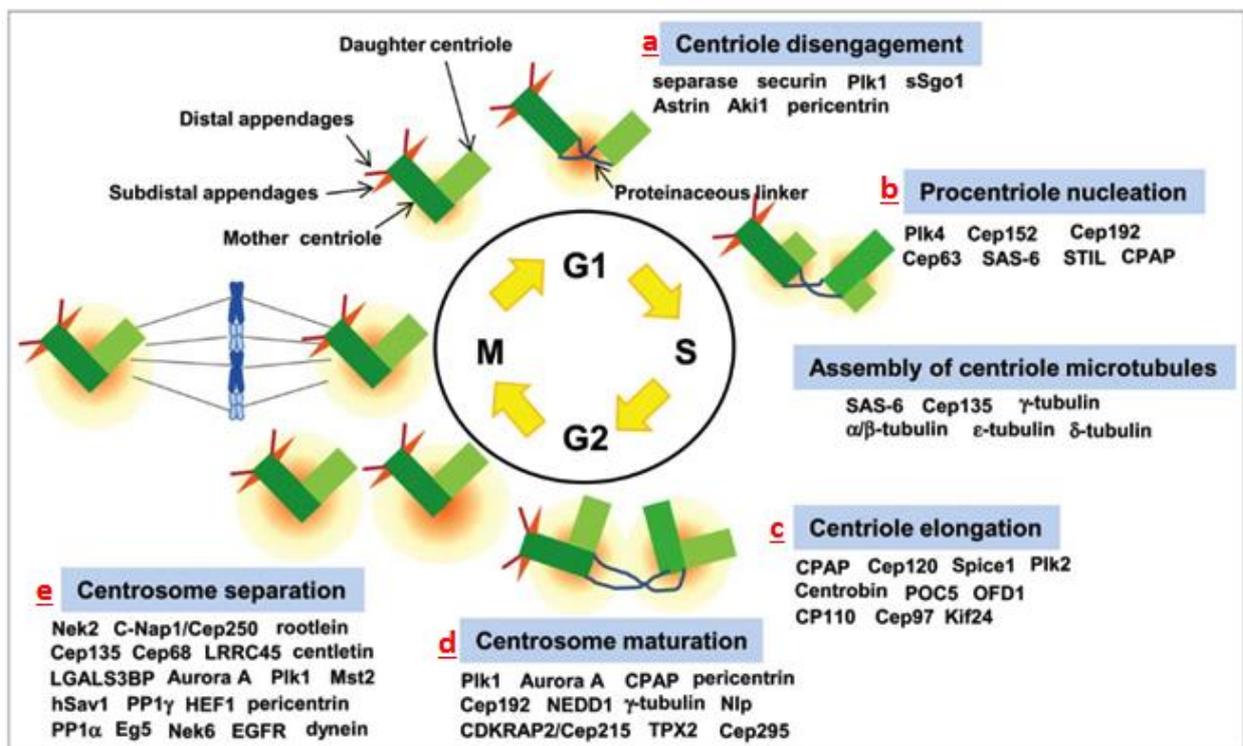


Figure 25. Le cycle de duplication des centrosomes. Adapté de ²⁵³. **a** En fin de mitose/début de phase G1, les centrioles perdent leur conformation orthogonale sous l'action d'une séparase (désengagement des centrioles). Ils restent liés par une connexion faible. **b** En fin de phase G1/début de phase S, un nouveau centriole (ou procentriole) est nucléé à l'extrémité proximale de chaque centriole parental. **c** L'élongation des procentrioles se poursuit jusqu'en phase G2. **d** Lors de la transition G2/M, la maturation des centrosomes (induite par la Polo like kinase-1 et l'Aurora kinase A) se caractérise par l'acquisition de marqueurs spécifiques par le centriole nouvellement formé (cenexine) et l'accumulation de protéines péricentriolaires. **e** La séparation des centrosomes et leur migration aux deux pôles de la cellule permet la formation d'un fuseau mitotique bipolaire. A la fin de mitose, chaque cellule possède un centrosome.

1.2.2.1.2 Les COMT non centrosomaux

Chez les animaux, le corpuscule basal est le COMT à l'origine des cils (au niveau des cellules épithéliales broncho-pulmonaires par exemple) et des flagelles (au niveau des spermatozoïdes). Il est impliqué dans la position de ces appendices, leur orientation et leur mouvement. De structure similaire au centriole, il est à la base du réseau microtubulaire (axonème) des cils et des flagelles et représente le point d'entrée des protéines dans ceux-ci (Figure 26).

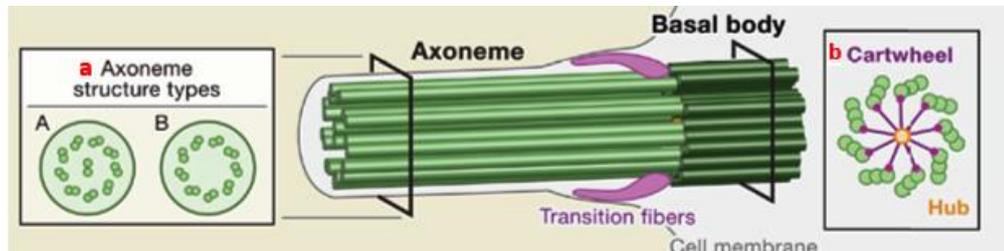


Figure 26. Structure des cils et des flagelles²⁵⁴. **a** Coupe transversale de l'axonème. L'axonème, de forme cylindrique, est composé de 9 doublets de microtubules entourant une paire centrale de microtubules (structure 9+2) ou sans doublet central (structure 9+0). **b** Coupe transversale du corpuscule basal (ou basal body). Le corpuscule basal est constitué de 9 triplets de microtubules organisés radialement.

D'autres sites non-centrosomaux d'organisation des microtubules sont observés au niveau des myotubes, des cellules épithéliales et des neurones (Figure 27).

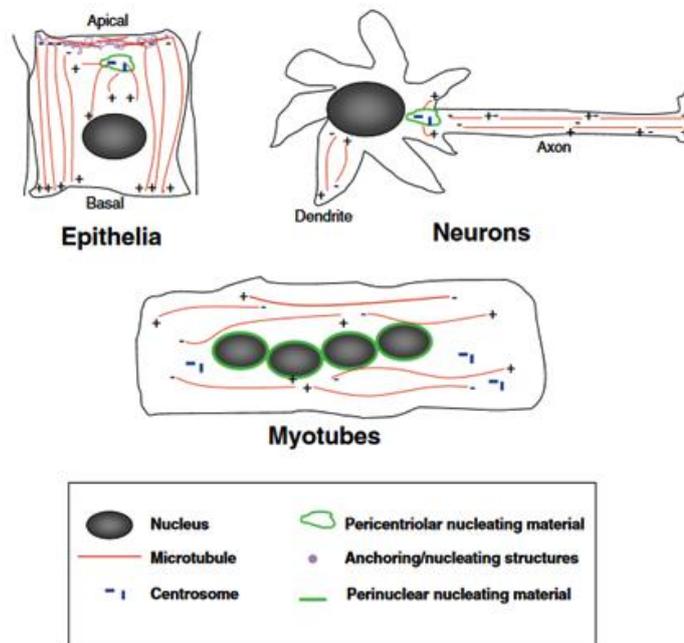


Figure 27. Les COMT non centrosomaux²⁵⁵. Le centrosome est toujours présent mais n'est plus l'organisateur principal des microtubules. Dans les cellules épithéliales polarisées, les microtubules s'orientent selon l'axe apical-basal, le bout plus étant exposé au niveau basal. Dans les neurones, les microtubules ont un assemblage linéaire, avec l'extrémité plus le plus souvent orienté au niveau distal. Dans les cellules musculaires squelettiques, la nucléation a lieu principalement au niveau des enveloppes nucléaires. Les microtubules ont une organisation linéaire avec l'extrémité plus orientée au niveau distal.

1.2.2.2.2 Les protéines régulatrices de la dynamique des microtubules

Les propriétés dynamiques et les fonctions des microtubules sont finement régulées *via* l'interaction des microtubules et des dimères de tubuline avec des protéines spécialisées : les protéines associées aux microtubules (**m**icrotubules-**a**ssociated **p**roteins ou MAPs)²⁵⁶. De façon générale, les MAPs s'associent sur toute la longueur des microtubules à l'exception des protéines +TIPs et -TIPs qui s'accumulent respectivement à l'extrémité plus et moins des microtubules. Les modifications post-traductionnelles des microtubules influencent fortement la répartition des MAPs le long des microtubules (cf chapitre 1.2.1.2.4)^{227,257}. Les MAPs régulant la dynamique des microtubules peuvent être classées en 2 groupes : les protéines stabilisant les microtubules et les protéines déstabilisant les microtubules. Nous détaillerons de façon non exhaustive les principales MAPs dans le chapitre suivant.

1.2.2.2.1 Les protéines stabilisatrices

Tableau 19. Les principales MAPs stabilisatrices, leur localisation au niveau des microtubules et leurs fonctions biochimiques

Localisation des MAPs	Classification des MAPs	Famille de protéines	Protéines représentatives chez l'homme	Fonctions biochimiques	Réf
Sur toute la longueur des microtubules	MAPs classiques	MAP1	MAP1A, MAP1B, MAP1S	Stabilisation des microtubules neuronaux	258
		MAP2/ Tau	MAP2 et Tau (neuronales), MAP4 (non neuronale)	Augmentation de la rigidité des microtubules, inhibition de la dépolymérisation	259
	Autres MAPs	STOP (<u>S</u> table- <u>T</u> ubule- <u>O</u> nly- <u>P</u> eptide) ou MAP6	E-STOP, N-STOP, SL21	Protection des microtubules contre la dépolymérisation induite par le froid ou les agents dépolymérisants	260,261
		double cortine	DCX (neuronale)	Inhibition de la dépolymérisation, réduction de la fréquence des catastrophes	262

+TIPs (Microtubule plus-end tracking proteins)	Protéines à domaine Cap-Gly	CLIPs (cytoplasmic linker protein)	CLIP-170	Augmentation de la fréquence des sauvetages, stabilisation des microtubules par interaction avec le cortex cellulaire, interaction avec des vésicules pour le trafic intracellulaire	263,264
		dynactine	Sous-unité du complexe dynactine p150 ^{glued}	diminution de la fréquence des catastrophes	265,266
	Protéines à motif Ser- x-Ile-Pro (SxIP) (où x représente un acide aminé variable)	APC (Adenomatous polyposis coli)	APC1, APC2	stabilisation des microtubules via l'interaction avec le cortex cellulaire et le réseau d'actine filamentaire, promotion de la croissance nette des microtubules et réduction de la fréquence des catastrophes	267,268
		spectraplakines	MACF1/ACF7	stabilisation des microtubules via l'interaction avec le cortex cellulaire et le réseau d'actine filamentaire	269
		CLASPs (CLIP associated proteins)	CLASP1, CLASP2	stabilisation des microtubules via l'interaction avec le cortex cellulaire, augmentation de la fréquence des sauvetages, suppression des événements de catastrophe	270

	Protéines à domaine TOG	Famille ch-TOG/XMAP215	Ch-TOG / CKAP5	Accélération de la polymérisation en favorisant l'incorporation des dimères de tubuline à l'extrémité plus des microtubules	270	
	MAPs ayant une fonction spécifique lors de la mitose	Kinesin-7		CENP-E	Capture des microtubules au niveau des kinétochores, nécessaire pour l'alignement correct des chromosomes en métaphase	271
		NuSAP		NuSAP	Stabilisation des microtubules près des chromosomes, nécessaire pour l'alignement correct des chromosomes en métaphase	272-274
		Kinesin- 5		Eg5	Stabilisation par interaction des microtubules antiparallèles émanant des pôles opposés (microtubules interpolaires en métaphase ou au niveau du midbody)	275,276
		MAP65		PRC1		277
	Autres MAPs	protéines EB (End-binding)		EB1, EB2, EB3	Induction de la croissance des microtubules, réduction de la fréquence des catastrophes	278
		CRMPs (Collapsin response mediator proteins)		CRMP2	Liaison aux dimères de tubuline et promotion de l'assemblage des microtubules	279,280
		dynéine		dynéine	Stabilisation par interaction avec le cortex cellulaire, réduction des phénomènes de catastrophe, interaction avec des vésicules pour le trafic intracellulaire	281

-TIPs (microtubule minus -end targeting proteins		γ -TURC		Nucléation des microtubules, stabilisation de l'extrémité moins des microtubules	Cf partie 1.2.2.2.1
	MAPs d'ancrage à l'extrémité moins	ninein	ninein	Ancrage de l'extrémité moins des microtubules	282
		bicaudal	BICD1		
		nudel	NDEL1		
		Famille CAMSAP (calmodulin-regulated spectrin-associated proteins)/Patronin/Nezha	CAMSAP1, CAMSAP2, CAMSAP3/Nezha	Protection de l'extrémité moins des fibres k contre le désassemblage induit par les enzymes dépolymérisantes (MCAK)	283
		MCRS1 (M icro s pherule protein1)	284		

	MAPs ayant une fonction spécifique lors de la mitose	NuMA (N uclear protein that associates with the M itotic A pparatus)	<i>NUMA</i>	Stabilisation des microtubules aux pôles des fuseaux mitotiques nécessaire pour l'assemblage correcte du fuseau mitotique et une division cellulaire normale	285
		<i>RHAMM</i> (R eceptor for H yaluronan- M ediated M otility)	<i>RHAMM</i>		286
		<i>TACC</i> (T ransforming A cidic C oiled- C oil)	<i>TACC-1, TACC-2 TACC-3</i>		287
		TPX2 (T argeting P rotein for X klp2)	<i>TPX2</i>		288

1.2.2.2.2 Les protéines déstabilisatrices

Tableau 20. Les principales MAPs déstabilisatrices, leur localisation au niveau des microtubules et leurs fonctions biochimiques

Localisation des MAPs	Classification des MAPs	Famille de protéines	Protéines représentatives chez l'homme	Fonctions biochimiques	Réf
Le long des microtubules	Protéines fragmentant les microtubules	Katanine	Katanine p60 et p80	ATPases et dépolymérase : fragmentation des microtubules et dépolymérisation des extrémités moins libres → régulation de la longueur et du nombre de microtubules et génération de nouveaux branchements de microtubules qui vont pouvoir à nouveau s'allonger (modèle de «cut and run»)	289,290
		spastine	SPAST		
		fidgetine	FIGN, FIGNL1, FIGNL2		

+TIPS et/ou - TIPs		Oncoprotéine18 ou stathmine	Op18/stathmine	-Déstabilisation indirecte des microtubules par séquestration des dimères de tubuline -Action directe sur les protofilaments courbés à l'extrémité en croissance →augmentation de la fréquence des catastrophes	291
	Kinésines	Kinésines 8	Kif18A, Kif18B, Kif19	Atteinte de l'extrémité plus du microtubule par hydrolyse de l'ATP, blocage de la dynamique des microtubules →augmentation des phénomènes de catastrophe	292
		Kinésines 13	Kif2A, Kif2B, Kif2C/MCAK, Kif24	Diffusion bidirectionnelle sur le microtubule, dépolymérisation ATP- dépendante d'une extrémité du microtubule en courbant les protofilaments, augmentation de la fréquence des catastrophes	

1.2.3 Fonctions des microtubules

Les microtubules sont des structures dynamiques essentielles dans de nombreux processus biologiques. Leurs fonctions sont médiées par les modifications post-traductionnelles affectant les microtubules²⁵⁷ et l'activité de MAPs²⁹³.

1.2.3.1 Rôles des microtubules dans les cellules en interphase

Dans les cellules en interphase, les microtubules participent avec les autres composants du cytosquelette au maintien de la forme cellulaire (Figure 28). Ils contribuent également au positionnement du noyau et des organelles dans le cytoplasme²⁹⁴. Disposant d'une polarité intrinsèque, les microtubules sont impliqués dans la polarité et la motilité²⁹⁵ cellulaires et servent de rails directeurs pour le transport intracellulaire des macromolécules et des organites (ou cargos) par les MAPs motrices (Figure 29). De plus, les microtubules constituent les éléments structuraux des cils et des flagelles à l'origine de leur mobilité. Ils permettent ainsi le déplacement des cellules pourvues de flagelles (telles que les spermatozoïdes) et le mouvement du milieu liquidien au contact du pôle apical des cellules ciliées (comme les cellules épithéliales broncho-pulmonaires). Les microtubules jouent également un rôle dans la transduction du signal intracellulaire^{266,296,297}. Les microtubules sont particulièrement indispensables pour le développement et la différenciation des neurones²⁹⁸.

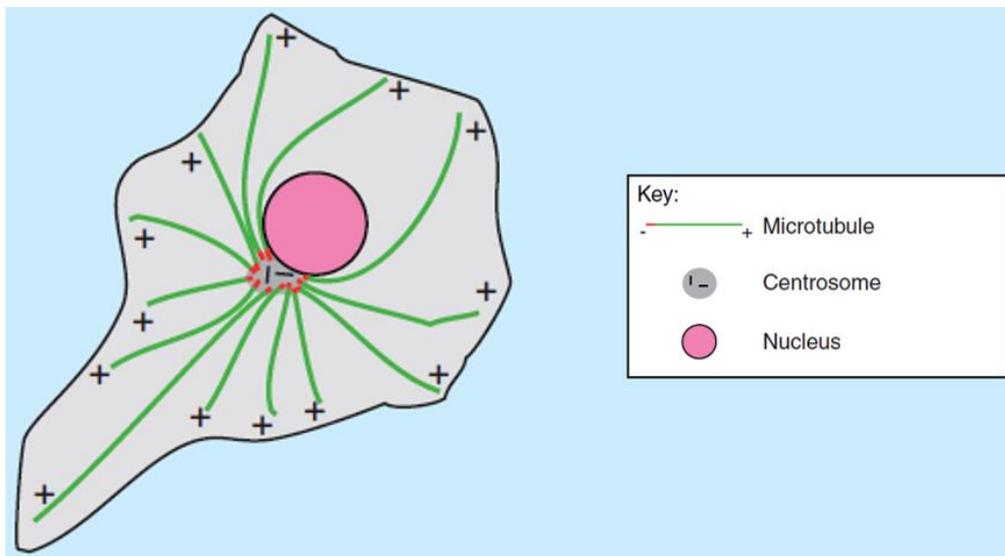


Figure 28. Représentation schématique du réseau microtubulaire interphasique²⁹⁹.

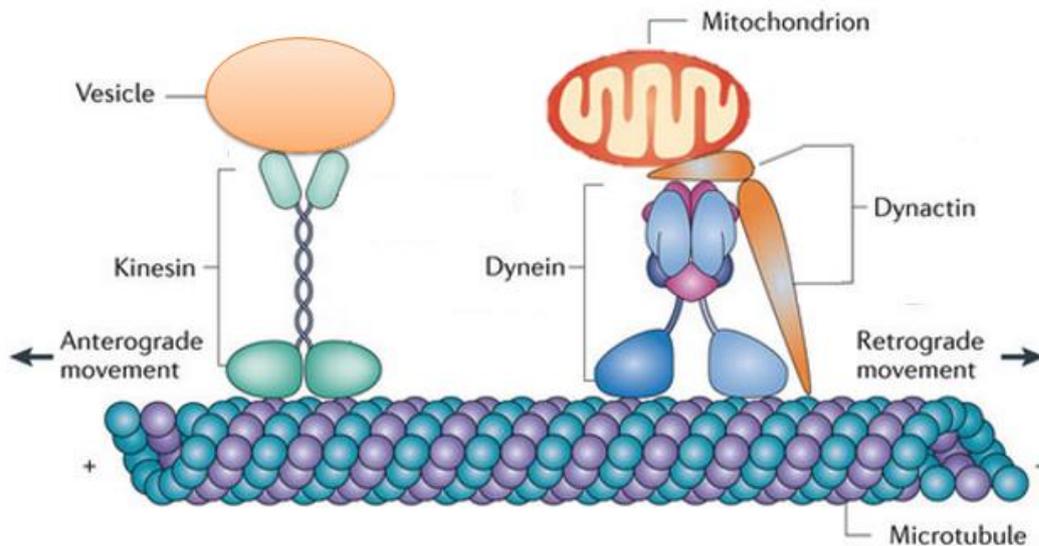
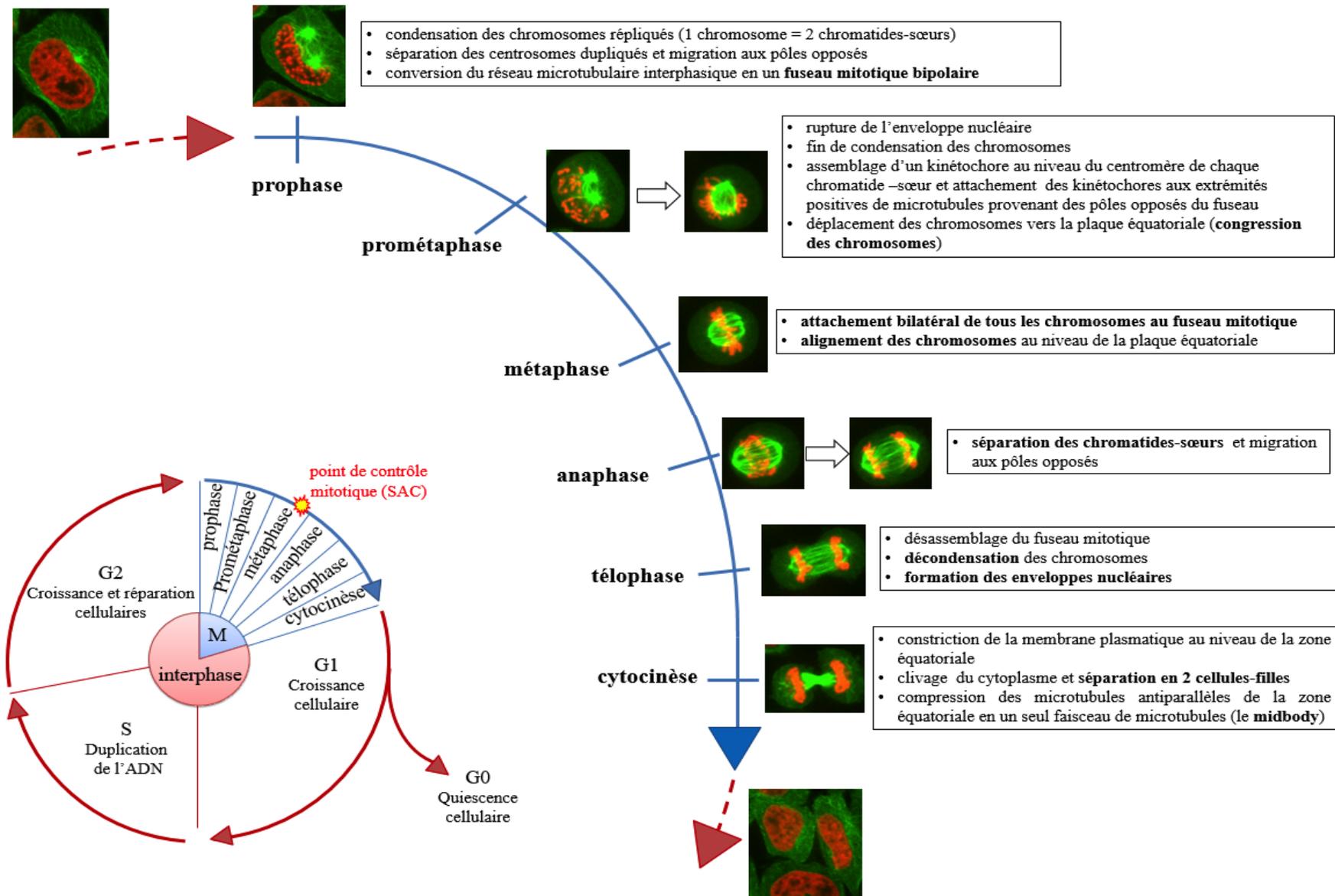


Figure 29. Représentation schématique du transport intracellulaire des cargos par les MAPs motrices le long des microtubules. Adapté de ³⁰⁰. Il existe deux types de moteurs moléculaires : la dynéine associée à la dynactine qui transporte les cargos vers l'extrémité moins des microtubules (mouvement rétrograde), et la kinésine qui transporte les cargos vers le bout plus des microtubules (mouvement antérograde). Ces moteurs moléculaires utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour se déplacer le long de ces microtubules.

1.2.3.2 Rôles des microtubules dans les cellules en mitose

Les microtubules ont un rôle central dans la mitose. Grâce à de nombreux moteurs moléculaires (cf partie 1.2.2.2.2), ils s'organisent en fuseau bipolaire afin d'assurer la motilité et la séparation des chromatides-sœurs lors de la mitose (Figure 30)³⁰¹.

Figure 30. Représentation schématique des phases du cycle cellulaire dans les cellules eucaryotes. L'interphase consiste en 4 phases: G0, G1, S et G2. La mitose est divisée en 5 étapes successives : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase, la télophase et la cytokinèse. La plaque équatoriale représente un plan imaginaire à égale distance des 2 pôles centrosomaux. Le point de contrôle mitotique (ou SAC) est un système de surveillance assurant la séparation correcte des chromatides-sœurs lors de la mitose. Les images de vidéomicroscopie en temps réel sur les cellules HeLa α -tubuline-GFP et histone H2B-mCherry (permettant de visualiser le noyau/les chromosomes) illustrent les modifications biologiques affectant la cellule dans les différentes phases du cycle. Abréviations : G0, Gap 0 ; G1, Gap 1 ; G2, Gap 2 ; M, mitose ; SAC, spindle-assembly checkpoint ou point de contrôle associé au fuseau mitotique.



1.2.3.2.1 *Le fuseau microtubulaire mitotique*

Au sein du fuseau mitotique mature, il existe 3 types de populations de microtubules à l'origine de fonctions mitotiques différentes (Figure 31) :

- les microtubules kinétochoriens (ou fibres kinétochoriennes ou fibres k) sont des faisceaux très stables de microtubules parallèles (20 à 40 microtubules par faisceau selon les phases du cycle)³⁰². Ils sont ancrés aux centrosomes par leur extrémité moins tandis que leur extrémité plus se lie aux chromosomes au niveau des kinétochores (une plateforme d'attachement des microtubules au niveau du centromère de chaque chromatide). Ils sont directement impliqués dans la ségrégation des chromosomes.
- les microtubules interpolaire émanent des centrosomes et leur extrémité plus irradie vers le centre du fuseau. Ils interagissent avec les bras des chromosomes ou avec leurs analogues ancrés à l'autre pôle de façon antiparallèle. Ils participent à l'établissement et au maintien du fuseau bipolaire ainsi qu'à la congression des chromosomes (le déplacement des chromosomes à égale distance des 2 pôles mitotiques).
- les microtubules astraux sont ancrés aux centrosomes par leur extrémité « moins » et leur extrémité « plus » irradie vers le cortex cellulaire de la cellule. Très dynamiques, ils jouent un rôle dans la séparation des centrosomes en prophase et le positionnement du fuseau³⁰³.

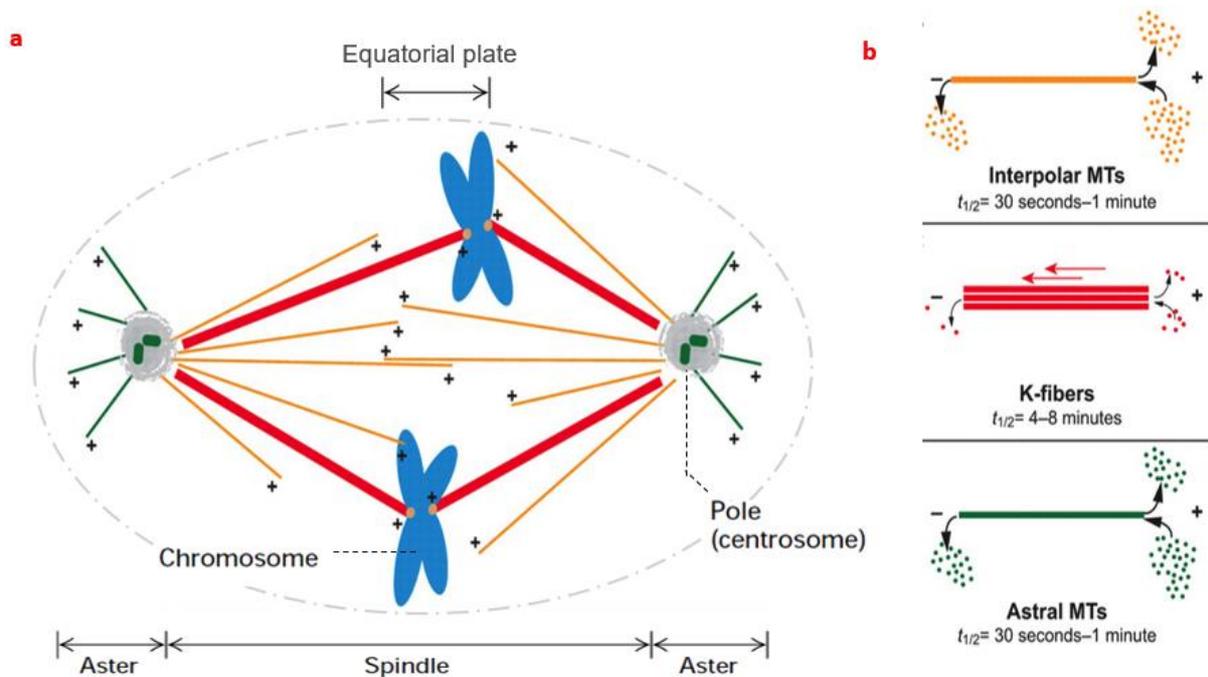


Figure 31. Représentation schématique des 3 types de microtubules mitotiques. Adapté de ³⁰⁴. **a** Fuseau bipolaire montrant les 3 types de microtubules mitotiques : les microtubules interpolaire (en orange), les fibres K (en rouge) et les microtubules astraux (en vert). Les « + » indiquent l'extrémité croissante des microtubules. **b** Représentation des 3 types de microtubules mitotiques et leurs propriétés dynamiques. Les microtubules astraux et interpolaire sont des microtubules très dynamiques avec une demi-vie inférieure à 1 minute. Les fibres k sont des faisceaux de microtubules très stables qui présentent un flux de tubuline constant en direction des pôles.

1.2.3.2.2 Attachement des chromosomes au fuseau mitotique et point de contrôle mitotique

La répartition équitable du matériel génétique entre les 2 cellules-filles est essentielle afin d'assurer la stabilité génomique et est médiée par l'attachement latéral et bi-orienté des chromosomes au fuseau bipolaire mitotique (attachement amphitélétique, Figure 32). Cet attachement amphitélétique garantit une tension égale des chromosomes de part et d'autre et ainsi leur alignement possible au niveau de la plaque équatoriale en métaphase.

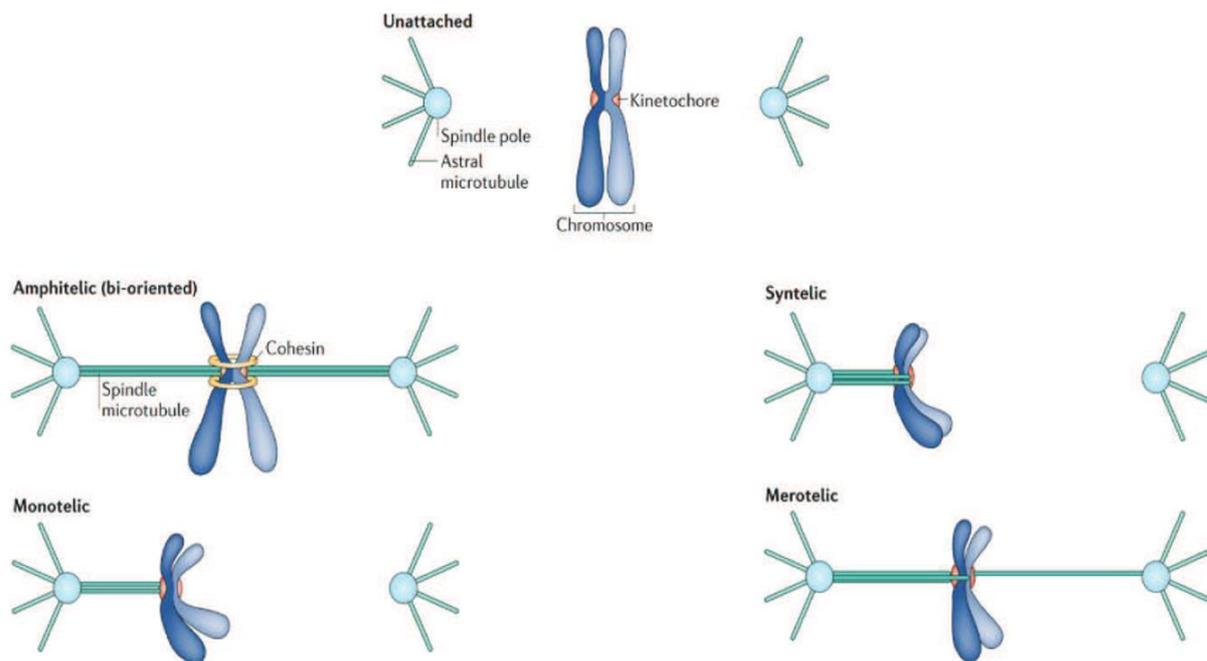


Figure 32. Représentation schématique des différentes configurations d'attachement des kinétochores au fuseau mitotique³⁰⁵. Chaque chromosome a 2 kinétochores, situés au niveau du centromère de ses 2 chromatides-sœurs. On parle d'attachement amphitélétique bi-orienté lorsque chaque kinétochore-frère est attaché à un pôle distinct du fuseau mitotique. L'attachement monotélétique consiste en la liaison d'un seul kinétochore à un pôle mitotique. Lorsque les 2 kinétochores sont liés au même pôle, on parle d'attachement syntélétique. Enfin, un attachement mérotélétique représente l'attachement correct d'un kinétochore à un pôle tandis que le kinétochore-frère est attaché aux 2 pôles.

Pour éviter les phénomènes d'aneuploïdie, un système complexe de surveillance du génome synchronise la progression du cycle cellulaire à l'attachement des kinétochores au fuseau mitotique : c'est le point de contrôle mitotique (ou point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique, ou spindle assembly checkpoint, SAC) (Figure 33)³⁰⁶. En cas d'attachement incorrect d'au moins un kinétochore (prométaphase), le SAC retarde l'initiation de l'anaphase. Ce blocage transitoire permet la déconnexion des attachements microtubules-kinétochores aberrants et la reconnexion des microtubules très dynamiques aux kinétochores libres (par mécanisme de recherche et capture)³⁰⁷. Ce n'est que lorsque les kinétochores sont attachés de façon amphitélétique (métaphase) que le SAC est désactivé et permet la transition vers l'anaphase (Figure 33)³⁰⁸.

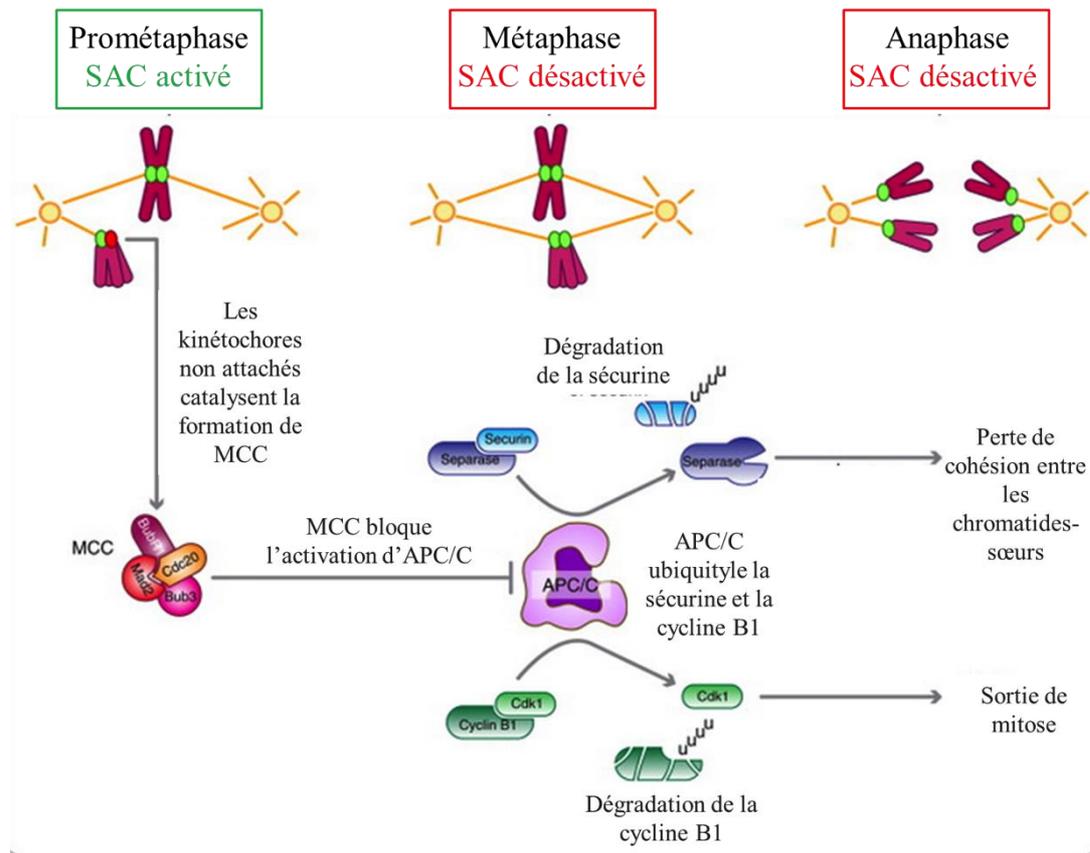


Figure 33. Mécanisme du SAC. Adapté de ³⁰⁹. En prométaphase les kinétochores non attachés (en rouge) induisent l'activation du SAC. Il en résulte la formation du complexe MCC (l'effecteur du SAC) composé des protéines BubR1, Bub3, Mad2 et Cdc20. Le MCC lie et inhibe l'activité de l'APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) impliqué dans la transition entre la métaphase et l'anaphase. Une fois tous les chromosomes alignés avec leurs kinétochores (en vert) attachés au fuseau (métaphase), le MCC n'est plus formé, ce qui permet l'activation de l'APC/C et secondairement l'ubiquitylation et la dégradation de la sécurine et de la cycline B1. La dégradation de la sécurine induit la libération de la séparase à l'origine de la séparation des chromatides sœurs. La dégradation de la cycline B1 induit quant à elle l'inactivation de cdk1 aboutissant à la sortie de mitose. Abréviations: APC/C, anaphase-promoting complex/cyclosome; MCC, mitotic checkpoint complex; SAC, spindle-assembly checkpoint.

1.2.4 Les agents ciblant les microtubules

Les agents ciblant les microtubules sont des cytotoxiques qui se lient aux dimères de tubuline et altèrent la dynamique des microtubules, aboutissant au blocage cellulaire en mitose et finalement à l'apoptose (ou mort cellulaire programmée). Les microtubules étant impliqués dans la migration des cellules endothéliales, ces médicaments ont un intérêt comme inhibiteurs de la néoangiogenèse au-delà de leur action antimittotique.

Les antimittotiques sont des composés très hétérogènes en termes d'origine, de structure chimique, de domaine de liaison à la tubuline et de mode d'action. Classiquement, les agents ciblant les microtubules sont répartis en 2 groupes selon leurs effets à fortes concentrations sur la masse microtubulaire : les agents stabilisateurs des microtubules (MSA, microtubules-

stabilizing agent) qui favorisent la polymérisation des microtubules et les agents déstabilisateurs de microtubules (MDA, microtubules-destabilizing agent) qui dissocient les microtubules. Ces agents ont également un effet toxique sur les cellules tumorales aux concentrations *in vivo* (10 à 100 fois inférieures aux concentrations affectant la masse de polymères) en inhibant l'instabilité dynamique des microtubules sans effet marqué sur la masse totale de microtubules³¹⁰⁻³¹².

1.2.4.1 Les agents stabilisateurs de microtubules

Les agents stabilisateurs de microtubules (MSA) sont majoritairement des composés naturels ou des dérivés synthétiques de produits naturels. Les MSA se lient aux polymères de tubuline au niveau de la sous-unité β et modifient la conformation de la boucle M, induisant ainsi une augmentation des interactions latérales entre les protofilaments^{313,314}. Ils favorisent également l'assemblage des dimères de tubuline (avec une diminution de la concentration critique de tubuline libre pour l'assemblage *in vitro* des microtubules et l'assemblage des microtubules en l'absence de GTP exogène ou de MAPs)^{315,316}. Actuellement, 2 sites de liaison aux MSA ont été identifiés : le domaine de liaison des taxanes et le domaine de liaison du laulimalide/péloruside A.

1.2.4.1.1 Domaine de liaison des taxanes

Initialement isolé de l'écorce de l'if (*Taxus brevifolia*), le paclitaxel fut le premier MSA identifié³¹⁷. Le paclitaxel et ses analogues structuraux semi-synthétiques (docétaxel notamment) constituent le groupe des taxanes et sont utilisés depuis les années 1990 dans le traitement de nombreux cancers (Tableau 21).

Tableau 21. Les principaux taxanes et leurs indications thérapeutiques

Taxanes	Indications
Paclitaxel TAXOL®	<ul style="list-style-type: none"> • cancer pulmonaire non à petites cellules localement avancé ou métastatique • cancer de l'ovaire localement avancé ou métastatique • cancer du sein opérable avec ou sans un envahissement ganglionnaire, cancer du sein localement avancé ou métastatique • sarcome de Kaposi avancé associé au sida
Docétaxel TAXOTERE®	<ul style="list-style-type: none"> • cancer du sein opérable avec ou sans un envahissement ganglionnaire, cancer du sein localement avancé ou métastatique • cancer pulmonaire non à petites cellules localement avancé ou métastatique • cancer de la prostate métastatique • cancer gastrique métastatique • cancer des voies aérodigestives supérieures
Cabazitaxel JEVTANA®	<ul style="list-style-type: none"> • cancer de la prostate métastatique
Paclitaxel albumine ABRAXANE®	<ul style="list-style-type: none"> • cancer du sein métastatique • cancer du pancréas métastatique • cancer bronchique non à petites cellules localement avancé ou métastatique

Le domaine de liaison des taxanes se situe sur la tubuline β entre la boucle M et une poche hydrophobe, au niveau de la partie luminale des microtubules (Figure 34). Ce site est accessible dans les microtubules préformés³¹⁸ et la cinétique de liaison du ligand à la tubuline est rapide³¹⁹ ce qui suggère l'existence d'un domaine intermédiaire (le pore externe de type I) auquel le médicament se lie pour accéder au site interne de liaison^{320,321}. Les composés se lient aux microtubules avec une stœchiométrie de 1:1 (soit 1 molécule fixée par hétérodimère, les 2 sites étant mutuellement exclusifs)^{322,323}.

D'autres MSA, de structures chimiques très différentes, entrent en compétition avec les taxanes pour le même site de liaison : ce sont notamment les epothilones³²⁴, l'eleutherobine, le discodermolide, la dictyostatine, la sarcodictyine et les ligands covalents (induisant une liaison irréversible aux microtubules) cyclostreptine et zampanolide. Ces composés sont actuellement en développement préclinique ou clinique.

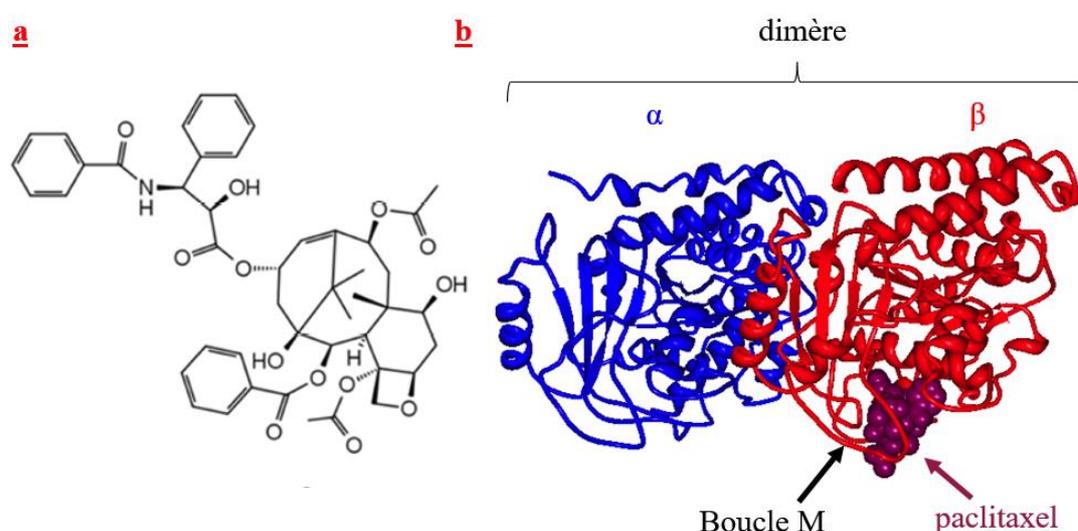


Figure 34. Structure et domaine de liaison du paclitaxel sur la tubuline. **a** Structure chimique du paclitaxel. **b** Diagramme Ribbon montrant la structure cristalline du dimère d' α/β tubuline stabilisé par le paclitaxel. Les structures secondaires des sous-unités α - et β -tubuline sont représentées en bleu et en rouge respectivement. Le paclitaxel est représenté par des sphères violettes. Structure extraite du site web Protein Data Bank (1JFF).

1.2.4.1.2 Domaine de liaison du laulimalide et du péloruside A

Le laulimalide³²⁵ et le péloruside A³²⁶ sont des produits naturels issus d'éponges marines et actuellement en étude préclinique. Leur site de liaison, accessible dans les microtubules préformés, est situé au niveau de la sous-unité β à la surface externe des microtubules³¹⁴ (Figure 35). Ces molécules se lient à la tubuline avec une stœchiométrie de 1:1. Le laulimalide/péloruside A et les taxanes peuvent être simultanément présents sur le même hétérodimère³²⁷.

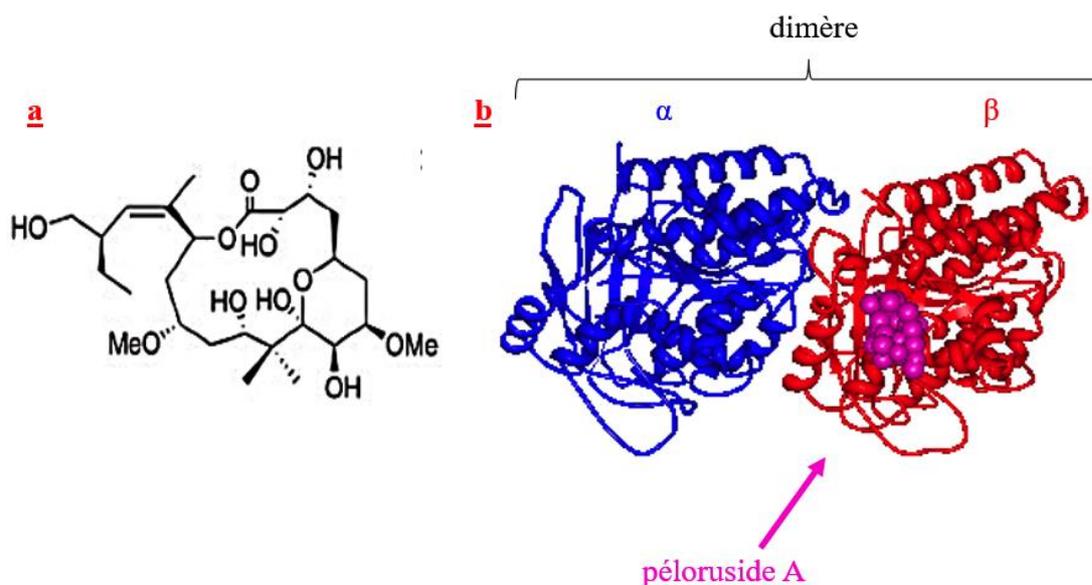


Figure 35. Structure et domaine de liaison du pèloruside A sur la tubuline. **a** Structure chimique du pèloruside A. **b** Diagramme Ribbon montrant la structure cristalline du dimère d' α/β tubuline stabilisé par le pèloruside A. Les structures secondaires des sous-unités α - et β -tubuline sont représentées en bleu et en rouge respectivement. Le pèloruside A est représenté par des sphères roses. Structure extraite de Protein Data Bank (4O4L).

1.2.4.2 Les agents déstabilisateurs de microtubules

Les agents déstabilisateurs de microtubules (MDA) induisent le désassemblage des microtubules préformés ou bloquent l'incorporation de nouveaux dimères de tubuline. Deux sites de liaison aux MDA sont très bien caractérisés : le site de liaison des colchicinoïdes et le domaine de liaison des vinca-alcaloïdes. De nouveaux domaines ont également été récemment découverts et sont en cours d'étude (domaines de liaison de la pironétine, du PM060184).

1.2.4.2.1 *Domaine de liaison des colchicinoïdes*

La colchicine, extraite des feuilles de colchique (*Colchicum autumnale*), est le premier MDA identifié. En dépit de son activité antimittotique et antiangiogénique importante, la colchicine n'est pas utilisée dans le traitement des cancers car elle présente un index thérapeutique très étroit (Tableau 22).

Tableau 22. La colchicine et ses indications thérapeutiques

Colchicine	Indications
colchicine	<ul style="list-style-type: none"> accès aigu de goutte autres accès aigus microcristallins : chondrocalcinose et rhumatisme à hydroxyapatite maladie périodique maladie de Behçet.

Le domaine de liaison de la colchicine, accessible seulement dans les dimères de tubuline libres³²⁸, se situe à l'interface entre les 2 sous-unités d'un même dimère (Figure 36). Elle se lie à ce domaine avec une stœchiométrie de 1:1 et forme un complexe faiblement réversible avec la tubuline. Ce complexe adopte une configuration incurvée défavorable pour l'assemblage des microtubules³²⁹. De plus, la liaison de la colchicine induit un déplacement de la boucle M de la sous-unité β menant à une perturbation des contacts latéraux entre protofilaments voisins et favorisant ainsi la dépolymérisation³³⁰.

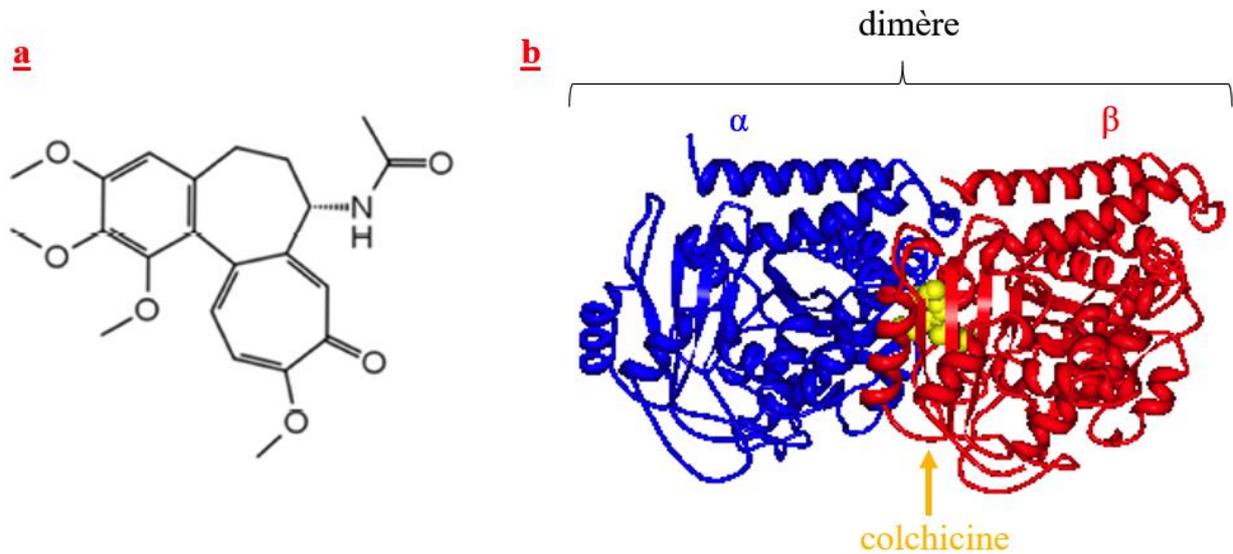


Figure 36. Structure et domaine de liaison de la colchicine sur la tubuline. **a** Structure chimique de la colchicine. **b** Diagramme Ribbon montrant la structure cristalline du dimère d' α/β tubuline déstabilisé par la colchicine. Les structures secondaires des sous-unités α - et β -tubuline sont représentées en bleu et en rouge respectivement. La colchicine est représentée par des sphères jaunes. Structure extraite de Protein Data Bank (4O2B). De nombreux composés capables de se lier au même domaine de liaison que la colchicine ont été identifiés ces dernières décennies. Certains sont utilisés principalement en recherche pour la découverte de nouveaux agents ou comme composé de référence pour l'étude de la mitose (nocodazole, podophyllotoxine). D'autres sont actuellement en cours d'évaluation préclinique ou clinique (combretastatine A4, la fosbretabuline (son dérivé phosphate), le 2-méthoxyœstradiol, l'ombrabuline, l'indibuline, la lexibuline, la plinabuline, le tivantinib, les phenylahistines, la steganacine, les chalcones)^{311,331-334}.

1.2.4.2.2 Domaine de liaison des vinca-alcaloïdes ou domaine vinca

Les vinca-alcaloïdes sont une famille de composés hétérocycliques dérivés des feuilles de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) et possédant une activité de dépolymérisation des microtubules. Ces composés naturels ou semi-synthétiques sont très largement utilisés comme chimiothérapies (Tableau 23).

Tableau 23. Les vinca-alcaloïdes et leurs indications thérapeutiques

Vinca-alcaloïdes	Indications
Vinblastine VELBE®	<ul style="list-style-type: none">• maladie de hodgkin et lymphomes non hodgkiniens• cancer du testicule• sarcome de Kaposi• choriocarcinome• cancer de l'ovaire• cancer du sein• cancer du rein• cancer de la vessie
Vincristine ONCOVIN®	<ul style="list-style-type: none">• leucémie aiguë lymphoblastique• maladie de Hodgkin• lymphomes non hodgkiniens• cancer du poumon• cancer du sein• cancer du col utérin• myélome• rhabdomyosarcomes• neuroblastomes• néphroblastomes• tumeurs embryonnaires de l'enfant• sarcome d'Ewing• ostéosarcome
Vindésine ELDISINE®	<ul style="list-style-type: none">• leucémies aiguës lymphoblastiques• cancer du sein• cancer de l'œsophage• cancer des voies aéro-digestives supérieures• cancer pulmonaire
Vinflunine JAVLOR®	<ul style="list-style-type: none">• cancer de la vessie
Vinorelbine NAVELBINE®	<ul style="list-style-type: none">• cancer du poumon non à petites cellules• cancer du sein métastatique

Ces molécules se lient à l'interface entre 2 hétérodimères organisés longitudinalement, dans une région proche du site d'échange GDP/GTP (Figure 37)³³⁵. La liaison du ligand avec une stœchiométrie de 1:1 induit une conformation en coude entre les 2 dimères qui interfère avec leur assemblage en microtubules. Ces composés se lient à l'extrémité croissante des microtubules, au niveau de la région luminale et induisent la dépolymérisation des microtubules par la perte de contacts entre les protofilaments voisins. A forte concentration, ces molécules ont aussi une affinité pour les dimères libres et induisent la formation d'agrégats de tubuline (paracristaux, spirales, tubules)^{334,335}.

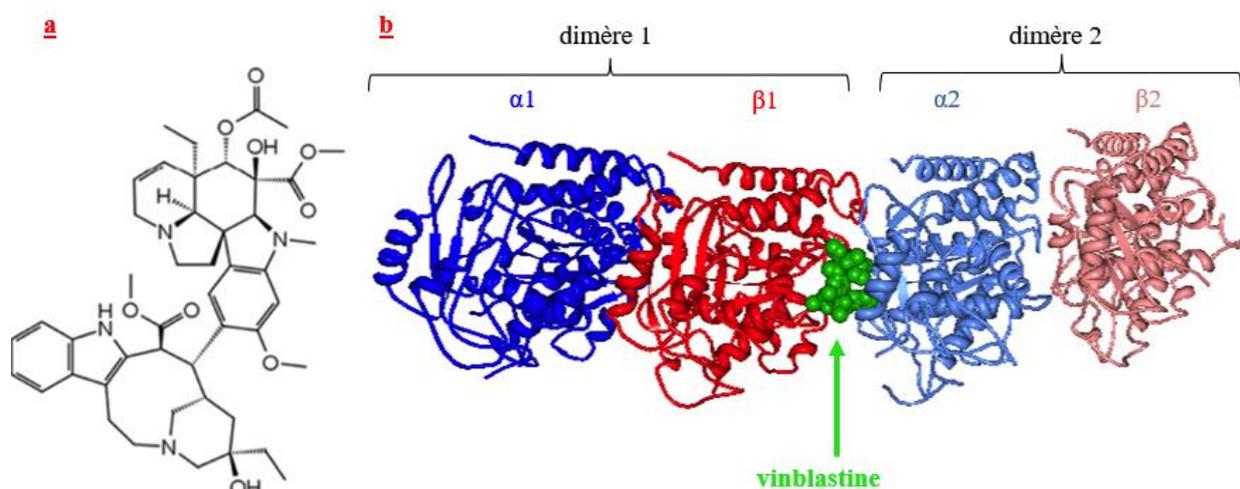


Figure 37. Structure et domaine de liaison de la vinblastine sur la tubuline. **a** Structure chimique de la vinblastine. **b** Diagramme Ribbon montrant la structure cristalline du dimère d' α/β tubuline déstabilisé par la vinblastine. Les structures secondaires des sous-unités α - et β -tubuline sont représentées en bleu et en rouge respectivement. La vinblastine est représentée par des sphères vertes. Structure extraite de Protein Data Bank (1Z2B).

De nouveaux composés entrant en compétition avec les vinca-alcaloïdes pour la liaison sur la tubuline ont été identifiés et font l'objet d'étude préclinique ou clinique : l'halichondrine B, l'eribuline mesylate, les maytansinoides, la rhizoxine.

Un deuxième site, très proche du site de liaison des vinca-alcaloïdes a été identifié et appartient lui-aussi au domaine vinca^{334,336}. La liaison d'un ligand sur ce site peptidique induit la formation d'agrégats et déstabilise les microtubules par inhibition de l'hydrolyse du GTP^{337,338}. La phomopsine A, la dolastatine, la cryptophycine et les spongistatines représentent les principaux ligands de ce site.

1.2.4.2.3 *Autres domaines de liaison des MDA*

La pironétine est une lactone insaturée d'origine mycobactérienne. A ce jour, c'est le seul composé capable d'interagir avec l' α -tubuline³³⁹ par établissement d'une liaison covalente irréversible^{340,341}. La liaison de la pironétine à la tubuline, à proximité de l'interface interdimerique (Figure 38), interfère avec l'assemblage des microtubules et induit un blocage cellulaire en mitose^{340,342}.

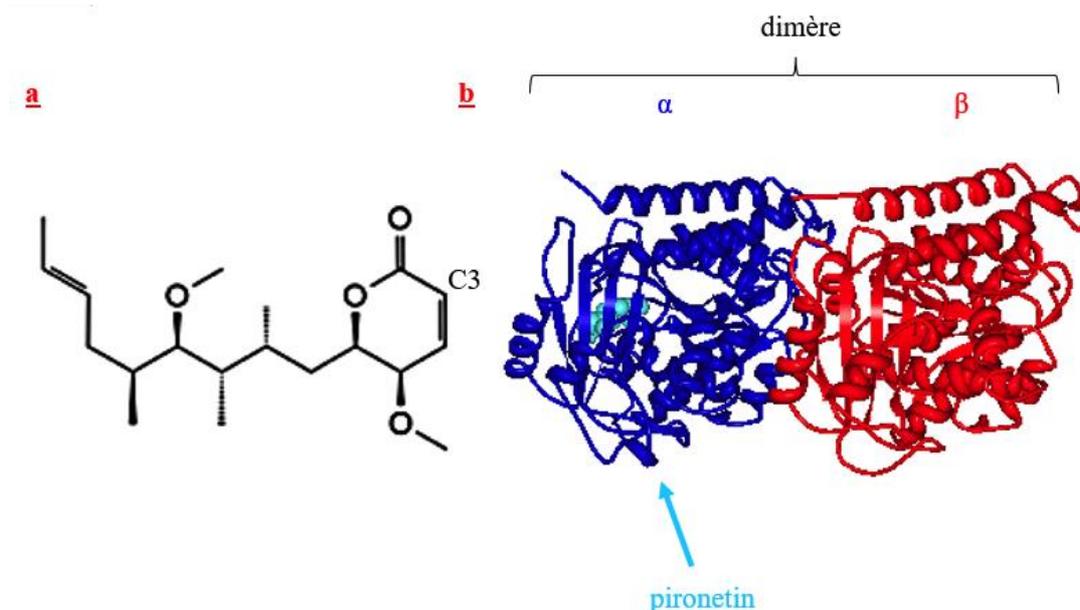


Figure 38. Structure et domaine de liaison de la pironétine sur la tubuline. **a** Structure chimique de la pironétine. **b** Diagramme Ribbon montrant la structure cristalline du dimère d' α/β tubuline déstabilisé par la pironétine. Les structures secondaires des sous-unités α - et β -tubuline sont représentées en bleu et en rouge respectivement. La pironétine est représentée par des sphères bleues. Structure extraite de Protein Data Bank (5FNV).

Le composé PM060184 est quant à lui un composé initialement extrait d'une éponge marine (*Lithoplocamia lithistoides*). Ce composé est actuellement en essai clinique de phase I pour le traitement des cancers avancés.

Le domaine de liaison est situé à l'interface entre 2 dimères associés longitudinalement, à proximité du site échangeable GDP/GTP³⁴³ (Figure 39). Il est localisé dans une poche de la sous-unité β . Ce site étant très proche du domaine vinca, la liaison de la molécule PM060184 interfère avec la fixation des vinca-alcaloïdes sur la tubuline. Le composé a un effet déstabilisateur sur les microtubules en se liant à l'extrémité plus des microtubules et en perturbant les interactions longitudinales entre les dimères. Il interagit également avec les dimères libres (avec une affinité de l'ordre du nanomolaire) et empêche l'assemblage des microtubules³⁴⁴.

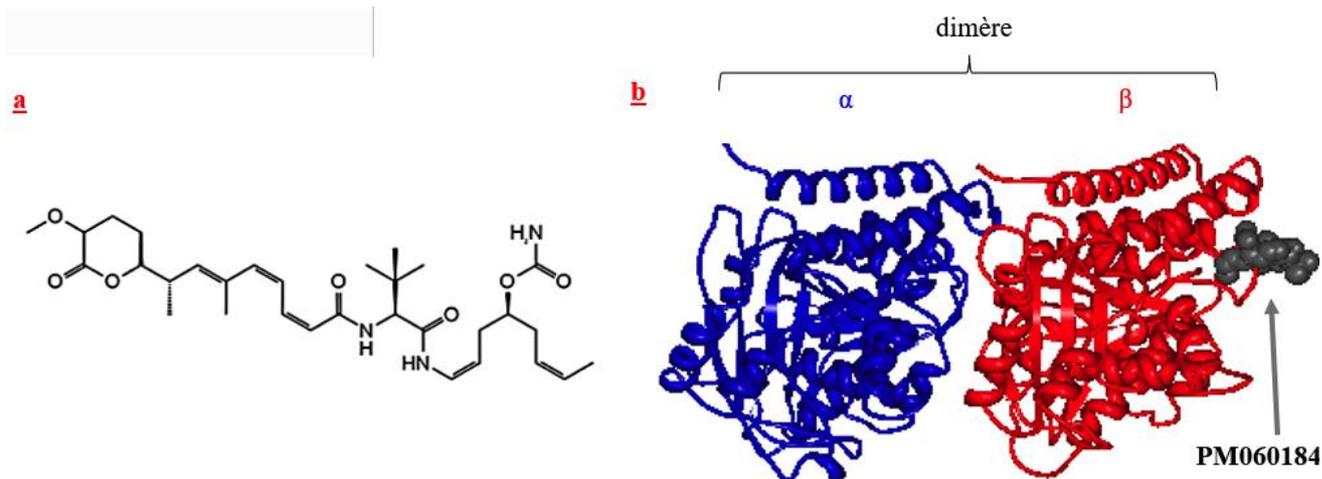


Figure 39. Structure et domaine de liaison du PM060184 sur la tubuline. **a** Structure chimique du PM060184. **b** Diagramme Ribbon montrant la structure cristalline du dimère d' α/β tubuline déstabilisé par le PM060184. Les structures secondaires des sous-unités α -et β -tubuline sont représentées en bleu et en rouge respectivement. PM060184 est représenté par des sphères grises. Structure extraite de Protein Data Bank (4TV9).

1.2.5 Résistances aux agents ciblant les microtubules

En dépit de l'intérêt croissant pour les nouvelles thérapies ciblées, les chimiothérapies restent un des traitements-clés pour la prise en charge des cancers avancés. Cependant, leur efficacité est fortement limitée par l'existence de résistance innée ou l'émergence de résistance acquise au cours du traitement. La compréhension des mécanismes impliqués dans la résistance aux chimiothérapies est essentielle pour le développement de nouveaux médicaments plus efficaces sur les cellules cancéreuses.

Les cellules sélectionnées après l'exposition à un agent chimiothérapeutique présentent souvent une résistance croisée vis-à-vis d'autres agents différents sur le plan structural ou mécanistique. Ce phénomène caractérise le phénotype de « MultiDrug Résistance » (MDR). La résistance aux chimiothérapies est un processus multifactoriel médié par (Figure 40):

- La surexpression de pompes membranaires d'efflux
- L'altération qualitative ou quantitative des microtubules ou des protéines associées
- L'altération des interactions entre les microtubules et les autres membres du cytosquelette
- L'altération des processus apoptotiques

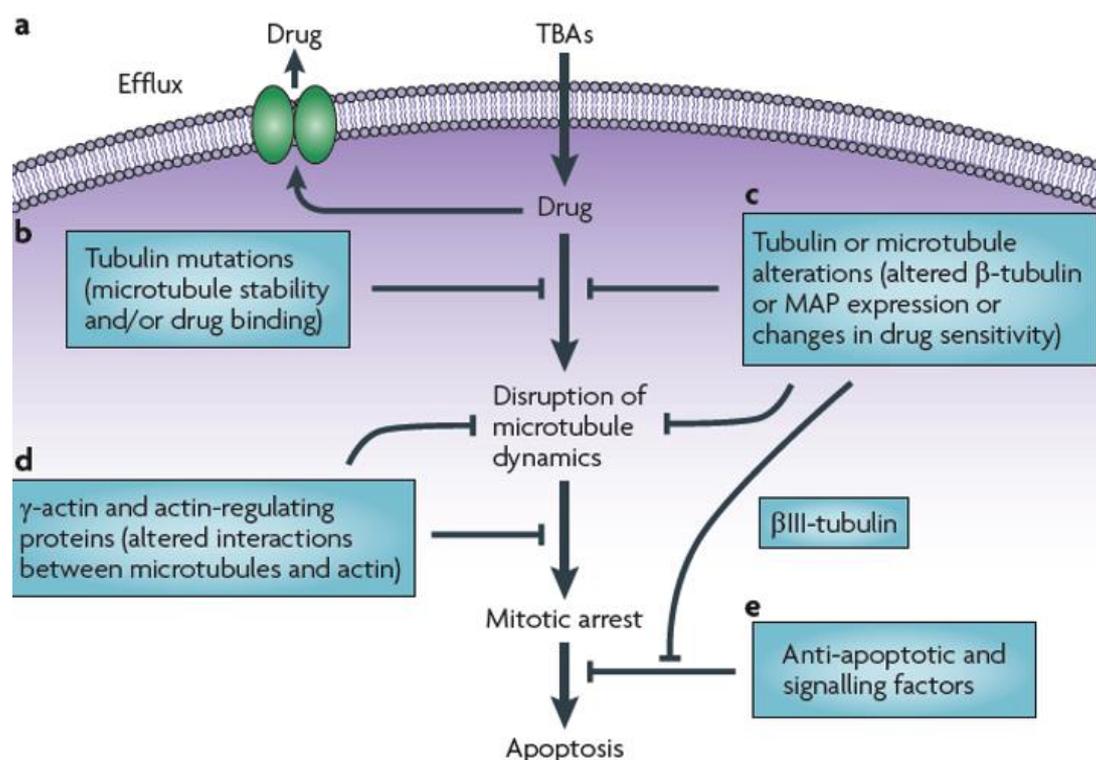


Figure 40. Principaux mécanismes de résistance aux agents ciblant les microtubules³¹⁰.

1.2.5.1 La surexpression de pompes membranaires d'efflux

La surexpression des pompes membranaires de la famille des protéines ABC (ATP Binding Cassette) constitue le principal mécanisme de résistance observé *in vitro* après une exposition répétée de lignées cellulaires cancéreuses à des agents ciblant les microtubules³¹¹. L'activité accrue de ces protéines d'efflux ATP-dépendantes à large spectre limite sensiblement l'accumulation intracellulaire des chimiothérapies et ainsi, leur efficacité^{345,346}. Parmi les protéines ABC, on peut notamment citer (Tableau 24) :

- La glycoprotéine P (ou P-gp), codée par le gène *MDR1* ou *ABCB1*, impliquée dans le phénotype MDR « classique » et réduisant notamment l'activité des vinca-alcaloïdes et des taxanes
- La protéine MRP1 (Multidrug Resistance-associated Protein 1), codée par le gène *ABCC1*, dont les vinca-alcaloïdes représentent un des principaux substrats
- La protéine MRP2 (Multidrug Resistance-associated Protein 2 (codée par le gène *ABCC2*), assurant notamment le transport des taxanes
- La protéine BCRP (Breast Cancer Resistance Protein (codée par le gène *ABCG2*) impliquée entre autre dans le transport des anthracyclines et des inhibiteurs des topoisomérases^{346,347}.

Des inhibiteurs de protéines d'efflux sont en développement mais n'ont pas pour le moment montré de bénéfice clinique³⁴⁸. La stratégie la plus prometteuse à ce jour est l'identification de nouveaux agents non transportés (ou faiblement transportés) par ces protéines d'efflux³⁴⁷ (Tableau 24).

Tableau 24. Sensibilité des agents ciblant les microtubules aux différents mécanismes de chimiorésistance

Agents	Sensibilité aux ABC protéines	Sensibilité au contenu en β -tubuline
Vincas	Sensible au MDR Sensible à MRP	Sensible au contenu en β III-tubuline
Cryptophycines	Insensible au MDR	n.d.
Dolastatines	Sensible au MDR	n.d.
Taxanes	Sensible au MDR Sensible à MRP2 et MRP7	Sensible au contenu en β III-tubuline
Épothilones	Sensible au MDR	Non
Discodermolides	Sensible au MDR Sensible à MRP1	Sensible au contenu en β III-tubuline
Cyclostreptine	Insensible au MDR	n.d.
Laulimalides	Insensible au MDR	n.d.
Taccalonolide	Insensible au MDR	Plus actif sur la β III-tubuline
Péloruside	Insensible au MDR	n.d.
Hémiasterline	Insensible au MDR	n.d.
Combretastatines	Insensible au MDR	Oui
2-méthoxyestradiol	Insensible au MDR	Inactif contre la beta I tubuline

MDR : multidrogue résistance ; ABC : protéines ATP *binding cassette* ; n.d. : non disponible.

1.2.5.2 L'altération qualitative ou quantitative des microtubules ou des protéines associées

Un second mécanisme de résistance consiste en une modification des microtubules ou des protéines associées à l'origine d'une perte d'affinité des agents antiméiotiques pour leur cible. Ces altérations résultent soit d'une mutation³⁴⁹ soit d'une modification de l'expression de ces protéines^{350,351}. L'inversion de composition des microtubules en ces différents isotypes influence notamment la sensibilité aux chimiothérapies. Ainsi, la surexpression de la β -tubuline de classe III a été corrélée à une mauvaise réponse aux taxanes et à l'épothilone B^{224,352-355}.

1.2.5.3 L'altération des interactions entre les microtubules et les autres membres du cytosquelette

Les cytosquelettes d'actine et de tubuline étant intimement connectés, toute altération des microfilaments d'actine ou de ses régulateurs (telle que la γ -actine) est associée à une perte de sensibilité vis-à-vis des agents ciblant les microtubules^{356,357}.

1.2.5.4 L'altération des processus apoptotiques

Une anomalie de signalisation apoptotique peut également induire des phénomènes de chimiorésistance. Par exemple, l'altération du SAC est associée à une capacité réduite du docétaxel à induire l'apoptose³⁵⁸.

Conclusion

- Les microtubules sont des polymères de tubuline très dynamiques impliqués dans de nombreux processus biologiques.
- En adoptant la conformation d'un fuseau bipolaire, les microtubules assurent la ségrégation des chromosomes homologues lors de la mitose et représentent une cible de choix pour le traitement des cancers à fort potentiel réplicatif.
- Les protocoles thérapeutiques anticancéreux incluent de nombreux agents de chimiothérapie perturbant la dynamique des microtubules
- Ces molécules sont cependant très toxiques et leur efficacité thérapeutique est limitée par des mécanismes de chimiorésistance.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

2 OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Depuis une vingtaine d'années, la prise en charge des cancers est orientée vers une médecine plus personnalisée, avec le développement de nouvelles thérapies ciblant spécifiquement certaines altérations moléculaires de la tumeur. Ces agents thérapeutiques ont permis d'améliorer la survie globale des patients et de limiter la toxicité systémique. Cependant, le recours à de telles molécules est restreint aux cancers présentant une mutation oncogénique ciblable et l'émergence de nombreux mécanismes de résistance limite leur efficacité à long terme. Dans ce contexte, les chimiothérapies restent encore aujourd'hui un traitement-clé à la disposition des oncologues. Elles associent souvent des sels de platine à un antimétabolite, mais sont fortement toxiques et soumises aux phénomènes de chimiorésistance. Un des enjeux actuels est donc d'identifier de nouveaux agents actifs sur les cancers résistants et mieux tolérés.

Notre équipe a réalisé, en collaboration avec l'Institut Curie (Laboratoire de Pharmacochimie, CNRS UMR9187/U1196, Paris), un criblage cellulaire à haut-débit sur un modèle de CBNPC résistant à l'apoptose et aux thérapies ciblées, et sélectionné une famille de 15 dérivés pyrrolo-pyrimidine restaurant l'apoptose des cellules de CBNPC résistantes. Mes travaux de thèse ont eu pour but de caractériser *in vitro* et *in vivo* l'ensemble de ces dérivés pyrrolo-pyrimidine afin de sélectionner à terme un potentiel candidat-médicament pour le traitement des cancers résistants. Dans cette optique, 3 axes de recherche ont été développés :

- 1) Nous avons dans un premier temps évalué le **potentiel anticancéreux de cette famille de composés** sur différents modèles cellulaires de CBNPC ainsi que d'autres cancers représentatifs. Ces résultats préliminaires ont permis de sélectionner 2 agents prometteurs pour la poursuite de l'étude (PP-2 et PP-13).
- 2) **Le mécanisme d'action** de ces 2 agents a été déterminé en observant les effets subcellulaires de PP-2 et PP-13 sur 2 modèles cellulaires de cancers sensibles à ces molécules. Des études d'interactions ont permis l'identification de leur cible thérapeutique, en collaboration avec l'équipe du Dr Jose Fernando Diaz Pereira (Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid). A partir de ces résultats, les essais portant sur la molécule PP-2 ne seront pas poursuivis en raison de ses effets plus modérés et de son affinité moindre pour sa cible. Les résultats relatifs à PP-2 seront présentés en résultats complémentaires dans la partie résultats de ce rapport de thèse.
- 3) Enfin, nous avons évalué **l'intérêt thérapeutique de PP-13 comparativement aux agents anticancéreux conventionnels**. Pour cela, nous avons déterminé son efficacité *in vitro* en condition de chimiorésistance. Nous avons également évalué sa toxicité et son efficacité thérapeutique sur la croissance tumorale et la dissémination des cellules tumorales *in ovo* et *in vivo*.

Les résultats obtenus concernant PP-13 ont fait l'objet d'un premier article actuellement sous presse (Scientific Reports, accepté en juillet 2017) et d'un second article en préparation. Ceux-ci sont exposés dans la partie résultats de ce manuscrit.

RESULTATS

3 RESULTATS

3.1 Le criblage cellulaire

Dans le but d'identifier de nouveaux agents anticancéreux, notre équipe a eu recours à une stratégie de criblage à haut débit sur des cellules de CBNPC résistantes à l'apoptose et aux thérapies ciblées anti-EGFR. Cette approche sans a-priori a permis de sonder tous les acteurs potentiels impliqués dans la résistance, qu'ils soient connus ou encore non identifiés. Plus de 7500 composés chimiques ont été testés. Après un criblage primaire et un criblage de validation, nous avons sélectionné, parmi 71 hits restaurant l'apoptose induite par privation sérique, une famille de composés possédant une forte homologie structurale pyrrolo-pyrimidine (Figure 41).

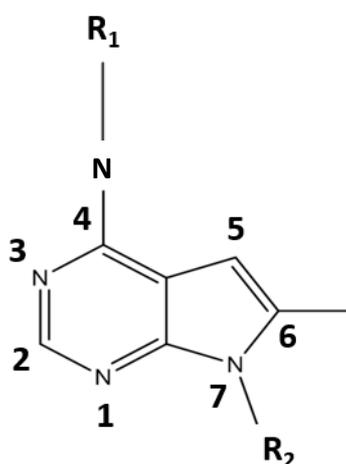


Figure 41. Le pharmacophore « 6-méthyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine » des composés chimiques étudiés.

Les 15 molécules de cette famille possèdent différents radicaux chimiques en position 4 et 7.

A partir de résultats préliminaires de cytotoxicité sur un panel de lignées cancéreuses, nous avons dans un premier temps décidé de poursuivre nos travaux sur les molécules réduisant d'au-moins 60 % la viabilité des cellules cancéreuses à 1 $\mu\text{mol/L}$ (molécules PP-1, 2, 10, 12, 13, 14 et 15) (Figure 42). Certains de ces composés chimiques ont montré des caractéristiques structurales et des profils cytotoxiques proches ce qui a permis de les classer en 2 sous-groupes : les molécules réduisant la prolifération cellulaire d'environ 60 % dont le chef de file est la molécule PP-2 et les molécules réduisant la prolifération cellulaire de près de 80 % dont le chef de file est la molécule PP-13.

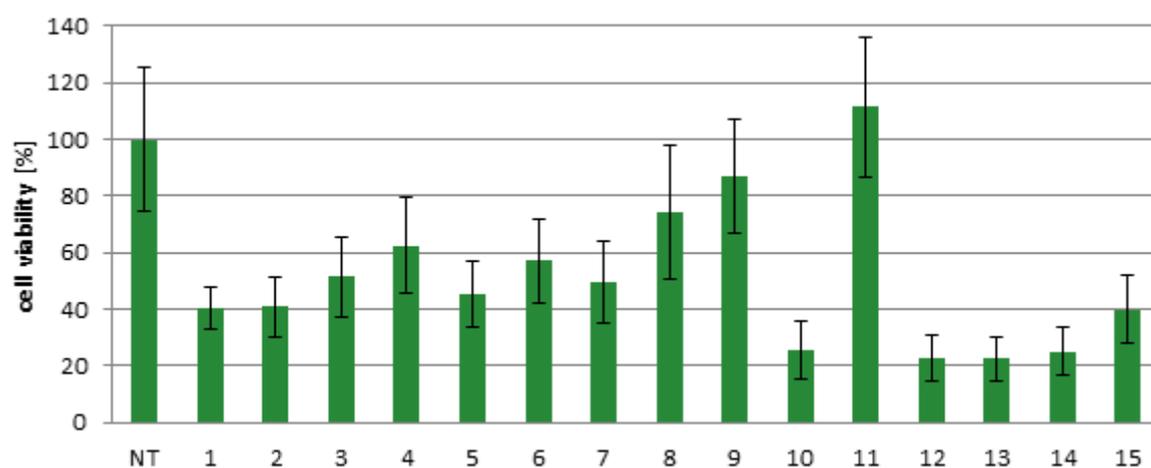


Figure 42. Effets des 15 dérivés pyrrolopyrimidine (abrévés 1-15) sur la prolifération d'une lignée de CBNPC H358. Les cellules ont été traitées pendant 72h par 1 $\mu\text{mol/L}$ de chaque molécule et la viabilité cellulaire a été déterminée par des tests MTT.

3.2 Caractérisation biologique et biochimique de PP-13

Dans cette partie, nous détaillons les résultats *in vitro* et *in vivo* concernant la molécule PP-13.

3.2.1 Article 1 :

Identification of pyrrolopyrimidine derivative PP-13 as a novel microtubule-destabilizing agent with promising anticancer properties

Gilson P, Josa-Prado F, Beauvineau C, Naud-Martin D, Vanwonderghem L, Mahuteau-Betzer F, Moreno A, Falson P, Lafanechère L, Frachet V, Coll JL, Díaz JF, Hurbin A, Busser B (2017). *Sci. Rep* (sous presse, accepté en juillet 2017). DOI:10.1038/s41598-017-09491-9.

3.2.1.1 Présentation de l'étude

Actuellement, les modalités de traitement pour la prise en charge des cancers avancés sont très diversifiées. Elles reposent principalement sur l'utilisation d'anciennes molécules de chimiothérapie ayant un spectre d'action large mais aussi une forte toxicité en raison de leur non-sélectivité, et des thérapies plus ciblées dont les spécificités d'action atténuent les effets indésirables et restreignent le nombre de patients répondeurs. Dans les 2 cas, de nombreux mécanismes de résistance affectent leur efficacité à long terme, soulignant la nécessité d'identifier de nouvelles molécules bien tolérées, actives sur les différents types de cancers, et capables de prendre le relai des agents anticancéreux conventionnels pour le traitement des formes résistantes.

Notre équipe a mis au point un criblage cellulaire sur plus de 7500 composés chimiques afin d'identifier de nouvelles molécules bioactives capables de restaurer la mort programmée dans un modèle cellulaire de CBNPC résistant à l'apoptose et aux thérapies ciblées. Cette approche à haut débit a notamment permis de sélectionner un dérivé pyrrolo-pyrimidine, PP-13, en raison de son fort potentiel cytotoxique. L'objectif de cette étude est de caractériser l'efficacité anticancéreuse de PP-13 sur différentes lignées cancéreuses humaines, de déterminer le mécanisme d'action de ce composé et sa cible moléculaire, et d'évaluer son efficacité thérapeutique et sa toxicité dans des modèles *in vivo* de cancers. Tout au long de cette étude, nous comparerons les effets de PP-13 à ceux du paclitaxel, un antiméiotique largement utilisé pour le traitement de nombreuses néoplasies avancées (ovaire, prostate, poumon, sein...).

3.2.1.2 Méthodes

Dans le cadre de nos travaux de recherche, nous disposons d'un large panel de lignées cellulaires cancéreuses humaines incluant des lignées de CBNPC de statut p53, *KRAS* et *EGFR* variés et des lignées de phénotype Multi-Drug Resistant. Nous avons déterminé la cytotoxicité de PP-13, son activité pro-apoptotique et son impact sur le cycle cellulaire par des tests MTT et des analyses de cytométrie en flux. Nous avons identifié la cible moléculaire de ce composé en réalisant successivement un kinome array, des expérimentations d'immunofluorescence, des essais *in vitro* de polymérisation de la tubuline associés à une

analyse des microtubules formés par microscopie électronique et des tests de liaison compétitive. Le devenir des cellules traitées par PP-13 a été suivi par vidéomicroscopie en temps réel. L'effet de PP-13 sur la croissance tumorale et l'invasion métastatique a été évalué *in vivo* dans des xénogreffes de CBNPC sur la membrane chorio-allantoïdienne d'œuf embryonné de poule.

3.2.1.3 Résultats

PP-13 inhibe la prolifération d'un large panel de lignées cellulaires de CBNPC, incluant des lignées résistantes aux thérapies ciblées. De façon intéressante, PP-13 exerce également un effet cytostatique sur d'autres lignées représentatives d'autres localisations cancéreuses suggérant un mécanisme d'action non spécifique des CBNPC. De plus, PP-13 n'est pas sensible aux mécanismes de chimiorésistance impliquant la surexpression des pompes membranaires d'efflux et pourrait donc dans ces conditions constituer une alternative intéressante aux agents antimitotiques conventionnels.

A l'échelle moléculaire, PP-13 perturbe l'organisation et l'instabilité dynamique des microtubules à l'origine d'un blocage cellulaire transitoire en prométaphase avec une activation du point de contrôle de l'assemblage des fuseaux mitotiques (SAC). Il en résulte un glissement mitotique, une aneuploïdie et l'apoptose des cellules. Des investigations mécanistiques ont permis d'établir que PP-13 se lie à la tubuline au niveau du site de liaison de la colchicine selon une stœchiométrie de 1:1. Contrairement aux agents ciblant les microtubules utilisés classiquement en cancérologie, PP-13 n'induit pas d'altération du réseau microtubulaire dans les cellules en interphase suggérant un effet toxique potentiellement moindre sur les tissus à renouvellement lent (et notamment une neurotoxicité périphérique réduite). Enfin, PP-13 présente une activité anti-tumorale et anti-métastatique significative *in vivo* dans un modèle de xénogreffe de CBNPC sur œuf embryonné de poule, sans induire de toxicité apparente sur l'embryon.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Identification of pyrrolopyrimidine derivative PP-13 as a novel microtubule-destabilizing agent with promising anticancer properties

Received: 22 March 2017
Accepted: 26 July 2017
Published: xx xx xxxx

Pauline Gilson^{1,2}, Fernando Josa-Prado³, Claire Beauvineau⁴, Delphine Naud-Martin⁴, Laetitia Vanwonterghem¹, Florence Mahuteau-Betzer⁴, Alexis Moreno⁵, Pierre Falson⁵, Laurence Lafanechère¹, Véronique Frachet^{1,6}, Jean-Luc Coll¹, Jose Fernando Díaz³, Amandine Hurbin¹ & Benoit Busser^{1,2}

Despite the emergence of targeted therapies and immunotherapy, chemotherapy remains the gold-standard for the treatment of most patients with solid malignancies. Spindle poisons that interfere with microtubule dynamics are commonly used in chemotherapy drug combinations. However, their troublesome side effects and the emergence of chemoresistance highlight the need for identifying alternative agents. We performed a high throughput cell-based screening and selected a pyrrolopyrimidine molecule (named PP-13). In the present study, we evaluated its anticancer properties *in vitro* and *in vivo*. We showed that PP-13 exerted cytotoxic effects on various cancer cells, including those resistant to current targeted therapies and chemotherapies. PP-13 induced a transient mitotic blockade by interfering with both mitotic spindle organization and microtubule dynamics and finally led to mitotic slippage, aneuploidy and direct apoptotic death. PP-13 was identified as a microtubule-targeting agent that binds directly to the colchicine site in β -tubulin. Interestingly, PP-13 overcame the multidrug-resistant cancer cell phenotype and significantly reduced tumour growth and metastatic invasiveness without any noticeable toxicity for the chicken embryo *in vivo*. Overall, PP-13 appears to be a novel synthetic microtubule inhibitor with interesting anticancer properties and could be further investigated as a potent alternative for the management of malignancies including chemoresistant ones.

In the last two decades, advances in the understanding of carcinogenesis have revolutionized the management of cancer patients with the development of targeted therapies and immunotherapy. Identification of genetic alterations in subsets of cancers leading to different subcellular signals of tumour growth and progression elicited the clinical use of oncogene-targeted therapies for patients harbouring such anomalies^{1–4}. In lung cancers with EGFR-activating mutations, anti-EGFR therapies, including gefitinib, erlotinib, and afatinib, have been shown to improve progression-free survival and were approved as first-line options⁵. However, despite the initial response, resistance mechanisms almost inevitably ensue and limit the long-term potency of targeted therapies^{6,7}. Moreover, efforts are still needed for the management of patients without targetable oncogenic driver

¹Cancer Target and Experimental Therapeutics, Institute for Advanced Biosciences, INSERM U1209, CNRS UMR5309, Grenoble Alpes University, Grenoble, France. ²Biochemistry, Toxicology and Pharmacology Department, Grenoble University Hospital, Grenoble, France. ³Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain. ⁴Institut Curie, PSL Research University, CNRS, INSERM UMR9187/U1196, Orsay, France. ⁵Drug Resistance Mechanisms and Membrane Proteins Laboratory, MMSB UMR 5086 CNRS/ Lyon 1 University, Institute of Biology and Chemistry of Proteins, Lyon, France. ⁶EPHE, PSL Research University, Paris, France. Amandine Hurbin and Benoit Busser jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.H. (email: amandine.hurbin@inserm.fr)

mutations representing 60% of non-small cell lung cancer (NSCLC) cases⁸. Immunotherapies, especially immune checkpoint inhibitors, are emerging for cancer therapy and have the advantage of providing durable responses and improved patient prognosis^{9–11}; however, intrinsic resistance for numerous tumour types has also restricted their use¹². Therefore, non-selective chemotherapy remains a gold-standard treatment for almost all patients with advanced solid cancers. Spindle poisons that interfere with microtubule dynamics represent a major class of conventional chemotherapy drugs commonly used in combination for cancer treatments⁸. Among the approved microtubule-targeting agents, taxanes and vinca-alkaloids that respectively stabilize and depolymerize microtubules are widely used. However, their troublesome side effects, especially myelosuppression and peripheral neurotoxicity, and the emergence of chemoresistance make essential the development of alternative agents¹³.

With the aim to identify new chemical compounds able to abolish resistance to apoptosis in NSCLC, we have conducted a high-throughput cell-based screening of more than 7500 molecules. We have selected a small molecule belonging to the pyrrolopyrimidine family (PP-13) that strongly induced apoptosis. Here, we show that PP-13 is cytotoxic for a large panel of human cancer cell lines. The PP-13 molecule induced mitotic cell blockade by impairing both mitotic microtubule organization and dynamics and was identified as a microtubule-targeting agent that selectively binds to the colchicine-binding site on β -tubulin. Contrary to conventional spindle poisons used for cancer treatment, PP-13 overcame multidrug resistance (MDR). This molecule also showed *in vivo* anti-tumour activity without any noticeable toxicity in the chicken embryo.

Results

Identification of a new molecule inhibiting proliferation of various human cancer cells. To identify new potent chemical molecules that induce apoptosis in a resistant NSCLC cell model, we designed a high-throughput cell-based assay on H358 NSCLC cells that we have previously described as a model of resistance to apoptosis induced by serum starvation^{14,15}. We screened 7520 compounds at a final concentration of 2.5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Among the 71 chemical molecules identified as restoring more than 49% of apoptosis, one pyrrolopyrimidine derivative, PP-13 (ethyl 4-((4-(benzylamino)-6-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-7-yl)methyl)benzoate), was finally selected for further biological and biochemical characterization owing to its high cytotoxic effects (Fig. 1A).

We first evaluated the ability of PP-13 to inhibit growth of human NSCLC cell lines (H358, H322, A549, H1975, H3255, H1650, PC9 and NCI-H460) harbouring various forms of *TP53*, *KRAS* and *EGFR* status (Supplementary Fig. S1). NSCLC cells treated with increasing concentrations of PP-13 showed a drastic inhibition of their viability regardless of their mutational status (Fig. 1B upper panel). Concentration values inhibiting cell growth by 50% (IC_{50}) ranged from 76 to 255 nmol.L^{-1} (Fig. 1B lower panel). Interestingly, PP-13 was effective both on NSCLC cell lines resistant (H1650, H1975) and sensitive (PC9, H3255) to anti-EGFR-targeted therapies. To determine if PP-13 activity was specific to NSCLC cells, we used other representative human cancer cell lines from various origins (colorectal cancer cell lines HCT116 and HT29; breast cancer cell line MCF7; prostate cancer cell line PC3; cervical cancer cell line HeLa; melanoma cell lines colo829, A375, A7 and SkMel-2) (Fig. 1C). Similar to the results obtained in NSCLC cells, the IC_{50} concentrations for PP-13 ranged from 67 to 145 nmol.L^{-1} , except for MCF7 cells, which resisted to PP-13. PP-13 also reduced the viability of normal human foetal lung fibroblasts, MRC5, and human keratinocyte, HaCat, with an IC_{50} of about 70 nmol.L^{-1} in the same range as for cancer cell lines (Fig. 1D). Similar effects were observed in these cell lines with the antimitotic chemotherapy paclitaxel currently used for breast cancers, ovarian cancers, or NSCLC treatment (Supplementary Fig. S2). Although IC_{50} concentrations for PP-13 were higher than those for paclitaxel in cancer cell lines, they were in the nanomolar range (Fig. 1 and Supplementary Fig. S2). In addition, MRC5 and HaCat normal cells appeared to be less sensitive to PP-13 compared to paclitaxel (Fig. 1D and Supplementary Fig. S2C). Taken together, these data suggest that PP-13 exerts an interesting cytotoxic activity in a wide panel of cancer cell lines.

PP-13 overcomes the multidrug-resistant (MDR) phenotype in cancer cells. The overexpression of efflux pumps or multidrug transporters confers cell resistance to many drugs and represents the major explanation for the mechanism of tumour cell chemoresistance to spindle poisons¹⁶. To determine the activity of PP-13 in an MDR phenotype context, we compared the effects of PP-13 on the proliferation of drug-sensitive cells with those on their drug-resistant counterparts that overexpress P-glycoprotein, BCRP, MRP1, or MRP2 efflux transporters (Table 1). PP-13 exerted similar cytotoxic effects in drug-sensitive cells and MDR cells, with an IC_{50} ranging between 280 nmol.L^{-1} and 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. This result indicates that PP-13 is not a substrate of these drug transporters. This contrasts with the active efflux of paclitaxel by P-glycoprotein, with a ratio of 375 between the IC_{50} of drug-sensitive and P-glycoprotein-overexpressing cells (Table 1 and ref. 16).

PP-13 induces mitotic blockade in cancer cells. Two cell lines presenting high sensitivity to PP-13 were chosen for further investigation: the H358 NSCLC cells that were used for the initial cell-based high-throughput screening model and the HeLa carcinoma cell line, with IC_{50} values of 170 and 120 nmol.L^{-1} , respectively. The effects of PP-13 on cell cycle distribution were assessed over time by flow cytometry in these cells. Both H358 and HeLa cells treated with PP-13 at the IC_{50} concentration transiently accumulated in the mitosis stage (Fig. 2A,B). Thirty-two percent of cells were found in mitosis after 18 h of PP-13 exposure compared to approximately 2% of vehicle-treated cells (Fig. 2A,B, and Supplementary Fig. S3). The percentage of mitotic cells then gradually decreased, concomitantly with the accumulation of apoptotic cells in the sub- G_1 fraction. After 72 h of PP-13 treatment, approximately 20% of cells underwent apoptosis compared to only 1% of the vehicle-treated cells. Consistent with the progressive increase in the apoptotic sub- G_1 cells, PP-13 strongly induced the cleavage of caspase-3 in both H358 and HeLa cells (Fig. 2C and Supplementary Fig. S4). Although PP-13 effect was not as strong as that of paclitaxel¹⁷ (Supplementary Fig. S2), these results showed that PP-13 induced mitotic cell arrest, which ultimately led to caspase-dependent apoptosis.

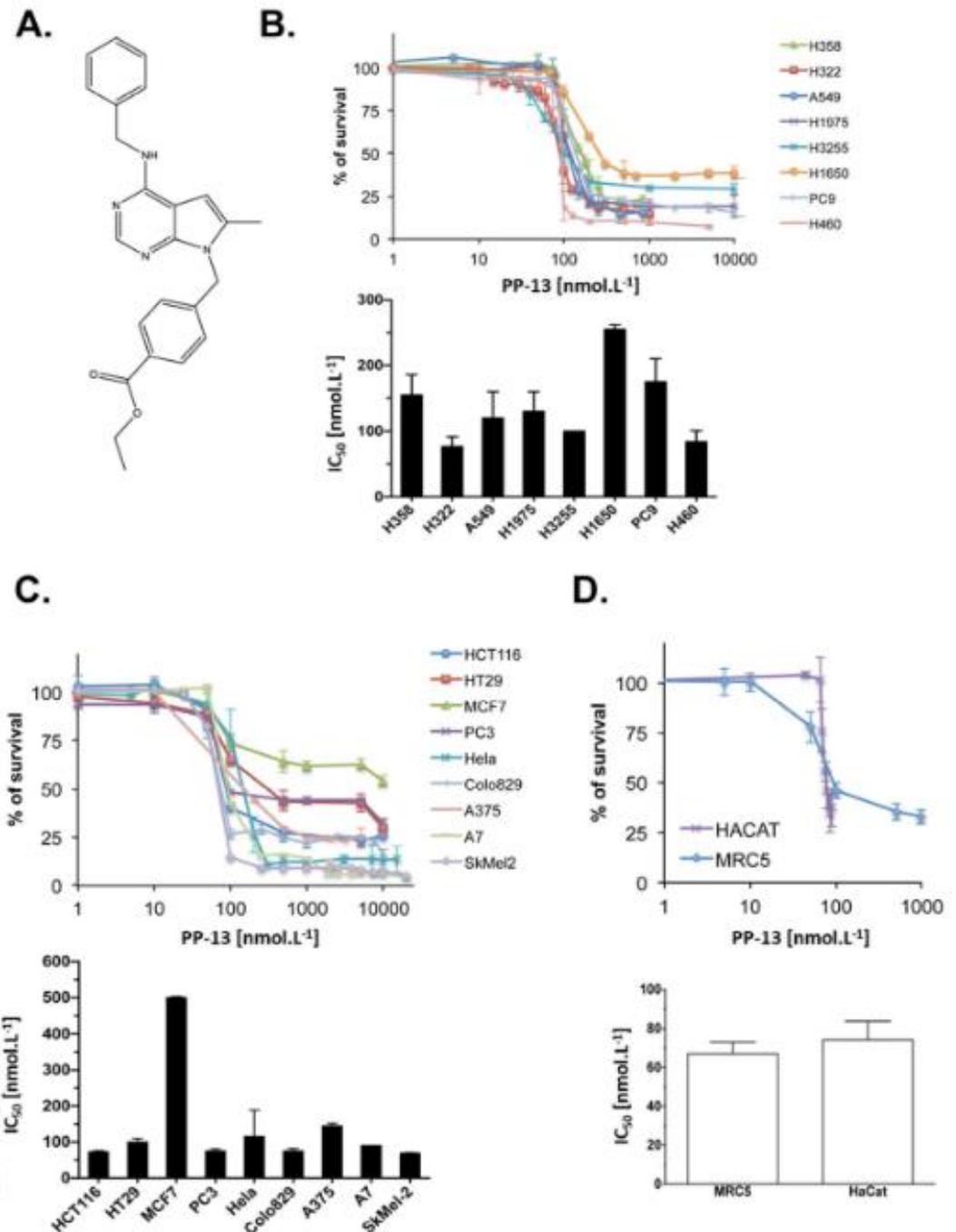


Figure 1. PP-13 significantly inhibited the proliferation of human cancer cell lines. (A) Chemical structure of PP-13. (B–D) The MTT assays in NSCLC cells (B), in other representative cancer cell lines from various origins (C), and in human foetal lung fibroblast MRC5 cells and in human keratinocyte HaCat cells (D), treated with the indicated concentrations of PP-13 for 72 h. Lower panels: PP-13 concentrations required to inhibit cell growth by 50% (IC_{50}) at 72 h. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments (in nmol.L⁻¹).

PP-13 interferes with both mitotic microtubule organization and spindle pole integrity. Since any perturbation of the microtubule dynamic balance can lead to microtubule disorganization and mitotic cell cycle arrest¹⁸, we investigated the effects of PP-13 on microtubules in HeLa cells by immunofluorescence. After a 24h treatment with PP-13, HeLa cells presented a microtubule organization in interphase similar to that of control cells (Fig. 3A). During metaphase, control cells typically showed 2 symmetrical and fusiform bipolar spindles with well-aligned chromosomes at the mid-plate (Fig. 3B). In contrast, PP-13-driven mitotically arrested cells showed short and multipolar spindles associated with strong defects in chromosome congression and alignment, suggesting a prometaphase blockade. In agreement with the flow cytometry analysis, the percentage of cells in interphase

Cell lines	IC ₅₀ of PP-13	IC ₅₀ of Paclitaxel
HEK293	780 nmol.L ⁻¹	nt
HEK293 overexpressing MRP2 transporter	700 nmol.L ⁻¹	nt
NIH-3T3	490 nmol.L ⁻¹	40 nmol.L ⁻¹
NIH-3T3 overexpressing P-glycoprotein transporter	490 nmol.L ⁻¹	>15 μmol.L ⁻¹
HEK293	1000 nmol.L ⁻¹	5 nmol.L ⁻¹
HEK293 overexpressing MRP1 transporter	650 nmol.L ⁻¹	6.3 nmol.L ⁻¹
HEK293	430 nmol.L ⁻¹	75 nmol.L ⁻¹
HEK293 overexpressing BCRP transporter	280 nmol.L ⁻¹	93 nmol.L ⁻¹

Table 1. PP-13 overcomes efflux-mediated chemoresistance. The effects of PP-13 and paclitaxel on cell viability were determined by MTT assays. Concentrations required to inhibit cell growth by 50% (IC₅₀) at 72 h in drug-sensitive cell lines and their multidrug-resistant counterparts overexpressing P-glycoprotein, MRP1, MRP2, or BCRP transporters. Data are the mean of triplicates. nt: not tested

decreased in response to PP-13 treatment, whereas abnormal mitotic cells accumulated (Fig. 3C). Moreover, huge and polynucleated cells in pseudo-interphase were also identified and accounted for almost 47% of total cells. Abnormal mitotic cells showed a mean of 2–4 spindle poles (Fig. 3D). Similar observations were made in PP-13-treated H358 cells, but the cells mostly showed more than 5 spindle poles and no significant augmentation of polynucleated cells (Supplementary Fig. S5). Since aberrant multipolar spindles are frequently associated with supernumerary centrosomes¹⁹, we quantified the microtubule-organizing centres (MTOCs) in mitotic cells using γ -tubulin staining (Fig. 3E and F). Under PP-13 treatment, HeLa cells displayed a variable number of γ -tubulin dots, with an average of 2–3 γ -tubulin dots per cell, while control cells normally harboured 2 γ -tubulin dots. In contrast, in H358 cells, the number of γ -tubulin dots was comparable to that of control cells (Supplementary Fig. S5). We next examined the centrosome composition with centrin-2, a specific marker for centrioles. Control cells showed each centrosome displaying a pair of cohesive centrioles (Fig. 3E), whereas PP-13-treated cells with more than 2 spindle poles presented variable numbers of centrin-2 dots (0, 1 or 2 dots per MTOC), likely because of the disengagement of centriole pairs²⁰. Overall, these observations showed that PP-13 induced mitotic spindle multipolarity and microtubule disorganization, resulting in prometaphase cell cycle arrest.

PP-13 activates the spindle assembly checkpoint followed by mitotic slippage, aneuploidy or direct apoptotic death.

The spindle assembly checkpoint (SAC) is a safety mechanism assuring faithful chromosome segregation during cell division. The SAC is typically activated during prometaphase and delays anaphase onset until all chromosomes are well aligned and correctly attached to the mitotic spindle by kinetochores. Since the SAC complex is frequently involved in prometaphase arrest²¹, we evaluated the impact of PP-13 on SAC activation by following the activation of BubR1, a major component of SAC (Fig. 4A and B). Time-lapse videomicroscopy of HeLa cells stably expressing BubR1-EGFP showed that the mean time of BubR1 activation in control cells was 1.60 ± 1.01 h, whereas it was more than 7.37 ± 2.79 h in PP-13-treated cells (Fig. 4A and B). Activation of BubR1 was thus approximately 5-times longer in PP-13-treated cells than in control cells, probably contributing to mitotic arrest. The fate of transiently arrested cells was next investigated by time-lapse videomicroscopy using HeLa cells stably expressing α -tubulin-EGFP and histone H2B-RFP (Fig. 4C and D). In control conditions, mitotic cells represented only 2% of cells and exhibited typical mitotic features (Fig. 4D and Supplementary Fig. S6). Under PP-13 treatment, different fates of abnormal mitotic cells were observed. Fifty percent of mitotic cells underwent apoptosis directly as evidenced by the emergence of membrane blebbing, chromatin condensation or apoptotic bodies (Fig. 4C and D, and Supplementary Fig. S7). Following prometaphase blockade, 35% of cells initiated aberrant cytokinesis with asymmetric cytoplasmic and chromosomal division (Fig. 4C and D, and Supplementary Fig. S8). This resulted in cell aneuploidy with the generation of non-viable cells or re-clustering, leading to the generation of polynucleated pseudo-interphase cells. In turn, cells either underwent cell death (94% of these cases), as indicated by the presence of micronuclei, nucleus hyperfragmentation or blebbing, or moved forward into mitosis (6% of these cases) (Fig. 4C and D, and Supplementary Fig. S9). Finally, a small fraction of cells died during interphase (13%) or slipped out of mitosis (2%). Similar defects were obtained with H358 cells, with the induction of either mitotic slippage (exit out of mitosis without cytokinesis, 64% of cases), asymmetric division (24% of cases), or direct apoptotic death (12% of cases) (Supplementary Fig. S10). Altogether, these data showed that PP-13 induced an SAC-dependent prometaphase blockade leading to aneuploidy, mitotic slippage and cell death.

PP-13 directly targets tubulin and competes with colchicine for binding. The main molecular targets of PP-13 involved in SAC-dependent prometaphase blockade could be mitotic kinases or tubulin. We first performed a kinome assay to test the ability of PP-13 to inhibit a panel of more than 450 human protein kinases including mitotic kinases and relevant cancer mutant kinases. No kinase was inhibited at 1 or 10 μ mol.L⁻¹, suggesting that PP-13 does not act as a kinase inhibitor (Supplementary Fig. S11). To evaluate whether tubulin is a target of PP-13, we performed an *in vitro* tubulin polymerization assay using pure tubulin. PP-13 did not delay

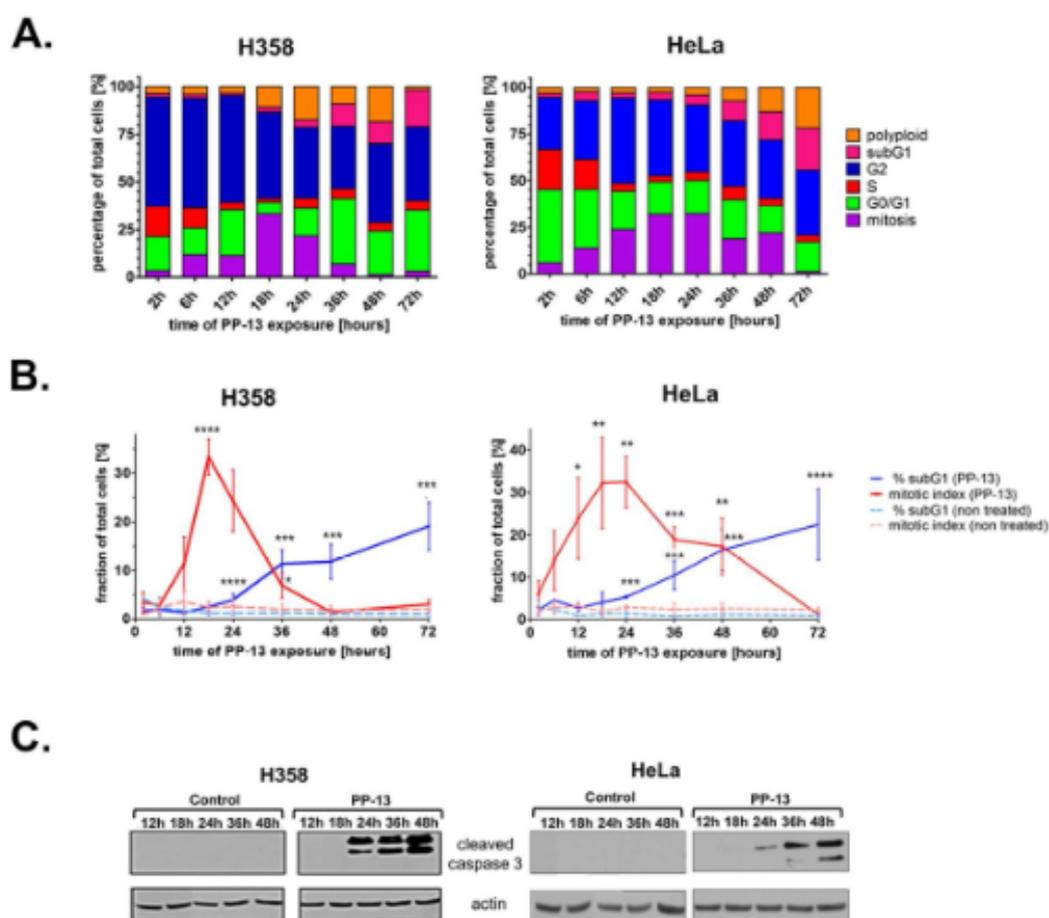


Figure 2. PP-13 interferes with the mitotic progression of H358 NSCLC and HeLa cells. H358 and HeLa cells were treated with PP-13 at 170 and 120 nmol.L⁻¹, respectively. (A) The cell-cycle phases were determined by flow cytometry over time as indicated. The histograms represent the mean of the percentage of cells in each phase of the cell cycle (n = 3 independent experiments). (B) Graphical representation of the percentage of mitotic and sub-G₁ cells in control and PP-13-treated cells. Data are presented as the mean ± SD of ≥ 3 independent experiments (****p < 0.01; ****0.01 < p < 0.02; ***0.02 < p < 0.03; **0.03 < p < 0.04, *0.04 < p < 0.05 compared to control cells). (C) Cleavage of caspase 3 was evaluated by western blotting. Actin was used as a loading control. For the sake of clarity, cropped blots are shown. Full-length blots are presented in Supplementary Fig. S4.

the start of microtubule assembly but significantly reduced the microtubule polymerization speed and maximal polymerized tubulin rate in a dose-dependent manner (Fig. 5A). After 1 h, 5 μmol.L⁻¹ of PP-13 decreased the tubulin polymer mass as much as 2.5 μmol.L⁻¹ of colchicine. The microtubule-depolymerizing effect of PP-13 was confirmed by electron microscopy (Fig. 5B). No microtubule was observed in the presence of PP-13 or colchicine. These observations indicated that PP-13 directly targets tubulin and exerts potent depolymerizing effects *in vitro*.

Because the colchicine binding site is a major pocket for most of the microtubule destabilizers²², we investigated the ability of PP-13 to bind to this site by competitive experiments with a reversible fluorescent colchicine analogue (MTC) whose binding to unassembled tubulin raises the fluorescence signal^{23,24}. In the conditions of the assay (absence of Mg²⁺ in the buffer), tubulin is in the dimeric state. Conditions were chosen to allow that roughly 50% of the colchicine binding sites in tubulin are occupied by MTC and 50% of them are free. In the presence of a competitor for the colchicine site, it will bind to the empty sites and the MTC binding equilibrium will be reshuffled resulting in a decreased intensity of the tubulin-bound MTC fluorescence in a dose-dependent manner, which was observed in Fig. 5C. Fifty μmol.L⁻¹ of PP-13 reduced the fluorescence intensity by 56%. This displacement of MTC by PP-13 fits to a competitive model²⁵ (Fig. 5D), demonstrating the ability of PP-13 to bind to the colchicine-binding site of tubulin. Based on the MTC binding constant (4.7.10⁵ M⁻¹), the binding constant of PP-13 was calculated as previously described²⁵ to be 9.3.10⁴ M⁻¹ (Fig. 5D).

PP-13 reduces tumour growth and metastasis invasion *in vivo*. To evaluate the antitumour activity of PP-13 *in vivo*, we used NSCLC H358 cells xenografted on chicken chorioallantoic membranes (CAM). Formed tumours were treated every 48 h with vehicle (0.5% DMSO), paclitaxel (50 μmol.L⁻¹), or PP-13 (0.17 μmol.L⁻¹) (Fig. 6A). Paclitaxel was used as a positive control and a concentration of 50 μmol.L⁻¹ was chosen to induce

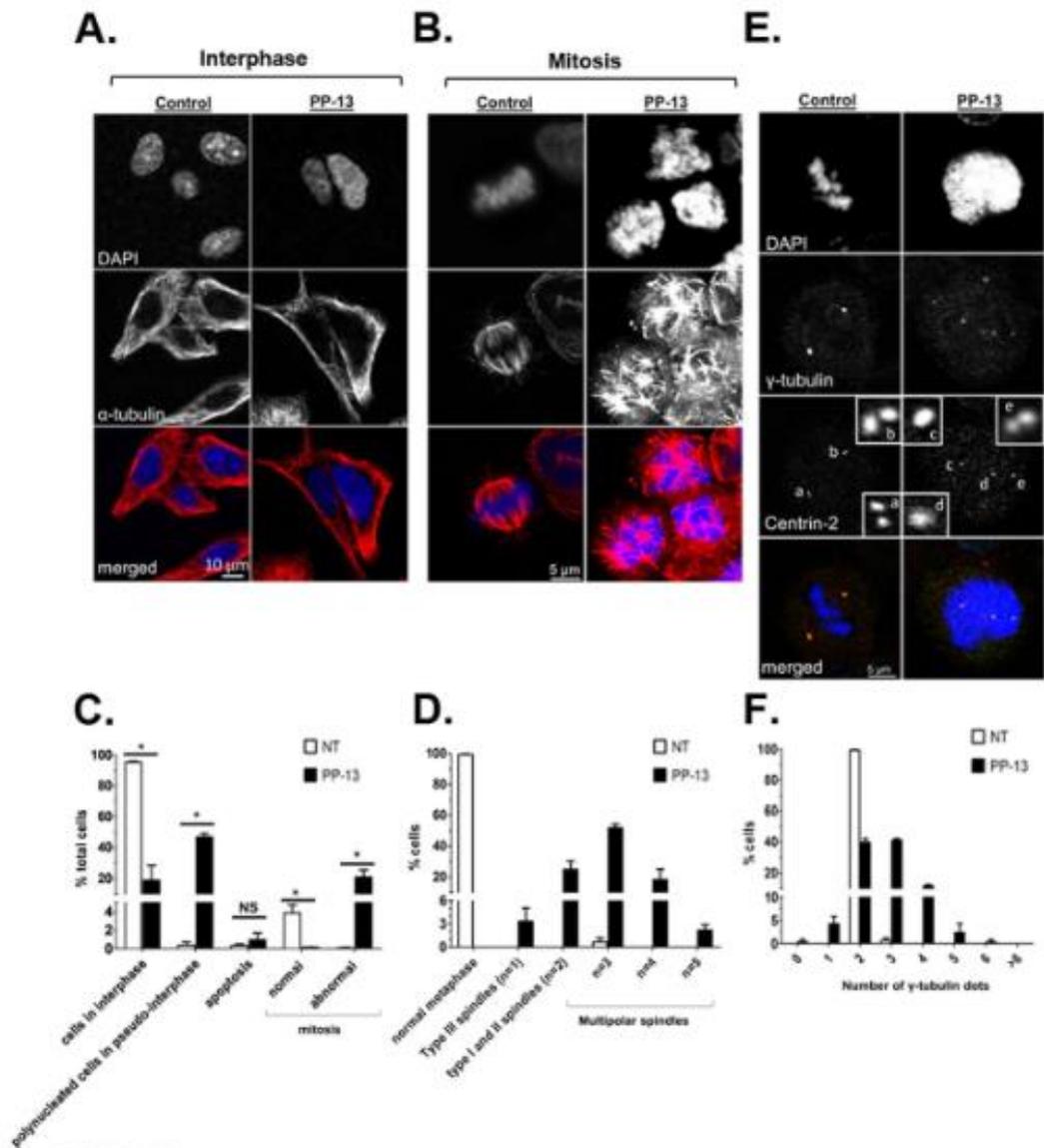


Figure 3. PP-13 interferes with mitotic spindle architecture and centrosome formation. HeLa cells were treated with or without 120 nmol.L^{-1} PP-13 for 24 h. (A,B) Representative confocal microscopy images of microtubules in cells in interphase (A) or mitosis (B). In red: α -tubulin, in blue: DNA staining with DAPI. (C) Quantification of interphase, mitotic, apoptotic and polynucleated cells. At least 550 cells were randomly chosen and scored in each condition. $*p = 0.0495$; NS, not significant. (D) Quantification of spindle poles per mitotic cell. According to conventional nomenclature⁶⁰, type I and II spindles are bipolar ($n = 2$) with at least one uncongressed chromosome; type III spindles are monopolar ($n = 1$), whereas multipolar spindles presented more than two poles ($n > 2$). At least 100 mitotic cells were randomly chosen and scored in each condition. n: number of mitotic spindles. (E) Confocal microscopy images showing centrosome organization and centrin-2 repartition in mitotic cells. Insets represent a zoom of the boxed area. In red: γ -tubulin, in green: centrin-2, in blue: DNA staining with DAPI, a-e: centrioles. (F) Quantification of γ -tubulin dots per mitotic cell. At least 100 mitotic cells were randomly chosen and scored in each condition.

significant tumour growth inhibition without toxicity for embryos. At day 19, tumours were recovered from the upper CAM and weighted. PP-13 significantly inhibited H358 tumour growth (Fig. 6B and C) compared to control. Importantly, the comparison of the number of dead chicken embryos in control and PP-13-treated eggs, as well as the analysis of embryos morphological or functional defects, indicated that PP-13 showed no noticeable toxicity in the chicken embryo (Supplementary Fig. S12). This suggests that in this model PP-13 is well tolerated at a dose sufficient to induce an anti-tumour effect. Analysis of the presence of H358 cells at the lower CAM by RT-qPCR allowed for the accurate detection of tumour cell dissemination (Fig. 6C). At $0.17 \mu\text{mol.L}^{-1}$, PP-13 reduced the metastasis ability of H358 cells compared to control, suggesting that PP-13 inhibits invasion mechanisms.

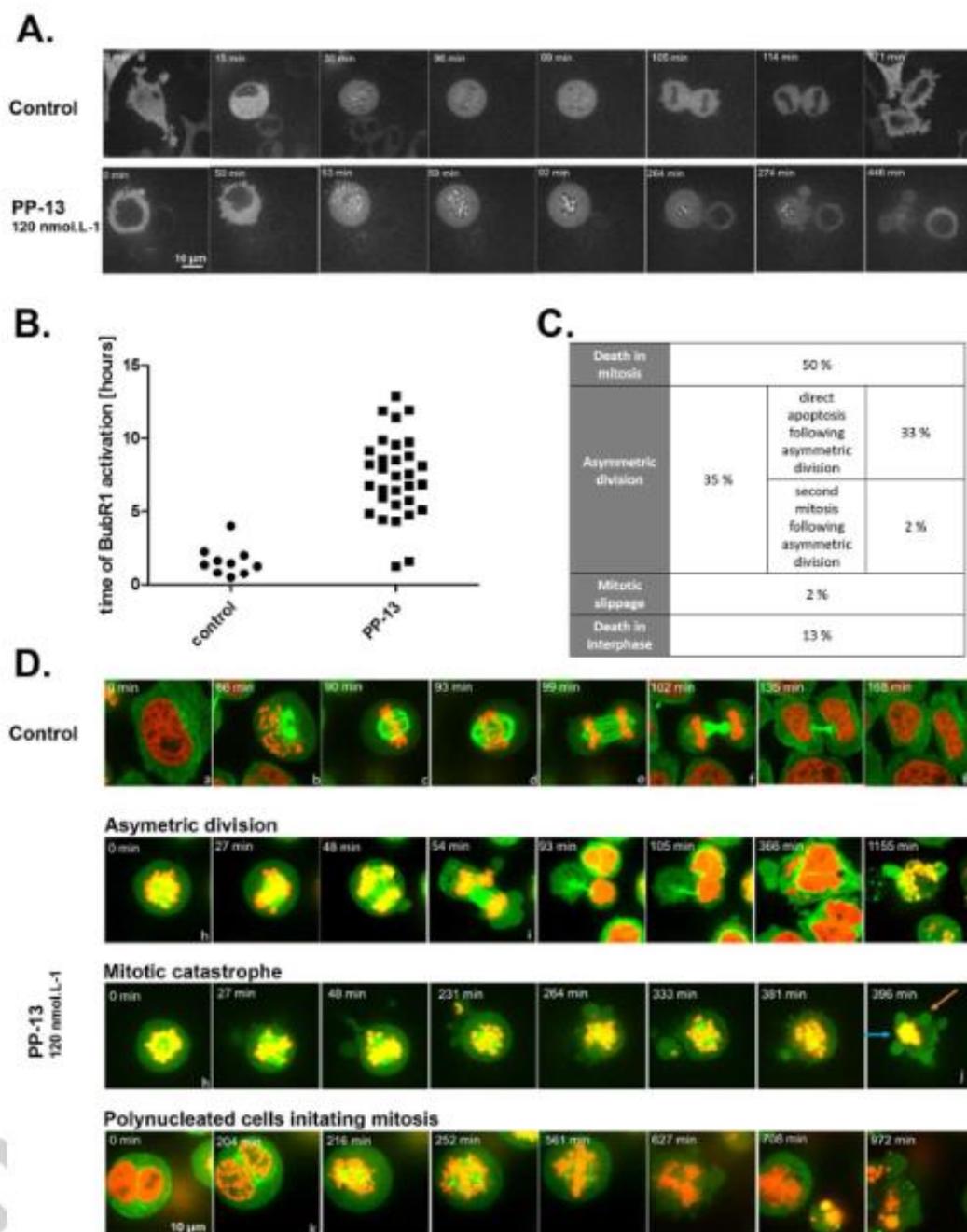


Figure 4. PP-13 induces cell prometaphase arrest then asymmetric division or direct apoptotic death. BubR1-EGFP HeLa cells (A,B) or α -tubulin-EGFP H2B-RFP HeLa cells (C,D) were treated with or without 120 nmol L⁻¹ PP-13, and cells were followed over time with time-lapse videomicroscopy. Times are indicated on each picture. (A) Spindle assembly checkpoint (SAC) activation was analysed over time by following the activation of BubR1. (B) Time of BubR1 activation was estimated by time-lapse videomicroscopy, after following 10 control cells and 31 treated cells over time. Only 2/31 treated cells had BubR1 activation time less than 2 hours due to mitotic catastrophe. (C) Percentages of different cell fates induced by PP-13 treatment were estimated by time-lapse videomicroscopy, after following 46 treated cells over time. (D) The cell division process was followed over time and representative pictures are shown. Control cells undergoing mitosis exhibit typical features of the different cell-cycle phases: a. interphase; b. prophase; c. metaphase; d. anaphase I; e. anaphase II; f. cytokinesis; g. interphase. PP-13 induces cell prometaphase arrest (h), then asymmetric division (i) or direct apoptotic death (j). Orange and blue arrows indicate blebbing and chromatin condensation respectively. Polynucleated cells generated from asymmetric division can initiate a second mitosis (k). In red: H2B-RFP, in green: α -tubulin-EGFP.

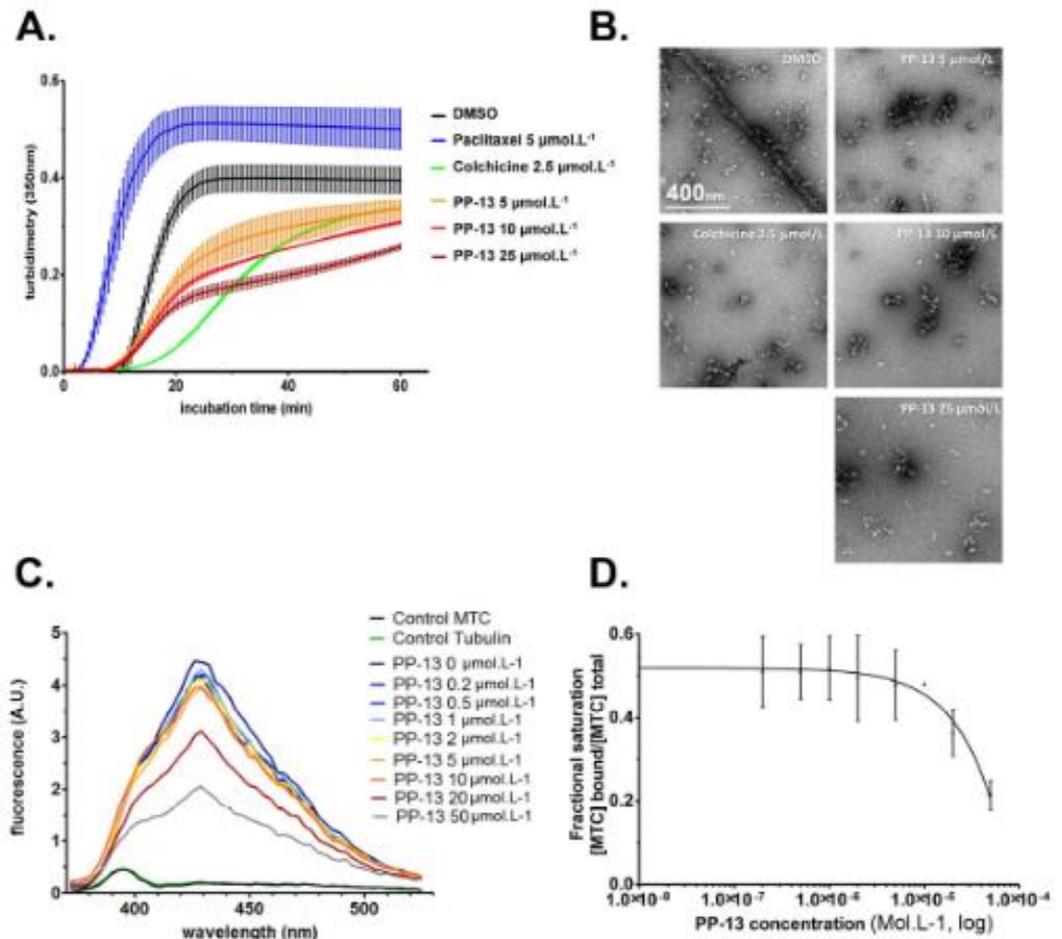


Figure 5. PP-13 is a microtubule-depolymerizing agent that competes with colchicine for tubulin binding. (A) Effect of PP-13 on microtubule dynamics assessed by an *in vitro* tubulin polymerization assay over time. Assembly of pure tubulin ($40 \mu\text{mol.L}^{-1}$) in the presence of increasing concentrations of PP-13 (0 to $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) was followed by turbidimetry at 350 nm. DMSO, paclitaxel ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) and colchicine ($2.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) were used as vehicle control, polymerizing and depolymerizing agents, respectively. Each turbidity value represents the mean \pm SD from 3 independent experiments. Error bars are not shown for the sake of clarity. (B) Representative transmission electron microscopy images showing the polymerization of tubulin ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) in the presence of DMSO, colchicine ($2.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) or increasing concentrations of PP-13 (0 to $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$). (C) Displacement of MTC from the colchicine binding site by PP-13. Fluorescence emission spectra (372–525 nm) of $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ MTC and $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ tubulin in the presence of increasing concentrations of PP-13 (0 to $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) are shown. Each fluorescence intensity value (in arbitrary unit, A.U.) represents the mean from 2 independent assays. Error bars are not shown for the sake of clarity. (D) Displacement isotherm of MTC by PP-13. MTC fractional saturation was calculated based on the concentration of MTC binding sites (0.8 per tubulin dimer) and the MTC binding constant ($4.7 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$).

Discussion

We have isolated a pyrrolopyrimidine derivative (PP-13) that is cytotoxic for several cancer cell lines in the same order of magnitude of concentrations as paclitaxel. MCF7 was the only cell line that resisted to both PP-13 and paclitaxel. One explanation could be the absence of caspase 3 in this cell line²⁶. In addition, PP-13 seemed less toxic than paclitaxel for normal cells. In an attempt to decipher its mechanism of action, we carefully analysed its effect on the cell cycle. We found that PP-13 induced spindle multipolarity, chromosome missegregation and subsequent transient mitotic arrest in prometaphase in H358 NSCLC and HeLa cervical cancer cells. Treated cells displayed supernumerary spindle poles likely because of a loss of spindle pole integrity and premature centriole pair disengagement given the atypical composition of MTOCs (0–2 centrioles per pole). A similar aberrant phenotype following mitotic blockade has been described for cells treated with nocodazole, colcemid or nitrous oxide²⁰. The consequences of PP-13 treatment on the number of mitotic spindles and spindle poles were found to be highly variable according to the cell type. PP-13-treated HeLa cells exhibited 2–4 mitotic spindles and 2–3 MTOCs, whereas PP-13-treated H358 cells displayed more than 5 mitotic spindles. The number of centrosomes of these latter cells appeared, however, normal, as assessed by γ -tubulin staining, which was equivalent to the staining of the DMSO-treated control cells. This could suggest that either the PP-13 molecular targets or mitotic

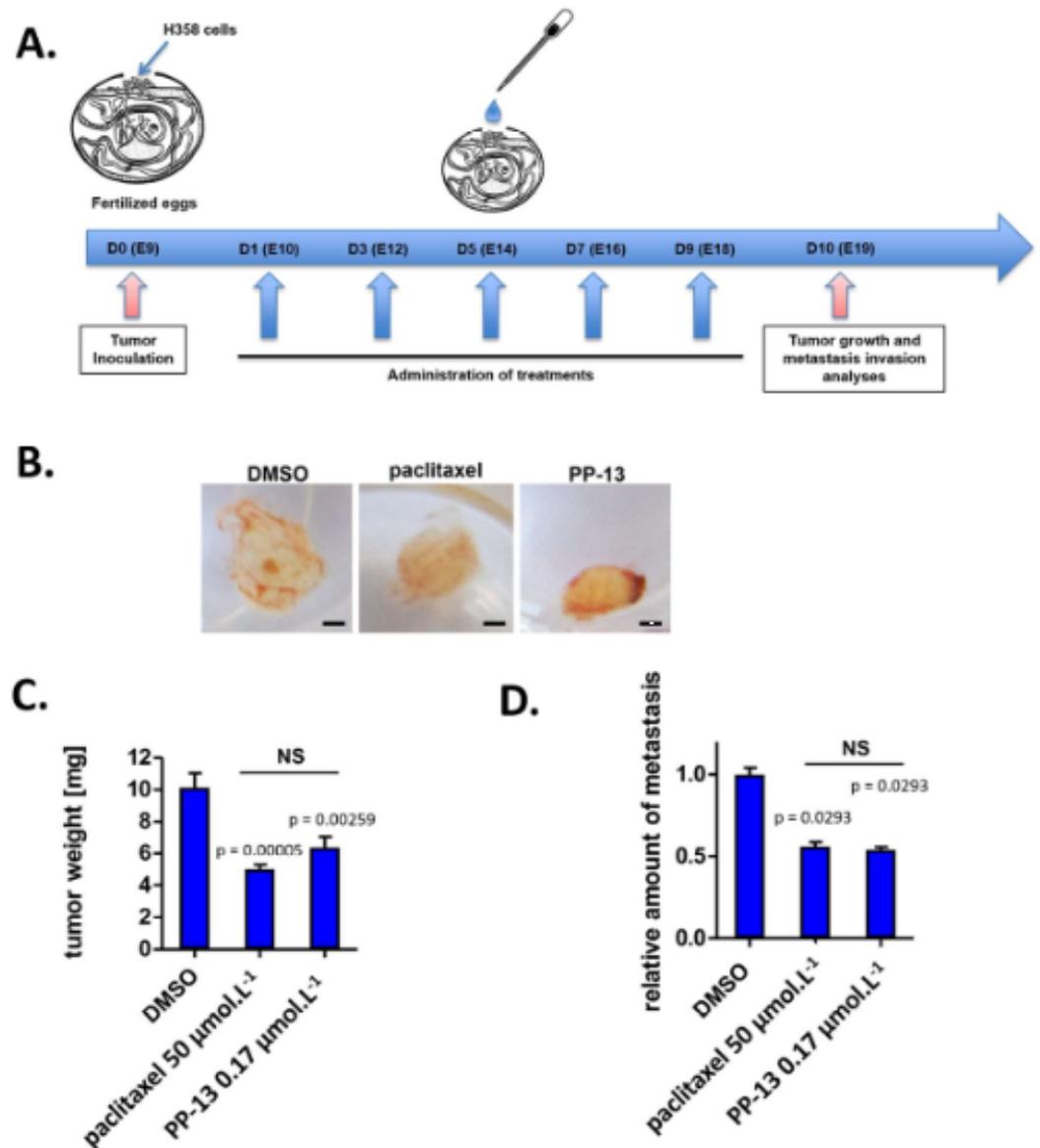


Figure 6. PP-13 inhibits tumour growth and cell dissemination *in vivo*. H358 NSCLC cells were xenografted on a chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). After treatment with vehicle (0.5% DMSO), paclitaxel ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) or PP-13 (170 nmol.L^{-1}), tumours were excised and weighed. (A) Schematic representation of the assay principle. (B) Representatives pictures of tumours at the end of the different treatments. Bar = 1 mm. (C) Effects of treatments on the H358 tumour weight (means \pm SEM of ≥ 16 samples). (D) Effects of treatments on H358 metastasis in the lower CAM (means \pm SEM of 15 samples). The presence of H358 cells in the lower CAM was evaluated by RT-qPCR.

checkpoints differ depending on the cell type. In addition, PP-13 induced an accumulation of polynucleated cells in the G_1 -like stage in HeLa cells and not in H358 cells. These different mitotic phenotypes observed between the different cell types could be explained by their p53 status, as p53 is a well-known sensor of mitotic failure²⁷.

In PP-13-treated cells, spindle multipolarity led to defects in chromosome alignment and spindle-kinetochore attachment. Thus, the lack of tension between the two sister kinetochores did not satisfy the spindle assembly checkpoint (SAC)²⁸. This is most likely the reason for the prolonged mitotic arrest observed in live imaging of HeLa cells expressing the major component of the SAC BubR1. Using time-lapse videomicroscopy, we observed that cells finally exited from prolonged mitotic arrest with various cell fates, as described elsewhere²⁹. We and others^{30,31} believe that the cell type might largely influence the cell outcome. We observed that half of HeLa cells died immediately during mitosis *via* mitotic catastrophe as evidenced by the presence of blebs, chromatin condensation and the release of apoptotic bodies, while the other cells (35%) escaped from the mitotic blockade through asymmetric division generating non-viable aneuploid cells. On the other hand, a large fraction of H358 cells (64%) exited mitosis without cell division (mitotic slippage), then died during interphase or a second mitosis.

Analysis of the effect of PP-13 on the kinetics of *in vitro* pure tubulin assembly indicated that PP-13 is able to inhibit tubulin assembly. This was confirmed by electron microscopy analysis of microtubules treated with PP-13. Competition experiments indicated that PP-13 binds tubulin at the colchicine-binding site, with an apparent binding affinity constant (K_b) of $9.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. The PP-13 K_b value can explain, at least in part, why the effects of PP-13 on microtubule organization are only observed in mitotic cells but not in interphase cells at the IC_{50} . The mass action law predicts that only 1% of PP-13 binds to the available binding sites, since its IC_{50} is 100 times less than its dissociation constant ($1/K_b$). Since tubulin disassembly by colchicinoids is stoichiometric, PP-13 would not induce a visible effect in the polymer mass at IC_{50} concentrations during interphase. Since most neurons mainly remain in interphase, PP-13 could have a reduced possibility of causing neurotoxic side effects because of microtubule destabilization. This remains to be confirmed, but suggested a potential benefit for PP-13 anti-cancer activity, compared to taxanes and vinca-alkaloids that also affect interphase cells^{16,32}. It is worth noting that the only 1% of tubulin bound to PP-13 is sufficient to alter the microtubule dynamics essential for division. This could explain the effects observed in mitotic cells and the activation of the spindle assembly checkpoint. Thus, PP-13 is nontoxic for interphasic cells because of its 10- to 100-fold lower microtubule dynamics compared to that in mitotic cells³³.

In addition, the PP-13 affinity for tubulin is much lower than that described for podophyllotoxin ($K_b = 1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$)³⁴ and colchicine ($K_b = 1.9 \times 10^6$ – $1.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$)³⁵. Such a lower affinity could be a favourable property as K_b has been shown to be correlated with tubulin ligand cytotoxicity²⁵. This suggests that PP-13 could be better tolerated than colchicine and podophyllotoxin whose toxicities (mostly myelosuppression and neurotoxicity) hamper their use as anti-cancer drugs.

Moreover, the K_b of PP-13 is in a range fairly similar to those of other well-known colchicine binding site ligands, such as MTC ($K_b = 4.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)³⁶ and nocodazole ($K_b = 4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)³⁷, indicating that PP-13 probably displays a sufficient affinity towards tubulin for its use as a promising antimetastatic agent. Currently, a large number of tubulin colchicine site-binding agents are undergoing preclinical or clinical development^{16,22,38,39}. However, none of these agents display the same pyrrolopyrimidin scaffold as PP-13 that makes this compound an attractive candidate for further pre-clinical investigations.

It is widely known that solid malignancies are prone to develop acquired MDR after conventional chemotherapy treatment, mainly because of overexpression of transmembrane efflux pumps, such as MRP1, MRP2, BCRP and P-glycoprotein⁴⁰. In this context, there is a keen interest to develop therapeutic alternatives with high cytotoxicity against MDR cancer cells. The recent FDA-approval of eribulin mesylate that overcomes the MDR cell phenotype^{41,42} illustrates this effort. In our study, PP-13 was shown to overcome efflux-mediated chemoresistance and could thus present a strong advantage over vinca-alkaloids that are actively effluxed by MRP1 and P-glycoprotein transporters or over taxanes that are exported by P-glycoprotein and MRP2¹⁶.

To confirm the PP-13 anticancer effects *in vivo* that were observed *in vitro*, we used the model of tumour xenografts in the chorioallantoic membrane of living chick embryos. Such *in ovo* experiments are accepted as potential alternatives to mammalian models for the *in vivo* assessment of drug toxicity and pharmacokinetics⁴³, especially in the cancerology field, since tumour implantation is facilitated by CAM physiological immunodeficiency^{44–46}. This model also allows for the evaluation of tumour metastatic invasion owing to the intense vascularization of the egg⁴⁵. We showed that PP-13 at a concentration of $0.17 \mu\text{mol.L}^{-1}$ effectively inhibits *in vivo* tumour growth with no detectable toxicity for the growing embryo. PP-13 also significantly reduced tumour cell dissemination *in vivo*, which suggested potential antimetastatic effects.

In summary, we described a pyrrolopyrimidine derivative (PP-13) that inhibited the growth of a wide range of cancer cell types, including targeted therapy-resistant and multidrug-resistant (MDR) cell lines. PP-13 caused prometaphase arrest associated with aberrant multipolar mitotic spindles, microtubule disorganization, and activation of spindle assembly checkpoint proteins. *In vitro* experiments revealed that PP-13 directly inhibits microtubule assembly by targeting the colchicine-binding site in beta tubulin. Finally, PP-13 exerted potent antitumour effects *in vivo* without noticeable toxicity in the chicken embryos. These findings suggest new prospects for PP-13 that could represent a promising alternative to conventional spindle poisons, such as taxanes or vinca-alkaloids in the case of MDR cancer cells.

Methods

Chemical reagents, antibodies and proteins. Molecule PP-13 (purity >95% by liquid chromatography – mass spectrometry) came from the Institut Curie (CNRS chemical library, 2004 version) dissolved in anhydrous dimethyl sulfoxide (DMSO, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and stored in a 10 mmol.L^{-1} stock solution. Paclitaxel, colchicine, formaldehyde, and Hoechst 33342 were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). The anti- α -tubulin and anti-actin antibodies were purchased from Santa Cruz (Clinisciences, Montrouge, France). The anti- γ -tubulin antibody was from Sigma. The anti-phospho-histone H3 and anti-cleaved caspase 3 (Asp¹⁷⁵) antibodies were purchased from Cell Signaling (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). Anti-centrin-2 antibodies were from Merck Millipore (Molsheim, France). Goat anti-mouse Alexa Fluor-488 and anti-rabbit Alexa Fluor-568 secondary antibodies were obtained from Life Technologies (Saint-Aubin, France). The tubulin used in the tubulin polymerization assay was isolated by Ecrins Therapeutics Services from bovine brain as previously described⁴⁷, while the tubulin used in transmission electron microscopy (TEM) and the competition fluorescence assay was isolated from calf brains^{48,49}. The calf brains used to purify the tubulin were a kind donation of Ganadería Fernando Díaz. They come from 6 to 12 months old calves sacrificed at the slaughterhouse Matadero Madrid-Norte S A Pol. Ind. Sur, Autovía Madrid-Burgos, 32,300, 28750 San Agustín del Guadalix, Madrid. These brains were extracted as other parts of the animals at the slaughterhouse following the commercial procedures. Since the brains used were officially approved as meat for human consumption, no further permissions from a comitee were required.

Cell lines. NSCLC (H358, H322, A549, H1975, H1650, H3255, PC9 and H460), other human cancer cell lines from different organs (HCT116, HT29, MCF7, PC3, HeLa, colo829, A375, A7, Skmel-2 NIH3T3, HEK293), human foetal lung fibroblast MRC5 cells, and human keratinocytes HaCat cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), routinely tested and authenticated by the ATCC, and cultured as recommended. HeLa cells expressing mEGFP- α -tubulin and mRFP-H2B were a generous gift from Dr D. Gerlich⁵⁰. HeLa cells expressing GFP-BubR1 were kindly provided by Pr A. Musacchio⁵¹. H358 cells stably expressing RFP-Histone H2B or cell lines overexpressing P-glycoprotein, MRP1, MRP2, or ABCG2 transporter were generated and selected in our laboratories. All cells were mycoplasma-free, cultured at 37 °C in the appropriate medium in a 5% CO₂ humidified atmosphere and used within 6 months after thawing.

Cell proliferation and apoptosis assays. Cell viability was analysed using the MTT assay as previously described⁵². Apoptotic cells with hypodiploid DNA staining were counted in “sub-G₁” peaks using flow cytometry. Cleavage of caspase-3 was also detected by immunoblotting as previously described⁵³.

Cell-cycle analysis. Cells were harvested, fixed in 70% ethanol at 4 °C, incubated with anti-phospho-histone 3 Alexa Fluor 488-labelled antibodies diluted in 1% Foetal Bovine Serum (FBS)/0.25% Triton \times 100/PBS for 1 h at room temperature, before staining with 20 μ g.mL⁻¹ propidium iodide in RNase A/PBS, as previously described⁵⁴. The percentage of cells in the specific cell-cycle phases (G₀/G₁, S, G₂, and M) was determined using an Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France).

Immunofluorescence analyses. Cells were grown on glass coverslips coated with 1 μ g.mL⁻¹ fibronectin, treated for 24 h, fixed and permeabilized with either 4% paraformaldehyde followed by 0.1% Triton \times 100 incubation or with methanol at -20 °C. After washing and saturation with 5% BSA/PBS, cells were incubated for 1 h with primary antibodies (anti- α -tubulin, anti- γ -tubulin, anti-centrin-2 antibodies), washed twice again, and incubated with Alexa Fluor 488 and/or Alexa Fluor 568 secondary antibodies for 45 min at RT. DNA was stained with 20 μ mol.L⁻¹ Hoechst 33342, and coverslips were mounted with fluorescence mounting medium (DAKO, Trappes, France). Fluorescent images were captured using a multiphoton confocal laser-scanning microscope (LSM 510, Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a Plan Aplanachromat 100 \times /1.4 NA oil objective and acquisition software LSM 510. All images are z-stacked.

Time-lapse videomicroscopy. HeLa cells expressing alpha-tubulin-EGFP H2B-mRFP or GFP-BubR1 were seeded on 2-well LabTek slides (Nunc, D. Dutscher, Brumath, France) coated with 1 μ g.mL⁻¹ fibronectin and allowed to grow for 24 h prior to imaging. After treatment, the slide was placed on a 37 °C heated stage (at 5% CO₂) and images were acquired every 3 min by a spinning disk confocal laser microscope (Andromeda iMIC, FEI, Munich, Germany) equipped with a Plan-Apochromat 40 \times /1.4 Oil objective and an EMCCD camera (iXon3897, Andor, Belfast, UK). For each time point, a stack of 15 planes (thickness: 2 μ m) was recorded. Acquisition (LA) and off-line analysis (OA) software programs were used.

Tubulin polymerization assay. The tubulin polymerization assay was performed by Ecrins Therapeutics Services (www.ecrins-therapeutics-services.com). Briefly, a half-area 96-well plate (Greiner Bio-one, Courtaboeuf, France) was charged with pure tubulin (40 μ mol.L⁻¹) in a PIPES-based polymerization buffer (80 mM K-PIPES pH 6.8, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA). After the addition of 1 mmol.L⁻¹ GTP, tubulin assembly was followed at 37 °C in the presence of colchicine, paclitaxel or increasing concentrations of PP-13, by turbidimetry variation at 350 nm every 30sec during 1h (FLUOstar Omega, BMG Labtechnologies). The experiment was performed in triplicate. A negative control contained an equivalent quantity of DMSO as the sample with higher concentration of PP-13 (25 μ mol.L⁻¹). The solubility of the compound in the polymerization buffer was checked prior to the test.

Transmission electron microscopy (TEM). Tubulin assembly was performed in GAB buffer (3.4 mol.L⁻¹ glycerol, 10 mmol.L⁻¹ sodium phosphate (NaPi), 1 mmol.L⁻¹ EGTA, 6 mmol.L⁻¹ MgCl₂, 1 mmol.L⁻¹ GTP, pH 6.7) with 25 μ mol.L⁻¹ of pure tubulin and increasing amounts of PP-13. Samples were fixed with 0.1% glutaraldehyde. Subsequently, the reaction was stopped with 100 mmol.L⁻¹ glycine, and then 4 μ L of a 1/10 dilution in water of the sample was mounted into a carbon-coated 400 mesh copper grid. Samples were counterstained with 2% (w/v) uranyl acetate prior to examination using TEM. Micrographs were obtained using a JEOL 1230 transmission electron microscope at 100 KeV and a 16 megapixel TemCam-F416 camera from TVIPS.

Competition fluorescence assay. The tubulin target site of PP-13 and its associated binding affinity constant (K_b) were determined by competitive assay using a fluorescent colchicine analogue MTC (2-methoxy-5-(2,3,4-trimethoxyphenyl)-2,4,6-cycloheptatrien-1-one) that reversibly binds to the colchicine-binding site^{55,56}. Equal amounts of pure tubulin and MTC (10 μ mol.L⁻¹) were mixed in a phosphate-based buffer (10 mmol.L⁻¹ NaPi, 0.1 mmol.L⁻¹ GTP). After addition of increasing concentrations of PP-13, the displacement of MTC binding to tubulin was measured by fluorescence changes using Fluoromax-2 (Jobin-Yvon SPEX, Longjumeau, France) (excitation wavelength: 350 nm, emission spectra: 372–525 nm). Tubulin and MTC alone served as negative controls for fluorescence normalization. Assuming 0.8 MTC sites per tubulin heterodimer and 4.7 \times 10⁵ M⁻¹ as the MTC binding constant⁵⁶, the PP-13 binding affinity constant was evaluated using the Equigra v5 program²⁵.

In vivo experiments. A chick embryo tumour growth and metastasis assay (InOvation, Grenoble, France) was performed as previously described^{44,57,58}. Briefly, fertilized White Leghorn eggs (SFPA, Hendrix Genetics group, Saint Briec) were incubated at 38 °C with 60% relative humidity for 9 days. According to the French legislation, no ethical approval is needed for scientific experimentations using oviparous embryos (decree n°

2013–118, February 1, 2013; art. R-214–88). The chorioallantoic membrane (CAM) was then dropped, and a 1-cm² window was cut in the eggshell above the CAM (at day 9). H358 cells were harvested by trypsinization, washed with complete medium, and suspended in serum-free medium. A 50 μ L inoculum of 1.10^5 H358 cells was added directly onto the CAM of each egg. Eggs were randomly allocated into 3 groups of 17–19 eggs to get sufficient surviving embryos at the end of the experiments. At day 10, when tumours began to be detectable, eggs were treated every two days for 10 days by dropping 100 μ L of either 50 μ mol.L⁻¹ paclitaxel, 0.17 μ mol.L⁻¹ PP-13 or 0.5% DMSO in PBS (vehicle) onto the tumour. The dropwise addition of a solution onto the large tumour area that depresses the CAM surface was found to be a suitable method, which avoided leakage and dispersion of the compounds. Then, the windows were sealed with cellophane tape and the eggs were returned to the incubator. At day 19, the upper portion of the CAM was removed and transferred to PBS, and the tumours were carefully cut away from normal CAM tissue and weighed. In parallel, a 1-cm² portion of the lower CAM was collected to evaluate the number of H358 cells. To count these cells, genomic DNA was extracted, and qPCR analysis was performed by using primers specific for genomic human Alu/repetitive sequences²⁹. Finally, the toxicity of the treatment was evaluated by scoring the number of dead embryos and looking for morphological or functional abnormalities in surviving embryos (Supplementary Fig. S12).

Statistical analysis. Continuous variables were compared using the non-parametric Mann-Whitney *U*-test or Kruskal-Wallis test. Categorical variables were compared using Fisher's exact test. All analyses were performed using Statview software. Statistical significance was defined as *p* values < 0.05.

Data availability. The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Iams, W. T., Sosman, J. A. & Chandra, S. Novel Targeted Therapies for Metastatic Melanoma. *Cancer J. Sudbury Mass* **23**, 54–58 (2017).
2. Seeber, A. & Gastl, G. Targeted Therapy of Colorectal Cancer. *Oncol. Res. Treat.* **39**, 796–802 (2016).
3. Di Cosimo, S. & Baselga, J. Management of breast cancer with targeted agents: importance of heterogeneity. [corrected]. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**, 139–147 (2010).
4. Crafton, S. M. & Salani, R. Beyond Chemotherapy: An Overview and Review of Targeted Therapy in Cervical Cancer. *Clin. Ther.* **38**, 449–458 (2016).
5. Dholaria, B., Hammond, W., Shreders, A. & Lou, Y. Emerging therapeutic agents for lung cancer. *J. Hematol. Oncol./J. Hematol. Oncol.* **9**, 138 (2016).
6. Maione, P. *et al.* Overcoming resistance to targeted therapies in NSCLC: current approaches and clinical application. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **7**, 263–273 (2015).
7. Wang, L., Wang, H., Song, D., Xu, M. & Liebman, M. New strategies for targeting drug combinations to overcome mutation-driven drug resistance. *Semin. Cancer Biol.* doi:10.1016/j.semcancer.2016.11.002.
8. Olaussen, K. A. & Postel-Vinay, S. Predictors of chemotherapy efficacy in non-small-cell lung cancer: a challenging landscape. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **27**, 2004–2016 (2016).
9. Curtis, S. A., Cohen, J. V. & Kluger, H. M. Evolving Immunotherapy Approaches for Renal Cell Carcinoma. *Curr. Oncol. Rep.* **18**, (2016).
10. Khanna, P., Blais, N., Gaudreau, P.-O. & Corrales-Rodriguez, L. Immunotherapy Comes of Age in Lung Cancer. *Clin. Lung Cancer* **18**, 13–22 (2017).
11. Margolin, K. The Promise of Molecularly Targeted and Immunotherapy for Advanced Melanoma. *Curr. Treat. Options Oncol.* **17**, (2016).
12. Zhao, X. & Subramanian, S. Intrinsic Resistance of Solid Tumors to Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Res.* doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2379 (2017).
13. Ferrara, R. *et al.* Tubulin inhibitors in non-small cell lung cancer: looking back and forward. *Expert Opin. Pharmacother.* **17**, 1113–1129 (2016).
14. Hurbin, A. *et al.* Cooperation of amphiregulin and insulin-like growth factor-1 inhibits Bax- and Bad-mediated apoptosis via a protein kinase C-dependent pathway in non-small cell lung cancer cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 19757–19767 (2005).
15. Hurbin, A., Dubrez, L., Coll, J.-L. & Favrot, M. C. Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1010**, 354–357 (2003).
16. Dumontet, C. & Jordan, M. A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 790–803 (2010).
17. Prudent, R. *et al.* Pharmacological inhibition of LIM kinase stabilizes microtubules and inhibits neoplastic growth. *Cancer Res.* **72**, 4429–4439 (2012).
18. Singh, P., Rathinasamy, K., Mohan, R. & Panda, D. Microtubule assembly dynamics: an attractive target for anticancer drugs. *IUBMB Life* **60**, 368–375 (2008).
19. Meraldi, P. Centrosomes in spindle organization and chromosome segregation: a mechanistic view. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* **24**, 19–34 (2016).
20. Maiato, H. & Logarinho, E. Mitotic spindle multipolarity without centrosome amplification. *Nat. Cell Biol.* **16**, 386–394 (2014).
21. Alfieri, C. *et al.* Molecular basis of APC/C regulation by the spindle assembly checkpoint. *Nature* **536**, 431–436 (2016).
22. Lu, Y., Chen, J., Xiao, M., Li, W. & Miller, D. D. An Overview of Tubulin Inhibitors That Interact with the Colchicine Binding Site. *Pharm. Res.* **29**, 2943–2971 (2012).
23. Andreu, J. M., Gorbunoff, M. J., Lee, J. C. & Timasheff, S. N. Interaction of tubulin with bifunctional colchicine analogues: an equilibrium study. *Biochemistry (Mosc.)* **23**, 1742–1752 (1984).
24. Bane, S., Puett, D., Macdonald, T. L. & Williams, R. C. Binding to tubulin of the colchicine analog 2-methoxy-5-(2', 3', 4'-trimethoxyphenyl)tropone. *Thermodynamic and kinetic aspects. J. Biol. Chem.* **259**, 7391–7398 (1984).
25. Diaz, J. F. & Buey, R. M. Characterizing ligand-microtubule binding by competition methods. *Methods Mol. Med.* **137**, 245–260 (2007).
26. Apoptosis in the absence of caspase 3. *Publ. Online 04 Oct. 2001 Doi10.1038/sjnc.1204815* **20**, (2001).
27. Meek, D. W. The role of p53 in the response to mitotic spindle damage. *Pathol. Biol. (Paris)* **48**, 246–254 (2000).
28. Wang, Y., Jin, F., Higgins, R. & McKnight, K. The current view for the silencing of the spindle assembly checkpoint. *Cell Cycle* **13**, 1694–1701 (2014).
29. Matson, D. R. & Stukenberg, P. T. Spindle Poisons and Cell Fate: A Tale of Two Pathways. *Mol. Interv.* **11**, 141–150 (2011).

30. Gascoigne, K. E. & Taylor, S. S. Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer Cell* **14**, 111–122 (2008).
31. Shi, J. & Mitchison, T. J. Cell death response to anti-mitotic drug treatment in cell culture, mouse tumor model and the clinic. *Endocr. Relat. Cancer*. doi:10.1530/ERC-17-0003 (2017).
32. Ogden, A., Rida, P. C. G., Reid, M. D. & Aneja, R. Interphase microtubules: chief casualties in the war on cancer? *Drug Discov. Today* **19**, 824–829 (2014).
33. Yvon, A. M., Wadsworth, P. & Jordan, M. A. Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Mol. Biol. Cell* **10**, 947–959 (1999).
34. Cortese, F., Bhattacharyya, B. & Wolff, J. Podophyllotoxin as a probe for the colchicine binding site of tubulin. *J. Biol. Chem.* **252**, 1134–1140 (1977).
35. Fernando Díaz, J. & Andreu, J. M. Kinetics of dissociation of the tubulin–colchicine complex. *Complete reaction scheme and comparison to thermodynamic measurements*. *J. Biol. Chem.* **266**, 2890–2896 (1991).
36. Medrano, F. J., Andreu, J. M., Gorbunoff, M. J. & Timasheff, S. N. Roles of ring C oxygens in the binding of colchicine to tubulin. *Biochemistry (Mosc.)* **30**, 3770–3777 (1991).
37. Xu, K., Schwarz, P. M. & Ludueña, R. E. Interaction of nocodazole with tubulin isoforms. *Drug Dev. Res.* **55**, 91–96 (2002).
38. Wang, Y. *et al.* Structures of a diverse set of colchicine binding site inhibitors in complex with tubulin provide a rationale for drug discovery. *FEBS J.* **283**, 102–111 (2016).
39. Massarotti, A., Coluccia, A., Silvestri, R., Sorba, G. & Brancale, A. The Tubulin Colchicine Domain: a Molecular Modeling Perspective. *ChemMedChem* **7**, 33–42 (2012).
40. Chen, Z. *et al.* Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett.* **370**, 153–164 (2016).
41. Osgood, C. L. *et al.* FDA Approval Summary: Eribulin for Patients with Unresectable or Metastatic Liposarcoma who have Received a Prior Anthracycline-Containing Regimen. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2422 (2017).
42. Aseyev, O., Ribeiro, J. M. & Cardoso, F. Review on the clinical use of eribulin mesylate for the treatment of breast cancer. *Expert Opin. Pharmacother.* **17**, 589–600 (2016).
43. Vargas, A., Zeisser-Labouébe, M., Lange, N., Gurny, R. & Delic, E. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the *in vivo* evaluation of drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 1162–1176 (2007).
44. Prudent, R. *et al.* Azaindole derivatives are inhibitors of microtubule dynamics, with anti-cancer and anti-angiogenic activities: Anti-angiogenic inhibitors of microtubule dynamics. *Br. J. Pharmacol.* **168**, 673–685 (2013).
45. Ribatti, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reprod. Toxicol. Elmsford N.* doi:10.1016/j.reprotox.2016.11.004 (2016).
46. Li, M. *et al.* The In Ovo Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay as an Efficient Xenograft Model of Hepatocellular Carcinoma. *J. Vis. Exp. JoVE*. doi:10.3791/52411 (2015).
47. Castoldi, M. & Popov, A. V. Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization–depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expr. Purif.* **32**, 83–88 (2003).
48. Andreu, J. M. Large scale purification of brain tubulin with the modified Weisenberg procedure. *Methods Mol. Med.* **137**, 17–28 (2007).
49. Díaz, J. F. & Andreu, J. M. Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: reversibility, ligand stoichiometry, and competition. *Biochemistry (Mosc.)* **32**, 2747–2755 (1993).
50. Steigemann, P. *et al.* Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell* **136**, 473–484 (2009).
51. Overlack, K. *et al.* A molecular basis for the differential roles of Bub1 and BubR1 in the spindle assembly checkpoint. *eLife* **4**, e05269 (2015).
52. Jeannot, V. *et al.* Synergistic activity of vorinostat combined with gefitinib but not with sorafenib in mutant KRAS human non-small cell lung cancers and hepatocarcinoma. *Oncotargets Ther.* **9**, 6843–6855 (2016).
53. Busser, B. *et al.* Amphiregulin promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in non-small-cell lung cancers. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **18**, 528–535 (2010).
54. Vignon, C. *et al.* Flow cytometric quantification of all phases of the cell cycle and apoptosis in a two-color fluorescence plot. *PLoS One* **8**, e68425 (2013).
55. Alejandro-García, T. *et al.* Cytotoxic Activity and Chemical Composition of the Root Extract from the Mexican Species *Linum scaberrimum*: Mechanism of Action of the Active Compound 6-Methoxypodophyllotoxin. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* **2015**, 298463 (2015).
56. La Regina, G. *et al.* Arylthioindole inhibitors of tubulin polymerization. 3. Biological evaluation, structure-activity relationships and molecular modeling studies. *J. Med. Chem.* **50**, 2865–2874 (2007).
57. El Hasasna, H. *et al.* *Rhus coriaria* suppresses angiogenesis, metastasis and tumor growth of breast cancer through inhibition of STAT3, NF- κ B and nitric oxide pathways. *Sci. Rep.* **6**, 21144 (2016).
58. Mikaelian, I. *et al.* Genetic and pharmacologic inhibition of mTORC1 promotes EMT by a TGF- β -independent mechanism. *Cancer Res.* **73**, 6621–6631 (2013).
59. Zijlstra, A. *et al.* A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction. *Cancer Res.* **62**, 7083–7092 (2002).
60. Jordan, M. A., Toso, R. J., Thrower, D. & Wilson, L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9552–9556 (1993).

Acknowledgements

This work was supported by the Institut Curie, the CNRS, the INSERM, and by grants from La Fondation de France, La Ligue contre le Cancer (comité de l'Isère), Cancéropôle CLARA (Lyon Auvergne Rhône-Alpes), and BFU2016–75319-R (AEI/FEDER, UE) from Ministerio de Economía y Competitividad (JFD). The authors acknowledge networking contribution by the COST Action CM1407 “Challenging organic syntheses inspired by nature - from natural products chemistry to drug discovery”. We kindly thank Dr. D. Gerlich and Pr A. Musacchio for generously providing HeLa cells expressing mEGFP- α -tubulin and mRFP-H2B and HeLa cells expressing GFP-BubR1 respectively. We also acknowledge with much gratitude Lauralie Perrone for help with IC₅₀, Francisco de Asis Balaguer for help with TEM studies and Dr I. Arnal for critical evaluation of the data.

Author Contributions

P.G., B.B., and A.H. conceived the project, designed the experiments, and interpreted the data. P.G., F.J.P., L.V., A.M., P.F., L.L., V.F., J.L.C., J.F.D. were involved in acquisition, analysis and interpretation of the data. J.F.D. designed the experiments of figure 5. C.B., D.N.M. and F.M.B. synthesized and characterized PP-13. J.L.C.,

B.B. and A.H. supervised research and analyses. P.G., B.B. and A.H. supervised the whole project and wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-09491-9

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

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

© The Author(s)

Uncorrected proof

Identification of pyrrolopyrimidine derivative PP-13 as a novel microtubule-destabilizing agent with promising anticancer properties

Pauline Gilson^{1,2}, Fernando Josa-Prado³, Claire Beauvineau⁴, Delphine Naud-Martin⁴, Laetitia Vanwonderghem¹, Florence Mahuteau-Betzer⁴, Alexis Moreno⁵, Pierre Falson⁵, Laurence Lafanechère¹, Véronique Frachet^{1,6}, Jean-Luc Coll¹, Jose Fernando Díaz³, Amandine Hurbin^{1*§}, Benoit Busser^{1,2§}

Supplementary information

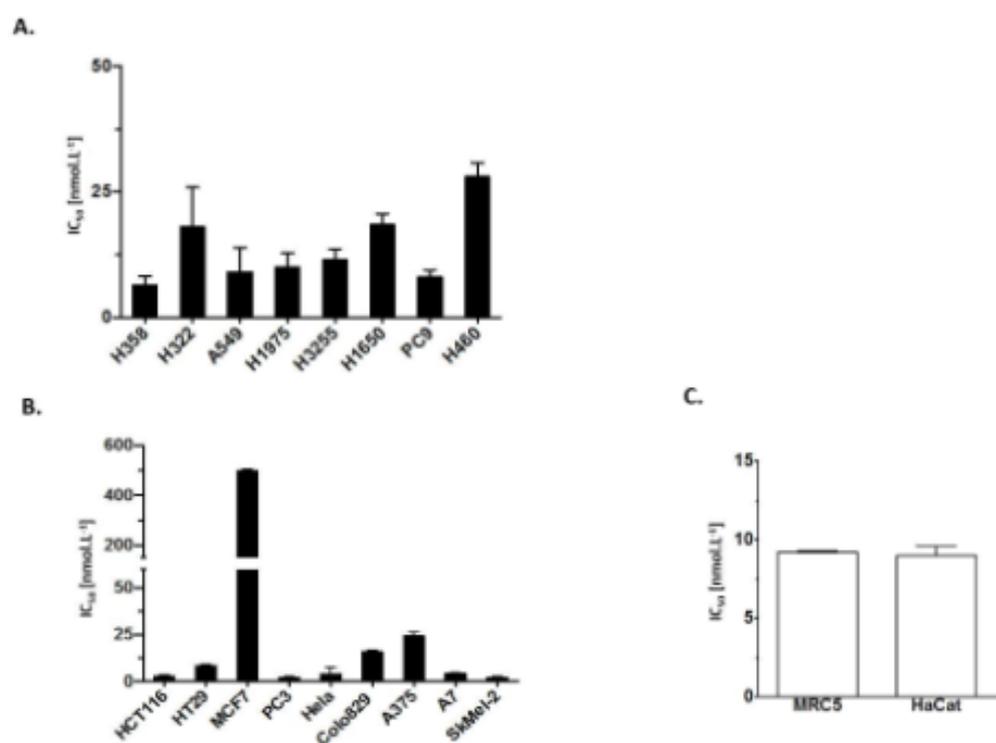
Supplementary figure S1

Genotypic features of NSCLC cell lines:

Amino acid mutation is indicated. WT: wild-type, EGFR-TKI: EGFR tyrosine kinase inhibitor, p.?: not defined.

cell line	gene	TP53	KRAS	EGFR	others
A549		WT	Mutant G12S	WT	
H460		WT	Mutant Q61H	WT	
H1650		Mutant p.?	WT	Mutant delE746_A750 (exon 19)	PTEN loss conferring resistance to EGFR-TKI
H1975		Mutant R273H	WT	Mutant: L858R (exon 21), T790M (exon 20) conferring resistance to EGFR-TKI	
H358		P53 deleted	Mutant G12C	WT	
PC9		Mutant R248Q	WT	Mutant delE746–A750 (exon 19)	
H3255		Mutant p.?	WT	Mutant L858R (exon 21)	
H322		Mutant R248L	WT	WT	

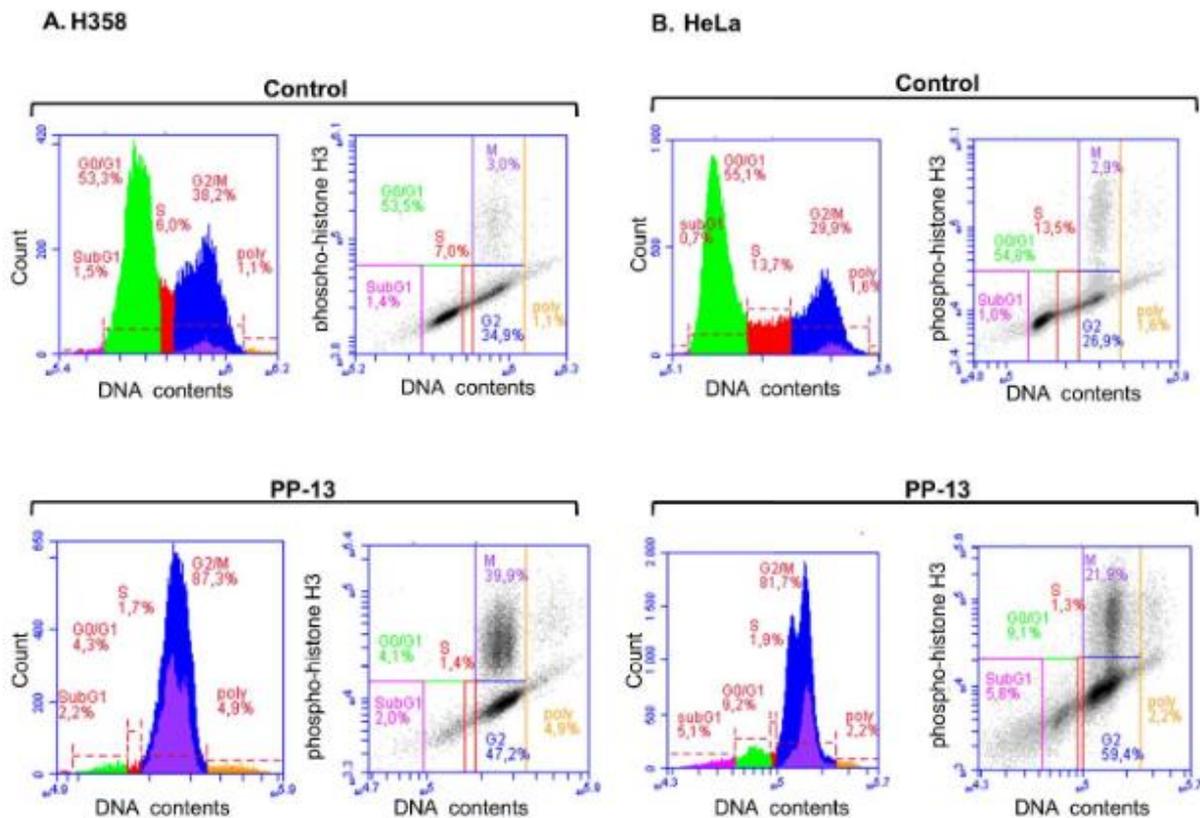
Supplementary figure S2



Paclitaxel inhibited the proliferation of human cancer cell lines.

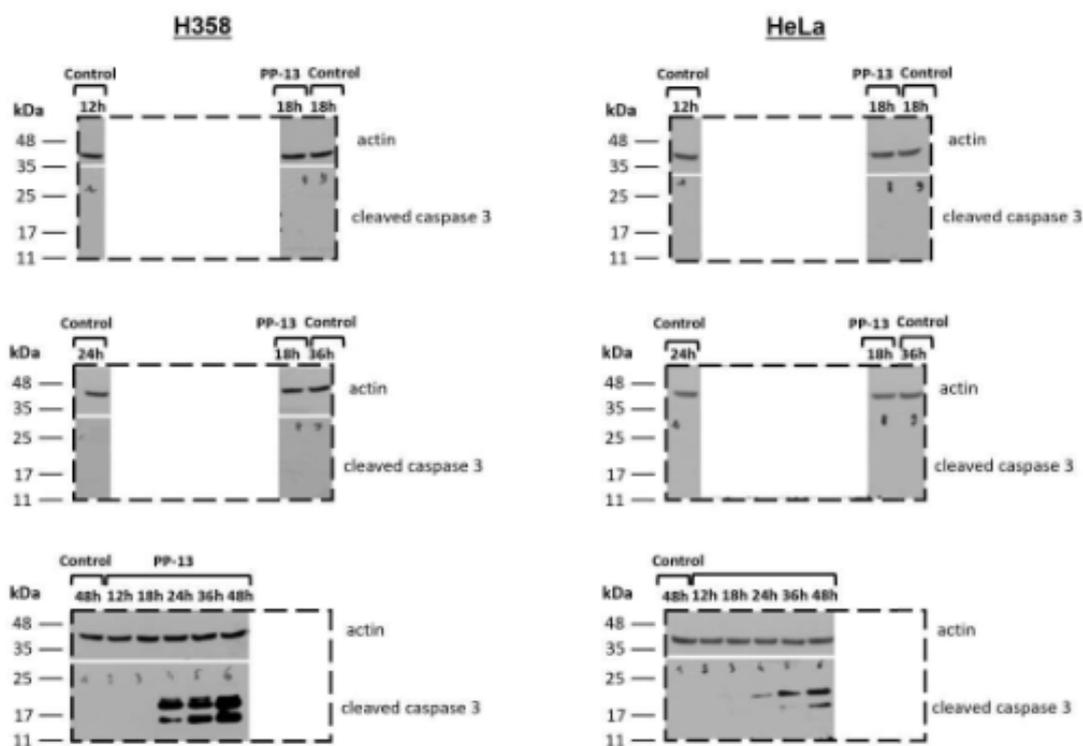
Paclitaxel concentrations required to inhibit cell growth by 50% (IC₅₀) at 72 h were determined by MTT assays in NSCLC cells (A.), in other representative cancer cell lines from various origins (B.), and in human fetal lung fibroblast MRC5 cells and in human keratinocyte HaCat cells (C.). Data represent the mean \pm SD of three independent experiments (in nmol.L⁻¹).

Supplementary figure S3



PP-13 interferes with mitotic progression of H358 and HeLa cells. H358 (A.) and HeLa (B.) cells were treated with PP-13 at 170 or 120 nmol.L⁻¹ respectively for 18 h. The percentage of cells in each phase of the cell-cycle was determined by flow cytometry. Representative histograms of ≥ 3 independent experiments show the repartition of cells in the different cell-cycle phases considering the DNA content. Associated dot plots show cell distribution according to phospho-histone H3 signal and DNA contents. Phosphorylated-histone H3 is used as a late G2/mitosis-specific marker. Propidium iodide estimates the cell DNA content.

Supplementary figure S4

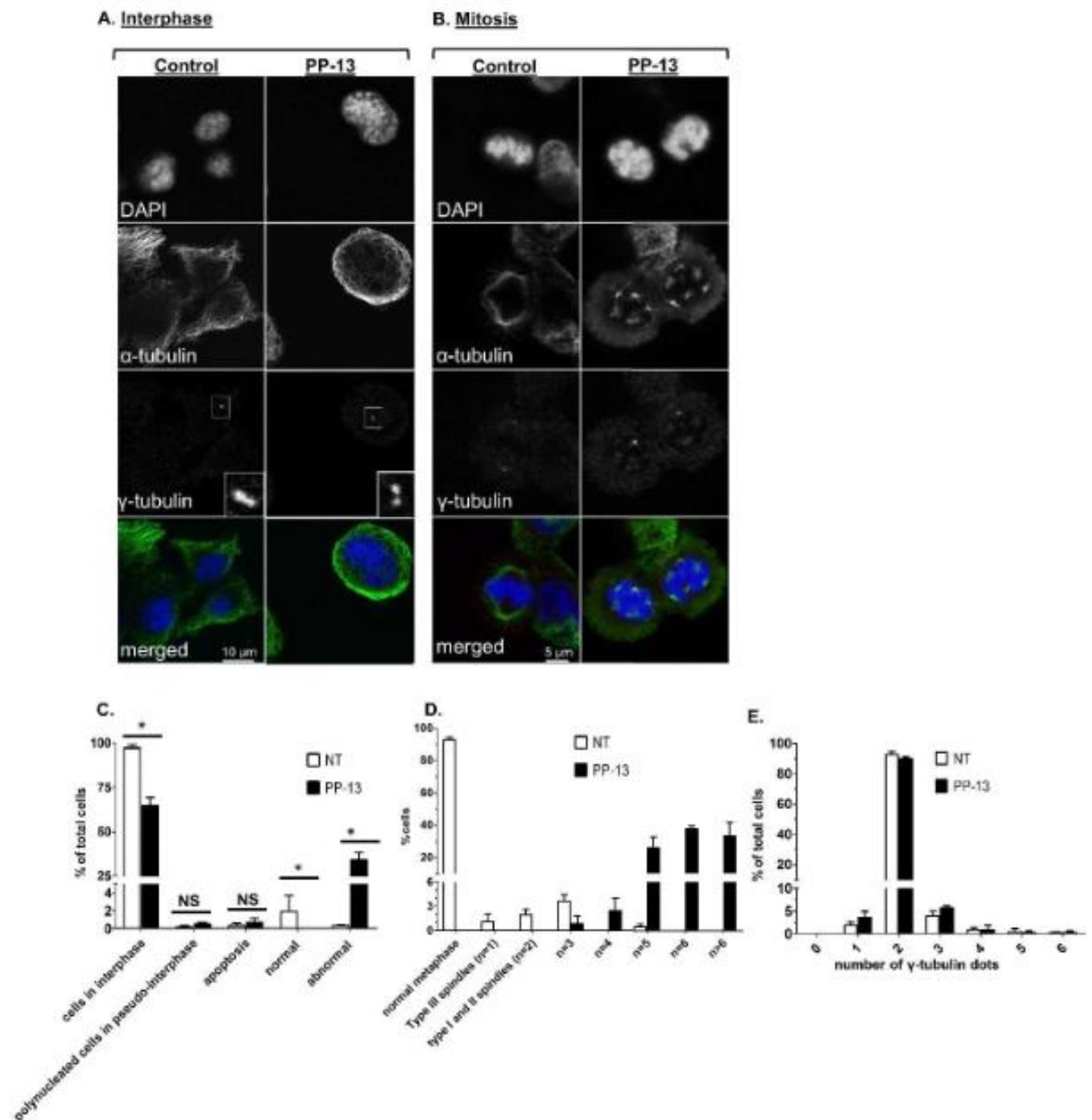


PP-13 strongly induced the cleavage of caspase-3 in both H358 and HeLa cells.

Cleavage of caspase 3 was evaluated by western blotting. Actin was used as a loading control.

Full-length blots are presented. Only conditions presented in results are shown.

Supplementary figure S5



PP-13 interferes with mitotic spindle architecture and centrosome formation in H358 cells. H358 cells were treated or not with 170 nmol.L^{-1} PP-13 for 24h. **A-B.** Representative confocal microscopy images of microtubules and centrosomes in cells in interphase (**A.**) or in mitosis (**B.**). In green: α -tubulin, in red: γ -tubulin, in blue: DNA staining with DAPI. Insets represent a zoom of the boxed area. **C.** Quantification of interphase, mitotic, apoptotic and polynucleated cells. Results for 300 cells randomly chosen and assigned. *, $p < 0.05$. NS, not significant. **D-E.** Quantification of mitotic spindles (**D.**) and γ -tubulin dots (**E.**) per mitotic cell. At least 100 mitotic cells were randomly chosen and scored in each condition. Mitotic spindles were classified according to a well-established nomenclature (Jordan et al., 1993): type I and II spindles are bipolar ($n=2$) with at least one uncongressed chromosomes, type III spindles are monopolar ($n=1$), and multipolar spindles present more than two poles ($n > 2$). n : number of mitotic spindles.

Supplementary Figure S6

The cell division process in control cells.

The cell division process of non-treated α -tubulin-EGFP H2B-RFP HeLa cells was followed over time with time-lapse videomicroscopy. Time-lapse interval was set to 3 minutes. Control cells undergoing mitosis exhibit typical features of the different cell-cycle phases: interphase, prophase, metaphase, anaphase I, anaphase II, cytokinesis, interphase. In red: H2B-RFP, in green: α -tubulin-EGFP.

Supplementary Figure S7

Following cell prometaphase arrest, a fraction of PP-13-treated cells undergo mitotic catastrophe. α -tubulin-EGFP H2B-RFP HeLa cells were treated with 120 nmol.L⁻¹ PP-13, and cells were followed over time with time-lapse videomicroscopy. Time-lapse interval was set to 3 minutes. Under PP-13 treatment, some cells directly undergo apoptosis following mitotic blockade. In red: H2B-RFP, in green: α -tubulin-EGFP.

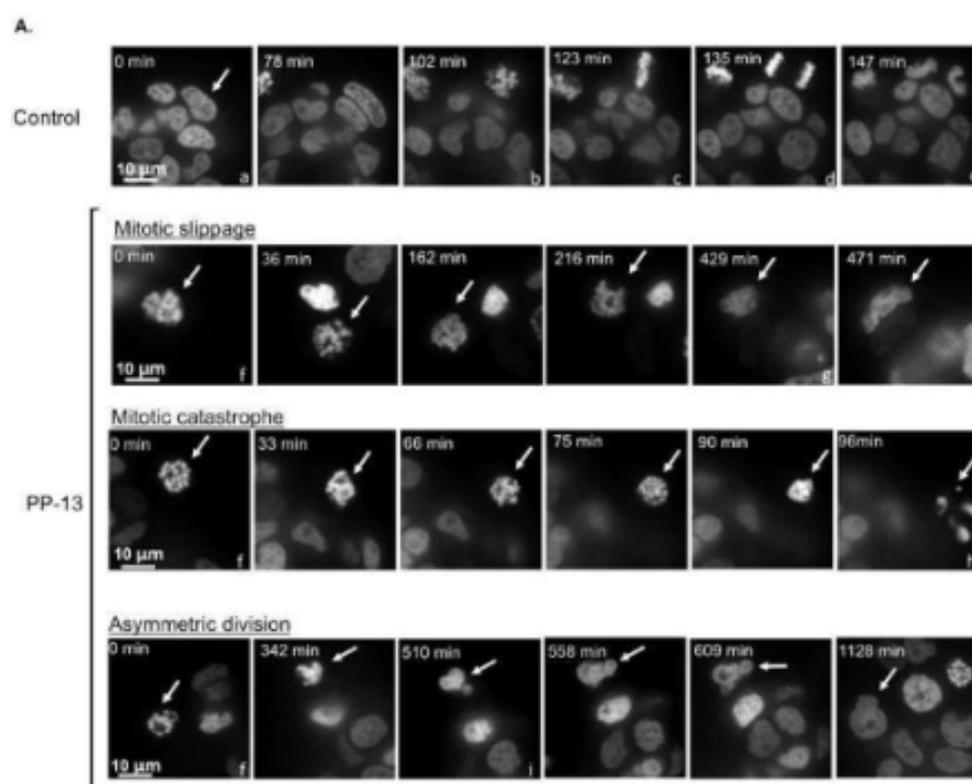
Supplementary Figure S8

Following cell prometaphase arrest, a fraction of PP-13-treated cells undergo asymmetric division. α -tubulin-EGFP H2B-RFP HeLa cells were treated with 120 nmol.L⁻¹ PP-13, and cells were followed over time with time-lapse videomicroscopy. Time-lapse interval was set to 3 minutes. Under PP-13 treatment, the fate of mitotically-arrested cells was various. Some cells initiated aberrant cytokinesis with asymmetric division leading to the generation of non-viable polynucleated cells. In red: H2B-RFP, in green: α -tubulin-EGFP.

Supplementary Figure S9

Under PP-13 treatment, generated polyploid cells undergo apoptosis or moved forward into mitosis. α -tubulin-EGFP H2B-RFP HeLa cells were treated with 120 nmol.L⁻¹ PP-13, and cells were followed over time with time-lapse videomicroscopy. Time-lapse interval was set to 3 minutes. In some cases, polynucleated cells generated from asymmetric division can initiate a second cell division process before undergoing apoptosis. In red: H2B-RFP, in green: α -tubulin-EGFP.

Supplementary figure S10



B.

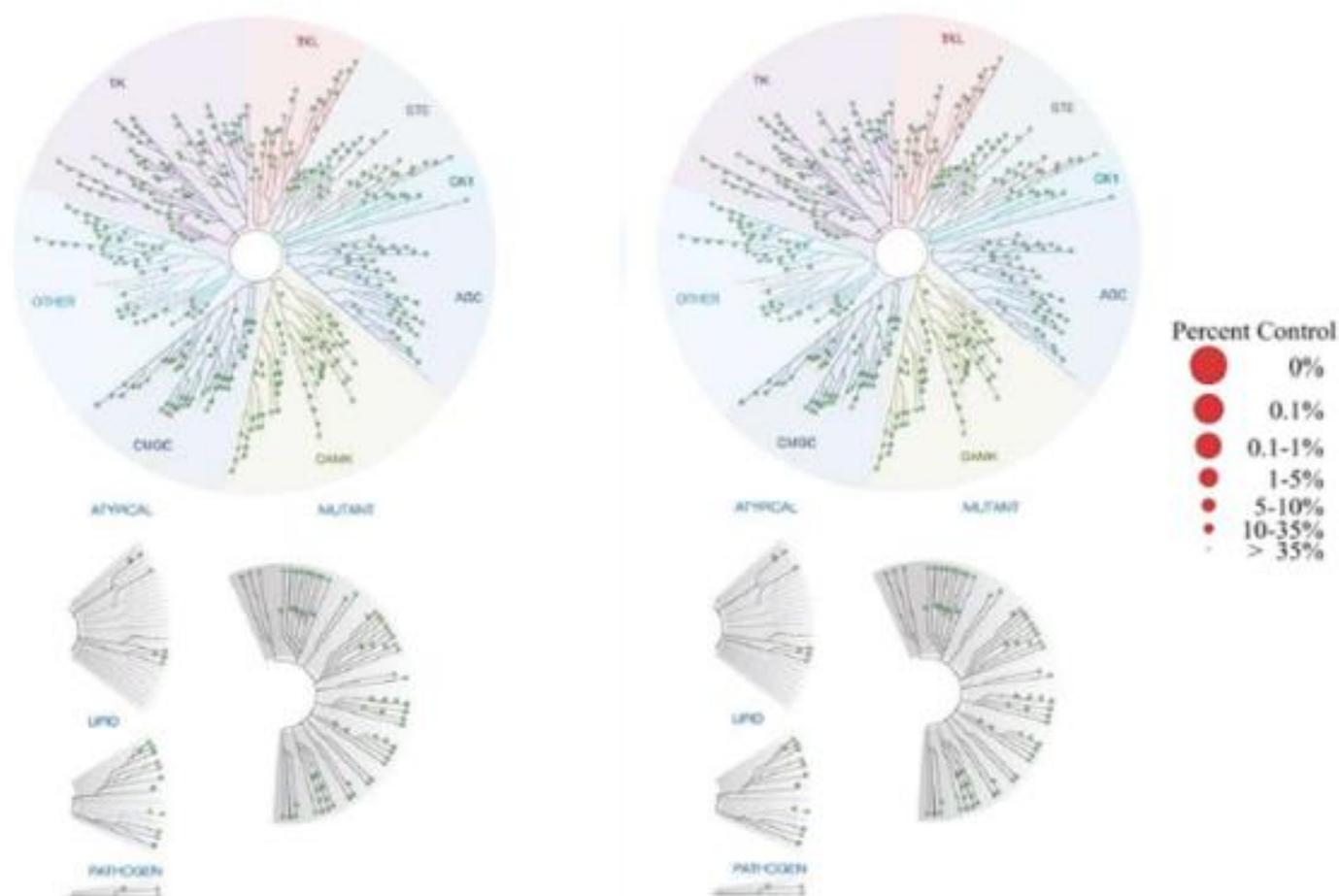
Death in mitosis	12 %
Asymmetric division	24 %
Mitotic slippage	64 %

PP-13 blocks H358 cells in prometaphase following mitotic slippage or direct apoptotic death. H2B-RFP H358 cells were treated or not with 170 nmol.L-1. PP-13 and cell division process was followed over the time using time-lapse videomicroscopy. **A.** Representative pictures from time-lapse videomicroscopy experiment are shown. In white: H2B-RFP. Control cells undergoing mitosis exhibit typical features of the different cell-cycle phases: a. interphase. b. prophase. c. metaphase. d. anaphase II; e. interphase. PP-13 induces cell prometaphase arrest (f), then mitotic slippage (g), direct apoptotic death (h) or asymmetric division (i). White arrows show the cell of interest. Time is indicated on each picture (in minutes). **B.** Percentages of different cell fate induced by PP-13 treatment were estimated by time-lapse videomicroscopy, after following 25 treated H2B-RFP H358 cells over time.

Supplementary figure S11

A. PP-13 (1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$)

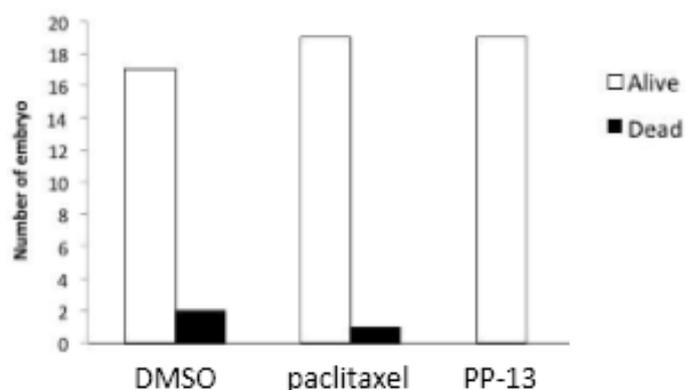
B. PP-13 (10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$)



PP-13 is not a kinase inhibitor. Interactions between PP-13 and more than 450 human kinases and disease relevant mutant variants were evaluated by a kinome array (KINOMEscan screening platform, LeadHunter™ Discovery Services, DiscoverX Corp., Fremont, United States), as previously described (Fabian et al., Nature Biotechnology 2005). PP-13 was screened at 1 (A.) and 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (B.). Red dots show significant kinase inhibition. The percentage represent the resultant kinases activity in presence of PP-13 compared to the negative control.

Supplementary figure S12: PP-13 does not induce noticeable toxicity in chicken embryos.

A. Number of dead and surviving embryo for the different experimental groups after 10 days of treatments



B. Twenty-two checkpoints were probed on chicken embryos to evaluate toxicity:

Analyzed part of the embryos	checkpoints
Head	size, closure, eyes, ear, face and branchial arc derivatives, mobility
Body	size, axis deformation, ventral and dorsal closures, caudal formation, sexual area
Limbs	size, axis morphology, mobility
Skin	appendage formation, attachment, blood vessel
Extra-embryonic structures	vascularization, transparency, attachment, blood vessel

C. Number of abnormality observed on surviving embryos after 10 days of treatment:

	Head	Body	limbs	Skin	Extra Emb.
DMSO	0	0	0	0	0
Paclitaxel	0	0	0	0	0
PP-13	0	0	0	0	0

0 = no abnormality

3.2.1.4 Conclusions

Dans le cadre de cette étude, nous avons identifié un nouvel agent ciblant les microtubules, PP-13, ayant une bonne efficacité anti-tumorale et sans effet toxique notable sur l'embryon. Nos résultats suggèrent que PP-13 pourrait représenter un candidat-médicament intéressant pour le traitement des cancers résistants, et principalement ceux devenus chimiorésistants par acquisition d'un phénotype MDR.

3.2.2 Résultats complémentaires : Caractérisation biologique et biochimique de PP-2

Dans cette partie, nous détaillons les résultats *in vitro* concernant la molécule PP-2 ou N-benzyl-6-méthyl-7-(thiophen-2-ylmethyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (Figure 43). Tout d'abord, l'efficacité anticancéreuse et la toxicité de PP-2 ont été déterminées *in vitro* dans différentes lignées de CBNPC et d'autres lignées cancéreuses humaines ainsi que dans des lignées normales. Puis, nous avons établi le mécanisme d'action de PP-2 au niveau subcellulaire, ainsi que sa cible thérapeutique.

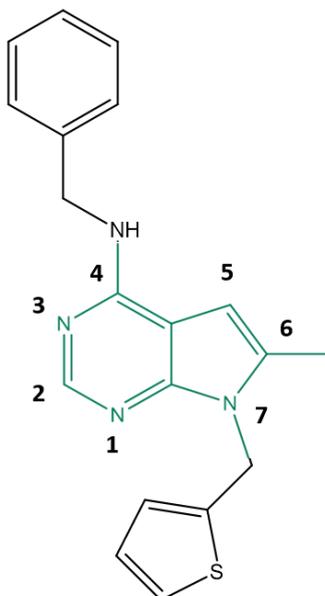


Figure 43. Structure chimique de la molécule PP-2 ou: N-benzyl-6-méthyl-7-(thiophen-2-ylmethyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine.

3.2.2.1 Efficacité anticancéreuse et toxicité de PP-2 *in vitro*

De la même manière que pour PP-13, nous avons déterminé par des tests MTT l'effet de PP-2 sur la prolifération de diverses lignées cancéreuses humaines. En réalisant des gammes de concentration, nous avons pu établir la concentration minimale de PP-2 capable de réduire de 50 % la croissance cellulaire ou IC₅₀ (inhibitory concentration 50). On observe que l'IC₅₀ de PP-2 est de l'ordre du micromolaire pour toutes les lignées de CBNPC avec des IC₅₀ variant de 0.9 à 1.6 $\mu\text{mol/L}$ (Figure 44 A.). L'activité cytotoxique de PP-2 est indépendante du statut mutationnel *KRAS*, *EGFR* et *p53* et de la réponse aux thérapies anti-EGFR. L'IC₅₀ de PP-2 est sensiblement du même ordre de grandeur dans d'autres lignées cancéreuses humaines (avec des IC₅₀ allant de 0.6 $\mu\text{mol/L}$ pour la lignée de cancer du côlon HCT116 à 2.2 $\mu\text{mol/L}$ pour la lignée de mélanome colo829) (Figure 44 B.). De même, on observe un effet cytotoxique similaire sur les lignées normales de fibroblastes pulmonaires humains (MRC5) et de kératinocytes (HaCat) avec des IC₅₀ de 1.5 et 1.7 $\mu\text{mol/L}$ respectivement (Figure 44 C.). L'ensemble de ces résultats suggèrent que PP-2 a une activité non-sélective tout comme PP-13. Néanmoins, PP-2 est moins efficace que PP-13 puisqu'elle présente des IC₅₀ en moyenne 10 fois plus élevées que les IC₅₀ obtenus pour PP-13.

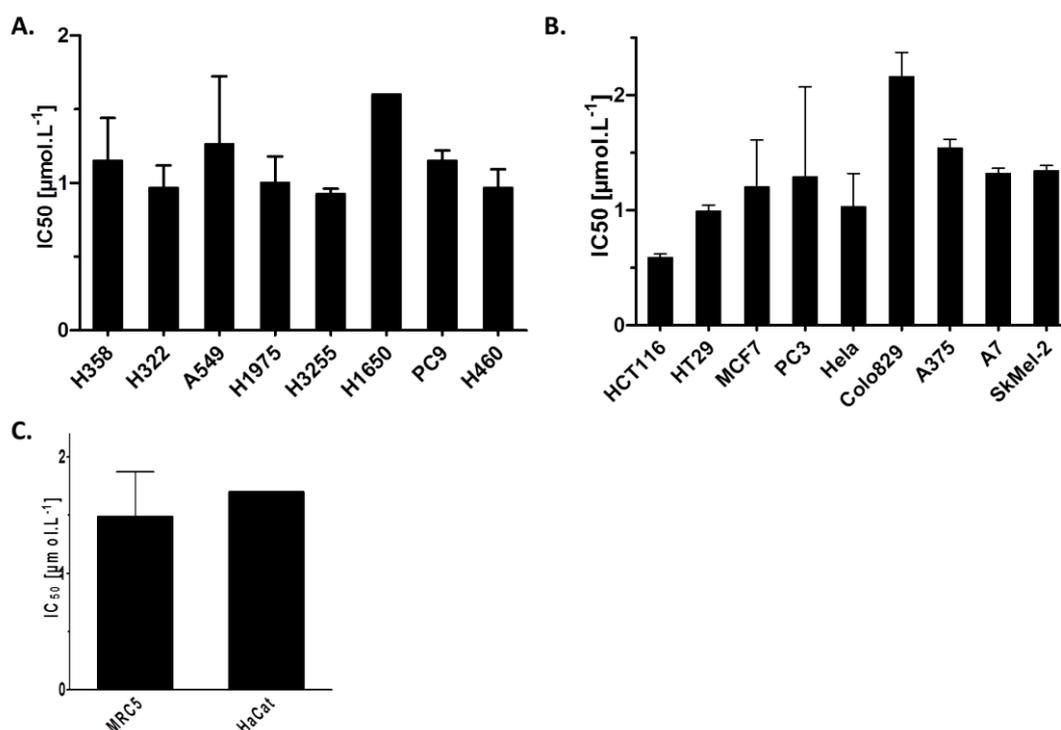


Figure 44. PP-2 inhibe la prolifération cellulaire d'un large panel de lignées cancéreuses humaines. Les concentrations de PP-2 nécessaires pour inhiber la croissance cellulaire de 50 % (IC₅₀) après 72h de traitement ont été déterminées par des tests MTT dans différents modèles cellulaires de CBNPC (A.), de cancers d'autres origines (B.) et dans des lignées normales de fibroblastes pulmonaires humains et de kératinocytes (C.).

3.2.2.2 Mécanisme d'action de PP-2

Par analyse du cycle cellulaire en cytométrie de flux, nous observons que PP-2 perturbe la progression du cycle cellulaire des cellules H358 et HeLa (Figure 45 A.). A l'IC₅₀, PP-2 induit un blocage transitoire des cellules en mitose entre 12 et 24h selon la lignée cellulaire étudiée (Figure 45 B.). A partir de 24 à 36h, tandis que le nombre de cellules en mitose décroît, le nombre de cellules en apoptose (en phase subG₁) augmente progressivement (Figure 45 B.). L'effet de PP-2 sur le cycle cellulaire semble plus modéré que celui de PP-13 au vu des pourcentages maximum de cellules bloquées en mitose et en phase subG₁ (Figure 45 C.).

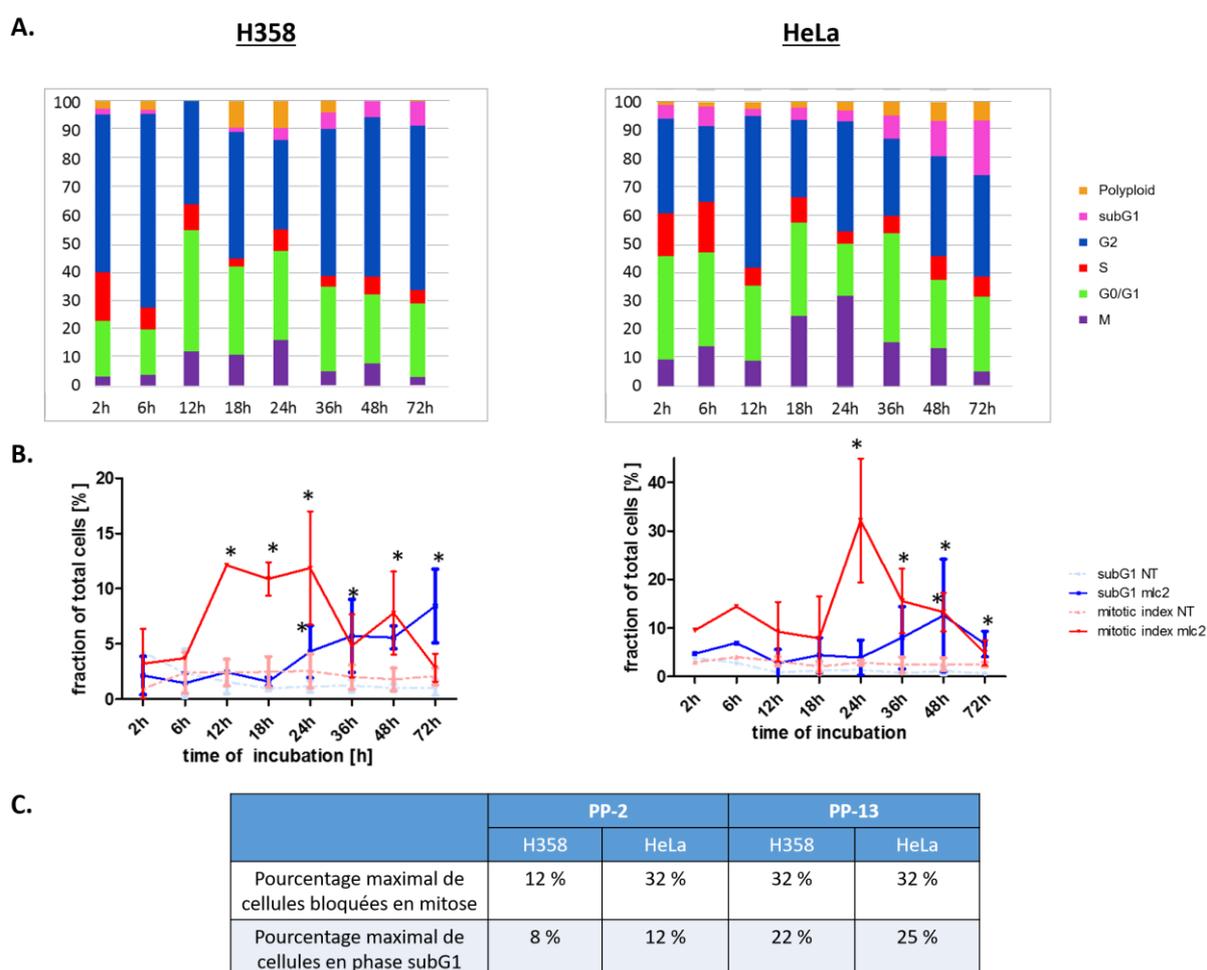


Figure 45. PP-2 interfère avec la progression du cycle cellulaire. La distribution dans le cycle cellulaire des cellules H358 et HeLa après traitement ou non par PP-2 (à l'IC₅₀) a été déterminée par cytométrie de flux. A. Histogrammes représentant le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle. B. Pourcentages de cellules en mitose (index mitotique) et en apoptose après différents temps de traitement. C. Evaluation par Western Blot de l'apoptose dépendante de la caspase 3 clivée après traitement.

Les effets subcellulaires de PP-2 sur le réseau microtubulaire après 24h de traitement ont été observés par immunofluorescence. Comme pour la molécule PP-13, PP-2 n'induit pas d'altération des microtubules dans les cellules en interphase (Figure 46 A.) tandis que dans les cellules en mitose, les cellules contrôles et traitées ont des profils très différents. Les cellules mitotiques traitées par PP-2 ont des fuseaux de microtubules en nombre souvent anormal (3 fuseaux dans 35 % des cellules en mitose), organisés en « touffes denses » et malorientés. Il en résulte une congession anormale des chromosomes à l'origine d'un blocage cellulaire en prométaphase (Figure 46 A. et C.). Au-delà d'une désorganisation des fuseaux microtubulaires, PP-2 induit, comme PP-13, une perte d'intégrité des centres organisateurs des microtubules (COMT) à l'origine d'un nombre supernuméraire de ces COMT composés d'un nombre très variable de centrioles (0-3 selon les COMT) (Figure 46 D.).

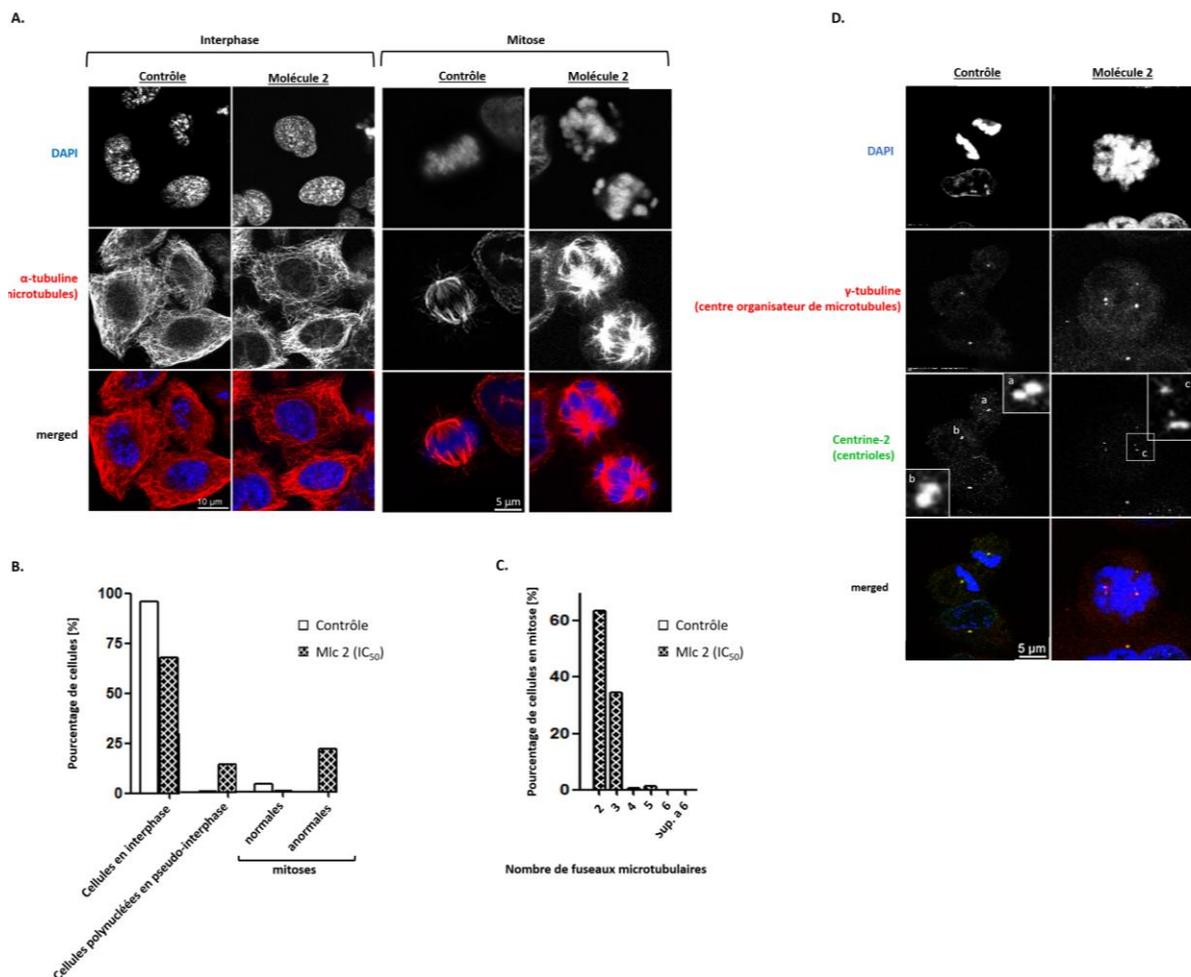


Figure 46. PP-2 perturbe l'organisation des fuseaux mitotiques et des centres organisateurs de microtubules. Les cellules HeLa sont traitées ou non pendant 24h par PP-2 (à l'IC₅₀) et sont analysées par immunofluorescence. A. Images de microscopie confocale montrant l'organisation des microtubules dans les cellules HeLa en interphase et en mitose. B. Quantification du nombre de cellules en interphase, en mitose et à l'état polynuclé. C. Quantification du nombre de fuseaux microtubulaires dans les cellules en mitose. D. Images de microscopie confocale présentant le nombre de centres organisateurs de microtubules dans les cellules et leur composition.

La perturbation de l'organisation des microtubules résulte généralement d'une perte de la dynamique de polymérisation/dépolymérisation des microtubules. Dans ce contexte, nous avons évalué l'effet de PP-2 sur la polymérisation de la tubuline en système acellulaire. PP-2 induit une dépolymérisation des microtubules de façon dose-dépendante comme l'atteste la baisse du taux de microtubules total et la réduction de la vitesse de polymérisation (calculée à partir de la pente de la courbe) par rapport au contrôle. Pour une même concentration (10 $\mu\text{mol/L}$), PP-2 et PP-13 dépolymérisent un tiers et la moitié des microtubules totaux respectivement, ce qui suggère que PP-2 a un effet dépolymérisant plus restreint que PP-13 (Figure 47 **A.**). Par ailleurs, un test d'interaction par compétition a établi que PP-2 se lie à la tubuline sur le même site de liaison de la colchicine que PP-13, selon une constante d'affinité d'environ $3.8 \cdot 10^{-4}$ M soit avec une affinité environ 2.5 fois plus faible que PP-13 (Figure 47 **B.**).

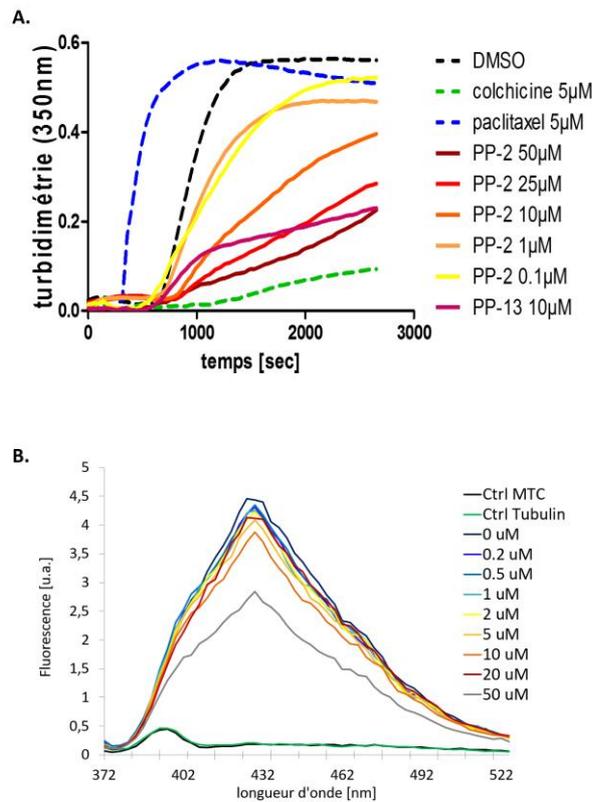


Figure 47. PP-2 est un agent dépolymérisant les microtubules qui se lie au site colchicine de la tubuline. A. Effets sur la dynamique des microtubules évalués par un test *in vitro* de polymérisation de la tubuline pure. La colchicine (en vert) et le paclitaxel (en bleu) sont utilisés comme des agents de référence dépolymérisant et polymérisant les microtubules respectivement. B. Déplacement du MTC (un analogue de la colchicine) du site de liaison colchicine de la tubuline par des concentrations croissantes de PP-2. C. Fraction de saturation de la tubuline par MTC en présence de concentrations croissantes de PP-2.

En conclusion, nous observons que la molécule PP-2 a des effets cellulaires et subcellulaires plus modestes que PP-13. Ceci peut pleinement s'expliquer par une différence d'affinité de PP-2 et PP-13 pour leur cible thérapeutique.

3.2.3 Article 2

PP-13, a new colchicine-binding site agent with *in vitro* and *in vivo* antimigration and antiangiogenic activities

Gilson P^{1,2}, Mediouni L¹, Couvet M¹, Vanwonderghem L¹, Henry M¹, Sancey L¹, Vollaire J¹, Jossierand V¹, Mahuteau-Betzer F³, Lafanechère L¹, Coll JL¹, Busser B^{1,2*\$}, Hurbin A^{1*\$}

3.2.3.1 Présentation de l'étude

Les chimiothérapies restent encore aujourd'hui un traitement de référence en cancérologie. Parmi ces thérapies non sélectives, les antimétabolites tels que les taxanes et les vinca-alcaloïdes sont très largement utilisés pour la prise en charge des cancers solides et hématologiques avancés. Cependant, leur intérêt clinique est restreint en raison de leur forte toxicité et de l'émergence de chimiorésistance rendant indispensable l'identification de nouvelles molécules thérapeutiques.

Nous avons précédemment identifié un nouvel inhibiteur des microtubules (PP-13) se liant au site colchicine de la β -tubuline et possédant une structure originale pyrrolo-pyrimidine. PP-13 a des effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques sur de nombreuses lignées représentatives de cancers. PP-13 a montré un potentiel antitumoral dans un modèle de xélogreffe tumorale sur la membrane chorio-allantoïdienne d'œuf embryonné de poule et présente l'avantage d'échapper aux mécanismes de chimiorésistance médiés par la surexpression de pompes d'efflux. Notre objectif à présent est d'évaluer le potentiel clinique de PP-13 en nous focalisant sur l'effet de PP-13 sur le développement métastatique et l'angiogenèse. Dans ce but, nous avons évalué les effets anti-migratoires et anti-angiogéniques de PP-13 *in vitro* et avons investigué l'efficacité thérapeutique et la toxicité de PP-13 *in vivo* dans un modèle tumoral orthotopique de développement métastatique murin.

3.2.3.2 Méthodes

Nous avons évalué la réponse antimigratoire de PP-13 par des tests de blessure en ayant recours à 3 lignées cellulaires cancéreuses humaines (A549, HeLa) et murine (4T1) ayant un fort potentiel invasif et métastatique *in vivo*. Nous avons déterminé l'effet de PP-13 sur la néo-angiogenèse *in vitro* en réalisant une expérimentation de formation de réseaux tubulaires 3D à partir de cellules HUVECs. L'activité antitumorale de PP-13 a été évaluée dans un modèle tumoral 3D de type sphéroïde grâce à des essais de viabilité et par évaluation de l'expression de H3P par immunofluorescence. L'efficacité thérapeutique de PP-13 a été investiguée *in vivo* dans un modèle de allogreffe tumorale 4T1 orthotopique sur souris. Nous avons déterminé la progression tumorale et métastatique dans ce modèle par bioluminescence *in vivo* et *ex vivo* et par des analyses immunohistochimiques HE sur tissus tumoraux et pulmonaires. L'évaluation toxicologique de PP-13 a été réalisée par analyses biologiques du sérum et de la moelle osseuse des souris. Tout au long de l'expérimentation, nous avons comparé les effets de cette nouvelle molécule par rapport à un agent antimétabolite conventionnel, le paclitaxel.

3.2.3.3 Résultats

In vitro, PP-13 réduit la migration des cellules tumorales ainsi que l'angiogenèse. Ces mécanismes semblent en partie liés à un effet cytotoxique direct sur les cellules. Dans un modèle tumoral 3D PP-13 induit une accumulation de cellules en mitose associée à une réduction significative de la croissance cellulaire. *In vivo*, nous avons montré que PP-13 réduit modérément le volume tumoral tandis que le paclitaxel n'a aucun effet sur la tumeur primaire à cette même dose. Tout comme le paclitaxel, PP-13 ne prévient pas la formation de métastases mais retarde la progression métastatique. Les souris traitées par PP-13 ont une charge métastatique globale réduite comparativement aux animaux contrôle et traités par le paclitaxel. Aux doses utilisées, PP-13 n'induit aucune toxicité apparente chez la souris.

PP-13, a new colchicine-binding site agent with *in vitro* and *in vivo* antimigration and antiangiogenic activities

Pauline Gilson^{1,2}, Lilya Mediouni¹, Morgane Couvet¹, Laetitia Vanwongerghem¹, Maxime Henry¹, Lucie Sancey¹, Julien Vollaire¹, Véronique Josserand¹, Florence Mahuteau-Betzer³, Laurence Lafanechère¹, Jean-Luc Coll¹, Benoit Busser^{1,2*§}, Amandine Hurbin^{1*§}

¹ Cancer Target and Experimental Therapeutics, Institute for Advanced Biosciences, INSERM U1209, CNRS UMR5309, Grenoble Alpes University, Grenoble, France.

² Biochemistry, Toxicology and Pharmacology Department, Grenoble University Hospital, Grenoble, France.

³ Institut Curie, PSL Research University, CNRS, INSERM UMR9187/U1196, Orsay, France.

§ co-last authors

* correspondence to amandine.hurbin@inserm.fr

bbusser@chu-grenoble.fr

Abstract

Spindle poisons that interfere with microtubule dynamics are still a major chemotherapeutic option widely used for the management of various advanced malignancies. However, major efforts are needed to reduce their toxicity and optimize their efficacy, especially in condition of chemoresistance. We previously identified a novel pyrrolo[2,3d]pyrimidine-based microtubule-depolymerizing agent (PP-13) that binds to the colchicine site of β -tubulin and exhibits anticancer properties in various human cancer cells, including chemoresistant subtypes.

Here, we investigated the therapeutic potential of PP-13 *in vitro* and *in vivo*, specifically its effects on metastasis and angiogenesis and its toxicity profile. We showed that PP-13 has antimigration and antiangiogenic properties *in vivo*, partly linked to a direct cytotoxic effect. PP-13 induced a mitotic blockade in 3D spheroid cultures associated with a reduced cell proliferation. In an orthotopic allograft model of paclitaxel-refractory breast tumour, PP-13 treatment was correlated with a reduced primary tumour size compared to paclitaxel and control groups and the absence of apparent toxicity in mice. Although PP-13 did not prevent the apparition of metastasis, it delayed their progression and decreased the global metastatic load as compared to paclitaxel or vehicle alone. All these findings suggest PP-13 to be a promising alternative molecule for conventional antimitotic drug-refractory tumours and may provide a rationale to further preclinical studies.

Introduction

Despite diverse innovations in targeted anticancer strategies over the last decade, non-selective chemotherapies are still widely used for the clinical management of various advanced malignancies¹. Microtubules represent one of the most common targets for chemotherapies as they fulfill vital cellular processes such as maintenance of cell shape, intracellular transport, cell motility, and chromosome migration during cell division². Taxanes and vinca-alkaloids account for the 2 main classes of microtubule-targeting agents, and are classically known to induce microtubule stabilization and depolymerization respectively³. Therapeutic doses⁴ of all compounds from these 2 families lead to the same consequence: the alteration of the dynamic state of the microtubules that finally impairs the progression of the cell division and causes cell death⁵. Beyond their cytotoxic activity, most of microtubule-binding drugs share antimetastatic, antiangiogenic or vascular-disrupting properties supporting their clinical interest for the treatment of cancers⁶⁻⁸. However, the troublesome side effects of microtubule inhibitors (particularly myelosuppression and peripheral neurotoxicity) and the emergence of chemoresistance (predominantly by the surexpression of efflux transporters) drastically limit their therapeutic outcomes³, hence arguing the need for alternative agents.

We have recently identified a novel pyrrolopyrimidine-based microtubule-depolymerizing agent (PP-13) that exerts anticancer effects *in vitro* in a wide range of human cancer cells⁹. PP-13 binds to the colchicine binding site of β -tubulin, interferes with microtubules organization and induces spindle multipolarity, transient mitotic cell cycle arrest and apoptosis. Interestingly, in marked contrast to conventional microtubule-damaging drugs, PP-13 escaped efflux pumps underlying its potential anticancer action in multi-drug resistant cancer cells. PP-13 leads *in vivo* to reduced tumour growth and metastasis invasion in tumour allografts of the chicken embryo chorioallantoic membrane without any noticeable toxicity for the embryo.

In the present study, we deepened the evaluation of the anticancer effects of PP-13 and we evaluated its impact on cell migration, metastasis and angiogenesis, both *in vitro* and *in vivo*. The therapeutic potential of PP-13 was investigated on highly invasive and aggressive cancer cell lines (HeLa cervical cancer cells, A549 NSCLC cells and 4T1 murine mammary cancer cells), cultured in 2D or in 3D-spheroids. Impact of PP-13 on angiogenesis was assessed using human endothelial cell lines (HUVEC). Finally, the toxicity and therapeutic effects of PP-13 were evaluated *in vivo* using 4T1 mammary cancer allograft and metastasis model.

Material & Methods

Chemical reagents

Paclitaxel was obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Molecule PP-13 was described more in details in ⁹. All drugs were dissolved in sterile anhydrous dimethyl sulfoxide (DMSO, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) at 10 mmol.L⁻¹ stock solution.

Cell culture

The human HeLa, A549 and HUVEC cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). HeLa cells expressing mEGFP- α -tubulin and mRFP-H2B were a generous gift from Dr D. Gerlich¹⁰. The 4T1 cells were stably transfected with a plasmid expressing the fusion histone H2B – RFP (generously provided by Dr Corinne Albiges Rizo, Institute for Advanced Biosciences, Grenoble, France) using JetPEI (Polyplus Transfection, Illkirch, France) according to the manufacturer's protocols then cells were selected with G418 antibiotic (*Thermo Fisher Scientific*, Braunschweig, Germany) and amplified. The 4T1 cells stably transfected with the pGL4.50[*luc2*/CMV/Hygro] vector encoding the firefly luciferase reporter gene *luc2* (Promega, Charbonnières, France) were generated using JetPEI followed by selection and cloning of positive cells.

All cells were cultured as recommended, routinely tested for the presence of mycoplasma (MycoAlert[®] Mycoplasma Detection Kit, Lonza, France) and used within 6 months after thawing.

2D cell culture:

Cells were maintained in culture at 37°C in the appropriate medium in a 5% CO₂ humidified atmosphere and the cell morphology was routinely checked.

3D cell culture:

Spheroids were derived from A549 (4,000 cells/well), HeLa expressing mEGFP- α -tubulin and mRFP-H2B (1,000 cells/well) and 4T1 expressing mRFP-H2B cells (2,000 cells/well) using 96-well round bottom Ultra Low Attachment (ULA) spheroid microplates (Corning, Tewksbury, MA, USA). After 24-48h of culture in the appropriate medium in a humidified atmosphere with 5% CO₂, a single spheroid is spontaneously formed in each well. Drug treatment was added 72h after implantation and the generation and growth of spheroids was routinely observed by an inverted microscope.

In vitro cytotoxicity assays

Cells were seeded in 96-well culture plates and exposed to serial dilutions of PP-13 and paclitaxel in complete appropriate medium for 72 hours. The cell viability was determined in 2D-cultured cells by the MTT assay as previously described¹¹ and in spheroids using CellTiter-Glo[®] 3D Cell Viability Assay (Promega)¹².

The potential growth inhibitory effect of the drugs was expressed as the percentage of surviving treated cells compared to untreated control cells. The drug concentrations required to inhibit cell growth by 50% (IC₅₀) were interpolated from the dose-response curves.

Immunofluorescence analyses

After 24h of PP-13 treatment, spheroids were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde, then washed, embedded in OCT and cutted into 7 µm sections before mounting onto SuperFrost UltraPlus slides (Menzel-Gläser, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Germany). Cryosections were rehydrated in PBS-glycine, permeabilized for 1h in PBS Triton X100 0.2%, washed in PBS-glycine, blocked in 10% goat serum and incubated overnight at 4°C with primary antibodies targeting α-tubulin (Santa Cruz, Clinisciences, Montrouge, France) and phospho-histone H3 (H3P, Cell Signaling, 1/1,000). Sections were then washed in 0.2% tween 20 /PBS and incubated for 1h with conjugated secondary Alexa fluor 633 goat anti-rabbit (Life technologies, 1/1000) and Alexa fluor 488 goat anti-mouse (Life technologies, 1/1000) antibodies. Cell nuclei were counterstained by Hoechst.

Fluorescence microscopy was carried out using a confocal microscope (LSM 710; Carl Zeiss). An objective Plan Aplanachromat 20×/0.8 NA air was used for “Fig.3-overview) and an objective Plan Aplanachromat 63×/1.4 NA oil was used for “Fig.3-zoom”.

H3P expression level in spheroids was counted based on color thresholding image adjustment using image J software (NIH, Bethesda, MD, USA).

Videomicroscopy studies

Spheroids were treated with PP-13 IC₅₀ concentrations for 24h then the plate was placed on a 37°C heated stage (at 5% CO₂) for image acquisition by a spinning disk confocal laser microscope (Andromeda iMIC, FEI, Munich, Germany) equipped with a Plan-Aplanachromat 20x/1.4 Oil objective and an EMCCD camera (iXon3897, Andor, Belfast, UK). Acquisition (LA) and off-line analysis (OA) software programs were used.

In vitro capillary-like tube formation assay

A 15-well ibidi angiogenesis microslide (ibidi, clinsciences) was coated with 10 μL of matrigel matrix (Corning, Amsterdam, The Netherlands) and incubated for 30 minutes at 37°C for gel polymerization. HUVECs cells (2.10^4 cells/well) were seeded on top of the polymerized gel matrix in complete medium with increasing concentrations of PP-13 or 0.1 % DMSO. The microslide was then placed in a 37°C heated stage in a 5% CO_2 humidified atmosphere. Images were acquired after 6h of incubation by a phase-contrast microscope with Achromat 5 \times /0.12 NA objective and analysed using the automated WimTube image analysis tool (Wimasis GmbH, Munich, Germany).

In vitro wound-healing assay

A549 (5.10^4 cells/well), 4T1-rvLuc2 ($3.3.10^4$ cells/well) and HeLa (5.10^4 cells/well) cells were seeded in culture inserts (ibidi, clinsciences) and allowed to grow for 48 hours until confluence. The inserts were then removed and the newly created cell-free gap (wound) was rinsed to remove cell debris. After the addition of graduating concentrations of PP-13 or DMSO in the medium, the recovery of the wound was recorded by video-microscopy (image acquisition every 5 min for 12h, $\times 10$ magnification) using the MetaMorph acquisition software. The closure rate was calculated using ImageJ software by establishing the surface area of the wound over the time.

In vivo studies

All animal studies were performed in accordance with the European Economic Community guidelines and the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication N 86-23 revised 1985). The in vivo experiments were approved by the institutional guidelines and the European Community for the use of experimental animals (authorization to experiment).

Orthotopic breast tumour implantation

Luciferase-modified mouse 4T1 cancer cells (4T1-rvLuc2 cells) were harvested, washed and resuspended in PBS at a concentration of 20 000 cells per 50 μL . Six-week-old female NMRI nude mice (Janvier, Le Genest, Saint Isle, France) were anesthetized using 4% of isoflurane/air for anaesthesia induction and 1.5% thereafter, and the cells were injected into the mammary fat pad, as previously described¹³.

At Day 0, mice were randomized into 4 groups of 8 animals, receiving either vehicle (NaCl 0.9%/DMSO 1%/PEG 30%/Tween80 1%, referred as control), 0.5 mg/kg paclitaxel (a well-known microtubule-binding agent widely used in human breast cancer therapy), 0.5 mg/kg PP-13 or 1 mg/kg PP-13. Intraperitoneal administration of 200 μL vehicle, PP-13 (0.5 and 1 mg/kg), and paclitaxel (0.5 mg/kg) was performed three times a week for 36 days. Twenty-

two days after 4T1-rvLuc2 cells implantation, the primary breast tumour was excised under general anaesthesia, then continuation of the treatment and thoracic metastases growth follow-up continued.

Antitumour efficacy and toxicity of PP-13 in vivo

Mice were daily examined for behavior and morbi-mortality and weighed 3 times a week. The primary tumour growth was monitored three times a week using a sliding caliper and the tumour volume was calculated as follow¹⁴: $V = D \times d^2 \times 0.4$ (where V is the tumour volume, D and d are the largest and the smallest diameters respectively). Thoracic metastasis growth was followed once a week by *in vivo* bioluminescence imaging (IVIS Kinetic, Perkinelmer, Waltham, MA, USA) (ventral and dorsal views) 5 min after the intraperitoneal injection of 150 mg/kg of Luciferin (Promega, Charbonnières, France), as previously described¹⁵. The bioluminescence signal is given as radiance photons/sec/cm²/steradian (p/sec/cm²/sr) and the intensity of the signal is represented in pseudocoloured images. The presence of thoracic metastasis was established when a region of at least 2 contiguous pixels over the determined intensity threshold is observed.

Five weeks after the initiation of the animal experiment, mice were euthanized and lungs, spleen, kidney, lymph nodes, liver, a section of the intestine, bone marrow, and plasma (blood drawn with heparinized syringe) were collected for further imaging and/or analyses. Biochemical analysis of the plasma samples was performed by Charles Rivers Laboratory (Massachusetts, USA). The haematological parameters were evaluated both in the blood and bone marrow samples.

Immunohistochemistry

Tumour tissues and organs were frozen in *OCT*-embedding medium (VWR international, Fontenay-sous-Bois, France) and cut into 7 μm thick sections using a cryomicrotome for immunohistochemical analysis. Histological observations were performed after fixation with 4% paraformaldehyde and staining with haematoxylin and eosin (HE). Immunohistochemical examinations were performed using an AxioImager M2 microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Statistical analyses

All data are expressed as the mean \pm SD for *in vitro* assays and the mean \pm SEM for *in vivo* experiments. Tests that were chosen for the statistical analyses are indicated in the legend figures. Statistical significance was defined as *p* values ≤ 0.05 (NS *p* > 0.05; * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001; **** *p* < 0.0001 compared to control). All analyses were performed using the GraphPad Prism v5.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA).

Data availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Results

- **PP-13 treatment inhibits cancer cell migration and angiogenesis *in vitro***

To elucidate whether PP-13 was able to prevent cancer metastasis, we tested the potential of PP-13 to inhibit cell migration in an *in vitro* wound-healing assay. For this purpose, we chose 3 cell models displaying a high level of proliferation, migration and invasiveness: the mouse 4T1 mammary cancer, the human A549 lung cancer and the human HeLa cervical cell line presenting PP-13 IC₅₀ values of 70, 125 and 120 nmol.L⁻¹, respectively. PP-13 was shown to reduce the cancer cell migration in all cell lines starting from the IC₅₀ concentrations (Fig 1).

Because most of the microtubule-targeting agents also exhibit antiangiogenic properties^{3,6,16,17}, we investigated the effects of PP-13 on the capillary-like structure formation *in vitro* using HUVEC endothelial cells plated on a Matrigel basement membrane. In absence of treatment, endothelial cells aligned and formed an organized network of capillary-like structures in 6h (Fig. 2A and B). PP-13 treatment interfered with the ability of HUVECs to form tube-like structures given the cell scattering and the reduction of the total number of branch sites and loops, the total tube length as well as the total cell-covered area compared to the control. (Fig. 2A and B). At the tested concentrations of PP-13, the inhibition of HUVEC cell proliferation was reduced. The inhibitory effect started from concentrations above 0.1 μmol.L⁻¹ (Fig.2C).

Hence, this suggests that PP-13 displayed potent antimigration and antiangiogenic properties *in vitro*, partly correlated with direct cytotoxic effects of PP-13.

- **PP-13 inhibits the growth of 3D spheroid cell cultures**

3D spheroids that reflect the microenvironment of solid tumour with appropriated cell-cell interactions as well as gradients of nutrients and oxygen¹⁸ were used to evaluate the effects of PP-13. PP-13 treatment interfered with cell growth in 3D cell cultures with IC₅₀ values in 4T1 mRFP-H2B (200 nmol.L⁻¹) and HeLa mEGFP-α-tubulin mRFP-H2B (200 nmol.L⁻¹) spheroids in the same range than for 2D monolayer cultures (67.5 and 150 nmol.L⁻¹ respectively) (table 1 and Suppl. Fig. S1). However, we noticed a marked difference in cell viability in A549 3D cells (IC₅₀ > 10 μmol.L⁻¹) compared to A549 2D cells (average IC₅₀ of

120 nmol.L⁻¹). The spheroids were treated during 24h with the corresponding IC₅₀ concentrations of PP-13. We reported a significant increase in the expression level of phosphorylated histone H3 (H3P), a marker of late G2/M, denoting the strong accumulation of cells in mitosis in A549 and HeLa spheroids compared to control 3D cells (Fig. 3A and B and Suppl. Fig. S3). Immunofluorescence images showed that PP-13 led to mitotic defects including multipolar mitotic spindles and miscongressed chromosomes (Fig. 3A and Suppl. Fig. S2). To conclude, PP-13 induced a mitotic spindle disorganization and prometaphase mitotic blockade associated with the inhibition of cancer cell growth in 3D spheroid cultures.

- **PP-13 delays tumour and metastasis growth *in vivo***

We established the mammary cancer allograft model in mice to evaluate the activity of PP-13 on tumour growth and metastasis formation (Fig. 4A) Once engrafted in the mammary fat pad, 4T1-rvLuc2 mouse cancer cells metastasize to multiple distant sites (lymph nodes, lungs, liver, bone, brain). This relevant orthotopic model mimics human breast cancers¹⁹. At the end of the treatment of 5 weeks of intraperitoneal administration of PP-13, all PP-13-treated mice were alive while the overall mortality was reported as 12.5% in paclitaxel and control groups (1/8 death in each group) (Suppl. Fig. S4).

Paclitaxel-treated group did not show any difference in primary tumour size at 0.5 mg/kg dose (Fig. 4B). At similar dose range, PP-13 significantly decreased the volume of the primary tumours in a dose-dependent manner, as compared to control and paclitaxel-treated groups (Fig. 4B). On day 22, there was a significant reduction of the tumour volume of about 26% and 37% in groups treated with 0.5 mg/kg PP-13 and 1 mg/kg PP-13 compared to the control respectively.

Bioluminescence imaging (BLI) allowed temporal and spatial monitoring of metastasis development. Paclitaxel slowed the metastasis progression in the thoracic areas (Suppl. Fig. S5) but had no effect on *in vivo* thoracic bioluminescence signal until D28 (Fig. 5A and B). It also induced a 23% decrease in lung *ex vivo* bioluminescence signal at D36 compared to control group (Fig. 5C and D). On the contrary, PP-13 delayed the metastasis establishment at D14 (Suppl. Fig. S5) and reduced the global metastatic load considering that 0.5 mg/kg PP-13 halved the control *in vivo* bioluminescence signal at D22 and 1 mg/kg PP-13 led to 42 % of the control bioluminescence intensity at D28 (Fig. 5A and B). This inhibitory effect on metastasis progression was confirmed at the end of the experiment by *ex vivo* bioluminescence imaging of the lungs (Fig. 5C and D). While all PP-13-treated and control mice exhibited lung metastases at day 36, there was a 66% reduction of the *ex vivo* bioluminescence signal in the lungs of animals treated with 1 mg/kg PP-13 compared to control mice (Fig. 5D). In the lymph nodes, the overall bioluminescence signal was markedly reduced in PP-13-treated groups, compared to paclitaxel and vehicle-treated groups respectively (Fig. 6A and B). Paclitaxel moderately reduced the metastasis establishment in mice lymph nodes and the number of invaded lymph nodes per mice (Fig. 6C and D). The percentage of mice with lymph nodes metastases was also reduced in PP-13-treated groups (reduction of 83 % in the 1 mg/kg PP-13 group as compared to the control group) (Fig. 6C),

as well as the number of metastatic lymph nodes (up to 92 % decrease in 1 mg/kg PP-13-treated mice compared to control mice) (Fig 6D). Taken together, these results showed that PP-13 decreased the tumour and metastasis growth.

- **PP-13 shows no apparent toxicity *in vivo***

To further complement these findings, we assessed the toxicity of PP-13 *in vivo* in comparison with control and paclitaxel groups, with a particular attention to the major side effects induced by conventional spindle poisons in the clinics. There was no appreciable body-weight loss in control and PP-13-treated mice over the time, while mice exposed to paclitaxel displayed a significant decrease in body weight between D28 and D36 (Suppl Fig. S6). Plasma clinical chemistry parameters analysis showed a significant decrease in phosphorus, creatinine, and glucose in paclitaxel-treated mice. No consistent change in plasma biochemical values were reported in 1 mg/kg PP-13-treated mice compared to control, excepted an isolated small but significant decrease in blood urea nitrogen dosage (Table 2). Haematological analysis of the blood and bone marrow cells from 1 mg/kg PP-13-treated mice did not reveal any apparent signs of myelosuppression or other haematological abnormalities compared to control (Table 3 and 4) while paclitaxel treatment led to a significant reduction of white blood cell count in blood and a slight increase in MCHC. Overall, these data suggest that PP-13 displayed a favourable safety profile as it slowed both tumour and metastasis progression and were well-tolerated at these doses compared to the control during the treatment period.

Discussion

In the present study, we explored the therapeutic efficacy of a new pyrrolo[2,3d]pyrimidine-based colchicine-binding site agent (PP-13) that previously showed promising anticancer properties *in vitro*⁹. Herein, the *in vitro* antitumour effects of PP-13 were confirmed in 3D tumour spheroids with a significant decrease of spheroid cell growth. The 3D spheroids are currently considered as a more suitable model than monolayer cell cultures because they better mimic the *in vivo* 3D tumour environment, cell-cell and cell-extra cellular matrix interactions that are known to be fundamental in tumorogenesis^{18,20,21}. The IC₅₀ values of PP-13 are highly variable depending on the cell type, ranging from 200 nmol.L⁻¹ in HeLa mEGFP- α -tubulin mRFP-H2B and 4T1 mRFP-H2B spheroids to > 10 μ mol.L⁻¹ in A549 3D model. The difference between PP-13 IC₅₀ in A549 2D and 3D models are not fully understood. Others showed that large spheroids (\geq 500 μ m diameter), as those generated in our experiments, display necrotic and hypoxic core resulting from chemical gradients of oxygen and nutrients that are correlated with chemoresistance, as reported in developing tumours²². The presence of various environmental factors affecting the tumour development (cell-cell adhesion, cell-cycle distribution, local pH, extracellular matrix...) ²¹ could also explain the lower sensitivity of spheroid cancer cells to drugs compared to 2D cell cultures as

also observed in *in vivo* tumour models^{23–25}. The physico-chemical properties of PP-13 could also be responsible of a lower sensitivity in 3D cells. All these hypotheses need to be further investigated.

In immunofluorescence images, the H3P expression and the presence of mitotic defects in both the inner and outermost layers suggests that the drug penetrate in the spheroids, although bystander effects are not excluded. As previously shown in 2D cell cultures, we confirmed in these 3D models that PP-13 induced a mitotic blockade finally leading to the inhibition of cell proliferation.

Angiogenesis and cancer cell migration are attractive therapeutic targets. The widely used capillary-like tube formation assays are helpful to study the effects of new molecules on many steps of neoangiogenesis including endothelial cell adhesion and migration, tubule formation²⁶. With this approach, we showed that PP-13 interfered with the tubule assembly by decreasing both the number of loops and branch nodes, the total length of the formed tubes and the cell-covered area. Likewise, a wound-healing assay reported the ability of PP-13 to inhibit cancer cell migration in 3 metastatic tumour cell models. Taken together, this indicated that PP-13 exerted potent antimigration and antiangiogenic properties *in vitro* that may potentiate its antineoplastic activity. Similar responses have been already reported with other microtubule-binding agents^{3,16,17,27–29} and have been shown to be mediated by the cytotoxic effects of the molecules⁶.

To confirm the clinical interest of using PP-13, we carried out an *in vivo* assay with the highly metastatic orthotopic 4T1 tumour allograft model. The orthotopic experimental mouse model is clinically relevant to predict the influence of the organ microenvironment on tumour cell behaviour and study the cancer cell invasion and metastasis growth³⁰. The 4T1 allogeneic transplant mouse model emulates triple negative breast cancers (TNBC) in humans that account for almost 15% of breast cancers and are associated with a high propensity to metastasize (in lymph nodes and lungs primarily), poor therapeutic options and prognosis³¹. The therapeutic arsenal for TNBC mainly consists of anthracyclines and taxanes-based chemotherapies however the emergence of resistance and frequent tumour recurrence support the need to identify alternative drugs for the management of refractory tumours. The 4T1 model thus represents an interesting approach to screen new molecules for TNBC therapy, especially since it spontaneously metastasize in the same regions as in TNBC and easily develops resistance to chemotherapies classically used in TNBC^{32,33}. In this experiment, we chose paclitaxel as a reference treatment with an appropriate dose to induce antimetastatic effects while limiting the side effects of the drug. Contrary to paclitaxel, PP-13 treatment induced an inhibition, albeit moderate, of the primary tumour volume at the tested concentrations. Further investigations with increased concentrations of PP-13 are now necessary to establish the maximal antitumour effect of PP-13 and the therapeutic index of the molecule.

The orthotopic implantation of 4T1 cancer cells stably expressing the luciferase allows the non-invasive visualization of metastases growth using *in vivo* and *ex vivo* bioluminescence imaging. At concentrations of 0.5 and 1 mg/kg, PP-13 administrated 3 times a week was not

able to prevent the development of metastasis but it delayed the metastatic progression and inhibited the global metastatic load in lungs and lymph nodes compared to control and paclitaxel-treated groups, arguing that PP-13 is more likely acting *via* a direct cytotoxic effect.

PP-13 treatment of breast carcinoma-bearing mice did not lead to any additional signs of toxicity compared to control animals, including the absence of myelosuppression classically observed with conventional antimetabolic drug treatments. However, this needs to be confirmed by further *in vivo* toxicity experiments in healthy mice exploring the optimal tolerated dose. At the same dose, paclitaxel led to a significant decrease in white blood cell count as already reported³⁴ as well as a slight reduction of glycemia, phosphorus and creatinine and an increase of MCHC in treated-mice in our conditions.

In summary, PP-13 significantly reduced cancer cell migration and neoangiogenesis processes in different *in vitro* cell models. PP-13 also led to a reduction of both tumour growth and metastasis progression in a mouse orthotopic tumour model associated with an insignificant toxicity. All these findings suggest that PP-13 may hold promise for efficient anticancer therapy as an alternative option to conventional spindle poisons and hence provide support for further preclinical studies.

Acknowledgements

This work was supported by the Institut Curie, the CNRS, the INSERM, and grants from “La Fondation de France” and “La Ligue contre le Cancer (comité de l’Isère)”.

We acknowledge the assistance of Alexei Grichine, Jacques Mazzega and Mylène Pezet (Optical microscopy Platform - Cell Imaging, INSERM U1209). *In vivo* evaluation was performed by the OPTIMAL Facility, part of the France Live Imaging program (FLI-Grenoble; French program “Investissement d’Avenir”; grant “Infrastructure d’avenir en Biologie Santé,” ANR-11-INBS-0006).

Authors contributions

PG, BB, and AH conceived the project, designed the experiments, and interpreted the data. PG, LM, MC, LV, MH, JV were involved in acquisition, analysis and interpretation of the data. VJ, MH, JV designed the *in vivo* experiment. FMB synthesized and characterized PP-13. JLC, BB and AH supervised research and analyses. PG, BB and AH supervised the whole project and wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

References

1. Miller, K. D. *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* (2016). doi:10.3322/caac.21349
2. Jordan, M. A. & Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 253–265 (2004).
3. Dumontet, C. & Jordan, M. A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 790–803 (2010).
4. Fanale, D. *et al.* Stabilizing versus Destabilizing the Microtubules: A Double-Edge Sword for an Effective Cancer Treatment Option? *Analytical Cellular Pathology* (2015). doi:10.1155/2015/690916
5. Jordan, M. A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2**, 1–17 (2002).
6. Schwartz, E. L. Antivascular actions of microtubule-binding drugs. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 2594–2601 (2009).
7. Bates, D. & Eastman, A. Microtubule destabilizing agents: far more than just anti-mitotic anti-cancer drugs: MDA mechanisms of action. *Br. J. Clin. Pharmacol.* (2016). doi:10.1111/bcp.13126
8. Kanthou, C. & Tozer, G. M. Microtubule depolymerizing vascular disrupting agents: novel therapeutic agents for oncology and other pathologies. *Int. J. Exp. Pathol.* **90**, 284–294 (2009).
9. Gilson, P. *et al.* Identification of pyrrolopyrimidine derivative PP-13 as a novel microtubule-destabilizing agent with promising anticancer properties. *Scientific Reports* (2017). doi:10.1038/s41598-017-09491-9
10. Steigemann, P. *et al.* Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell* **136**, 473–484 (2009).

11. Jeannot, V. *et al.* Synergistic activity of vorinostat combined with gefitinib but not with sorafenib in mutant KRAS human non-small cell lung cancers and hepatocarcinoma. *OncoTargets Ther.* **9**, 6843–6855 (2016).
12. Molla, A., Couvet, M. & Coll, J.-L. Unsuccessful mitosis in multicellular tumour spheroids. *Oncotarget* (2017). doi:10.18632/oncotarget.15673
13. Prunier, C. *et al.* LIM Kinase Inhibitor Pyr1 Reduces the Growth and Metastatic Load of Breast Cancers. *Cancer Res.* **76**, 3541–3552 (2016).
14. Busser, B. *et al.* Amphiregulin promotes resistance to gefitinib in nonsmall cell lung cancer cells by regulating Ku70 acetylation. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **18**, 536–543 (2010).
15. Jeannot, V. *et al.* Targeting CD44 receptor-positive lung tumors using polysaccharide-based nanocarriers: Influence of nanoparticle size and administration route. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **12**, 921–932 (2016).
16. Pasquier, E., Honoré, S. & Braguer, D. Microtubule-targeting agents in angiogenesis: where do we stand? *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **9**, 74–86 (2006).
17. Pasquier, E., André, N. & Braguer, D. Targeting microtubules to inhibit angiogenesis and disrupt tumour vasculature: implications for cancer treatment. *Curr. Cancer Drug Targets* **7**, 566–581 (2007).
18. Lovitt, C. J., Shelper, T. B. & Avery, V. M. Advanced Cell Culture Techniques for Cancer Drug Discovery. *Biology* **3**, 345–367 (2014).
19. Pulaski, B. A. & Ostrand-Rosenberg, S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr. Protoc. Immunol.* **Chapter 20**, Unit 20.2 (2001).
20. Hirschhaeuser, F. *et al.* Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* **148**, 3–15 (2010).

21. Mehta, G., Hsiao, A. Y., Ingram, M., Luker, G. D. & Takayama, S. Opportunities and Challenges for use of Tumor Spheroids as Models to Test Drug Delivery and Efficacy. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **164**, 192–204 (2012).
22. Däster, S. *et al.* Induction of hypoxia and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment. *Oncotarget* **8**, 1725–1736 (2016).
23. Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F. & Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev. Technol.* **12**, 207–218 (2014).
24. Breslin, S. & O’Driscoll, L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget* **7**, 45745–45756 (2016).
25. Nirmalanandhan, V. S., Duren, A., Hendricks, P., Vielhauer, G. & Sittampalam, G. S. Activity of anticancer agents in a three-dimensional cell culture model. *Assay Drug Dev. Technol.* **8**, 581–590 (2010).
26. Xie, D., Ju, D., Speyer, C., Gorski, D. & Kosir, M. A. Strategic Endothelial Cell Tube Formation Assay: Comparing Extracellular Matrix and Growth Factor Reduced Extracellular Matrix. *J. Vis. Exp. JoVE* (2016). doi:10.3791/54074
27. Lu, Y., Chen, J., Xiao, M., Li, W. & Miller, D. D. An Overview of Tubulin Inhibitors That Interact with the Colchicine Binding Site. *Pharm. Res.* **29**, 2943–2971 (2012).
28. Su, M. *et al.* The anti-angiogenic effect and novel mechanisms of action of Combretastatin A-4. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
29. Shen, C.-H. *et al.* Combretastatin A-4 inhibits cell growth and metastasis in bladder cancer cells and retards tumour growth in a murine orthotopic bladder tumour model. *Br. J. Pharmacol.* **160**, 2008–2027 (2010).

30. Man, S., Munoz, R. & Kerbel, R. S. On the development of models in mice of advanced visceral metastatic disease for anti-cancer drug testing. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 737–747 (2007).
31. Kaur, P. *et al.* A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. *BMC Cancer* **12**, 120 (2012).
32. Bao, L. *et al.* Increased expression of P-glycoprotein is associated with doxorubicin chemoresistance in the metastatic 4T1 breast cancer model. *Am. J. Pathol.* **178**, 838–852 (2011).
33. Luo, T. *et al.* (-)-Epigallocatechin gallate sensitizes breast cancer cells to paclitaxel in a murine model of breast carcinoma. *Breast Cancer Res. BCR* **12**, R8 (2010).
34. Perez, E. A. Paclitaxel in Breast Cancer. *The Oncologist* **3**, 373–389 (1998).

Figures

Figure 1

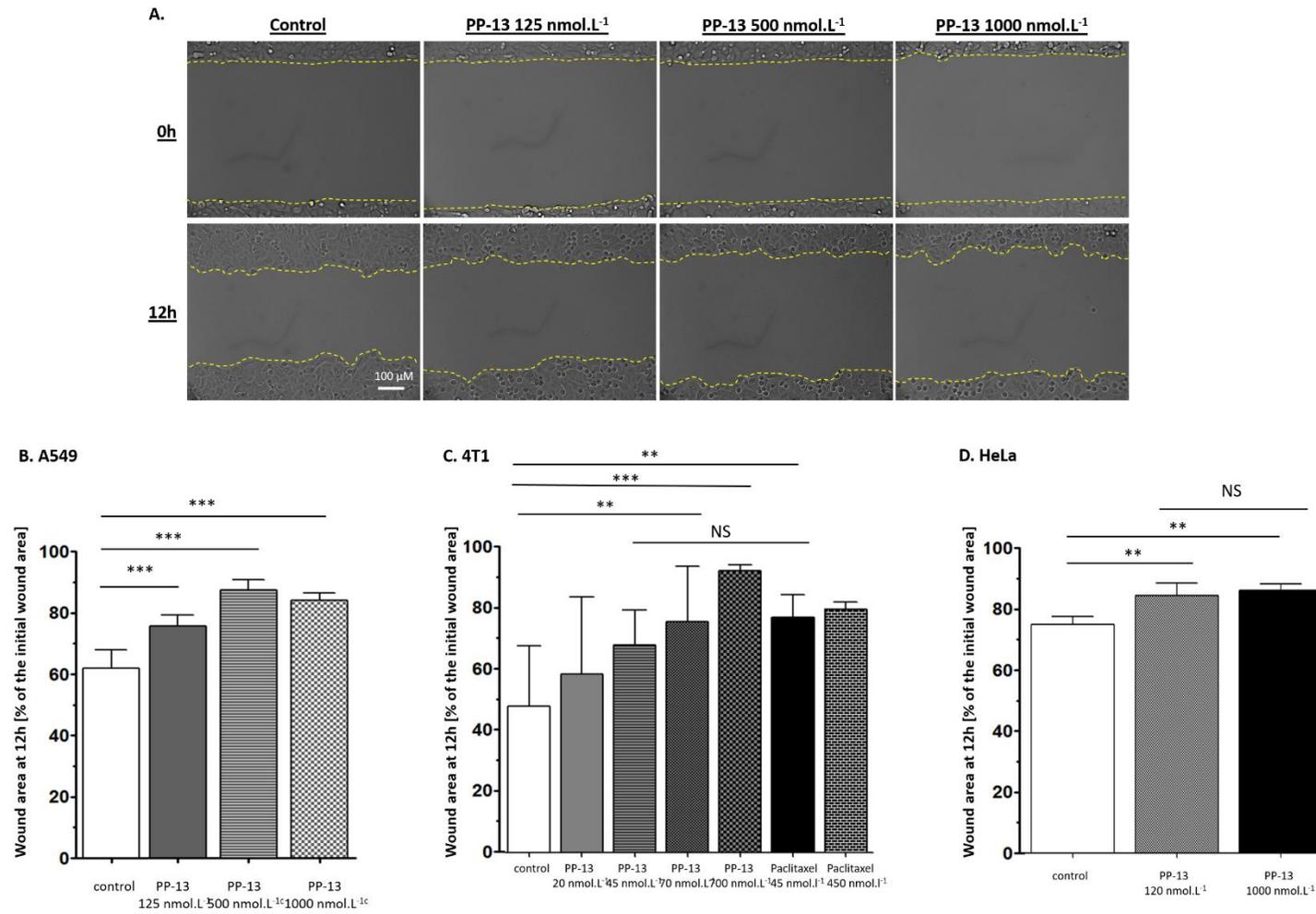


Figure 1: *In vitro* effects of PP-13 on cancer cell migration using a wound healing assay.

A. Representative images from a scratch assay experiment for A549 cells at different time points (0h and 12h) (x10 magnification). The dotted white line delineates the edges of the wound. B-D. Quantification of the wound recovery in A549 (B.), 4T1-rvLuc2 (C.) and HeLa (D.) cell models. Histograms represent the percentage of wound area at 12h compared to the initial wound area in each condition. Data are expressed as mean \pm SD from 3 independent experiments (One-way ANOVA with Bonferroni post-tests).

Figure 2

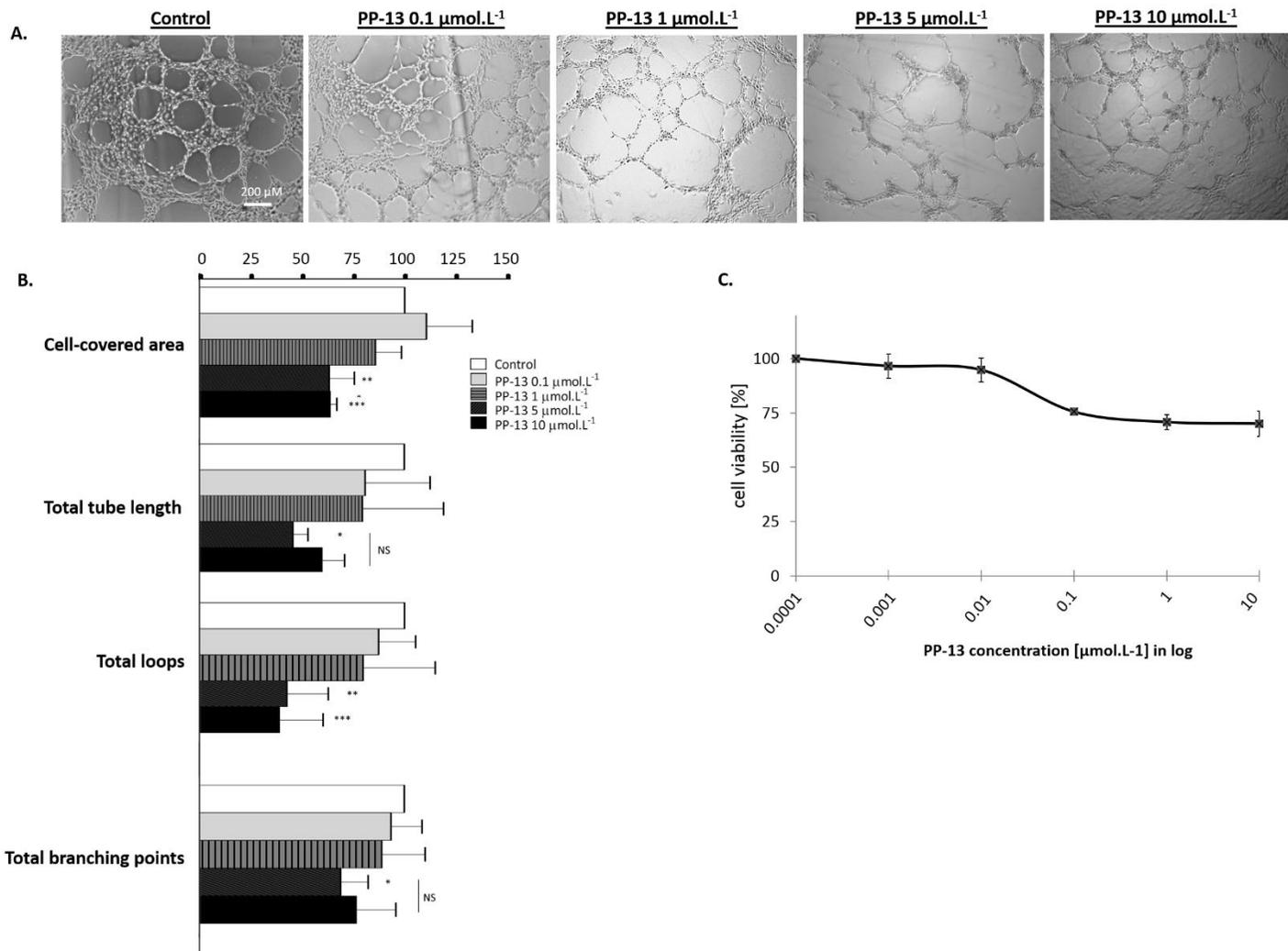


Figure 2: *In vitro* effects of PP-13 on angiogenesis by capillary-like tube formation assay.

A. Representative images of the HUVEC capillary-like tubes formation in each condition (x5 magnification). B. Quantification of the tubes length, the cell covered area, the number of loops and the number of branching points. All these data are presented as percentages in comparison to control cells. Data are expressed as mean \pm SD of 3 independent experiments (One-way ANOVA with Bonferroni post-tests). C. Cell viability of HUVEC cells after 6h of PP-13 treatment. Data represent the mean \pm SD from ≥ 3 experiments.

Figure 3

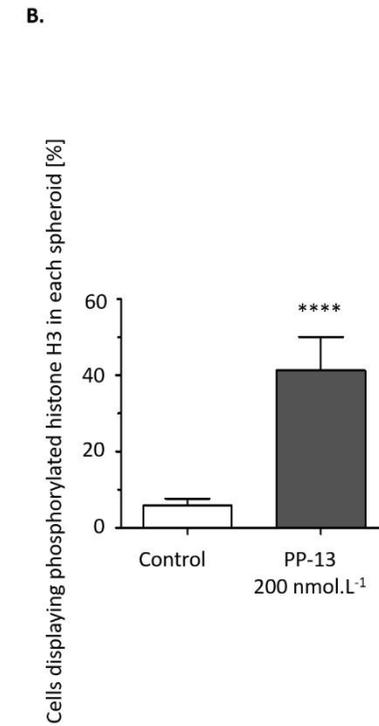
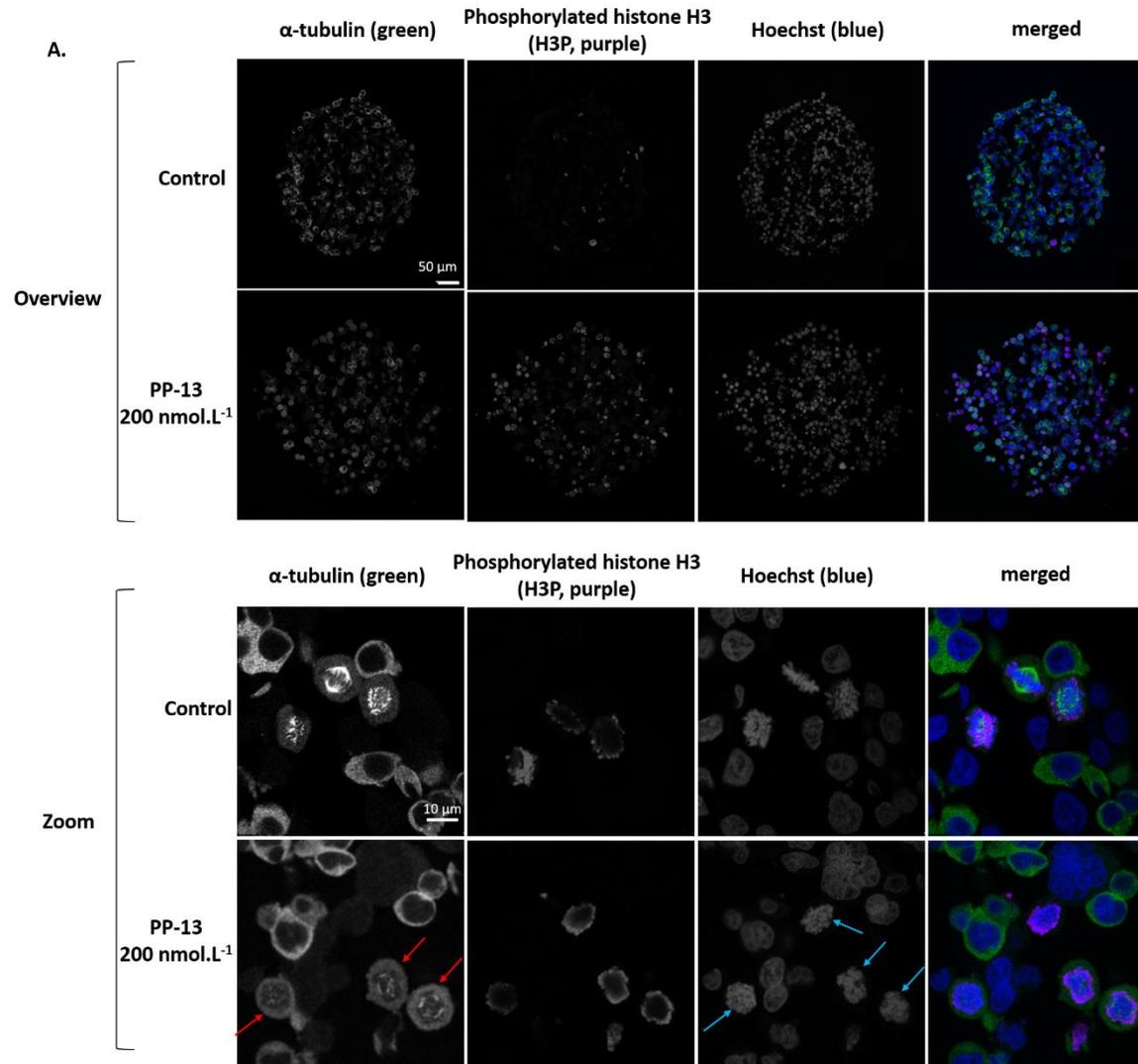


Figure 3: Effects of PP-13 on microtubule organization and phosphorylated-histone H3 (H3P) expression level in HeLa mEGFP- α -tubulin mRFP-H2B spheroids by immunofluorescence analysis. HeLa mEGFP- α -tubulin mRFP-H2B spheroids were treated for 24h with vehicle (control) or PP-13 IC₅₀ concentrations (200 nmol.L⁻¹). **A.** Representative confocal microscopy images of microtubules and H3P in spheroid sections (global view and zoom). Merged images: in green: α -tubulin, in purple: H3P, in blue: nuclei/chromosomes. Red and blue arrows indicate multipolar mitotic spindles and miscongressed chromosomes respectively. **B.** Quantification of H3P in spheroids. The percentage of H3P was calculated as the number of H3P-positive cells compared to the total number of nuclei in 19 control- and 37 treated-spheroid sections (Mann-Whitney *U*-test).

Figure 4

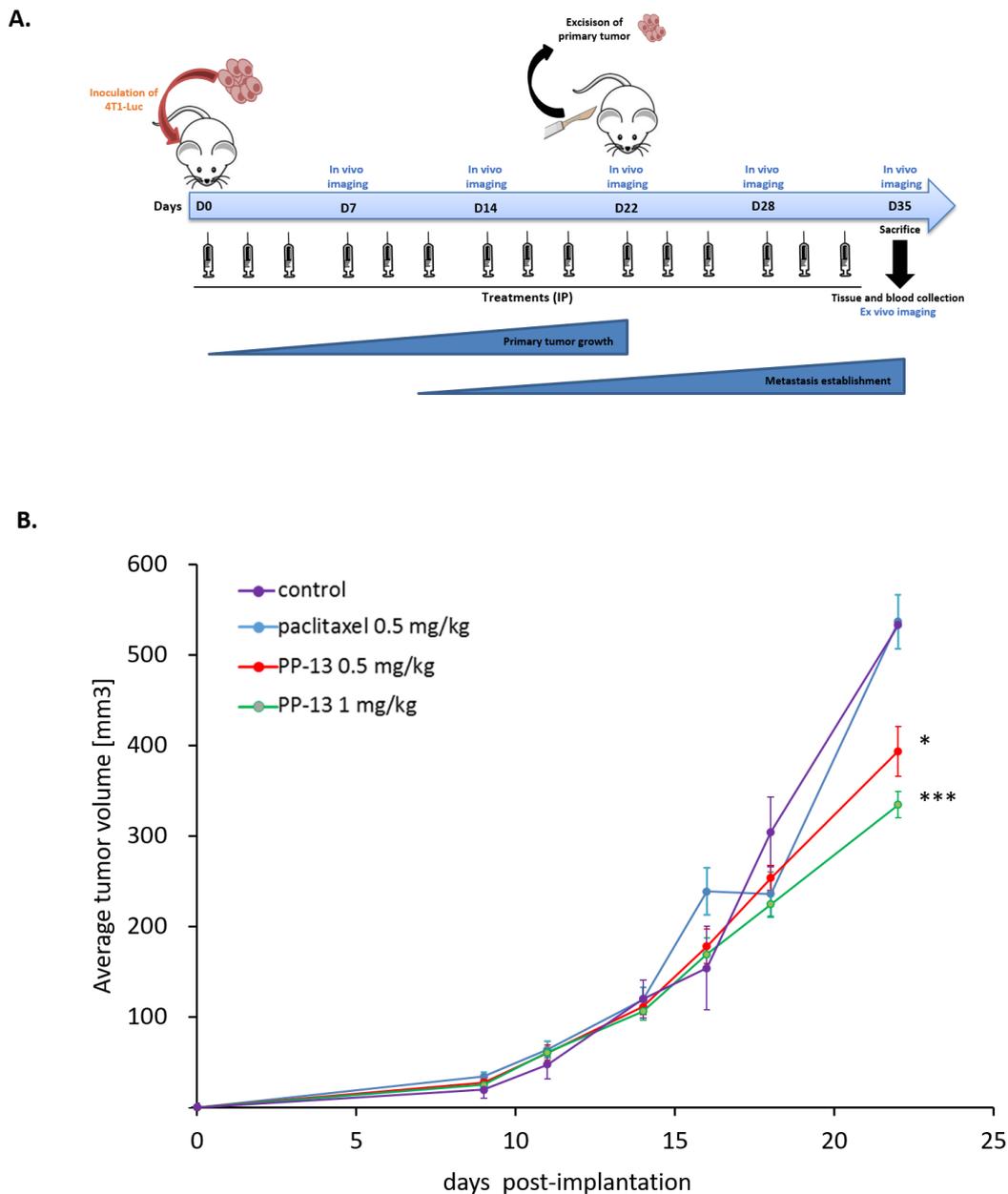


Figure 4: Effects of PP-13 on primary tumour growth after intraperitoneal administration in a 4T1-rvLuc2 orthotopic breast tumour model. A. Schematic representation of the treatment plan. Abbreviations: IP, intraperitoneal. **B.** Growth and primary tumour volume of vehicle, 0.5 mg/kg paclitaxel, 0.5 mg/kg PP-13 or 1 mg/kg PP-13 treated animals over the time. Data are expressed as mean \pm SEM (n=8 mice/group) (One-way ANOVA with Bonferroni post-tests).

Figure 5

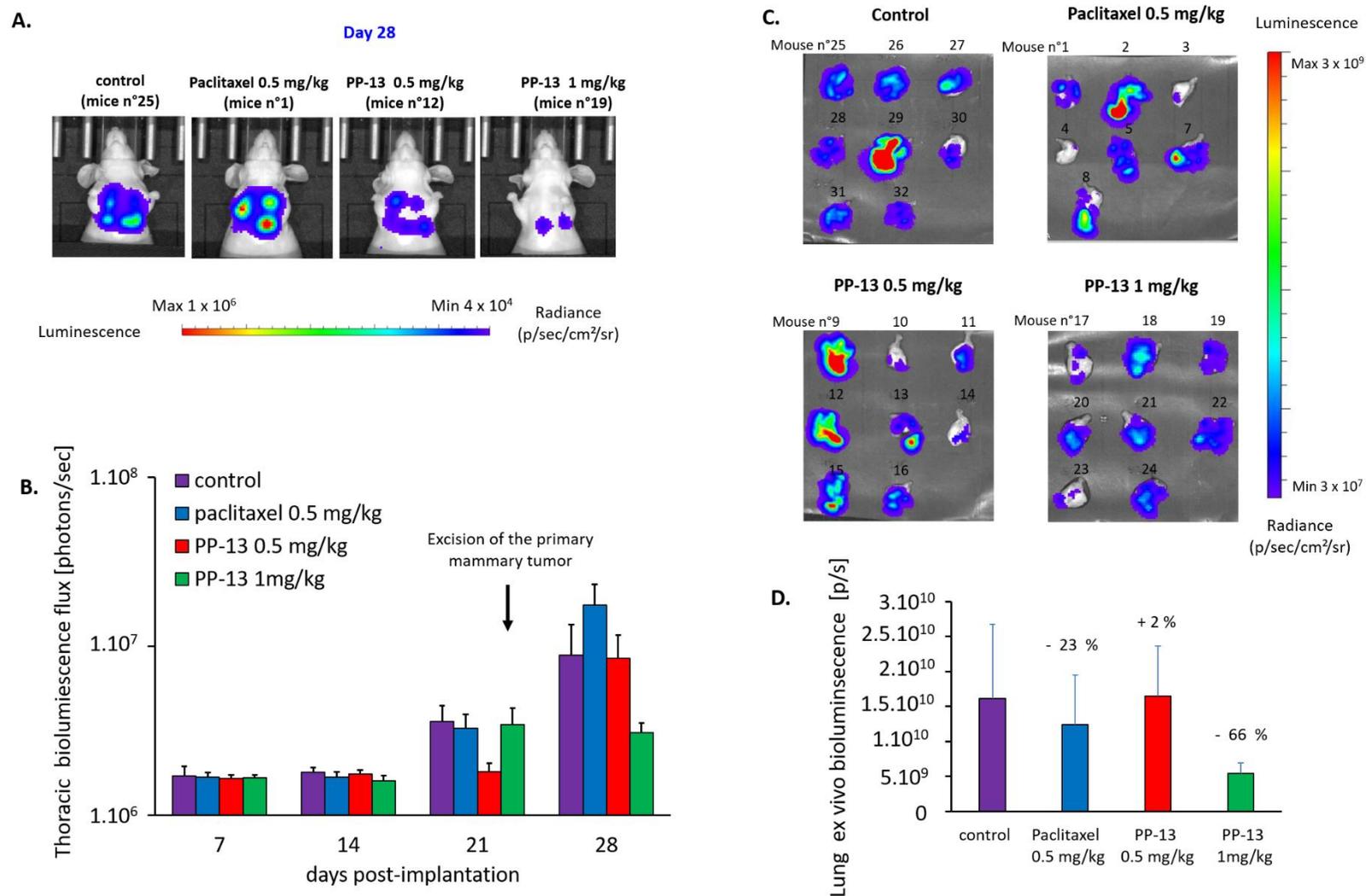


Figure 5: Effects of PP-13 treatment on metastasis development in a 4T1-rvLuc2 orthotopic breast tumour model. **A.** Representative *in vivo* bioluminescence images of the thoracic metastases (ventral view) in a mouse, at day 28 after tumour implantation. **B.** Quantification of *in vivo* bioluminescence imaging of the thoracic areas over the time (ventral and dorsal views). Data are expressed as mean \pm SEM (n=8 mice/group). **C.** Representative *ex vivo* bioluminescence images of the lungs at Day 36 after tumour implantation (n=8 lungs/group, 8 mice/group except for paclitaxel-treated group (7 mice/group)). **D.** The metastatic load in the lungs was estimated by quantifying bioluminescence of these areas and shown as a percentage \pm SEM of the control group. Numbers indicate the percentage of metastasis inhibition in treated mice compared to control group.

Figure 6

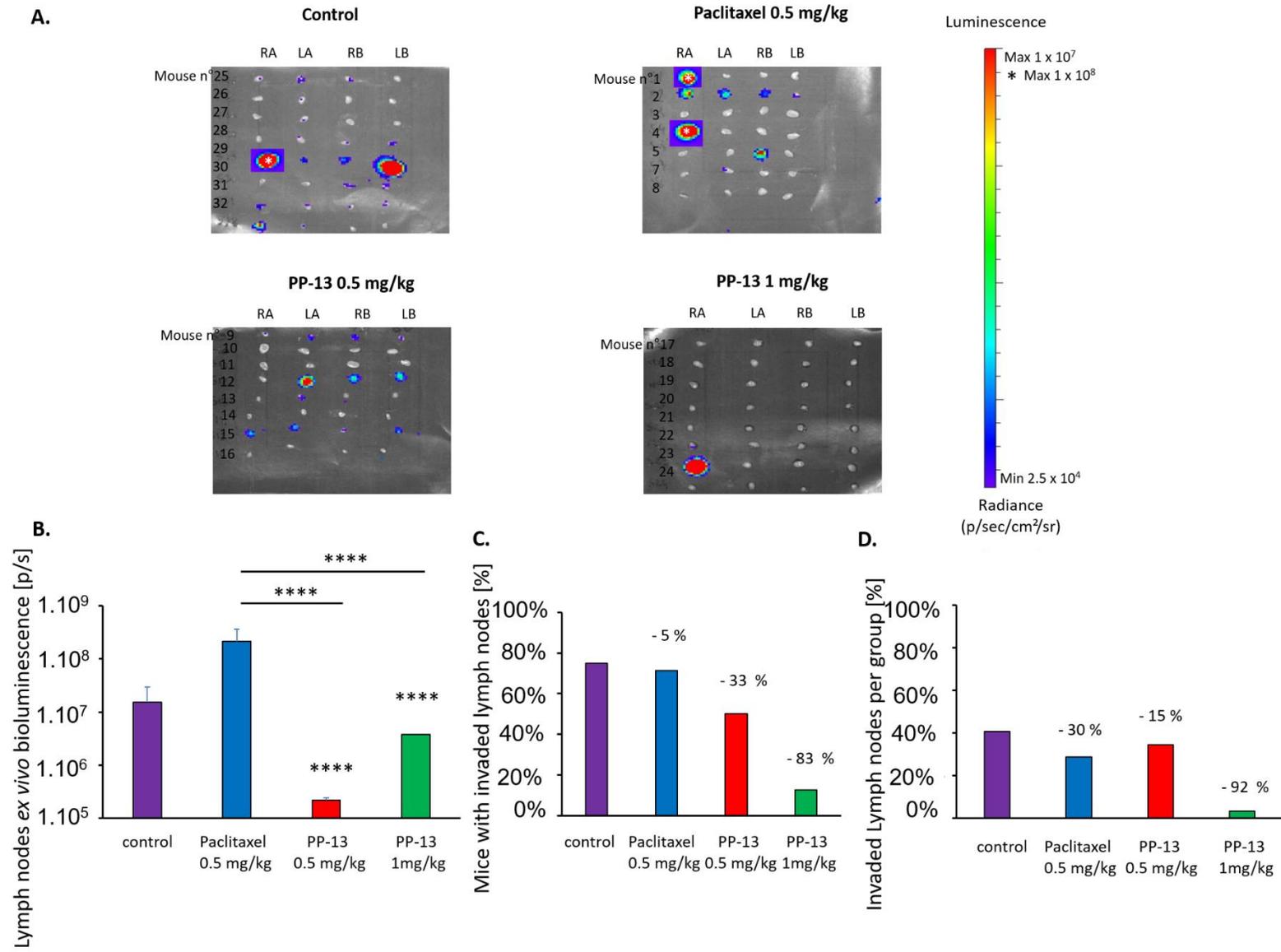


Figure 6: Effects of PP-13 on lymph node metastatic progression in an orthotopic breast tumour model. *Ex vivo* bioluminescence imaging of the lymph nodes (n=32 lymph nodes/group, 8 mice/group) at day 36 after tumour implantation. **A.** *Ex vivo* bioluminescence images of lymph nodes. **B.** The metastatic load in the lymph nodes was estimated by quantifying bioluminescence of these areas and shown as a percentage \pm SEM of the control group. **C.** The number of mice harbouring at least one metastasis in the lymph nodes at day 36 was scored in each condition. Results are expressed as percentage \pm SEM of the control group. Numbers indicate the percentage of metastasis inhibition in treated mice compared to control group. **D.** The invaded lymph nodes in the animals were numbered in each condition and represented as percentage \pm SEM of the control group. Numbers indicate the percentage of metastasis inhibition in treated mice compared to control group. Abbreviations: RA, right axillary lymph nodes; LA, left axillary lymph nodes; RB, right brachial lymph nodes; LB, left brachial lymph nodes.

Table 1: Sensitivity of various cancer cell lines to PP-13 and paclitaxel

The drug concentrations required inhibiting cell growth by 50% (IC_{50}) at 72 h in various cancer cells cultured in 2D-monolayer (2D) or spheroids. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments (in $nmol.L^{-1}$). HeLa mEGFP- α -tubulin and mRFP-H2B cells were named HeLa; 4T1 mRFP-H2B is named 4T1.

Cell lines and condition		PP-13 IC_{50} [$nmol.L^{-1}$]
HeLa	2D	150
	Spheroids	200
A549	2D	120
	Spheroids	> 10,000
4T1	2D	67.5
	Spheroids	200

Table 2: Plasma clinical chemistry parameters analysis

Biochemical analysis of the plasma samples from control, paclitaxel and 1mg/kg PP-13 treated mice. Data represent the mean \pm SD of 6 mice per group.

Serum biochemistry	control	paclitaxel 0.5 mg/kg		PP-13 1 mg/kg	
		Mean value	Significance (p)	Mean value	Significance (p)
Potassium (mEq/L)	6.3 \pm 0.8	6.6 \pm 0.9	NS	5.8 \pm 0.8	NS
Chloride (mEq/L)	113.2 \pm 1.8	110.3 \pm 3.4	NS	113.0 \pm 1.7	NS
Calcium (mg/dL)	9.7 \pm 0.3	9.6 \pm 0.1	NS	9.7 \pm 0.4	NS
Phosphorus (mg/dL)	8.2 \pm 1.9	5.4 \pm 0.2	p < 0.005	6.5 \pm 0.7	NS
Glucose (g/l)	2.1 \pm 0.4	1.6 \pm 0.1	p < 0.037	2.1 \pm 0.3	NS
Aspartate amino-transferase (UI/L)	201.5 \pm 48.2	188.5 \pm 56.4	NS	205.7 \pm 34.7	NS
Alanine amino-transferase (UI/L)	33.3 \pm 11.3	48.5 \pm 10.4	NS	38.0 \pm 12.2	NS
Alkaline phosphatase (UI/L)	52.5 \pm 12.3	50.2 \pm 9.3	NS	58.5 \pm 15.2	NS
Total bilirubin (mg/dL)	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.2	NS	0.2 \pm 0.1	NS
Total proteins (g/L)	42.0 \pm 2.1	43.7 \pm 1.9	NS	43.7 \pm 2.2	NS
Albumin (g/L)	23.0 \pm 1.5	23.8 \pm 2.1	NS	24.5 \pm 2.3	NS
Globulins (g/dL)	1.9 \pm 0.2	2.0 \pm 0.2	NS	1.9 \pm 0.1	NS
Cholesterol (g/l)	0.7 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	NS	0.8 \pm 0.1	NS
Triglycerides (g/l)	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	NS	0.6 \pm 0.1	NS
Creatinine (mg/l)	9.7 \pm 3.4	2.3 \pm 0.5	p < 0.004	4.0 \pm 3.9	NS
Blood Urea Nitrogen (g/l)	0.2 \pm 0.02	0.2 \pm 0.04	NS	0.1 \pm 0.02	p < 0.018

Table 3: Haematological analysis

Complete blood count test and leukocyte count of the plasma samples from control, paclitaxel and 1mg/kg PP-13 treated mice. Data represent the mean \pm SD (n=8 mice/group).

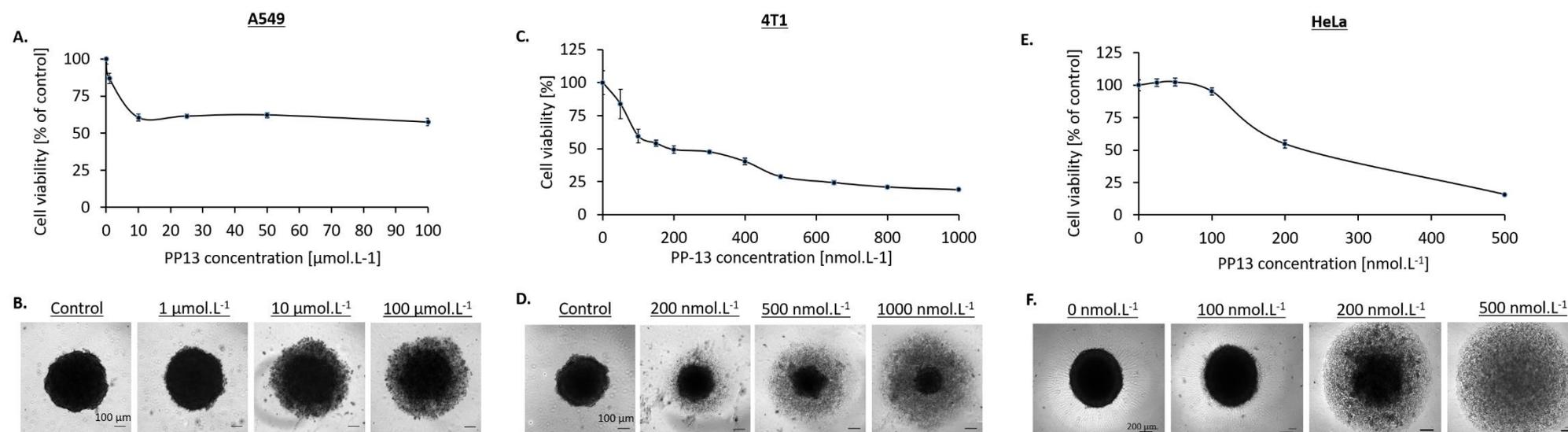
Haematological analyses	control	paclitaxel 0.5 mg/kg		PP-13 1 mg/kg	
	Mean value	Mean value	Significance (p)	Mean value	Significance (p)
Red blood cells (RBC) (T/L)	8.16 \pm 0.58	7.21 \pm 0.96	NS	7.59 \pm 0.45	NS
Haemoglobin (g/dL)	13.71 \pm 1.01	12.42 \pm 1.66	NS	13.15 \pm 0.74	NS
Haematocrit (%)	40.83 \pm 3.31	35.48 \pm 4.63	NS	38.14 \pm 2.24	NS
Mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) (g/dL)	33.59 \pm 0.53	35.03 \pm 0.70	p < 0.01	34.46 \pm 0.51	NS
Mean Corpuscular Haemoglobin (MCH) (pg)	16.80 \pm 0.40	17.22 \pm 0.31	NS	17.31 \pm 0.30	NS
Mean corpuscular volume (MCV) (μM^3)	50.00 \pm 1.15	49.17 \pm 1.33	NS	50.25 \pm 1.28	NS
Red cell distribution index (RDI) (%)	15.03 \pm 0.97	14.93 \pm 0.80	NS	14.56 \pm 0.85	NS
White blood cells (WBC) (G/L)	18.3 \pm 3.49	11.78 \pm 3.95	p < 0.05	16.99 \pm 2.91	NS
lymphocytes (% of WBC)	50.09 \pm 8.19	39.10 \pm 16.90	NS	47.48 \pm 6.39	NS
Monocytes (% of WBC)	23.93 \pm 4.88	25.95 \pm 6.63	NS	21.05 \pm 1.17	NS
Granular cells (% of WBC)	25.99 \pm 3.96	34.95 \pm 11.77	NS	31.10 \pm 6.90	NS

Table 4: Bone marrows Analysis. Evaluation of the global cell abundance and megakaryocyte and leukocyte counts in the bone marrow from control, paclitaxel and 1mg/kg PP-13 treated mice. Data represent the mean \pm SD (n=8 mice/group).

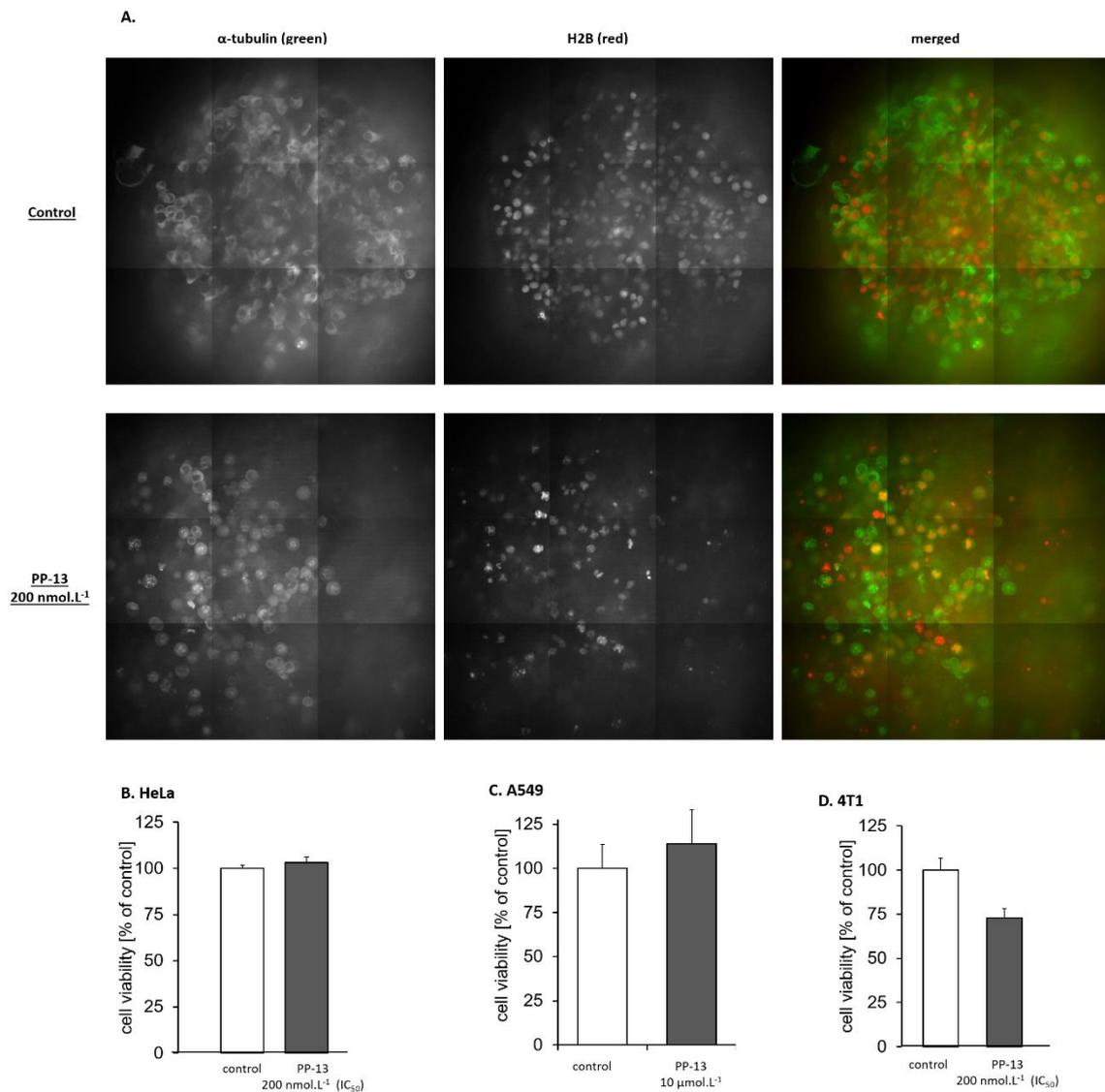
Haematological analysis of the bone marrow	control	paclitaxel 0.5 mg/kg		PP-13 1 mg/kg	
	Mean value	Mean value	Significance (p)	Mean value	Significance (p)
Cell abundance in the bone marrow: from score 1 (low abundance) to score 4 (high abundance)	2.38 \pm 0.92	3.14 \pm 0.38	NS	2.86 \pm 0.69	NS
megakaryocytes	16.00 \pm 6.52	28.71 \pm 12.51	NS	18.00 \pm 11.03	NS
Granular line (%)	74.88 \pm 8.97	63.36 \pm 13.00	NS	63.25 \pm 11.07	NS
Erythroblastic line (%)	14.31 \pm 9.59	22.14 \pm 14.39	NS	28.63 \pm 9.18	NS
Lymphocytes (%)	6.06 \pm 4.10	8.43 \pm 3.41	NS	5.19 \pm 3.61	NS
Monocytes (%)	4.75 \pm 2.73	6.14 \pm 3.86	NS	2.75 \pm 2.24	NS

Supplementary information

Suppl. Figure S1



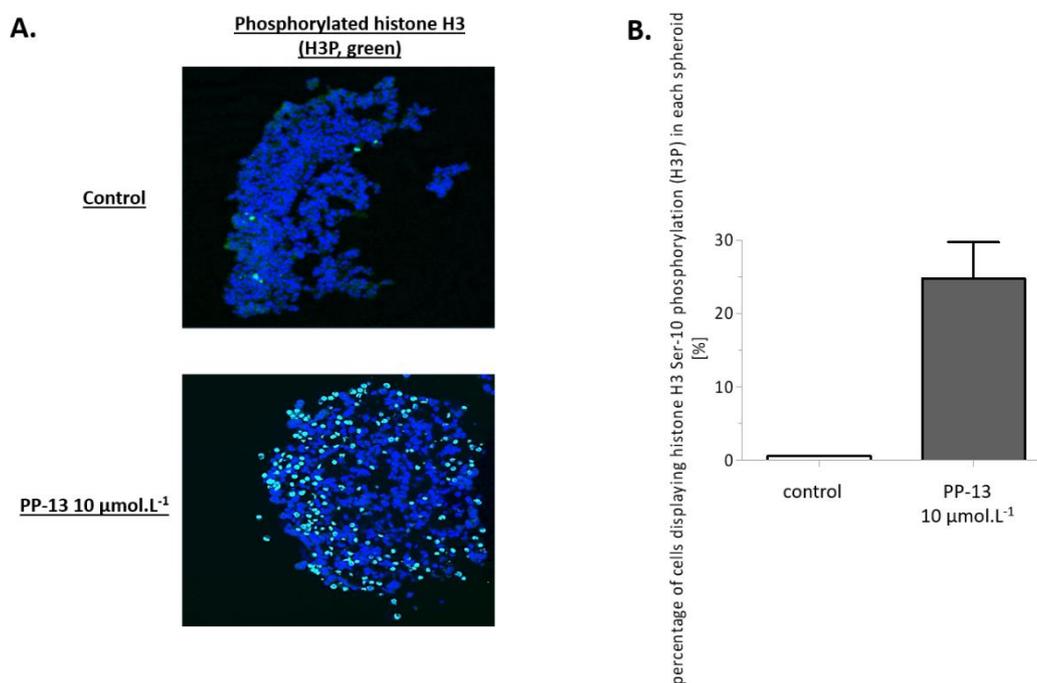
Suppl. Figure S1: Cell viability in spheroids treated for 24h with IC_{50} concentrations of PP-13 by CellTiter-Glo[®] assays. A549 (A,B), 4T1 mRFP-H2B (C,D) and HeLa mEGFP- α -tubulin mRFP-H2B spheroids (E,F) were treated for 72h with vehicle (control) or graduating concentrations of PP-13. A,C,E. Cell viability in spheroids after 72h of PP-13 treatment (in nmol.L^{-1} or $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Data represent the mean \pm SD from 3 independent experiments. B,D,F. Representative images of A549, 4T1 mRFP-H2B and HeLa mEGFP- α -tubulin mRFP-H2B spheroids in each condition.



Suppl. Figure S2

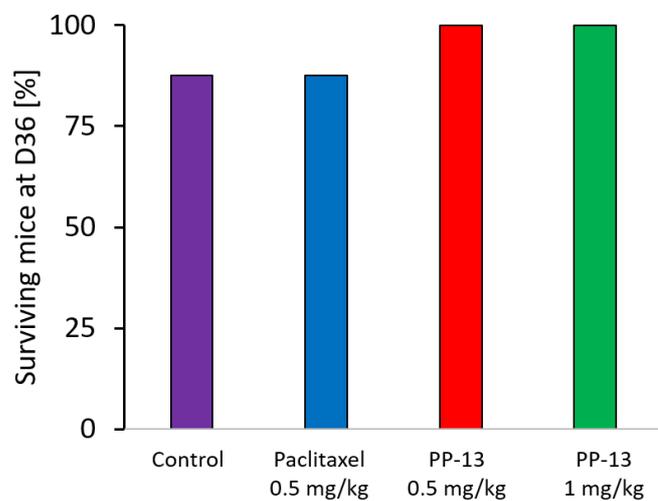
Suppl. Figure S2: Effects of PP-13 on spheroids visualized by a spinning disk videomicroscope. A. Representative images of HeLa mEGFP- α -tubulin mRFP-H2B spheroids treated for 24h with vehicle (control) or 200 nmol.L⁻¹ PP-13. In red: H2B-RFP, in green: α -tubulin-EGFP. B-D. Cell viability of HeLa mEGFP- α -tubulin mRFP-H2B (B.), A549 (C.) and 4T1 mRFP-H2B (D.) spheroids after 24h of treatment with their respective PP-13 IC₅₀ concentrations.

Suppl. Figure S3



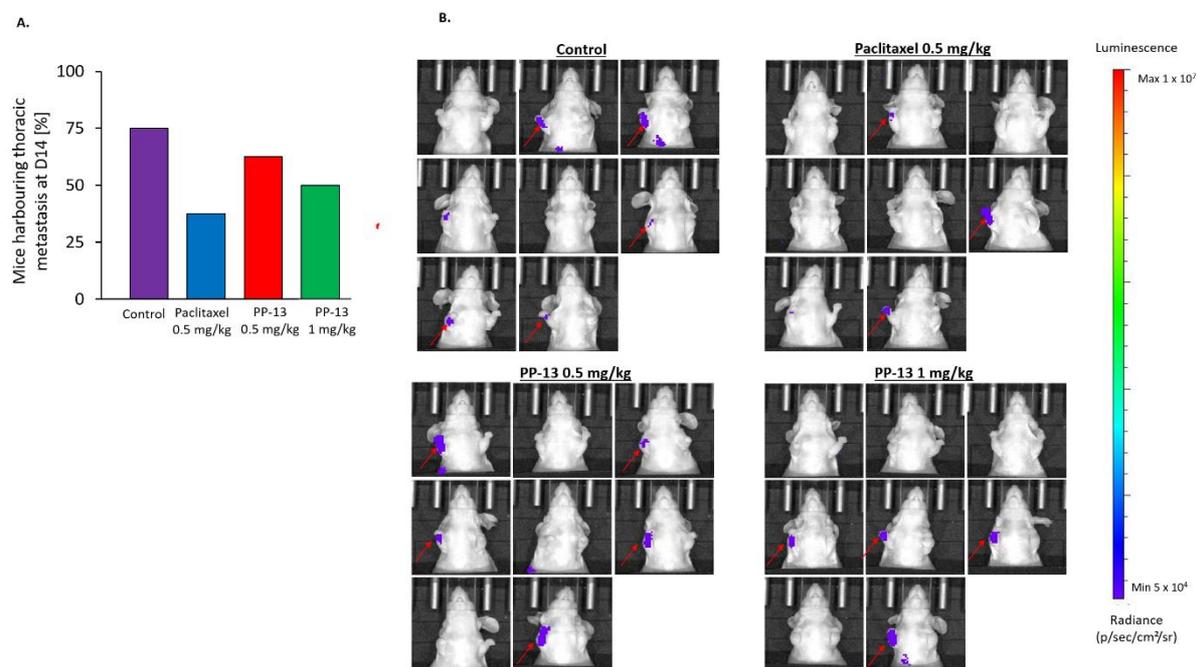
Suppl. Figure S3: Effects of PP-13 on phosphorylated-histone H3 (H3P) expression level in A549 spheroids by immunofluorescence analysis. A549 spheroids were treated for 24h with vehicle (control) or 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ PP-13 then analysed by immunofluorescence analysis. **A.** Representative confocal microscopy images of microtubules and H3P in spheroid sections. In green: H3P, in blue: nuclei/chromosomes. **B.** Quantification of H3P in spheroids (preliminar results). The percentage of H3P was calculated as the number of H3P-positive cells compared to the total number of nuclei in 2 control- and 3 treated-spheroid sections.

Suppl. Fig S4



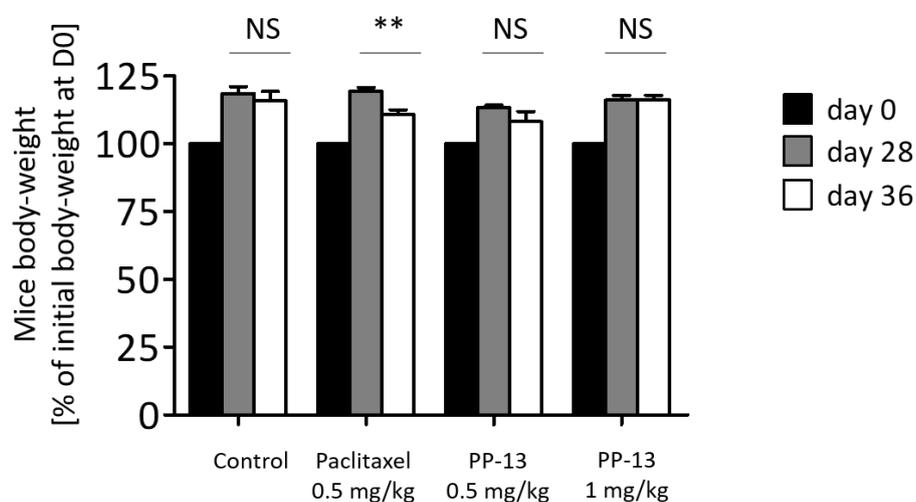
Suppl. Fig S4: Survival rate of mice in each group of the *in vivo* experimentation.

Suppl. Figure S5



Suppl. Figure S5: Thoracic metastasis after PP-13 treatment in an orthotopic mammary tumour model. Evaluation of the metastasis progression at Day 14 by in vivo bioluminescence imaging of the thoracic areas A. Mice harbouring thoracic metastasis at Day 14 in each group. B. In vivo thoracic bioluminescence images of mice at Day 14.

Suppl. Figure S6



Suppl. Figure S6: Toxicity evaluation of PP-13 treatment in a mouse orthotopic mammary tumour model. Mice body-weight at Day 0, Day 28 and D36 in each group. Data are presented as percentage of mice body-weight at a determined Day compared to the initial body-weight at Day 0. Results are expressed as mean \pm SEM (n= 8 mice/group) (comparison of Day 28 VS Day 36, Two-way ANOVA with Bonferroni post-tests).

3.2.3.4 Conclusions

Le nouvel agent poison du fuseau PP-13 que nous avons précédemment identifié semble avoir un potentiel thérapeutique intéressant en raison de sa faible toxicité et de ses effets antitumoraux et antimétastatiques *in vitro* et *in vivo*. Des études précliniques complémentaires de toxicité aiguë et chronique doivent à présent être réalisées afin d'identifier la fenêtre thérapeutique de PP-13. L'étude d'une combinaison de traitement associant PP-13 à une autre chimiothérapie ou une thérapie ciblée est envisagée pour le traitement de différents cancers (principalement des cancers chimiorésistants) en alternative aux combinaisons à base de paclitaxel.

3.2.4 Résultats complémentaires

Dans le cas du modèle murin de tumeur mammaire orthotopique 4T1, l'imagerie de bioluminescence *in vivo* a été réalisée afin d'évaluer la croissance tumorale au cours du temps, en complément de la mesure du volume tumorale au pied à coulisse. Comme le montrent les Figure 48B et C, le paclitaxel n'a pas montré de différence significative du signal de bioluminescence à J22 par rapport au contrôle. Le signal de bioluminescence dans la tumeur primaire a diminué à J22 dans les groupes traités par PP-13 comparativement au groupe contrôle (Figure 48A et B). Cette réduction n'était cependant pas statistiquement significative pour le groupe PP-13 de 1 mg / kg en raison d'une grande variabilité interindividuelle. Il est à noter qu'en présence de 0,5 mg / kg de PP-13, l'intensité du signal a augmenté graduellement jusqu'au jour 7 et a chuté par la suite (Figure 48A et B), probablement en raison de la nécrose retrouvée dans la tumeur primaire (Figure 49).

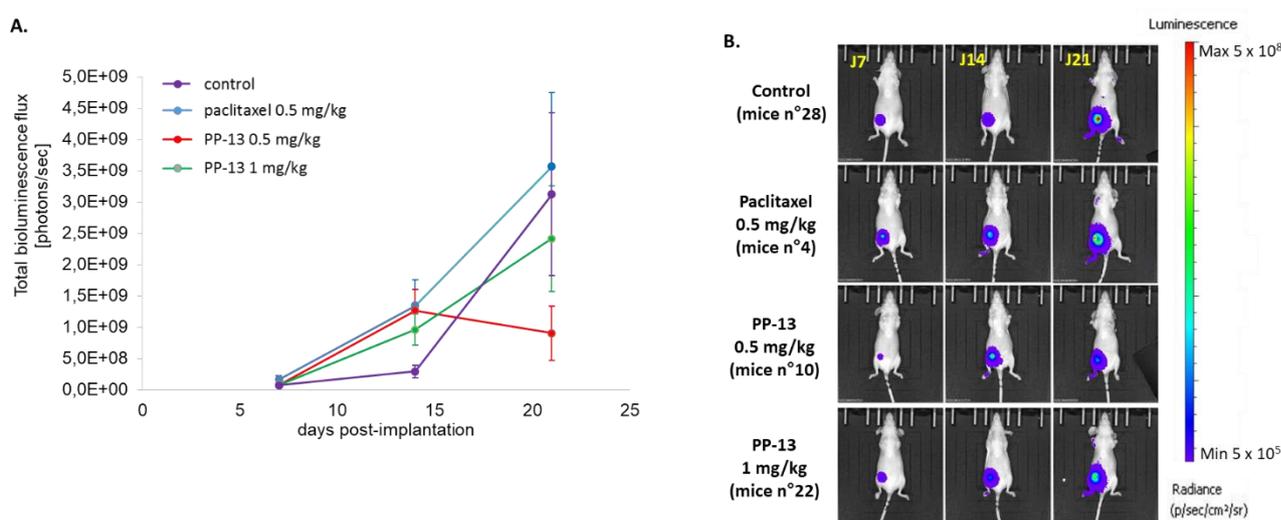


Figure 48. Effets de PP-13 sur la croissance tumorale dans un modèle de cancer mammaire orthotopique 4T1-rvLuc2. **A.** Imagerie de bioluminescence *in vivo* de la tumeur primaire. Les données sont exprimées comme des moyennes \pm SEM (n=8 souris/groupe). **B.** Images de bioluminescence *in vivo* des tumeurs primaires 4T1-rvLuc2 (vue dorsale) des souris contrôle et traitées au cours du temps. Une souris représentative par condition est montrée.

La réaction enzymatique de la luciférase nécessite un apport suffisant d'ATP, d'oxygène et de luciférine exogène. Tout processus qui perturbe cet équilibre (comme la nécrose, l'apoptose cellulaire, ou l'hypoxie tissulaire) entraîne une réduction de l'intensité du signal³⁵⁹. Les

analyses macroscopiques et histologiques des tumeurs primaires ont montré que 88% des tumeurs dans le groupe traité par 0,5 mg / kg PP-13 ont présenté des zones nécrotiques à J22 comparativement aux autres groupes (Figure 49A). De plus, le score moyen de nécrose au sein des tumeurs primaires de ce groupe est plus élevé que dans les groupes contrôle et paclitaxel (Figure 49B et C) ce qui peut expliquer la diminution artificielle de bioluminescence pour ces tumeurs au-delà de J14 (Figure 48A et B). Ces données suggèrent par ailleurs que les effets anti-tumoraux de PP-13 pourraient en partie résulter d'une induction de la nécrose cellulaire.

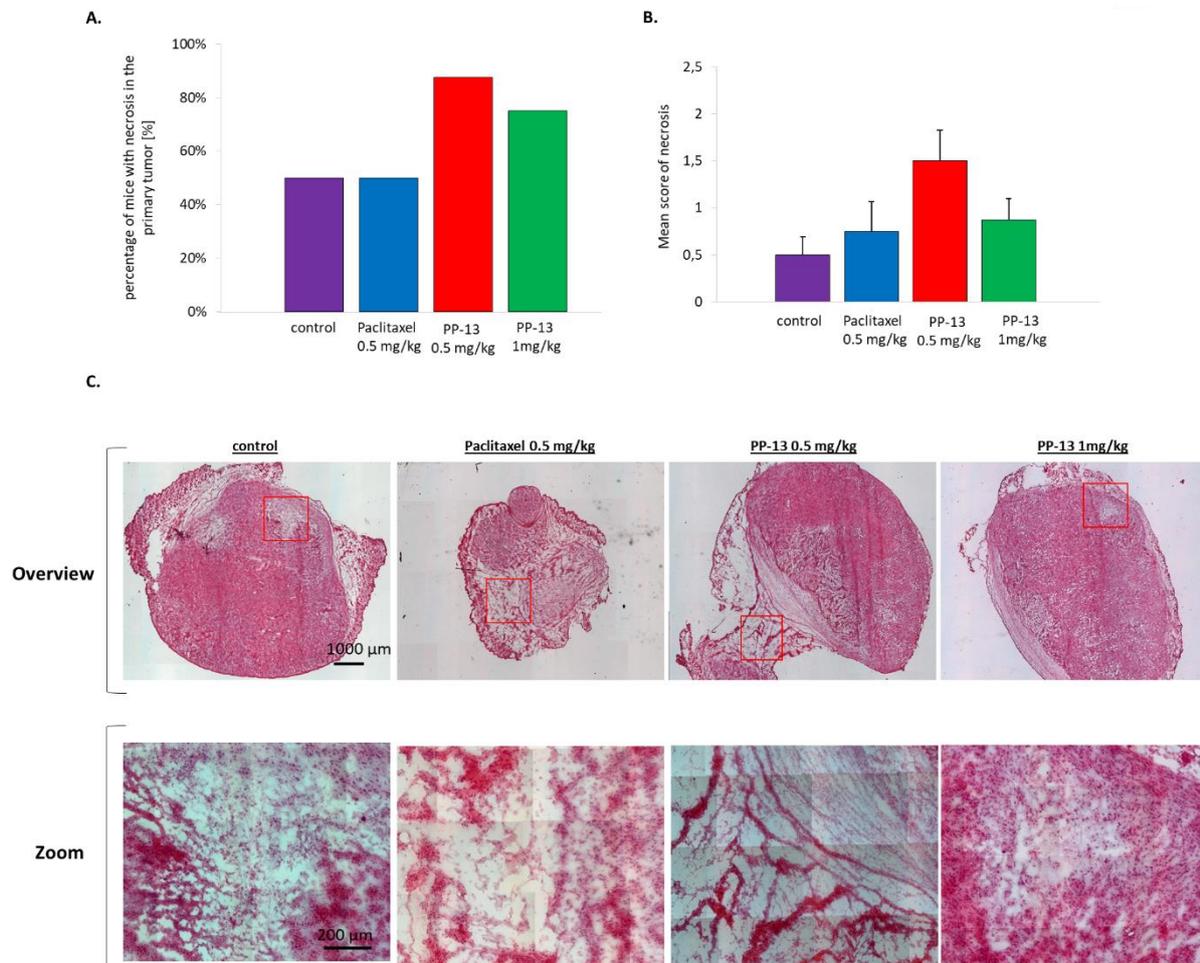


Figure 49. Induction de nécrose dans les tumeurs primaires dans un modèle orthotopique de cancer mammaire 4T1-rvLuc2 22 jours après l'implantation tumorale. A. La présence de nécrose dans les tumeurs primaires a été évaluée par analyse macroscopique des tissus par un pathologiste. Le pourcentage de souris présentant de la nécrose dans la tumeur primaire dans chaque groupe (n=8souris/groupe). B. Score moyen de nécrose dans chaque condition. La nécrose a été estimée dans chaque tumeur primaire par un pathologiste selon un score de nécrose (score 0 : pas de nécrose, score 4 : haut degré de nécrose) (n=8 souris/groupe). C. Les tissus tumoraux congelés ont été coupés et colorés par hématoxyline et éosine (HE). Une image représentative de chaque groupe est montrée (vue globale et zoom).

DISCUSSION

4 DISCUSSION

Les microtubules sont depuis longtemps une cible reconnue pour le traitement des cancers. De nombreux agents altérant la dynamique des microtubules ont été développés (taxanes, vinca-alcaloïdes) et représentent encore aujourd'hui une part importante des thérapies médicamenteuses utilisées en clinique. Cependant, ces drogues sont généralement responsables de nombreux effets indésirables invalidants et leur efficacité clinique est restreinte par de nombreux mécanismes de chimiorésistance nécessitant l'identification de nouvelles options thérapeutiques pour les contourner.

Dans ce contexte, notre équipe a réalisé un criblage cellulaire phénotypique d'une chimiothèque nationale et identifié de nouveaux composés présentant un pharmacophore commun « 6-méthyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine » (Figure 41) et possédant une activité antimittotique par dépolymérisation des microtubules.

4.1 PP-13 : un nouvel agent poison du fuseau

4.1.1 Les analogues pyrrolo-pyrimidine

Des molécules analogues présentant le noyau de base pyrrolopyrimidine ont déjà été citées dans la littérature et présentent un intérêt en cancérologie. Il s'agit pour la plupart d'inhibiteurs sélectifs de certains acteurs moléculaires impliqués dans les principales voies de signalisation intracellulaires. Ainsi, certains dérivés de cette famille sont des inhibiteurs directs d'Akt³⁶⁰, de Src³⁶¹, d'IGF1R³⁶², d'EGFR/HER2³⁶³ et ont montré des effets anticancéreux intéressants dans des modèles tumoraux *in vitro* ou *in vivo*. Cependant, aucune de ces molécules n'a été développée pour une utilisation clinique jusqu'à aujourd'hui. D'autres dérivés ont également été identifiés comme des agents antimittotiques mais leur étude s'est souvent arrêtée à la synthèse d'analogues et à l'étude de leurs effets cellulaires^{364,365}.

4.1.2 Pyrrolo-pyrimidine et inhibition de kinases

De par leur structure chimique, les composés pyrrolo-pyrimidine que nous avons identifiés étaient pressentis comme de potentiels agents inhibiteurs de tyrosine kinases³⁶⁶. Le kinome array que nous avons réalisé n'a cependant révélé aucune action inhibitrice pour trois de ces dérivés (parmi lesquels PP-2 et PP-13, testés à des concentrations 1 et 10 $\mu\text{mol/L}$) sur les 450 kinases étudiées (incluant les kinases mitotiques, les kinases des voies de signalisation intracellulaires et les kinases mutées impliquées dans les principaux cancers). Ceci montre que ces composés n'ont pas d'activité directe sur les kinases cellulaires.

4.1.3 Pyrrolo-pyrimidine et tubuline

Les études d'interactions ont montré que PP-13 se lie directement à la tubuline, sur le même site de liaison que la colchicine, et selon une constante d'affinité de $9,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Il en résulte une désorganisation des microtubules à l'origine d'un blocage SAC-dépendant des cellules en

prométaphase. L'affinité d'un ligand pour la tubuline est directement corrélée au potentiel antimitotique et à la cytotoxicité de celui-ci³⁶⁷. Cette considération pourrait expliquer les différences d'effets cellulaire et subcellulaire que nous observons entre PP-2 et PP-13. En effet, PP-2 présente une constante d'affinité 2 fois plus faible (d'environ $3,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$), et un effet dépolymérisant des microtubules 2 fois moins important que PP-13. Il en résulte un effet multipolaire et un blocage mitotique moins marqués ainsi qu'une IC_{50} en moyenne 10 fois plus élevée que PP-13 sur les lignées cancéreuses humaines.

4.1.4 Relation structure-activité

L'activité des dérivés pyrrolo-pyrimidine est très variable selon la nature et l'encombrement stérique de leurs chaînes latérales. Seul le radical chimique en position 7 varie entre les structures chimiques de PP-2 et PP-13 à l'origine de leur différence d'affinité pour la tubuline (Figure 50).

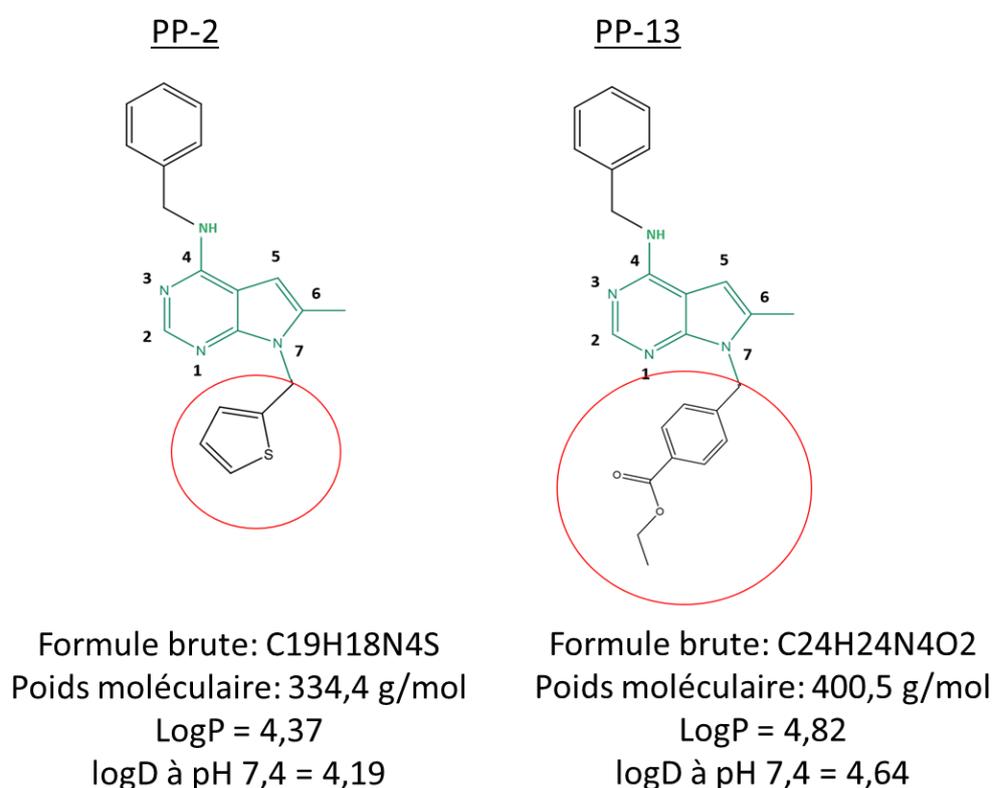


Figure 50. Structure et caractéristiques chimiques des composés PP-2 et PP-13.

La molécule PP-13 possède un groupement méthylbenzoate à cette position conférant à la molécule un encombrement stérique favorisant vraisemblablement la liaison au site colchicine de la tubuline. Il serait intéressant d'étudier les interactions PP-13 - tubuline par modélisation moléculaire (docking in silico) afin d'identifier les déterminants structurels de PP-13

responsables de son affinité/activité. Cette analyse permettrait d'optimiser la structure de PP-13 pour améliorer ses propriétés biologiques.

La fonction methyl en position 6 est présente chez tous les composés pyrrolopyrimidine identifiés lors du criblage, et pourrait être importante pour l'activité biologique de ces composés. Nous avons comparé les effets cellulaires et moléculaires d'un des dérivés pyrrolopyrimidine avec son analogue déméthylé en position 6, testé lui aussi lors du criblage haut-débit mais dépourvu d'activité. L'ensemble de nos essais *in vitro* sur ces 2 agents (étude de cytotoxicité et d'apoptose cellulaires, étude du cycle par cytométrie de flux et de l'organisation microtubulaire par immunofluorescence) ont montré une activité quasi nulle de la molécule déméthylée sur les lignées cancéreuses, suggérant ainsi le rôle essentiel du groupement methyl en position 6 pour l'activité antimittotique des dérivés pyrrolopyrimidine.

4.2 Activité antitumorale de PP-13 *in vitro*

4.2.1 Effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques de PP-13

PP-13 a une activité anticancéreuse qui peut être qualifiée de "large spectre" puisqu'inhibant significativement la prolifération de lignées représentatives de cancers humains nombreuses et variées incluant des lignées de mélanome, de côlon, de prostate, du col de l'utérus et de CBNPC. De façon intéressante, PP-13 réduit également la viabilité cellulaire de diverses lignées résistantes aux thérapies ciblées et aux chimiothérapies. Pour l'ensemble de ces lignées, PP-13 présente une IC₅₀ faible, généralement de l'ordre d'une centaine de nanomolaires. La seule exception à cette règle est la lignée de cancer du sein MCF7 qui présente une résistance relative à PP-13 tout comme au paclitaxel. Nous avons montré que l'effet antiprolifératif était directement lié à l'induction de l'apoptose cellulaire caspase 3-dépendante. Dans ce contexte, l'absence d'expression de la caspase 3 dans cette lignée³⁶⁸ pourrait interférer avec l'activation de l'apoptose cellulaire et ainsi avec l'efficacité biologique de PP-13. Pour confirmer cette hypothèse, nous pourrions inhiber l'expression de la caspase 3 par siRNA ou à l'aide de peptides synthétiques (Ac-DEVD-CHO, zVAD-fmk)^{369,370} dans les lignées de cancers du poumon et d'autres cancers précédemment étudiées et comparer l'IC₅₀ de PP-13 dans ces lignées comparativement aux lignées d'origine.

L'efficacité anticancéreuse de PP-13 a également été observée dans un modèle cellulaire tumoral en 3D. Ce modèle de sphéroïde multicellulaire est une alternative intéressante aux modèles de culture 2D car il permet de mimer de façon plus appropriée le microenvironnement tumoral, les interactions cellules – cellules et cellules – matrice extracellulaire ainsi que les gradients de nutriments et d'oxygène observés *in vivo*^{371–373,371}. Après traitement par PP-13, la prolifération des cellules cancéreuses cultivées en 3D est significativement réduite. L'IC₅₀ de PP-13 est très variable selon le type cellulaire, de l'ordre de 200 nmol.L-1 dans les cellules 3D HeLa et 4T1 et au-delà de 10 µmol.L-1 dans les sphéroïdes A549. Cette variation d'IC₅₀ est corrélée aux caractéristiques du sphéroïde (adhésion des cellules au sein du sphéroïde, taille du sphéroïde, distribution des cellules dans le cycle cellulaire, ...)^{373–376}.

4.2.2 Effets anti-angiogéniques de PP-13

L'angiogenèse et la vascularisation tumorale constituent une caractéristique du développement de nombreux cancers. De nombreux agents ciblant les microtubules ont montré, au-delà de leur activité sur la tumeur primaire, une inhibition de ces 2 mécanismes permettant de potentialiser leurs effets contre le cancer³⁷⁷. Il a été établi récemment que la réponse anti-vasculaire des agents antimitotiques était en partie due aux effets cytotoxiques et antiprolifératifs directs des drogues sur les cellules endothéliales. Cependant, leur action s'étendrait également à d'autres processus impliqués dans la néoangiogenèse et le maintien de la microvasculature (adhésion et migration des cellules endothéliales, interactions entre cellules)³⁷⁷.

Nos résultats préliminaires dans un modèle *in vitro* d'angiogenèse utilisant des cellules endothéliales HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell), montrent que PP-13 induit un effet anti-angiogénique significatif dès 5 $\mu\text{mol/L}$. Grâce à leurs propriétés de différenciation, les cellules HUVEC peuvent générer des réseaux tubulaires tridimensionnels *in vitro*. L'effet anti-angiogénique des drogues est alors quantifié selon 4 critères : le nombre de tubules formés et leur longueur, la surface totale du réseau et le nombre de points de jonction entre ces tubules. Il apparaît que PP-13 réduit le nombre de points de branchement, de boucles, la longueur totale des tubes et l'aire couverte par les cellules cependant il n'est pas exclu que cette réponse anti-angiogénique résulte d'un effet toxique sur les cellules endothéliales plutôt que d'un effet direct sur la néovascularisation. On pourrait également établir grâce à cet essai les effets de PP-13 sur la microvasculature tumorale en ajoutant la molécule une fois les structures tubulaires formées (24h en moyenne après l'ensemencement des cellules HUVEC sur matrigel). Ce test est cependant limité car il ne prend pas en compte les interactions avec le microenvironnement de la tumeur. Pour compléter nos résultats, nous réaliserons un immunomarquage CD31, marqueur des vaisseaux sanguins, sur des coupes fines des tumeurs de l'expérience *in vivo* afin d'évaluer la densité microvasculaire après traitement par PP-13³⁷⁸. Nous pourrions également réaliser un test *in vivo* consistant à implanter des éponges en sous cutané chez la souris, afin de mesurer la quantité d'hémoglobine, et déterminer ainsi la réponse angiogénique en présence de PP-13³⁷⁹.

4.2.3 Effet anti-migratoire de PP-13

Nous avons réalisé des tests de blessure *in vitro* afin d'évaluer la capacité de PP-13 à inhiber la migration des cellules cancéreuses. Nous avons pour cela eu recours à 3 lignées cancéreuses humaines (A549, HeLa) ou murines (4T1) ayant des propriétés invasives et métastatiques importantes *in vivo*. Ces essais ont montré que PP-13 réduisait significativement le recouvrement de la blessure dans ces 3 lignées à des concentrations équivalentes à l'IC₅₀. L'observation des cellules pendant seulement 12h permet en théorie de s'affranchir de l'effet de la prolifération cellulaire sur le recouvrement de la blessure (le temps de doublement moyen de ces lignées étant d'environ 24h). Cependant, on ne peut pas exclure que cet effet sur la réponse migratoire résulte plus du blocage mitotique et de l'effet cytotoxique direct de PP-13 que de l'effet sur la migration même des cellules. Pour répondre à cette question, nous aimerions réaliser des expérimentations de cell-tracking, afin d'évaluer l'effet de la drogue sur le mouvement et la vitesse d'une cellule isolée en culture, et des tests de migration dits transwells pour déterminer l'effet de la drogue sur la migration cellulaire à travers une membrane poreuse. On envisage aussi de réaliser des tests d'invasion *in vitro* permettant d'établir les capacités de PP-13 à inhiber la destruction de la matrice extracellulaire par les cellules cancéreuses (via l'action des métalloprotéinases de la matrice (MMP)).

4.3 Activité anti-tumorale de PP-13 *in vivo*

4.3.1 Effet antitumoral de PP-13 *in ovo*

Sur la base des résultats obtenus *in vitro*, nous avons évalué l'efficacité anti-tumorale de PP-13 *in vivo*. Dans un premier temps, nous avons réalisé un essai *in ovo* de xéngreffe tumorale sur œuf embryonné de poule. Ce modèle constitue depuis quelques années une nouvelle alternative au modèle murin pour l'étude préclinique de nouvelles molécules³⁸⁰. Il a un intérêt tout particulier en cancérologie³⁸¹⁻³⁸⁵ car l'immunodéficiences physiologique de l'embryon favorise la prise de greffe tumorale³⁸⁶ et l'importante vascularisation de l'œuf permet l'étude des processus métastatiques et d'angiogenèse inhérents à la croissance tumorale³⁸⁷⁻³⁸⁹. Ce modèle expérimental présente de nombreux avantages comparativement aux modèles murins :

- une durée d'expérimentation plus courte (généralement une vingtaine de jours, comparativement à 2-3 mois chez la souris)
- des quantités faibles de drogues nécessaires
- un prix global en moyenne 5 à 10 fois moins élevé que chez la souris
- une plus grande puissance statistique (en moyenne 17-20 embryons par condition)
- l'évaluation facile et sensible de l'invasion métastatique, par la quantification par qPCR des séquences humaines répétitives Alu³⁹⁰ des cellules cancéreuses ayant migré à l'opposé de la zone d'implantation de la tumeur (seuil de détection de 25 cellules/tissu^{389,390})
- L'évaluation rapide et globale de la toxicité de la drogue sur la survie et la détection d'anomalies morphologiques et fonctionnelles des embryons

- Pas besoin d'autorisation préalable du comité d'éthique pour l'expérimentation animale

Grâce à ce modèle expérimental, nous montrons que la molécule PP-13 a une activité anti-tumorale et anti-métastatique sur les cellules de CBNPC H358 *in vivo*. L'activité anticancéreuse intrinsèque de PP-13 a été testée à une concentration correspondant à l'IC₅₀ de la molécule *in vitro*, ce qui est faible pour une utilisation *in vivo*. Il serait intéressant de réaliser une étude dose-effet sur ce modèle afin de déterminer l'efficacité antitumorale maximale.

4.3.2 Effet anti-tumoral et anti-métastatique *in vivo* de PP-13

Nous avons confirmé ces résultats en utilisant un modèle tumoral orthotopique de cancer mammaire chez la souris, développé par la plateforme d'imagerie du petit animal « Optimal » de l'Institut. Ce modèle orthotopique, contrairement aux modèles hétérotopiques, permet de prendre en compte les interactions entre les cellules tumorales et le microenvironnement de l'organe cible, et développe plus souvent des métastases³⁹¹. Le modèle allogénique 4T1 est bien documenté et approprié pour évaluer l'efficacité de nouvelles molécules anticancéreuses sur les cancers du sein avancés³⁹². Les cellules 4T1 induisent le développement rapide d'une tumeur mammaire et la diffusion de métastases principalement dans les ganglions lymphatiques et les poumons comme le feraient les tumeurs humaines de cancer du sein. En réalisant l'excision de la tumeur primaire 22 jours après l'implantation, l'effet de PP-13 sur les phases tardives du processus métastatique (dissémination, extravasation et colonisation) peut être évalué à plus long terme.

4.3.2.1 Effet anti-tumoral *in vivo*

L'effet inhibiteur de PP-13 est dose-dépendent mais modéré sur la croissance de la tumeur primaire. On observe une diminution significative de 30 % du volume tumoral 22 jours après l'implantation. Nous avons complété ces données par imagerie de bioluminescence. L'imagerie de bioluminescence est un outil-clé pour étudier l'efficacité thérapeutique de nouvelles molécules anticancéreuses chez le petit animal lorsque la tumeur et les métastases sont peu accessibles³⁹³. Cette méthode d'imagerie moléculaire fonctionnelle consiste en l'injection des cellules cancéreuses 4T1 exprimant la luciférase, qui en présence de son substrat, la D-luciférine, conduit à l'émission d'un signal lumineux. Nous avons ainsi localisé et suivi de façon non-invasive et en temps réel la croissance tumorale et la diffusion métastatique. Cette technique est très sensible. Nous avons ainsi observé que le signal de bioluminescence de la tumeur primaire augmentait de façon exponentielle au cours du temps dans les groupes de souris contrôles et traitées par 1 mg/kg PP-13. Contrairement au volume tumoral mesuré au pied à coulisse, le signal de bioluminescence du groupe traité par PP-13 à 0.5 mg/kg chute en fin d'expérimentation. En effet, la réaction enzymatique de la luciférase requiert un apport suffisant en ATP, en oxygène et en luciférine exogène. Tout mécanisme perturbant cet équilibre, aboutit à une réduction de l'intensité du signal³⁵⁹. C'est notamment le cas lors de nécrose, d'apoptose cellulaire, ou d'hypoxie tissulaire. L'analyse de la nécrose dans la tumeur primaire par analyse macroscopique et histologique montre une nécrose très

marquée dans le groupe traité par PP-13 0.5 mg/kg comparativement aux autres groupes, ce qui peut expliquer cette baisse artificielle de la bioluminescence.

4.3.2.2 Effet anti-métastatique *in vivo*

Nous avons observé que PP-13 ne prévient pas la formation de métastases mais ralentit la diffusion métastatique et réduit la charge métastatique. Nos résultats *in vivo* suggèrent que cet effet inhibiteur semble résulter (tout du moins en partie) de l'effet cytotoxique direct sur les cellules tumorales plutôt que d'un effet direct sur la migration et l'invasion métastatique.

Dans le cadre de l'imagerie de bioluminescence *in vivo*, les phénomènes d'absorption, de dispersion et de transmission de la lumière sont fortement dépendant des caractéristiques intrinsèques des tissus avoisinants et de la profondeur de ceux-ci. Ils peuvent très largement moduler (de façon artefactuelle) l'intensité du signal qui ne reflète alors plus le nombre de cellules cancéreuses présentes³⁵⁹. Nous avons donc confirmé les résultats de bioluminescence *in vivo* par des analyses complémentaires des ganglions et des poumons par bioluminescence *ex vivo*.

Sur la base de l'ensemble de ces données, on peut en conclure que sur ce modèle de cancer mammaire orthotopique, la molécule PP-13 inhibe modérément la progression tumorale mais ralentit surtout la progression métastatique. A présent, nous aimerions tester des concentrations plus importantes de la drogue pour compléter l'évaluation de l'effet thérapeutique, mais cela ne sera possible que si la fenêtre thérapeutique de la molécule est suffisamment grande pour que cela ne génère pas de toxicité chez l'animal.

Le traitement débute le même jour que l'implantation des cellules cancéreuses (« non staged model ») afin d'évaluer son effet sur la prise tumorale. Il est administré par voie intrapéritonéale, une voie d'administration assez proche de la voie intraveineuse, qui permet de s'affranchir de l'effet de premier passage et facilite l'administration chez l'animal. Par la suite, pour des essais éventuels chez l'homme, il faudrait envisager une administration comme les autres agents ciblant les microtubules par voie intraveineuse. Il serait de plus intéressant de réaliser un second essai *in vivo* afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique de PP-13 sur des tumeurs établies.

4.4 Evaluation toxicologique de PP-13

Idéalement, les agents anticancéreux utilisés en clinique ne devraient comporter qu'une faible toxicité systémique. Or, les agents antimétaboliques conventionnels présentent souvent, de par leur mécanisme d'action non sélectif, un grand nombre d'effets indésirables (myélosuppression, nausées et vomissements voire mucite, neuropathie périphérique...)³¹¹. C'est notamment le problème observé ces derniers mois avec le docétaxel (TAXOTERE®), un antimétabolique de la famille des taxanes classiquement utilisés pour le traitement des cancers du sein avancés. Un encadrement de sa prescription est préconisé par l'ANSM et l'INCa depuis qu'il a été reconnu responsable de la mort de 7 patientes en raison d'effets indésirables majeurs (entérocolite sur terrain neutropénique).

Nous avons dans un premier temps évalué la toxicité de PP-13 *in vitro* sur des lignées humaines normales de fibroblastes pulmonaires (MRC5) et de kératinocytes (HaCat). PP-13

présente une activité cytotoxique sur ces lignées, avec une IC₅₀ très similaire à celles obtenues pour les lignées cancéreuses.

In ovo, nous n'avons pas observé de mortalité prématurée des embryons ni détecté d'anomalies de la taille, du développement, du nombre ou de la formation de leurs membres. Ce profil a priori non toxique reste cependant à confirmer dans la mesure où nous n'avons pas testé plusieurs concentrations. De plus, ce modèle ne permet pas de détecter certains effets indésirables classiquement retrouvés avec les antimétabolites (myélosuppression et toxicité digestive notamment).

Chez la souris, nous avons évalué la toxicité globale de PP-13 et surtout la toxicité chronique liée à son administration répétée. Aux concentrations utilisées, nous n'avons pas observé de perte de poids chez les souris traitées comparativement aux souris contrôles ni aucun changement de comportement des animaux (prostration, grattements, anorexie...). A la fin de l'expérimentation, les souris traitées ne présentaient pas d'anomalies de leurs bilans biochimique et hématologique par rapport aux souris contrôles, à l'exception d'une faible baisse de l'urée plasmatique. Dans la mesure où cette variation est isolée (pas d'anomalies de la créatinine plasmatique en parallèle), ceci ne semble pas présager d'une toxicité rénale. Ultérieurement, des analyses histologiques des différents tissus (rein, rate, foie, pancréas, intestin) permettront de confirmer ces premières constatations.

En conclusion, nos résultats préliminaires suggèrent que la molécule PP-13 semble peu toxique à des concentrations thérapeutiques, permettant d'envisager un potentiel développement clinique intéressant. Des essais *in vivo* de toxicité aiguë devront être réalisés afin de déterminer la fenêtre thérapeutique de PP-13 et la dose maximale tolérée.

4.5 Intérêt de PP-13 comparativement aux autres agents ciblant les microtubules

4.5.1 PP-13 et les agents ciblant les microtubules utilisés en clinique

Les agents ciblant les microtubules sont une classe d'agents anticancéreux reconnue depuis longtemps. Les principaux antimétabolites classiquement utilisés en cancérologie sont les taxanes et les vinca-alcaloïdes. Les taxanes induisent la stabilisation des microtubules et sont très largement utilisés dans les cancers solides avancés, incluant les cancers du sein, du poumon, de prostate et de l'ovaire. Les vinca-alcaloïdes sont quant à eux des agents dépolymérisant les microtubules principalement indiqués dans les lymphomes et leucémies³¹². A ceux-ci s'ajoutent d'autres agents plus récents tels que l'ixabépilone (IXEMPRA[®])³⁹⁴ au mécanisme d'action sensiblement similaire aux taxanes et l'éribuline (HALAVEN[®])^{395,396} un agent résistant au phénotype MDR qui sont tous deux indiqués en seconde ligne pour le traitement des cancers du sein métastatiques.

Nous avons choisi de comparer tout au long de nos travaux la molécule PP-13 avec un taxane, le paclitaxel, car en dépit de leurs mécanismes d'action antagonistes ils induisent tous deux une perte de la dynamique des microtubules à l'origine de leurs effets cellulaires. De plus, notre objectif étant de trouver une alternative thérapeutique pour le traitement des cancers solides avancés, il nous semblait plus approprié d'utiliser le paclitaxel, classiquement indiqué dans ces néoplasies, comme référence.

Il apparaît *in vitro* que le paclitaxel induit un arrêt mitotique plus marqué que PP-13: 33 nmol/L de paclitaxel sont suffisants pour induire le blocage de 80-95 % des cellules HeLa en mitose³⁹⁷ tandis que 125 nmol/L de PP-13 sont nécessaires pour arrêter 35 % des cellules en phase M. Ceci s'accompagne d'un effet cytotoxique du paclitaxel plus important sur de nombreuses lignées cancéreuses humaines, avec une IC₅₀ en moyenne 15-20 fois plus faible que PP-13. Seule la lignée de cancer du sein MCF-7 présente une résistance à PP-13 et au paclitaxel, avec une IC₅₀ d'environ 500 nmol/L pour ces 2 agents. Contrairement au paclitaxel, l'effet réduit de PP-13 sur les cellules en interphase semblent suggérer un effet moins toxique sur les cellules à prolifération lente et notamment un effet neurotoxique moindre. Pour confirmer cette hypothèse, il conviendrait de réaliser des tests de toxicité *in vitro* sur cellules neuronales. En conclusion, même si le paclitaxel semble être un agent antimitotique plus puissant *in vitro* que PP-13, il faut à présent confirmer cette tendance *in vivo* afin de comparer les 2 agents dans leur globalité (biodistribution, pharmacocinétique, pharmacodynamique, toxicité).

In ovo, PP-13 a exercé des effets antitumoraux et antimétastatiques similaires à ceux obtenus avec le paclitaxel, ce dernier étant administré à une dose 300 fois plus élevée.

In vivo, la molécule PP-13 semble présenter un bénéfice clinique par rapport au paclitaxel dans la mesure où elle induit une régression du volume tumoral tandis que le paclitaxel à cette même dose n'a aucun effet sur la tumeur primaire. De la même façon, PP-13 ralentit la progression métastatique et la charge métastatique au niveau ganglionnaire et pulmonaire comparativement au paclitaxel. Il a déjà été reporté que la lignée cellulaire 4T1 est résistante au paclitaxel. Nous nous sommes volontairement placés dans des conditions de traitement subthérapeutique pour le paclitaxel afin de pouvoir comparer les effets de celui-ci avec ceux potentiellement supérieurs de PP-13.

Dans les modèles *in ovo* et murin, il est difficile d'établir des différences de toxicité entre PP-13 et le paclitaxel car nous n'avons obtenu aucune toxicité apparente aux concentrations utilisées hormis un effet hypoglycémique, une augmentation du CCMH et une neutropénie induit par le paclitaxel *in vivo*. Des études de toxicité aiguës et chroniques doivent être réalisées pour ces 2 drogues afin d'approfondir cette question.

De plus, le paclitaxel, lorsqu'il est utilisé en clinique est très souvent combiné à d'autres agents chimiothérapeutiques afin de potentialiser l'effet anticancéreux. Il serait donc cohérent de comparer les effets de PP-13 et du paclitaxel respectivement en combinaison avec une ou plusieurs molécules anticancéreuses. Des essais préliminaires de combinaison de traitement *in vitro* ont montré que la combinaison de PP-13 avec d'autres agents chimiothérapeutiques comme le cisplatine n'était pas synergique tandis que l'effet de PP-13 combiné à des thérapies ciblées anti-EGFR semblait additif. Il faudrait donc tester *in vivo* ce type de combinaisons thérapeutiques.

4.5.2 PP-13 et chimiorésistance

Nous avons mis en évidence *in vitro* que PP-13 échappe aux mécanismes de chimiorésistance impliquant la surexpression des pompes d'efflux (MRP1, MRP2, P-gp, BCRP), de la même façon que d'autres analogues pyrrolo-pyrimidine³⁹⁸. Ces mécanismes impactent très fortement

l'efficacité des antimétabolites conventionnels tels que les taxanes et les vinca-alcaloïdes³¹¹. Depuis quelques années, de nombreux inhibiteurs de ces transporteurs membranaires ont été développés mais ils présentent souvent une forte toxicité et/ou n'ont pas montré d'efficacité *in vivo*³⁹⁹. Le seul recours pour contourner ces mécanismes dits « MDR » (Multi Drug Resistant) est donc de développer de nouveaux agents anticancéreux non transportés par ces pompes. L'eribuline récemment approuvée par la FDA montre l'intérêt grandissant pour ces nouveaux agents MDR résistants en clinique^{400,401}. Dans ce contexte, la molécule PP-13 pourrait donc avoir un fort potentiel clinique pour le traitement des cancers chimiorésistants, et prendre le relai des agents chimiothérapeutiques conventionnels sensibles à ces mécanismes. Pour vérifier cette idée, nous pourrions réaliser une seconde expérimentation animale et inoculer aux souris des cellules cancéreuses rendues chimiorésistantes *in vitro* par exposition prolongée au paclitaxel. On pourrait ainsi dans ce modèle confirmer ou infirmer le bénéfice thérapeutique de PP-13 en condition de chimiorésistance comparativement au paclitaxel.

4.5.3 PP-13 et les autres agents ciblant le site colchicine de la tubuline

A ce jour, de nombreuses molécules capables de cibler le site colchicine de la β -tubuline ont été découvertes, parmi lesquelles le nocodazole, la podophyllotoxine, la combretastatine A4, la fosbretabuline, le 2-méthoxyœstradiol, l'ombrabuline, l'indibuline, la lexibuline, la plinabuline, le tivantinib, les phenylahistines, la steganacine, les chalcones et la curacine A^{311,331-334}. Aucune ne possède une structure chimique semblable à celle de PP-13³³³. Certaines (telles que la curacine A ou le nocodazole) ont été abandonnées en raison de leur trop forte toxicité³³¹. D'autres en revanche présentent un fort potentiel anticancéreux et sont en cours d'évaluation clinique. C'est le cas notamment de la fosbrétabuline pour laquelle des essais de phase II ont été menés ou sont actuellement en cours pour le traitement des cancers de la thyroïde, de l'ovaire et du CBNPC⁴⁰². Le développement clinique de ces molécules laisse présager de l'intérêt du site de liaison de la colchicine comme cible thérapeutique dans les cancers.

Conclusions

Nous avons identifié un nouvel agent inhibiteur des microtubules présentant une structure originale pyrrolo-pyrimidine et possédant des propriétés antitumorales et antimétastatiques prometteuses. Comparativement aux antimétabolites conventionnels, PP-13 a l'avantage majeur d'échapper aux mécanismes de chimiorésistance médiés par la surexpression des pompes d'efflux. Dans ce contexte, PP-13 pourrait donc constituer une alternative intéressante pour le traitement de seconde ligne de certains cancers chimiorésistants. De plus, nous n'avons à ce jour démontré aucune toxicité apparente de PP-13 *in vivo*. L'ensemble de ces résultats suggèrent de poursuivre l'étude préclinique de cette molécule afin d'évaluer l'effet dose-réponse de PP-13 ainsi que ses caractéristiques pharmacodynamiques et pharmacocinétiques.

BIBLIOGRAPHIE

5 BIBLIOGRAPHIE

1. Bulletin épidémiologique hebdomadaire 7 juin 2011 n°22- Données sur la mortalité en France : principales causes de décès en 2008 et évolutions depuis 2000. Available at: http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2011/22/beh_22_2011.pdf. (Accessed: 13th June 2017)
2. Plan cancer 2014-2019 : priorités et objectifs - Plan cancer | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Plan-cancer/Plan-cancer-2014-2019-priorites-et-objectifs>. (Accessed: 23rd August 2016)
3. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Available at: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. (Accessed: 23rd August 2016)
4. Les cancers en France en 2016 : l'essentiel des faits et chiffres - Actualités | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Actualites-et-evenements/Actualites/Les-cancers-en-France-en-2016-l-essentiel-des-faits-et-chiffres>. (Accessed: 24th April 2017)
5. Binder-Foucard, F. *et al.* Cancer incidence and mortality in France over the 1980–2012 period: Solid tumors. *Rev. D'Épidémiologie Santé Publique* **62**, 95–108 (2014).
6. Binder-Foucard F, Belot A Delafosse P Remontet L Woronoff AS Bossard N. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012 / 2013 / Maladies chroniques et traumatismes / Rapports et synthèses / Publications et outils / Accueil. Available at: <http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2013/Estimation-nationale-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-France-entre-1980-et-2012>. (Accessed: 29th August 2016)
7. IARC Publications Website - Attributable Causes of Cancer in France in the Year 2000. Available at: <http://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Working-Group-Reports/Attributable-Causes-Of-Cancer-In-France-In-The-Year-2000-2007>. (Accessed: 8th June 2017)
8. Lichtenstein, P. *et al.* Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N. Engl. J. Med.* **343**, 78–85 (2000).
9. 1. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158314>. (Accessed: 8th June 2017)

10. Fiche Repère 'La prévention primaire des cancers en France' - Ref : FRFACTRISK15 | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Fiche-Repere-La-prevention-primaire-des-cancers-en-France>. (Accessed: 1st May 2017)
11. Pelucchi, C., Gallus, S., Garavello, W., Bosetti, C. & La Vecchia, C. Cancer risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aero-digestive tract and liver. *Alcohol Res. Health J. Natl. Inst. Alcohol Abuse Alcohol.* **29**, 193–198 (2006).
12. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health. *The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General.* (Centers for Disease Control and Prevention (US), 2014).
13. Morgan, G. *et al.* National Cancer Institute Conference on Treating Tobacco Dependence at Cancer Centers. *J. Oncol. Pract.* **7**, 178–182 (2011).
14. Tonini, G., D'Onofrio, L., Dell'Aquila, E. & Pezzuto, A. New molecular insights in tobacco-induced lung cancer. *Future Oncol.* **9**, 649–655 (2013).
15. Le Faou, A.-L. & Scemama, O. [Epidemiology of tobacco smoking]. *Rev. Mal. Respir.* **22**, 8S27-32 (2005).
16. Sasco, A. J., Secretan, M. B. & Straif, K. Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer* **45**, S3–S9 (2004).
17. Coglianò, V. J. *et al.* Preventable exposures associated with human cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **103**, 1827–1839 (2011).
18. Gandini, S. *et al.* Tobacco smoking and cancer: A meta-analysis. *Int. J. Cancer* **122**, 155–164 (2008).
19. Hecht, S. S. More than 500 trillion molecules of strong carcinogens per cigarette: use in product labelling? *Tob. Control* **20**, 387–387 (2011).
20. Hecht, S. S., Kassié, F. & Hatsukami, D. K. Chemoprevention of lung carcinogenesis in addicted smokers and ex-smokers. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 476–488 (2009).
21. The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke - NCBI Bookshelf. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44324/>. (Accessed: 1st May 2017)
22. Hackshaw, A. K., Law, M. R. & Wald, N. J. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ* **315**, 980–988 (1997).
23. Health, C. O. on S. and. Smoking and Tobacco Use; Fact Sheet; Health Effects of Secondhand Smoke. *Smoking and Tobacco Use* Available at:

- http://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/fact_sheets/secondhand_smoke/health_effects/. (Accessed: 1st May 2017)
24. IARC Monographs- Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol83/>. (Accessed: 28th September 2016)
 25. Taylor, R., Najafi, F. & Dobson, A. Meta-analysis of studies of passive smoking and lung cancer: effects of study type and continent. *Int. J. Epidemiol.* **36**, 1048–1059 (2007).
 26. Corrao, G., Bagnardi, V., Zambon, A. & La Vecchia, C. A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of 15 diseases. *Prev. Med.* **38**, 613–619 (2004).
 27. Boffetta, P. & Hashibe, M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.* **7**, 149–156 (2006).
 28. Altieri, A. *et al.* Wine, beer and spirits and risk of oral and pharyngeal cancer: a case-control study from Italy and Switzerland. *Oral Oncol.* **40**, 904–909 (2004).
 29. TESTINO, G. The Burden of Cancer Attributable to Alcohol Consumption. *Mædica* **6**, 313–320 (2011).
 30. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis - PIIS2214-109X(16)30143-7.pdf. Available at: [http://www.thelancet.com/pdfs/journals/langlo/PIIS2214-109X\(16\)30143-7.pdf](http://www.thelancet.com/pdfs/journals/langlo/PIIS2214-109X(16)30143-7.pdf). (Accessed: 13th June 2017)
 31. IARC Monographs- causes of cancers Available at: <http://www.iarc.fr/fr/publications/pdfs-online/wcr/2003/wcrf-2.pdf>. (Accessed: 12th June 2017)
 32. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 59 (1994) -Hepatitis Viruses. Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol59/index.php>. (Accessed: 13th June 2017)
 33. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 64 (1995)-Human Papillomaviruses. Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol64/index.php>. (Accessed: 13th June 2017)
 34. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 70 (1997)- Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8. Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol70/index.php>. (Accessed: 13th June 2017)
 35. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 67 (1996)-Human Immunodeficiency Viruses and Human T-Cell Lymphotropic Viruses. Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol67/index.php>. (Accessed: 13th June 2017)

36. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 61 (1994) - Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter Pylori. Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol61/index.php>. (Accessed: 13th June 2017)
37. Nutrition et prévention primaire des cancers : actualisation des données - Ref : ETNUTRIKAN15 | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Nutrition-et-prevention-primaire-des-cancers-actualisation-des-donnees>. (Accessed: 12th June 2017)
38. INSERM / KANTAR HEALTH / ROCHE. Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité en 2012. Available at: http://www.roche.fr/content/dam/roche_france/fr_FR/doc/obepi_2012.pdf. (Accessed: 12th June 2017)
39. DREES. L'état de santé de la population en France - RAPPORT 2015 - rappeds_v11_16032015.pdf. Available at: http://drees.solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/rappeds_v11_16032015.pdf. (Accessed: 12th June 2017)
40. Renehan, A. G. & Soerjomataram, I. Obesity as an Avoidable Cause of Cancer (Attributable Risks). *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer* **208**, 243–256 (2016).
41. Desnoyers, A., Riesco, E., Fülöp, T. & Pavic, M. Activité physique et cancer : mise au point et revue de la littérature. *Rev. Médecine Interne* **37**, 399–405 (2016).
42. Rapport cancer prof-VF.qxd - rapport_cancer_pro.pdf. Available at: http://invs.santepubliquefrance.fr//publications/2003/cancers_pro/rapport_cancer_pro.pdf. (Accessed: 12th June 2017)
43. Torre, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* **65**, 87–108 (2015).
44. Hamra, G. B. *et al.* Outdoor Particulate Matter Exposure and Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ. Health Perspect.* (2014). doi:10.1289/ehp.1408092
45. Narayanan, D. L., Saladi, R. N. & Fox, J. L. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int. J. Dermatol.* **49**, 978–986 (2010).
46. Lissowska, J. *et al.* Family history and lung cancer risk: international multicentre case–control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. *Cancer Causes Control* **21**, 1091–1104 (2010).

47. Les prédispositions génétiques - Oncogénétique | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/L-organisation-de-l-offre-de-soins/Oncogenetique/Les-predispositions-genetiques>. (Accessed: 12th June 2017)
48. Surveillance des femmes porteuses d'une mutation BRCA : l'Institut actualise ses recommandations - Actualités | Institut National Du Cancer. Available at: [http://www.e-cancer.fr/Actualites-et-evenements/Actualites/Surveillance-des-femmes-porteuses-d-une-mutation-BRCA-l-Institut-actualise-ses-recommandations/\(btn\)/retour](http://www.e-cancer.fr/Actualites-et-evenements/Actualites/Surveillance-des-femmes-porteuses-d-une-mutation-BRCA-l-Institut-actualise-ses-recommandations/(btn)/retour). (Accessed: 12th June 2017)
49. Petrucelli, N., Daly, M. B. & Pal, T. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. in *GeneReviews*(®) (eds. Pagon, R. A. et al.) (University of Washington, Seattle, 1993).
50. Le dispositif national d'oncogénétique - Oncogénétique | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/L-organisation-de-l-offre-de-soins/Oncogenetique/Le-dispositif-national-d-oncogenetique>. (Accessed: 15th June 2017)
51. Herbst, R. S., Heymach, J. V. & Lippman, S. M. Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1367–1380 (2008).
52. van Meerbeeck, J. P., Fennell, D. A. & De Ruyscher, D. K. Small-cell lung cancer. *The Lancet* **378**, 1741–1755 (2011).
53. Petersen, I. The Morphological and Molecular Diagnosis of Lung Cancer. *Dtsch. Ärztebl. Int.* **108**, 525–531 (2011).
54. Brambilla, E. & Gazdar, A. Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *Eur. Respir. J.* **33**, 1485–1497 (2009).
55. Wang, X.-N. *et al.* Trefoil Factor 3 as a Novel Biomarker to Distinguish Between Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma. *Medicine (Baltimore)* **94**, (2015).
56. Drilon, A., Rekhtman, N., Ladanyi, M. & Paik, P. Squamous-cell carcinomas of the lung: emerging biology, controversies, and the promise of targeted therapy. *Lancet Oncol.* **13**, e418–e426 (2012).
57. Référentiel interrégional: Cancer bronchique non à petites cellules | Réseau Espace Santé Cancer Rhône-Alpes Auvergne 2016. Available at: <http://espacecancer.sante-ra.fr/Pages/referentiel-cnadc.aspx>. (Accessed: 28th September 2016)
58. Rami-Porta, R., Asamura, H. & Goldstraw, P. Predicting the prognosis of lung cancer: the evolution of tumor, node and metastasis in the molecular age—challenges and opportunities. *Transl. Lung Cancer Res.* **4**, 415–423 (2015).

59. Mirsadraee, S. The 7th lung cancer TNM classification and staging system: Review of the changes and implications. *World J. Radiol.* **4**, 0 (2012).
60. Weinberg, R. A. How cancer arises. *Sci. Am.* **275**, 62–70 (1996).
61. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
62. Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes - Molecular Cell Biology - NCBI Bookshelf. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21662/>. (Accessed: 31st July 2016)
63. Schubbert, S., Shannon, K. & Bollag, G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 295–308 (2007).
64. Cox, A. D. & Der, C. J. Ras history. *Small GTPases* **1**, 2–27 (2010).
65. Raparia, K., Villa, C., DeCamp, M. M., Patel, J. D. & Mehta, M. P. Molecular profiling in non-small cell lung cancer: a step toward personalized medicine. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **137**, 481–491 (2013).
66. Califano, R. *et al.* Beyond EGFR and ALK inhibition: Unravelling and exploiting novel genetic alterations in advanced non small-cell lung cancer. *Cancer Treat. Rev.* **41**, 401–411 (2015).
67. Pappou, E. P. & Ahuja, N. The Role of Oncogenes in Gastrointestinal Cancer. *Gastrointest. Cancer Res. GCR* S2–S15 (2010).
68. Davies, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949–954 (2002).
69. Meng, D. *et al.* Prognostic value of K-RAS mutations in patients with non-small cell lung cancer: A systematic review with meta-analysis. *Lung Cancer* **81**, 1–10 (2013).
70. Chang, Y.-Y. *et al.* Impact of KRAS mutation on outcome of patients with metastatic colorectal cancer. *Hepatogastroenterology.* **61**, 1946–1953 (2014).
71. Mao, C. *et al.* KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: A meta-analysis of 22 studies. *Lung Cancer* **69**, 272–278 (2010).
72. Sforza, V. *et al.* Mechanisms of resistance to anti-epidermal growth factor receptor inhibitors in metastatic colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **22**, 6345–6361 (2016).
73. Waring, P., Tie, J., Maru, D. & Karapetis, C. S. RAS Mutations as Predictive Biomarkers in Clinical Management of Metastatic Colorectal Cancer. *Clin. Colorectal Cancer* **15**, 95–103 (2016).
74. Alamgeer, M., Ganju, V. & Watkins, D. N. Novel therapeutic targets in non-small cell lung cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **13**, 394–401 (2013).
75. Sasaki, T., Hiroki, K. & Yamashita, Y. The Role of Epidermal Growth Factor Receptor in Cancer Metastasis and Microenvironment. *BioMed Res. Int.* **2013**, e546318 (2013).

76. Krasinskas, A. M. EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma. *Pathol. Res. Int.* **2011**, e932932 (2011).
77. COSMIC: Gene analysis - EGFR. Available at: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=EGFR>. (Accessed: 18th June 2017)
78. Chan, B. A. & Hughes, B. G. M. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Transl. Lung Cancer Res.* **4**, 36–54 (2015).
79. Stewart, E. L., Tan, S. Z., Liu, G. & Tsao, M.-S. Known and putative mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies in NSCLC patients with EGFR mutations—a review. *Transl. Lung Cancer Res.* **4**, 67–81 (2015).
80. Guiu, S., Coudert, B., Favier, L., Arnould, L. & Fumoleau, P. [Management of metastatic HER2-positive breast cancer: present and future]. *Bull. Cancer (Paris)* **97**, 365–383 (2010).
81. Gutierrez, C. & Schiff, R. HER 2: Biology, Detection, and Clinical Implications. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **135**, 55–62 (2011).
82. Iqbal, N. & Iqbal, N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol. Biol. Int.* **2014**, e852748 (2014).
83. Wooster, R., Futreal, A. P. & Stratton, M. R. Sequencing Analysis of BRAF Mutations in Human Cancers. *Methods Enzymol.* **407**, 218–224 (2006).
84. Hussain, M. R. M. *et al.* BRAF gene: From human cancers to developmental syndromes. *Saudi J. Biol. Sci.* **22**, 359–373 (2015).
85. Pratilas, C. A. & Solit, D. B. Therapeutic strategies for targeting BRAF in human cancer. *Rev. Recent Clin. Trials* **2**, 121–134 (2007).
86. Mutations of the BRAF gene in human cancer. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12068308/>. (Accessed: 19th June 2017)
87. Sierra, J. R. & Tsao, M.-S. c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **3**, S21–S35 (2011).
88. Samuels, Y. & Waldman, T. Oncogenic Mutations of PIK3CA in Human Cancers. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **347**, 21–41 (2010).
89. Stankov, K., Popovic, S. & Mikov, M. C-KIT signaling in cancer treatment. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 2849–2880 (2014).
90. Ashman, L. K. & Griffith, R. Therapeutic targeting of c-KIT in cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* **22**, 103–115 (2013).

91. Biegging, K. T., Mello, S. S. & Attardi, L. D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 359–370 (2014).
92. Olivier, M. *et al.* Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther.* **16**, 1–12 (2009).
93. Cortot, A. B. *et al.* Mutation of TP53 and Alteration of p14arf Expression in EGFR- and KRAS-Mutated Lung Adenocarcinomas. *Clin. Lung Cancer* **15**, 124–130 (2014).
94. Dobrowolski, R., Hein, R., Buettner, R. & Bosserhoff, A. K. Loss of p14ARF expression in melanoma. *Arch. Dermatol. Res.* **293**, 545–551 (2002).
95. Romagosa, C. *et al.* p16Ink4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene* **30**, 2087–2097 (2011).
96. Guo, X. E., Ngo, B., Modrek, A. S. & Lee, W.-H. Targeting Tumor Suppressor Networks for Cancer Therapeutics. *Curr. Drug Targets* **15**, 2–16 (2014).
97. Li, X. *et al.* High levels of Phosphatase and Tensin Homolog Expression Predict Favorable Prognosis in Patients with Non-small Cell Lung Cancer. *Cell Biochem. Biophys.* **73**, 631–637 (2015).
98. Milella, M. *et al.* PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors. *Front. Oncol.* **5**, (2015).
99. Chalhoub, N. & Baker, S. J. PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **4**, 127–150 (2009).
100. Liang, X., Wang, P., Gao, Q., Xiang, T. & Tao, X. Endogenous LKB1 knockdown accelerates G(1)/S transition through p53 and p16 pathways. *Cancer Biol. Ther.* **9**, 156–160 (2010).
101. Zhao, R.-X. & Xu, Z.-X. Targeting the LKB1 Tumor Suppressor. *Curr. Drug Targets* **15**, 32–52 (2014).
102. Mavaddat, N. *et al.* Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 812–822 (2013).
103. Mersch, J. *et al.* Cancers Associated with BRCA1 and BRCA2 Mutations other than Breast and Ovarian. *Cancer* **121**, 269–275 (2015).
104. Haute Autorité de Santé - Dépistage et prévention du cancer du sein. Available at: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2024559/fr/depistage-et-prevention-du-cancer-du-sein. (Accessed: 13th June 2017)
105. Le dépistage du cancer colorectal en pratique - Dépistage du cancer colorectal | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Se-faire-depister/Depistage-du-cancer-colorectal/Le-depistage-en-pratique>. (Accessed: 13th June 2017)

106. Cancer colorectal - Dépistage par test immunologique et autres modalités - Ref: OUTCCRIM15 | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Cancer-colorectal-Depistage-par-test-immunologique-et-autres-modalites>. (Accessed: 13th June 2017)
107. Le nouveau test , ODLC - Office De Lutte contre le Cancer. Available at: <http://www.odlc.org/le-nouveau-test-OC-Sensor.html>. (Accessed: 13th June 2017)
108. Haute Autorité de Santé - Dépistage et prévention du cancer du col de l'utérus. Available at: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1623735/fr/depistage-et-prevention-du-cancer-du-col-de-l-uterus. (Accessed: 13th June 2017)
109. Dépistage Organisé Col Utérin, ODLC - Office De Lutte contre le Cancer. Available at: <http://www.odlc.org/depistage-organise-col-uterin.html>. (Accessed: 13th June 2017)
110. Bird, T. G. *et al.* Alpha-Fetoprotein Detection of Hepatocellular Carcinoma Leads to a Standardized Analysis of Dynamic AFP to Improve Screening Based Detection. *PLoS One* **11**, e0156801 (2016).
111. Di Bisceglie, A. M. *et al.* Serum alpha-fetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C: results from the HALT-C Trial. *J. Hepatol.* **43**, 434–441 (2005).
112. Niederle, B. Screening for medullary carcinoma of the thyroid. *Br. J. Surg.* **101**, 1625–1626 (2014).
113. Lee, D. J. *et al.* Recent changes in prostate cancer screening practices and prostate cancer epidemiology. *J. Urol.* doi:10.1016/j.juro.2017.05.074
114. Dosage des marqueurs tumoraux. Available at: <http://www.onco-npdc.fr/dosage-marqueurs-tumoraux.html>. (Accessed: 14th June 2017)
115. Les thérapies ciblées dans le traitement du cancer en 2015 - État des lieux et enjeux - Ref: APDEMOMED16 | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Les-therapies-ciblees-dans-le-traitement-du-cancer-en-2015-Etat-des-lieux-et-enjeux>. (Accessed: 13th June 2017)
116. Haute Autorité de Santé - ALD n° 30 - Cancer du sein. Available at: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_927251/fr/ald-n-30-cancer-du-sein. (Accessed: 8th June 2017)
117. Haute Autorité de Santé - ALD n° 30 - Cancer de l'endomètre. Available at: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1021574/fr/ald-n-30-cancer-de-l-endometre. (Accessed: 8th June 2017)
118. Survie attendue des patients atteints de cancer : état des lieux 2010 - Ref: RAPSURVIE10 | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Survie-attendue-des-patients-atteints-de-cancer-etat-des-lieux-2010>. (Accessed: 13th June 2017)

- publications/Survie-attendue-des-patients-atteints-de-cancer-etat-des-lieux-2010. (Accessed: 13th June 2017)
119. Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine 1989-2013 - Partie 1 : tumeurs solides / 2016 / Maladies chroniques et traumatismes / Rapports et synthèses / Publications et outils / Accueil. Available at: <http://invs.santepubliquefrance.fr/fr./Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2016/Survie-des-personnes-atteintes-de-cancer-en-France-metropolitaine-1989-2013-Partie-1-tumeurs-solides>. (Accessed: 28th September 2016)
 120. Semenova, E. A., Nagel, R. & Berns, A. Origins, genetic landscape, and emerging therapies of small cell lung cancer. *Genes Dev.* **29**, 1447–1462 (2015).
 121. D’Amico, A. V. *et al.* Biochemical outcome following external beam radiation therapy with or without androgen suppression therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* **284**, 1280–1283 (2000).
 122. Haute Autorité de Santé - ALD n° 30 - Cancer de la prostate. Available at: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_725257/fr/ald-n-30-cancer-de-la-prostate. (Accessed: 8th June 2017)
 123. Etchegary, H., Dicks, E., Tamutis, L. & Dawson, L. Quality of life following prophylactic gynecological surgery: experiences of female Lynch mutation carriers. *Fam. Cancer* 1–9 (2017). doi:10.1007/s10689-017-9997-6
 124. Dionigi, F. *et al.* What about prophylactic surgery in BRCA1/BRCA2 mutation carriers? Observations from an Italian pilot study. *Breast J.* n/a-n/a doi:10.1111/tbj.12825
 125. Chirurgie prophylactique des cancers avec prédisposition génétique - Ref: RECOCHIRPRO09 | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Chirurgie-prophylactique-des-cancers-avec-predisposition-genetique>. (Accessed: 8th June 2017)
 126. Wu, X. *et al.* Palliative Surgery in Treating Painful Metastases of the Upper Cervical Spine: Case Report and Review of the Literature. *Medicine (Baltimore)* **95**, (2016).
 127. Heidenreich, A., Porres, D. & Pfister, D. The Role of Palliative Surgery in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Oncol. Res. Treat.* **38**, 670–677 (2015).
 128. Side Effects of Surgery. *Cancer.Net* (2011). Available at: <http://www.cancer.net/navigating-cancer-care/how-cancer-treated/surgery/side-effects-surgery>. (Accessed: 8th June 2017)
 129. Baskar, R., Dai, J., Wenlong, N., Yeo, R. & Yeoh, K.-W. Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Front. Mol. Biosci.* **1**, (2014).

130. Haute Autorité de Santé - Procédures de radiothérapie externe. Available at: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_685063/fr/procedures-de-radiotherapie-externe. (Accessed: 7th June 2017)
131. Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C. & Barton, M. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer* **104**, 1129–1137 (2005).
132. Begg, A. C., Stewart, F. A. & Vens, C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 239–253 (2011).
133. Orth, M. *et al.* Current concepts in clinical radiation oncology. *Radiat. Environ. Biophys.* **53**, 1–29 (2014).
134. Barnett, G. C. *et al.* Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 134–142 (2009).
135. Pittl, S., Brown, M. L., Linsenmeier, C. & Guckenberger, M. [Palliative radiotherapy - alleviating symptoms and improving quality of life]. *Praxis* **105**, 243-247; quiz 248-249 (2016).
136. Médecin traitant et patient en radiothérapie : conseils pratiques - Ref : BRORADPRO08 | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Medecin-traitant-et-patient-en-radiotherapie-conseils-pratiques>. (Accessed: 8th June 2017)
137. Papac, R. J. Origins of cancer therapy. *Yale J. Biol. Med.* **74**, 391–398 (2001).
138. Ison, D. H. Esophageal Cancer Chemotherapy: Recent Advances. *Gastrointest. Cancer Res. GCR* **2**, 85–92 (2008).
139. Ramalingam, S. First-line chemotherapy for advanced-stage non-small-cell lung cancer: focus on docetaxel. *Clin. Lung Cancer* **7 Suppl 3**, S77-82 (2005).
140. Hassan, M. S. U., Ansari, J., Spooner, D. & Hussain, S. A. Chemotherapy for breast cancer (Review). *Oncol. Rep.* **24**, 1121–1131 (2010).
141. Lee, H. S. & Park, S. W. Systemic Chemotherapy in Advanced Pancreatic Cancer. *Gut Liver* **10**, 340–347 (2016).
142. Hurwitz, M. Chemotherapy in Prostate Cancer. *Curr. Oncol. Rep.* **17**, 44 (2015).
143. Park, S. C. & Chun, H. J. Chemotherapy for Advanced Gastric Cancer: Review and Update of Current Practices. *Gut Liver* **7**, 385–393 (2013).
144. Agence Nationale de Sécurité du Médicament. Available at: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/index.php>. (Accessed: 15th June 2017)
145. Matzo, M. Palliative Chemotherapy. *Am. J. Nurs.* **116**, 59–62 (2016).

146. Chabner, B. A. & Roberts, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 65–72 (2005).
147. Emil Frei, I. I. I. & Eder, J. P. Combination Chemotherapy. (2003).
148. Faure, S. L'hormonothérapie anticancéreuse. *Actual. Pharm.* **49**, 49–52 (2010).
149. Bastide, C., Bruyère, F., Karsenty, G., Guy, L. & Rozet, F. [Hormonal treatment in prostate cancer]. *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.* **23**, 1246–1257 (2013).
150. Malhotra, J., Jabbour, S. K. & Aisner, J. Current state of immunotherapy for non-small cell lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* **6**, 196–211 (2017).
151. Bonotto, M. *et al.* Immunotherapy for gastric cancers: emerging role and future perspectives. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **10**, 609–619 (2017).
152. Bigot, F., Bonnet, C. & Massard, C. [Immunotherapy for the treatment of patients with genitourinary cancers: Review and perspectives]. *Bull. Cancer (Paris)* **104**, 370–379 (2017).
153. Johnson, D. B., Peng, C. & Sosman, J. A. Nivolumab in melanoma: latest evidence and clinical potential. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **7**, 97–106 (2015).
154. McGranahan, T., Li, G. & Nagpal, S. History and current state of immunotherapy in glioma and brain metastasis. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **9**, 347–368 (2017).
155. Dhupkar, P. & Gordon, N. Interleukin-2: Old and New Approaches to Enhance Immune-Therapeutic Efficacy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **995**, 33–51 (2017).
156. Anselmo Da Costa, I. *et al.* Immunotherapeutic strategies for the treatment of renal cell carcinoma: Where will we go? *Expert Rev. Anticancer Ther.* **17**, 357–368 (2017).
157. Bottoni, U. *et al.* Melanoma and IFN alpha: potential adjuvant therapy. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **28**, 271–279 (2014).
158. Tarhini, A. A., Gogas, H. & Kirkwood, J. M. IFN- α in the treatment of melanoma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189**, 3789–3793 (2012).
159. Hirbod-Mobarakeh, A. *et al.* Specific immunotherapy in renal cancer: a systematic review. *Ther. Adv. Urol.* **9**, 45 (2017).
160. Tsai, H.-F. & Hsu, P.-N. Cancer immunotherapy by targeting immune checkpoints: mechanism of T cell dysfunction in cancer immunity and new therapeutic targets. *J. Biomed. Sci.* **24**, (2017).
161. Pianko, M. J., Liu, Y., Bagchi, S. & Lesokhin, A. M. Immune checkpoint blockade for hematologic malignancies: a review. *Stem Cell Investig.* **4**, 32 (2017).

162. Huang, J. *et al.* Immune Checkpoint in Glioblastoma: Promising and Challenging. *Front. Pharmacol.* **8**, 242 (2017).
163. Shen, M. & Ren, X. Highlights on immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **39**, 1010428317695013 (2017).
164. Yeku, O., Li, X. & Brentjens, R. J. Adoptive T-Cell Therapy for Solid Tumors. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book Am. Soc. Clin. Oncol. Meet.* **37**, 193–204 (2017).
165. Zeltsman, M., Dozier, J., McGee, E., Ngai, D. & Adusumilli, P. S. CAR T-cell therapy for lung cancer and malignant pleural mesothelioma. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* (2017). doi:10.1016/j.trsl.2017.04.004
166. Geyer, M. B. & Brentjens, R. J. Review: Current clinical applications of chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells. *Cytotherapy* **18**, 1393–1409 (2016).
167. Lee, D. W. *et al.* Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* **124**, 188–195 (2014).
168. Kroschinsky, F. *et al.* New drugs, new toxicities: severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management. *Crit. Care* **21**, 89 (2017).
169. Gangadhar, T. C. & Vonderheide, R. H. Mitigating the toxic effects of anticancer immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **11**, 91–99 (2014).
170. Cagle, P. T. & Chirieac, L. R. Advances in treatment of lung cancer with targeted therapy. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **136**, 504–509 (2012).
171. A. Martel, C. Morel, J.M. Canonge, F. Puisset. What are targeted therapies? (2017). Available at: <http://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/25312.pdf>. (Accessed: 16th June 2017)
172. Les inhibiteurs de tyrosine kinase en oncologie – Tyrosine kinase inhibitors in oncology - 14557.pdf. Available at: <http://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/14557.pdf>. (Accessed: 16th June 2017)
173. Médicaments ciblant BCR-ABL : Imatinib, Dasatinib, Nilotinib, Bosutinib, Ponatinib - Médicament ciblant JAK : Ruxolitinib - Anticancéreux par voie orale : informer, prévenir et gérer leurs effets indésirables - Ref : PEROSBCRJAK15 | Institut Natio. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Medicaments-ciblant-BCR-ABL-Imatinib-Dasatinib-Nilotinib-Bosutinib-Ponatinib-Medicament-ciblant-JAK-Ruxolitinib-Anticancereux-par-voie-orale-informer-prevenir-et-gerer-leurs-effets-indesirables>. (Accessed: 18th June 2017)
174. Wang, S. C. & Hung, M. C. HER2 overexpression and cancer targeting. *Semin. Oncol.* **28**, 115–124 (2001).

175. Moasser, M. M. The oncogene HER2; Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* **26**, 6469–6487 (2007).
176. Guo, G. *et al.* Ligand-independent EGFR signaling. *Cancer Res.* **75**, 3436–3441 (2015).
177. The mechanism of acquired resistance to irreversible EGFR tyrosine kinase inhibitor-afatinib in lung adenocarcinoma patients. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.7189
178. Dziadkowiec, K. N., Gąsiorowska, E., Nowak-Markwitz, E. & Jankowska, A. PARP inhibitors: review of mechanisms of action and BRCA1/2 mutation targeting. *Przegląd Menopauzalny Menopause Rev.* **15**, 215–219 (2016).
179. Cancer de l’ovaire et inhibiteur de PARP - Oncogénétique | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/L-organisation-de-l-offre-de-soins/Oncogenetique/Cancer-de-l-ovaire-et-inhibiteur-de-PARP>. (Accessed: 15th June 2017)
180. George, A., Kaye, S. & Banerjee, S. Delivering widespread BRCA testing and PARP inhibition to patients with ovarian cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 284–296 (2017).
181. Pertuzumab in the treatment of HER2+ breast cancer. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24717573>. (Accessed: 16th June 2017)
182. Maximiano, S., Magalhães, P., Guerreiro, M. P. & Morgado, M. Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* **30**, 75–86 (2016).
183. Rogers, J. E. Patient considerations in metastatic colorectal cancer - role of panitumumab. *OncoTargets Ther.* **10**, 2033–2044 (2017).
184. Seshacharyulu, P. *et al.* Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **16**, 15–31 (2012).
185. Greig, S. L. & Keating, G. M. Ramucirumab: A Review in Advanced Gastric Cancer. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* **29**, 341–351 (2015).
186. Bevacizumab: a review of its use in advanced cancer. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25315029>. (Accessed: 16th June 2017)
187. Oncomip - Référentiels. Available at: <http://www.oncomip.org/fr/espace-professionnel/referentiels/biologie-moleculaire-151.html>. (Accessed: 15th June 2017)
188. Bordi, P., Del Re, M., Danesi, R. & Tiseo, M. 2PD Monitoring of secondary drug resistance mutations in circulating tumor DNA of patients with advanced ALK positive NSCLC. *J. Thorac. Oncol.* **11**, S57 (2016).

189. Fiches repère - Publications sur le cancer | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Collections/Fiches-repere>. (Accessed: 13th December 2016)
190. Mise en page 1 - gp_cancer_foie.pdf. Available at: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-02/gp_cancer_foie.pdf. (Accessed: 14th June 2017)
191. Uzman, A. Molecular Cell Biology, Sixth Edition. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **38**, 60–61 (2010).
192. Chretien, D. Lattice defects in microtubules: protofilament numbers vary within individual microtubules. *J. Cell Biol.* **117**, 1031–1040 (1992).
193. Metoz, F., Arnal, I. & Wade, R. H. Tomography without Tilt: Three-Dimensional Imaging of Microtubule/Motor Complexes. *J. Struct. Biol.* **118**, 159–168 (1997).
194. Kikkawa, M., Ishikawa, T., Nakata, T., Wakabayashi, T. & Hirokawa, N. Direct visualization of the microtubule lattice seam both in vitro and in vivo. *J. Cell Biol.* **127**, 1965–1971 (1994).
195. Chrétien, D., Fuller, S. D. & Karsenti, E. Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J. Cell Biol.* **129**, 1311–1328 (1995).
196. Nogales, E. Structural Insights into Microtubule Function. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 277–302 (2000).
197. Desai, A. & Mitchison, T. J. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 83–117 (1997).
198. Wade, R. H. & Hyman, A. A. Microtubule structure and dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 12–17 (1997).
199. Weisenberg, R. C., Broisy, G. G. & Taylor, E. W. Colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. *Biochemistry (Mosc.)* **7**, 4466–4479 (1968).
200. Oakley, C. E. & Oakley, B. R. Identification of γ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* **338**, 662–664 (1989).
201. Dutcher, S. K. & Trabuco, E. C. The UNI3 gene is required for assembly of basal bodies of *Chlamydomonas* and encodes delta-tubulin, a new member of the tubulin superfamily. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1293–1308 (1998).
202. Chang, P. & Stearns, T. Delta-tubulin and epsilon-tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function. *Nat. Cell Biol.* **2**, 30–35 (2000).
203. Vaughan, S. *et al.* New tubulins in protozoal parasites. *Curr. Biol. CB* **10**, R258-259 (2000).
204. Findeisen, P. *et al.* Six Subgroups and Extensive Recent Duplications Characterize the Evolution of the Eukaryotic Tubulin Protein Family. *Genome Biol. Evol.* **6**, 2274–2288 (2014).

205. Little, M. & Seehaus, T. Comparative analysis of tubulin sequences. *Comp. Biochem. Physiol. B* **90**, 655–670 (1988).
206. Downing, K. H. & Nogales, E. Crystallographic structure of tubulin: implications for dynamics and drug binding. *Cell Struct. Funct.* **24**, 269–275 (1999).
207. Akhmanova, A. & Steinmetz, M. O. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 309–322 (2008).
208. Nogales, E., Wolf, S. G. & Downing, K. H. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**, 199–203 (1998).
209. Keskin, O., Durell, S. R., Bahar, I., Jernigan, R. L. & Covell, D. G. Relating Molecular Flexibility to Function: A Case Study of Tubulin. *Biophys. J.* **83**, 663–680 (2002).
210. Löwe, J., Li, H., Downing, K. . & Nogales, E. Refined structure of $\alpha\beta$ -tubulin at 3.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **313**, 1045–1057 (2001).
211. Correia, J. J., Beth, A. H. & Williams, R. C. Tubulin exchanges divalent cations at both guanine nucleotide-binding sites. *J. Biol. Chem.* **263**, 10681–10686 (1988).
212. Spiegelman, B. M., Penningroth, S. M. & Kirschner, M. W. Turnover of tubulin and the N site GTP in Chinese hamster ovary cells. *Cell* **12**, 587–600 (1977).
213. Oakley, B. R. An abundance of tubulins. *Trends Cell Biol.* **10**, 537–542 (2000).
214. Aldaz, H., Rice, L. M., Stearns, T. & Agard, D. A. Insights into microtubule nucleation from the crystal structure of human γ -tubulin. *Nature* **435**, 523–527 (2005).
215. Oakley, B. R., Paolillo, V. & Zheng, Y. γ -Tubulin complexes in microtubule nucleation and beyond. *Mol. Biol. Cell* **26**, 2957–2962 (2015).
216. Dutcher, S. K. Long-lost relatives reappear: identification of new members of the tubulin superfamily. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 634–640 (2003).
217. Bond, J. F., Fridovich-Keil, J. L., Pillus, L., Mulligan, R. C. & Solomon, F. A chicken-yeast chimeric beta-tubulin protein is incorporated into mouse microtubules in vivo. *Cell* **44**, 461–468 (1986).
218. Lewis, S. A., Gu, W. & Cowan, N. J. Free intermingling of mammalian beta-tubulin isotypes among functionally distinct microtubules. *Cell* **49**, 539–548 (1987).
219. Joshi, H. C. & Cleveland, D. W. Differential utilization of beta-tubulin isotypes in differentiating neurites. *J. Cell Biol.* **109**, 663–673 (1989).

220. Pucciarelli, S. *et al.* Distinct Functional Roles of β -Tubulin Isoforms in Microtubule Arrays of *Tetrahymena thermophila*, a Model Single-Celled Organism. *PLoS ONE* **7**, e39694 (2012).
221. Feng, R. *et al.* Mutations in *TUBB8* and Human Oocyte Meiotic Arrest. *N. Engl. J. Med.* **374**, 223–232 (2016).
222. Ludueña, R. F. & Banerjee, A. The Isoforms of Tubulin. in *The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology* (ed. Fojo, T.) 123–175 (Humana Press, 2008).
223. Panda, D., Miller, H. P., Banerjee, A., Ludueña, R. F. & Wilson, L. Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isoform composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 11358–11362 (1994).
224. Gan, P. P., McCarroll, J. A., Byrne, F. L., Garner, J. & Kavallaris, M. Specific β -Tubulin Isoforms Can Functionally Enhance or Diminish Etoposide B Sensitivity in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *PLoS ONE* **6**, e21717 (2011).
225. Derry, W. B., Wilson, L., Khan, I. A., Ludueña, R. F. & Jordan, M. A. Taxol Differentially Modulates the Dynamics of Microtubules Assembled from Unfractionated and Purified β -Tubulin Isoforms [†]. *Biochemistry (Mosc.)* **36**, 3554–3562 (1997).
226. Janke, C. & Chloë Bulinski, J. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 773–786 (2011).
227. Song, Y. & Brady, S. T. Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. *Trends Cell Biol.* **25**, 125–136 (2015).
228. Erck, C. *et al.* A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 7853–7858 (2005).
229. Marcos, S. *et al.* Tubulin Tyrosination Is Required for the Proper Organization and Pathfinding of the Growth Cone. *PLoS ONE* **4**, e5405 (2009).
230. Mitchison, T. & Kirschner, M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237–242 (1984).
231. Hyman, A. A., Salser, S., Drechsel, D. N., Unwin, N. & Mitchison, T. J. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol. Biol. Cell* **3**, 1155–1167 (1992).
232. Valiron, O., Arnal, I., Caudron, N. & Job, D. GDP-tubulin incorporation into growing microtubules modulates polymer stability. *J. Biol. Chem.* **285**, 17507–17513 (2010).
233. David-Pfeuty, T., Erickson, H. P. & Pantaloni, D. Guanosinetriphosphatase activity of tubulin associated with microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5372–5376 (1977).

234. Ohi, R. & Zanic, M. Ahead of the Curve: New Insights into Microtubule Dynamics. *F1000Research* **5**, 314 (2016).
235. Mozziconacci, J., Sandblad, L., Wachsmuth, M., Brunner, D. & Karsenti, E. Tubulin dimers oligomerize before their incorporation into microtubules. *PLoS One* **3**, e3821 (2008).
236. Walker, R. A. *et al.* Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J. Cell Biol.* **107**, 1437–1448 (1988).
237. Valiron, O. New insights into microtubule elongation mechanisms. *Commun. Integr. Biol.* **4**, 10–13 (2011).
238. Margolis, R. L. & Wilson, L. Microtubule treadmills--possible molecular machinery. *Nature* **293**, 705–711 (1981).
239. Lloyd, C. & Chan, J. Microtubules and the shape of plants to come. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 13–22 (2004).
240. Yenjerla, M., Lopus, M. & Wilson, L. Analysis of Dynamic Instability of Steady-State Microtubules In Vitro by Video-Enhanced Differential Interference Contrast Microscopy with an Appendix by Emin Oroudjev. in *Methods in Cell Biology* **95**, 189–206 (Elsevier, 2010).
241. Valiron, O., Caudron, N. & Job, D. Microtubule dynamics: *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 2069–2084 (2001).
242. Müller-Reichert, T., Chrétien, D., Severin, F. & Hyman, A. A. Structural changes at microtubule ends accompanying GTP hydrolysis: information from a slowly hydrolyzable analogue of GTP, guanylyl (alpha,beta)methylenediphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3661–3666 (1998).
243. Wang, H.-W. & Nogales, E. Nucleotide-dependent bending flexibility of tubulin regulates microtubule assembly. *Nature* **435**, 911–915 (2005).
244. Bowne-Anderson, H., Zanic, M., Kauer, M. & Howard, J. Microtubule dynamic instability: A new model with coupled GTP hydrolysis and multistep catastrophe: Prospects & Overviews. *BioEssays* **35**, 452–461 (2013).
245. Walker, R. A., Inoué, S. & Salmon, E. D. Asymmetric behavior of severed microtubule ends after ultraviolet-microbeam irradiation of individual microtubules in vitro. *J. Cell Biol.* **108**, 931–937 (1989).
246. Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo- electron microscopy study. *J. Cell Biol.* **114**, 977–991 (1991).
247. Cassimeris, L., Pryer, N. K. & Salmon, E. D. Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *J. Cell Biol.* **107**, 2223–2231 (1988).

248. Sammak, P. J. & Borisy, G. G. Direct observation of microtubule dynamics in living cells. *Nature* **332**, 724–726 (1988).
249. Shelden, E. & Wadsworth, P. Observation and quantification of individual microtubule behavior in vivo: microtubule dynamics are cell-type specific. *J. Cell Biol.* **120**, 935–945 (1993).
250. McNally, F. J. Modulation of microtubule dynamics during the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 23–29 (1996).
251. Azimzadeh, J. & Bornens, M. Structure and duplication of the centrosome. *J. Cell Sci.* **120**, 2139–2142 (2007).
252. Lyle, K., Kumar, P. & Wittmann, T. SnapShot: Microtubule Regulators I. *Cell* **136**, 380.e1-380.e2 (2009).
253. Fujita, H., Yoshino, Y. & Chiba, N. Regulation of the centrosome cycle. *Mol. Cell. Oncol.* **3**, e1075643 (2016).
254. Bettencourt-Dias, M. & Glover, D. M. SnapShot: Centriole Biogenesis. *Cell* **136**, 188.e1-188.e2 (2009).
255. Bartolini, F. & Gundersen, G. G. Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *J. Cell Sci.* **119**, 4155–4163 (2006).
256. Mandelkow, E. & Mandelkow, E. M. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 72–81 (1995).
257. Wloga, D. & Gaertig, J. Post-translational modifications of microtubules. *J. Cell Sci.* **123**, 3447–3455 (2010).
258. Halpain, S. & Dehmelt, L. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* **7**, 224 (2006).
259. Dehmelt, L. & Halpain, S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* **6**, 204 (2005).
260. Guillaud, L. *et al.* STOP Proteins are Responsible for the High Degree of Microtubule Stabilization Observed in Neuronal Cells. *J. Cell Biol.* **142**, 167–179 (1998).
261. Bosc, C., Andrieux, A. & Job, D. STOP Proteins[†]. *Biochemistry (Mosc.)* **42**, 12125–12132 (2003).
262. Moores, C. A. *et al.* Distinct roles of doublecortin modulating the microtubule cytoskeleton. *EMBO J.* **25**, 4448–4457 (2006).
263. Lomakin, A. J. *et al.* CLIP-170-Dependent Capture of Membrane Organelles by Microtubules Initiates Minus-End Directed Transport. *Dev. Cell* **17**, 323–333 (2009).

264. Arnal, I., Heichette, C., Diamantopoulos, G. S. & Chrétien, D. CLIP-170/Tubulin-Curved Oligomers Coassemble at Microtubule Ends and Promote Rescues. *Curr. Biol.* **14**, 2086–2095 (2004).
265. Lazarus, J. E., Moughamian, A. J., Tokito, M. K. & Holzbaur, E. L. F. Dynactin Subunit p150Glued Is a Neuron-Specific Anti-Catastrophe Factor. *PLoS Biol.* **11**, e1001611 (2013).
266. Jo, H., Loison, F. & Luo, H. R. Microtubule dynamics regulates Akt signaling via dynactin p150. *Cell. Signal.* **26**, 1707–1716 (2014).
267. Kita, K. Adenomatous Polyposis Coli on Microtubule Plus Ends in Cell Extensions Can Promote Microtubule Net Growth with or without EB1. *Mol. Biol. Cell* **17**, 2331–2345 (2006).
268. Zumbunn, J., Kinoshita, K., Hyman, A. A. & Näthke, I. S. Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Curr. Biol. CB* **11**, 44–49 (2001).
269. Kodama, A., Karakesisoglou, I., Wong, E., Vaezi, A. & Fuchs, E. ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics. *Cell* **115**, 343–354 (2003).
270. Al-Bassam, J. & Chang, F. Regulation of microtubule dynamics by TOG-domain proteins XMAP215/Dis1 and CLASP. *Trends Cell Biol.* **21**, 604–614 (2011).
271. Gardner, M. K. CENP-E hangs on at dynamic microtubule ends. *Nat. Cell Biol.* **15**, 1030–1032 (2013).
272. Ribbeck, K., Raemaekers, T., Carmeliet, G. & Mattaj, I. W. A Role for NuSAP in Linking Microtubules to Mitotic Chromosomes. *Curr. Biol.* **17**, 230–236 (2007).
273. Ribbeck, K. NuSAP, a Mitotic RanGTP Target That Stabilizes and Cross-links Microtubules. *Mol. Biol. Cell* **17**, 2646–2660 (2006).
274. Li, C. *et al.* NuSAP modulates the dynamics of kinetochore microtubules by attenuating MCAK depolymerisation activity. *Sci. Rep.* **6**, 18773 (2016).
275. Chen, Y. & Hancock, W. O. Kinesin-5 is a microtubule polymerase. *Nat. Commun.* **6**, 8160 (2015).
276. Wojcik, E. J. *et al.* Kinesin-5: Cross-bridging mechanism to targeted clinical therapy. *Gene* **531**, 133–149 (2013).
277. Walczak, C. E. & Shaw, S. L. A MAP for Bundling Microtubules. *Cell* **142**, 364–367 (2010).
278. Komarova, Y. *et al.* Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *J. Cell Biol.* **184**, 691–706 (2009).
279. Fukata, Y. *et al.* CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat. Cell Biol.* (2002). doi:10.1038/ncb825

280. Lin, P.-C., Chan, P. M., Hall, C. & Manser, E. Collapsin Response Mediator Proteins (CRMPs) Are a New Class of Microtubule-associated Protein (MAP) That Selectively Interacts with Assembled Microtubules via a Taxol-sensitive Binding Interaction. *J. Biol. Chem.* **286**, 41466–41478 (2011).
281. Hendricks, A. G. *et al.* Dynein Tethers and Stabilizes Dynamic Microtubule Plus Ends. *Curr. Biol.* **22**, 632–637 (2012).
282. Mogensen, M. M., Malik, A., Piel, M., Bouckson-Castaing, V. & Bornens, M. Microtubule minus-end anchorage at centrosomal and non-centrosomal sites: the role of ninein. *J. Cell Sci.* **113** (Pt 17), 3013–3023 (2000).
283. Akhmanova, A. & Hoogenraad, C. C. Microtubule minus-end-targeting proteins. *Curr. Biol. CB* **25**, R162–171 (2015).
284. Eibes, S. & Roig, J. MCRS1: Not only ran. *Cell Cycle* **15**, 2693–2694 (2016).
285. Haren, L., Gnadt, N., Wright, M. & Merdes, A. NuMA is required for proper spindle assembly and chromosome alignment in prometaphase. *BMC Res. Notes* **2**, 64 (2009).
286. Maxwell, C. A. RHAMM Is a Centrosomal Protein That Interacts with Dynein and Maintains Spindle Pole Stability. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2262–2276 (2003).
287. Thakur, H. C. *et al.* Role of centrosomal adaptor proteins of the TACC family in the regulation of microtubule dynamics during mitotic cell division. *Biol. Chem.* **394**, (2013).
288. Wadsworth, P. TPX2. *Curr. Biol.* **25**, R1156–R1158 (2015).
289. Sharp, D. J. & Ross, J. L. Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *J. Cell Sci.* **125**, 2561–2569 (2012).
290. Yu, W. *et al.* The Microtubule-severing Proteins Spastin and Katanin Participate Differently in the Formation of Axonal Branches. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1485–1498 (2008).
291. Gupta, K. K. *et al.* Mechanism for the catastrophe-promoting activity of the microtubule destabilizer Op18/stathmin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 20449–20454 (2013).
292. Walczak, C. E., Gayek, S. & Ohi, R. Microtubule-Depolymerizing Kinesins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **29**, 417–441 (2013).
293. Etienne-Manneville, S. From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 104–111 (2010).
294. Bornens, M. Organelle positioning and cell polarity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 874–886 (2008).
295. Etienne-Manneville, S. Microtubules in Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **29**, 471–499 (2013).

296. Gundersen, G. G. & Cook, T. A. Microtubules and signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 81–94 (1999).
297. Liu, L.-Z. *et al.* Microtubule network is required for insulin-induced signal transduction and actin remodeling. *Mol. Cell. Endocrinol.* **365**, 64–74 (2013).
298. Breuss, M. & Keays, D. A. Microtubules and Neurodevelopmental Disease: The Movers and the Makers. in *Cellular and Molecular Control of Neuronal Migration* (eds. Nguyen, L. & Hippenmeyer, S.) **800**, 75–96 (Springer Netherlands, 2014).
299. Dammermann, A., Desai, A. & Oegema, K. The minus end in sight. *Curr. Biol.* **13**, R614–R624 (2003).
300. Millecamps, S. & Julien, J.-P. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 161–176 (2013).
301. McIntosh, J. R. Mitosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, a023218 (2016).
302. McEwen, B. F., Heagle, A. B., Cassels, G. O., Buttle, K. F. & Rieder, C. L. Kinetochore fiber maturation in PtK1 cells and its implications for the mechanisms of chromosome congression and anaphase onset. *J. Cell Biol.* **137**, 1567–1580 (1997).
303. Rosenblatt, J. Spindle assembly: asters part their separate ways. *Nat. Cell Biol.* **7**, 219–222 (2005).
304. Meunier, S. & Vernos, I. Microtubule assembly during mitosis – from distinct origins to distinct functions? *J. Cell Sci.* **125**, 2805–2814 (2012).
305. London, N. & Biggins, S. Signalling dynamics in the spindle checkpoint response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 736–748 (2014).
306. Musacchio, A. The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Curr. Biol.* **25**, R1002–R1018 (2015).
307. Tanaka, T. U. Kinetochore–microtubule interactions: steps towards bi-orientation. *EMBO J.* **29**, 4070–4082 (2010).
308. Etemad, B., Kuijt, T. E. F. & Kops, G. J. P. L. Kinetochore–microtubule attachment is sufficient to satisfy the human spindle assembly checkpoint. *Nat. Commun.* **6**, 8987 (2015).
309. Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F. G. & Taylor, S. S. The Spindle Assembly Checkpoint. *Curr. Biol.* **22**, R966–R980 (2012).
310. Kavallaris, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 194–204 (2010).

311. Dumontet, C. & Jordan, M. A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 790–803 (2010).
312. Jordan, M. A. & Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 253–265 (2004).
313. Snyder, J. P., Nettles, J. H., Cornett, B., Downing, K. H. & Nogales, E. The binding conformation of Taxol in α -tubulin: A model based on electron crystallographic density. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 5312–5316 (2001).
314. Protá, A. E. *et al.* Structural Basis of Microtubule Stabilization by Lauimalide and Peloruside A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 1621–1625 (2014).
315. Zhao, Y., Mu, X. & Du, G. Microtubule-stabilizing agents: New drug discovery and cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* **162**, 134–143 (2016).
316. Schiff, P. B. & Horwitz, S. B. Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine 5'-triphosphate or microtubule-associated proteins. *Biochemistry (Mosc.)* **20**, 3247–3252 (1981).
317. Schiff, P. B., Fant, J. & Horwitz, S. B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **277**, 665–667 (1979).
318. Díaz, J. F. Molecular Recognition of Taxol by Microtubules. KINETICS AND THERMODYNAMICS OF BINDING OF FLUORESCENT TAXOL DERIVATIVES TO AN EXPOSED SITE. *J. Biol. Chem.* **275**, 26265–26276 (2000).
319. Díaz, J. F. Fast Kinetics of Taxol Binding to Microtubules. EFFECTS OF SOLUTION VARIABLES AND MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEINS. *J. Biol. Chem.* **278**, 8407–8419 (2003).
320. Díaz, J. F., Barasoain, I., Souto, A. A., Amat-Guerri, F. & Andreu, J. M. Macromolecular Accessibility of Fluorescent Taxoids Bound at a Paclitaxel Binding Site in the Microtubule Surface. *J. Biol. Chem.* **280**, 3928–3937 (2005).
321. Barasoain, I. *et al.* Probing the Pore Drug Binding Site of Microtubules with Fluorescent Taxanes: Evidence of Two Binding Poses. *Chem. Biol.* **17**, 243–253 (2010).
322. Nogales, E., Grayner Wolf, S., Khan, I. A., Ludueña, R. F. & Downing, K. H. Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. *Nature* **375**, 424–427 (1995).
323. Field, J. J., Díaz, J. F. & Miller, J. H. The Binding Sites of Microtubule-Stabilizing Agents. *Chem. Biol.* **20**, 301–315 (2013).

324. Bollag, D. M. *et al.* Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res.* **55**, 2325–2333 (1995).
325. Pryor, D. E. *et al.* The microtubule stabilizing agent laulimalide does not bind in the taxoid site, kills cells resistant to paclitaxel and epothilones, and may not require its epoxide moiety for activity. *Biochemistry (Mosc.)* **41**, 9109–9115 (2002).
326. Gaitanos, T. N. Peloruside A Does Not Bind to the Taxoid Site on α -Tubulin and Retains Its Activity in Multidrug-Resistant Cell Lines. *Cancer Res.* **64**, 5063–5067 (2004).
327. Gapud, E. J. Laulimalide and Paclitaxel: A Comparison of Their Effects on Tubulin Assembly and Their Synergistic Action When Present Simultaneously. *Mol. Pharmacol.* **66**, 113–121 (2004).
328. Ravelli, R. B. G. *et al.* Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* **428**, 198–202 (2004).
329. Bhattacharyya, B., Panda, D., Gupta, S. & Banerjee, M. Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. *Med. Res. Rev.* **28**, 155–183 (2008).
330. Peng, L. X., Hsu, M. T., Bonomi, M., Agard, D. A. & Jacobson, M. P. The Free Energy Profile of Tubulin Straight-Bent Conformational Changes, with Implications for Microtubule Assembly and Drug Discovery. *PLoS Comput. Biol.* **10**, e1003464 (2014).
331. Lu, Y., Chen, J., Xiao, M., Li, W. & Miller, D. D. An Overview of Tubulin Inhibitors That Interact with the Colchicine Binding Site. *Pharm. Res.* **29**, 2943–2971 (2012).
332. Wang, Y. *et al.* Structures of a diverse set of colchicine binding site inhibitors in complex with tubulin provide a rationale for drug discovery. *FEBS J.* **283**, 102–111 (2016).
333. Massarotti, A., Coluccia, A., Silvestri, R., Sorba, G. & Brancale, A. The Tubulin Colchicine Domain: a Molecular Modeling Perspective. *ChemMedChem* **7**, 33–42 (2012).
334. Stanton, R. A., Gernert, K. M., Nettles, J. H. & Aneja, R. Drugs that target dynamic microtubules: A new molecular perspective. *Med. Res. Rev.* **31**, 443–481 (2011).
335. Gigant, B. *et al.* Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* **435**, 519–522 (2005).
336. Chen, S.-M., Meng, L.-H. & Ding, J. New microtubule-inhibiting anticancer agents. *Expert Opin. Investig. Drugs* **19**, 329–343 (2010).
337. Cormier, A., Marchand, M., Ravelli, R. B. G., Knossow, M. & Gigant, B. Structural insight into the inhibition of tubulin by vinca domain peptide ligands. *EMBO Rep.* **9**, 1101–1106 (2008).

338. Boukari, H., Sackett, D. L., Schuck, P. & Nossal, R. J. Single-walled tubulin ring polymers. *Biopolymers* **86**, 424–436 (2007).
339. Kobayashi, S. *et al.* Pironetin, a novel plant growth regulator produced by *Streptomyces* sp. NK10958. II. Structural elucidation. *J. Antibiot. (Tokyo)* **47**, 703–707 (1994).
340. Yang, J. *et al.* Pironetin reacts covalently with cysteine-316 of α -tubulin to destabilize microtubule. *Nat. Commun.* **7**, 12103 (2016).
341. Prota, A. E. *et al.* Pironetin Binds Covalently to α Cys316 and Perturbs a Major Loop and Helix of α -Tubulin to Inhibit Microtubule Formation. *J. Mol. Biol.* **428**, 2981–2988 (2016).
342. Usui, T. *et al.* The Anticancer Natural Product Pironetin Selectively Targets Lys352 of α -Tubulin. *Chem. Biol.* **11**, 799–806 (2004).
343. Prota, A. E. *et al.* A new tubulin-binding site and pharmacophore for microtubule-destabilizing anticancer drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 13817–13821 (2014).
344. Pera, B. *et al.* New Interfacial Microtubule Inhibitors of Marine Origin, PM050489/PM060184, with Potent Antitumor Activity and a Distinct Mechanism. *ACS Chem. Biol.* **8**, 2084–2094 (2013).
345. Li, J. *et al.* Expression of MRP1, BCRP, LRP, and ERCC1 in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Correlation With Response to Chemotherapy and Survival. *Clin. Lung Cancer* **10**, 414–421 (2009).
346. Chen, Z. *et al.* Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett.* **370**, 153–164 (2016).
347. Westover, D. & Li, F. New trends for overcoming ABCG2/BCRP-mediated resistance to cancer therapies. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **34**, (2015).
348. Lhommé, C. *et al.* Phase III study of valsopodar (PSC 833) combined with paclitaxel and carboplatin compared with paclitaxel and carboplatin alone in patients with stage IV or suboptimally debulked stage III epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **26**, 2674–2682 (2008).
349. Monzó, M. *et al.* Paclitaxel resistance in non-small-cell lung cancer associated with beta-tubulin gene mutations. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **17**, 1786–1793 (1999).
350. Rosell, R. *et al.* Transcripts in pretreatment biopsies from a three-arm randomized trial in metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncogene* **22**, 3548–3553 (2003).
351. Rouzier, R. *et al.* Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 8315–8320 (2005).

352. Gan, P. P., Pasquier, E. & Kavallaris, M. Class III β -Tubulin Mediates Sensitivity to Chemotherapeutic Drugs in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* **67**, 9356–9363 (2007).
353. Sève, P. & Dumontet, C. Is class III beta-tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents? *Lancet Oncol.* **9**, 168–175 (2008).
354. Sève, P. & Dumontet, C. [Class III beta tubulin expression in nonsmall cell lung cancer]. *Rev. Mal. Respir.* **27**, 383–386 (2010).
355. Kavallaris, M., Burkhart, C. A. & Horwitz, S. B. Antisense oligonucleotides to class III beta-tubulin sensitize drug-resistant cells to Taxol. *Br. J. Cancer* **80**, 1020–1025 (1999).
356. Verrills, N. M., Walsh, B. J., Cobon, G. S., Hains, P. G. & Kavallaris, M. Proteome Analysis of Vinca Alkaloid Response and Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia Reveals Novel Cytoskeletal Alterations. *J. Biol. Chem.* **278**, 45082–45093 (2003).
357. Verrills, N. M. *et al.* Alterations in gamma-actin and tubulin-targeted drug resistance in childhood leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 1363–1374 (2006).
358. Masuda, A., Maeno, K., Nakagawa, T., Saito, H. & Takahashi, T. Association between Mitotic Spindle Checkpoint Impairment and Susceptibility to the Induction of Apoptosis by Anti-Microtubule Agents in Human Lung Cancers. *Am. J. Pathol.* **163**, 1109–1116 (2003).
359. Sadikot, R. T. & Blackwell, T. S. Bioluminescence Imaging. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2**, 537–540 (2005).
360. Liu, Y. *et al.* Structural optimization elaborates novel potent Akt inhibitors with promising anticancer activity. *Eur. J. Med. Chem.* **138**, 543–551 (2017).
361. Missbach, M. *et al.* A novel inhibitor of the tyrosine kinase Src suppresses phosphorylation of its major cellular substrates and reduces bone resorption in vitro and in rodent models in vivo. *Bone* **24**, 437–449 (1999).
362. García-Echeverría, C. *et al.* In vivo antitumor activity of NVP-AEW541—A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer Cell* **5**, 231–239 (2004).
363. Kawakita, Y. *et al.* Design and synthesis of pyrrolo[3,2-d]pyrimidine HER2/EGFR dual inhibitors: Improvement of the physicochemical and pharmacokinetic profiles for potent in vivo anti-tumor efficacy. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 6171–6180 (2012).
364. Gangjee, A., Yu, J., Copper, J. E. & Smith, C. D. Discovery of novel antitumor antimetabolic agents that also reverse tumor resistance. *J. Med. Chem.* **50**, 3290–3301 (2007).

365. A new purine analogue with antimetabolic activity - *European Journal of Cancer*. Available at: [http://www.ejccancer.com/article/0014-2964\(74\)90050-4/abstract](http://www.ejccancer.com/article/0014-2964(74)90050-4/abstract). (Accessed: 31st July 2017)
366. Traxler P. and Furet. Strategies toward the design of novel and selective protein tyrosine kinase inhibitors. - PubMed - NCBI. Available at: <https://sci-hub.cc/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10454197>. (Accessed: 1st August 2017)
367. Díaz, J. F. & Buey, R. M. Characterizing ligand-microtubule binding by competition methods. *Methods Mol. Med.* **137**, 245–260 (2007).
368. Apoptosis in the absence of caspase 3. *Publ. Online 04 Oct. 2001 Doi101038sjonc1204815* **20**, (2001).
369. Garcia-Calvo, M. *et al.* Inhibition of Human Caspases by Peptide-based and Macromolecular Inhibitors. *J. Biol. Chem.* **273**, 32608–32613 (1998).
370. Van Noorden, C. J. The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochem.* **103**, 241–251 (2001).
371. Lovitt, C. J., Shelper, T. B. & Avery, V. M. Advanced Cell Culture Techniques for Cancer Drug Discovery. *Biology* **3**, 345–367 (2014).
372. Hirschhaeuser, F. *et al.* Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* **148**, 3–15 (2010).
373. Mehta, G., Hsiao, A. Y., Ingram, M., Luker, G. D. & Takayama, S. Opportunities and Challenges for use of Tumor Spheroids as Models to Test Drug Delivery and Efficacy. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **164**, 192–204 (2012).
374. Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F. & Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev. Technol.* **12**, 207–218 (2014).
375. Breslin, S. & O'Driscoll, L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget* **7**, 45745–45756 (2016).
376. Nirmalanandhan, V. S., Duren, A., Hendricks, P., Vielhauer, G. & Sittampalam, G. S. Activity of anticancer agents in a three-dimensional cell culture model. *Assay Drug Dev. Technol.* **8**, 581–590 (2010).
377. Schwartz, E. L. Antivascular actions of microtubule-binding drugs. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 2594–2601 (2009).
378. Wang, D. *et al.* Immunohistochemistry in the evaluation of neovascularization in tumor xenografts. *Biotech. Histochem. Off. Publ. Biol. Stain Comm.* **83**, 179–189 (2008).

379. Keramidas, M., Jossierand, V., Feige, J.-J. & Coll, J.-L. Noninvasive and quantitative assessment of in vivo angiogenesis using RGD-based fluorescence imaging of subcutaneous sponges. *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* **15**, 239–244 (2013).
380. Vargas, A., Zeisser-Labouèbe, M., Lange, N., Gurny, R. & Delie, F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 1162–1176 (2007).
381. El Hasasna, H. *et al.* Rhus coriaria suppresses angiogenesis, metastasis and tumor growth of breast cancer through inhibition of STAT3, NFκB and nitric oxide pathways. *Sci. Rep.* **6**, 21144 (2016).
382. Kroiss, A. *et al.* Androgen-regulated microRNA-135a decreases prostate cancer cell migration and invasion through downregulating ROCK1 and ROCK2. *Oncogene* **34**, 2846–2855 (2015).
383. Mikaelian, I. *et al.* Genetic and pharmacologic inhibition of mTORC1 promotes EMT by a TGF-β-independent mechanism. *Cancer Res.* **73**, 6621–6631 (2013).
384. Dhaheri, Y. A. *et al.* Anti-Metastatic and Anti-Tumor Growth Effects of Origanum majorana on Highly Metastatic Human Breast Cancer Cells: Inhibition of NFκB Signaling and Reduction of Nitric Oxide Production. *PLoS ONE* **8**, (2013).
385. Prudent, R. *et al.* Azaindole derivatives are inhibitors of microtubule dynamics, with anti-cancer and anti-angiogenic activities: Anti-angiogenic inhibitors of microtubule dynamics. *Br. J. Pharmacol.* **168**, 673–685 (2013).
386. Kain, K. H. *et al.* The chick embryo as an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **243**, 216–228 (2014).
387. Ribatti, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* (2016). doi:10.1016/j.reprotox.2016.11.004
388. Fein, M. R. & Egeblad, M. Caught in the act: revealing the metastatic process by live imaging. *Dis. Model. Mech.* **6**, 580–593 (2013).
389. Zijlstra, A., Lewis, J., Degryse, B., Stuhlmann, H. & Quigley, J. P. The inhibition of tumor cell intravasation and subsequent metastasis via regulation of in vivo tumor cell motility by the tetraspanin CD151. *Cancer Cell* **13**, 221–234 (2008).
390. Zijlstra, A. *et al.* A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction. *Cancer Res.* **62**, 7083–7092 (2002).

391. Man, S., Munoz, R. & Kerbel, R. S. On the development of models in mice of advanced visceral metastatic disease for anti-cancer drug testing. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 737–747 (2007).
392. Aslakson, C. J. & Miller, F. R. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* **52**, 1399–1405 (1992).
393. Zinn, K. R. *et al.* Noninvasive Bioluminescence Imaging in Small Animals. *ILAR J. Natl. Res. Counc. Inst. Lab. Anim. Resour.* **49**, 103–115 (2008).
394. Li, J., Ren, J. & Sun, W. Systematic review of ixabepilone for treating metastatic breast cancer. *Breast Cancer Tokyo Jpn.* **24**, 171–179 (2017).
395. Dybdal-Hargreaves, N. F., Risinger, A. L. & Mooberry, S. L. Eribulin Mesylate: Mechanism of Action of a Unique Microtubule Targeting Agent. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**, 2445–2452 (2015).
396. Bai, R. *et al.* Interactions of halichondrin B and eribulin with tubulin. *J. Chem. Inf. Model.* **51**, 1393–1404 (2011).
397. Jordan, M. A., Toso, R. J., Thrower, D. & Wilson, L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 9552–9556 (1993).
398. Schmitt, S. M., Stefan, K. & Wiese, M. Pyrrolopyrimidine Derivatives as Novel Inhibitors of Multidrug Resistance-Associated Protein 1 (MRP1, ABCC1). *J. Med. Chem.* **59**, 3018–3033 (2016).
399. Ughachukwu, P. & Uneke, P. Efflux Pump-Mediated Resistance in Chemotherapy. *Ann. Med. Health Sci. Res.* **2**, 191–198 (2012).
400. Osgood, C. L. *et al.* FDA Approval Summary: Eribulin for Patients with Unresectable or Metastatic Liposarcoma who have Received a Prior Anthracycline-Containing Regimen. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* (2017). doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2422
401. Aseyev, O., Ribeiro, J. M. & Cardoso, F. Review on the clinical use of eribulin mesylate for the treatment of breast cancer. *Expert Opin. Pharmacother.* **17**, 589–600 (2016).
402. Rustin, G. J. *et al.* A Phase Ib trial of CA4P (combretastatin A-4 phosphate), carboplatin, and paclitaxel in patients with advanced cancer. *Br. J. Cancer* **102**, 1355–1360 (2010).

Thèse soutenue par Pauline GILSON

CARACTERISATION *IN VITRO* ET *IN VIVO* DE NOUVEAUX AGENTS PYRROLO-PYRIMIDINE CIBLANT LES MICROTUBULES POUR LE TRAITEMENT DES CANCERS

En dépit de l'émergence des thérapies ciblées et de l'immunothérapie, la chimiothérapie reste un gold-standard pour le traitement de nombreux cancers. Parmi les agents chimiothérapeutiques conventionnels, les antimétoproliques interférant avec la dynamique des microtubules (taxanes, vinca-alcaloïdes) sont très largement utilisés. Cependant, leurs nombreux effets indésirables et l'émergence de chimiorésistance limitent leur efficacité et soulignent la nécessité d'identifier de nouveaux inhibiteurs de la tubuline.

Notre équipe a réalisé un criblage cellulaire à haut-débit sur plus de 7500 molécules chimiques et identifié une famille de composés pyrrolo-pyrimidine, active sur les formes de cancer pulmonaire résistantes à l'apoptose et aux thérapies ciblées. Notre objectif était de caractériser *in vitro* et *in vivo* 15 molécules de cette famille afin d'identifier à terme un potentiel candidat-médicament pour le traitement des cancers résistants.

Des essais préliminaires de cytotoxicité et d'apoptose sur différentes lignées cancéreuses pulmonaires ont permis de sélectionner, parmi les 15 composés pyrrolo-pyrimidine, 2 molécules prometteuses : PP-2 et PP-13. PP-2 et PP-13 ont des effets cytotoxiques sur de nombreuses lignées cancéreuses humaines, incluant les lignées résistantes aux thérapies ciblées. En perturbant l'organisation et la dynamique des microtubules, PP-2 et PP-13 induisent le blocage transitoire des cellules en proméphase puis aboutissent aux phénomènes de catastrophe mitotique, de glissement mitotique ou de division asymétrique. Des études mécanistiques avancées montrent que PP-2 et PP-13 sont des agents poisons du fuseau et entrent en compétition avec la colchicine pour la liaison sur la tubuline. Contrairement aux antimétoproliques conventionnels, PP-2 et PP-13 ne sont pas sensibles aux mécanismes de chimiorésistance par surexpression de pompes d'efflux. De plus, à l'IC50, ces 2 composés n'affectent pas le réseau microtubulaire des cellules à l'interphase suggérant un effet toxique (et principalement neurotoxique) moindre. La molécule PP-13 semble être la molécule anticancéreuse la plus prometteuse en raison de son IC50 10 fois inférieure à celle de PP-2 dans les différentes lignées cancéreuses étudiées et d'une affinité pour la tubuline 2 fois plus élevée. *In vivo*, PP-13 réduit significativement la croissance tumorale et étatsistique. L'ensemble de ces résultats suggère que PP-13 pourrait être une alternative intéressante pour le traitement de nombreux cancers y compris des cancers chimiorésistants.

CHARACTERIZATION OF NEW MICROTUBULE-TARGETING AGENTS WITH A PYRROLO-PYRIMIDINE STRUCTURE FOR THE TREATMENT OF CANCERS

Despite the emergence of targeted therapies and immunotherapy, chemotherapy remains a gold-standard for the treatment of numerous malignancies. Antimitotic agents that interfere with microtubule dynamics (taxanes, vinca alkaloids) are commonly used in chemotherapy drug combinations. However, their troublesome side effects and the emergence of resistance highlight the need for identifying alternative agents. Thanks to a high throughput cell-based assay, we screened agents able to restore apoptosis in apoptosis-resistant lung cancer cells. We selected 15 molecules belonging to the pyrrolopyrimidine family and investigated their anti-cancer effects *in vitro* and *in vivo*. Our aim was to identify a potential drug-candidate for the treatment of resistant cancers.

From cytotoxicity and apoptosis preliminary assays, we selected the 2 most promising molecules (PP-2, PP-13) among the 15 pyrrolopyrimidine compounds. PP-2 and PP-13 exert cytotoxic effects on a large panel of human cancer cell lines, including targeted therapy-resistant cell lines. By interfering with mitotic spindle organization and microtubule dynamics, PP-2 and PP-13 impair the congression of the chromosomes, promote spindle assembly checkpoint-dependent mitotic blockade and finally lead to asymmetric division, mitotic slippage and direct apoptotic death. PP-2 and PP-13 directly target tubulin and compete with colchicine for the binding to tubulin. Unlike conventional antimitotic agents, PP-2 and PP-13 are not sensitive to chemoresistance mechanisms involving the overexpression of efflux pumps. Moreover, at IC50, these two compounds do not affect the microtubule network during interphase suggesting a less toxic (mainly neurotoxic) effect. Among these two compounds, the PP-13 molecule appears to be the most interesting anti-cancer molecule because of its IC50 10-fold lower than PP-2 and its 2-fold higher affinity for tubulin. *In vivo*, PP-13 significantly reduces tumor and metastasis growth. All these results suggest that PP-13 might be a potential alternative for the treatment of many cancers including chemoresistant cancers.

Mot-clés : criblage à haut débit, microtubules, antimétoproliques, résistance, apoptose.

Keywords: high-throughput screen, microtubules, antimitotic agent, resistance, apoptosis.

Centre de Recherche Institute for Advanced Biosciences (IAB)

UGA-Inserm U1209-CNRS UMR5309

Equipe COLL "Thérapie ciblée, diagnostic précoce et imagerie du cancer"

