



HAL
open science

Évaluation de l'activité anticancéreuse d'un nouveau dérivé pyrrolo-pyrimidine (PP-13) ciblant les microtubules dans les cancers broncho-pulmonaires non-à-petites cellules résistants

Pauline Gilson

► **To cite this version:**

Pauline Gilson. Évaluation de l'activité anticancéreuse d'un nouveau dérivé pyrrolo-pyrimidine (PP-13) ciblant les microtubules dans les cancers broncho-pulmonaires non-à-petites cellules résistants. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01470464

HAL Id: dumas-01470464

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01470464v1>

Submitted on 27 Feb 2017

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2017

N°

**EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTICANCEREUSE D'UN NOUVEAU DERIVE
PYRROLO-PYRIMIDINE (PP-13) CIBLANT LES MICROTUBULES DANS LES
CANCERS BRONCHO-PULMONAIRES NON-A-PETITES CELLULES
RESISTANTS**

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES D'INNOVATION
PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de THESE

Pauline GILSON

[Données à caractère personnel]

MEMOIRE SOUTENU PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE
GRENOBLE

Le : 19/01/2017

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury : Monsieur le Professeur Jean-Luc Lenormand

Membres : Madame le Docteur Amandine Hurbin (co-directeur de thèse)

Monsieur le Docteur Benoit Busser (co-directeur de thèse)

Monsieur le Docteur Walid Rachidi

Madame le Docteur Carole Ferraro-Peyret

Monsieur le Docteur Xavier Fonrose

Doyen de la Faculté : M. le Pr. Michel SEVE

Vice-doyen et Directrice des Etudes : Mme Christine DEMEILLIERS

Année 2016-2017

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	LAPM - UMR CNRS 5163
PU-PH	ALLENET	Benoit	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
PU	BAKRI	Aziz	TIMC-IMAG CNRS UMR 5525
ATER	BARDET	Jean-Didier	
MCU	BATANDIER	Cécile	LBFA - INSERM U1055
MCU-PH	BEDOUCHE	Pierrick	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	HP2 - INSERM U1042
MAST	BELLET	Béatrice	-
ATER	BOUCHERLE	Benjamin	DPM
DCE	BOULADE	Marine	SyMMES
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	DPM -UMR 5063 UJF CNRS
DCE	BOURDIER	Guillaume	HP2
MCU	BOURGOIN	Sandrine	IAB - CRI INSERM UJF U823
DCE	BOUVET	Raphaël	HP2
MCU	BRETON	Jean	L.C.I.B. - UMR E3 CEA UJF
MCU	BRIANCON-MARJOLLET	Anne	HP2 - INSERM U1042
DCE	BROCCO	Benjamin	ILL
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	IBS - UMR 5075 CEA CNRS UJF
PU	BURMEISTER	Wim	UVHCI - UMI 3265 UJF EMBL CNRS
MCU-PH	BUSSER	Benoit	IAB - CRI INSERM UJF U823
Professeur émérite	CALOP	Jean	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	LAPM - UMR 5163 CNRS UJF
AHU	CHANOINE	Sébastien	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
MCU	CHOISNARD	Luc	DPM -UMR 5063 UJF CNRS
AHU	CHOVELON	Benoit	DPM -UMR 5063 UJF CNRS
PU-PH	CORNET	Murielle	THEREX - TIMC IMAG UMR 5525 CNRS UJF
DCE	COUCHET	Morgane	LBFA
PU-PH	DANEL	Vincent	SMUR SAMU
PU	DECOUT	Jean-Luc	DPM -UMR 5063 UJF CNRS
MCU	DELETRAZ - DELPORTE	Martine	Equipe SIS -EAM 4128 UCB
MCU	DEMEILLIERS	Christine	LBFA - INSERM U1055
PU	DROUET	Christian	AGIM - CNRS 3405

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
PU	DROUET	Emmanuel	UVHCI - UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
MCU	DURMORT - MEUNIER	Claire	I.B.S – UMR 5075 CEA UJF CNRS
PU-PH	FAURE	Patrice	HP2- INSERM U1042
PRCE	FITE	Andrée	-
AHU	GARNAUD	Cécile	THEREX – TIMC IMAG UMR 5525 NCRS UJF
PRAG	GAUCHARD	Pierre-Alexis	-
MCU-PH	GERMI	Raphaëlle	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
MCU	GEZE	Annabelle	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	GILLY	Catherine	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	GODIN-RIBUOT	Diane	HP2- INSERM U1042
PRCE	GOUBIER MATHYS	Laurence	-
Professeure émérite	GRILLOT	Renée	-
MCU	GROSSET	Catherine	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	GUIEU	Valérie	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
AHU	HENNEBIQUE	Aurélie	sous réserve de création de poste
MCU	HININGER-FAVIER	Isabelle	LBFA - Inserm U1055
MCU	JOYEUX-FAURE	Marie	HP2- INSERM U1042
MCU	KHALEF	Nawel	TIMC-IMAG CNRS UMR 5525
MCU	KRIVOBOK	Serge	LCBM, IRTSV CEA
DCE	LE	Cong Anh Khanh	CERMAV
PU	LENORMAND	Jean Luc	THEREX, TIMC-IMAG
DCE	MARILLIER	Mathieu	HP2
PU	MARTIN	Donald	TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF CNRS
AHU	MAZET	Roseline	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	MELO DE LIMA	Christelle	L.E.C.A – UMR CNRS 5553
PU	MOINARD	Christophe	LBFA - Inserm U1055
DCE	MONTEMAGNO	Christopher	LRB
ATER	MORAND	Jessica	HP2
PU-PH	MOSSUZ	Pascal	THEREX - TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCU	MOUHAMADOU	Bello	L.E.C.A – UMR CNRS 5553
DCE	MOULIN	Sophie	HP2
DCE	NADER	Serge	LCBM
DCE	NGUYEN	Kim-Anh	DPM
MCU	NICOLLE	Edwige	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	OUKACINE	Farid	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	PERES	Basile	DPM- UJF/CNRS UMR 5063
DCE	PERONNE	Lauralie	IAB
MCU	PEUCHMAUR	Marine	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	PEYRIN	Éric	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	RACHIDI	Walid	L.C.I.B - UMR E3 CEA/UJF
MCU	RAVELET	Corinne	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	RIBUOT	Christophe	HP2- INSERM U1042

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
PAST	RIEU	Isabelle	-
Professeure émérite	ROUSSEL	Anne -Marie	-
PU-PH	SEVE	Michel	CR INSERM / UJF U823 Institut Albert Bonniot
MCU	SOUARD	Florence	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
DCE	TAHER	Raleb	IBS
ATER	TAHMASEBI	Faezeh	TIMC-IM2AG
MCU	TARBOURIECH	Nicolas	UVHCI, UMR 3265 UJF-EMBL- CNRS
DCE	TODOROV	Zlatomir	BCI
PAST	TROUILLER	Patrice	-
DCE	VACHEZ	Yvan	CRI-GIN
MCU	VANHAVERBEKE	Cécile	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
DCE	VERNET	Céline	CRI-IAB
DCE	VRAGNIAU	Charles	UVHCI
PU	WOUESSIDJEWE	Denis	DPM –UMR 5063 UJF CNRS

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches

BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIB : Centre d'Innovation en Biologie

CRI : Centre de Recherche INSERM

CNRS : Centre National de Recherche Scientifique

DCE : Doctorants Contractuels Enseignement

DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire et de Cognition et Ontogenèse »

HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

IAB : Institut Albert Bonniot,

IBS : Institut de Biologie Structurale

JR : Jean Roget

LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes

LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux

LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie

LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine

LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers

PAST : Professeur Associé à Temps Partiel

PRAG : Professeur Agrégé

PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement

PU : Professeur des Universités

PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers

TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation

UMR: Unité Mixte de Recherche

UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

Remerciements

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

Au président de thèse

Monsieur le Professeur Jean-Luc Lenormand

Je suis sensible à l'honneur que vous me faites de présider mon jury de thèse. 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. Grâce à toi, j'ai pu apprendre beaucoup sur la méthodologie et la rigueur scientifiques. Je suis très heureuse de pouvoir continuer ma thèse d'Université avec toi.

Monsieur le Docteur Benoit Busser

Merci beaucoup pour ton soutien sans faille, tes encouragements, ta bonne humeur et pour m'avoir laissé de l'autonomie.

Merci également pour tes conseils et tes critiques scientifiques très constructives.
Tu as été mon mentor tout au long de mon internat.

Aux membres du jury :

Monsieur le Docteur Walid Rachidi

Je tiens sincèrement à vous remercier d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Merci également pour votre gentillesse ainsi que pour les enseignements que vous m'avez confiés.

Veuillez trouver ici l'assurance de mon profond respect.

Madame le Docteur Carole Ferraro-Peyret

Je vous remercie sincèrement de me faire l'honneur de juger mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

Monsieur le Docteur Xavier Fonrose

Je te remercie d'avoir accepté avec tant d'enthousiasme de participer à l'évaluation de ce travail de thèse. Un grand merci également pour tous nos échanges et réflexions sur les microtubules.

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

Je remercie sincèrement le Professeur Benoît Polack de m'avoir accueillie au sein de l'Institut de Biologie et Pathologie (IBP) 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 des Biosciences Avancées (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 de son 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.

Aux Drs Laurence Lafanechère et 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 et Jon' mes colocs de bureau, Morgane, Julien Mélanie, Maxime, Thibault, Véronique, Xavier, Annie, Lucie, Julien, Laetitia, et à tous les anciens membres pour leur accueil, leur gentillesse, leurs conseils scientifiques et leur bonne humeur.

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

Une pensée pour tous les membres de l'Unité Médicale 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 4 ans d'internat. Je remercie notamment les « Ensmm », Clem, Marco, Jerem, Bea, Juju, Raph, Hortense, Nico pour tous les bons week-ends passés ensemble.

Un immense merci aux pharmaciennes Amande, Anne-So, Mahoud, Lulu pour leur précieuse amitié.

Aux trois autres fantastiques : Lulu ma co-workeuse d'internat, Caro et Anne !! Après Rouen, à quand un week-end grenoblois ?

A tous les « vieux IPR » Kat, Julie, Delphine, Manu et Nuria, qui m'ont si bien accueillie à mon arrivée à Grenoble. Merci pour toutes ces soirées passées ensemble et ces « bons repas » à l'internat.

Et bien sûr à toute la team Bisontine - ils se reconnaîtront-!

A ma belle-famille pour son accueil.

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

A toi, mon Max, mon roc, qui ne comprend pas grand chose à la cancérologie et aux microtubules, mais qui a toujours été là pour « chasser les fautes d'orthographe » dans mon manuscrit, écouter mes présentations, la jouer top chef pour mon pot de thèse, bref pour toujours me soutenir et me motiver ! Merci pour toutes ces années passées ensemble et pour toutes celles à venir....

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

Table des matières

Table des matières	1
Index des Illustrations	3
Liste des abréviations	7
Introduction	11
1. Les cancers broncho-pulmonaires	11
1.1. Généralités	11
1.1.1. Données épidémiologiques des cancers broncho-pulmonaires	11
1.1.2. Facteurs étiologiques et facteurs de risque	16
1.1.2.1. Le tabagisme	16
1.1.2.2. Le radon	17
1.1.2.3. Autres substances cancérigènes	17
1.1.2.4. Prédisposition génétique	17
1.1.2.5. Pathologies pulmonaires et systémiques	17
1.1.3. Classification des cancers du poumon	17
1.1.3.1. Classification histologiques (OMS)	18
1.1.3.2. Classification TNM (UICC)	20
1.2. Les CBNPC	22
1.2.1. Physiopathologie des CBNPC	22
1.2.2. Caractéristiques moléculaires des CBNPC	25
1.2.2.1. Les proto-oncogènes	25
1.2.2.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs	29
1.2.3. Prise en charge thérapeutique des CBNPC	31
1.2.3.1. Diagnostic	31
1.2.3.2. Pronostic	33
1.2.3.3. Thérapeutique	34
1.2.3.4. Suivi des patients porteurs de CBNPC	43
2. Microtubules	45
2.1. Structure des microtubules	45
2.1.1. Structure générale	45
2.1.2. La tubuline	46
2.1.2.1. Les tubulines α et β	47
2.1.2.2. La tubuline γ	48

2.1.2.3. Les isotypes de tubuline	49
2.1.2.4 Les modifications post-traductionnelles de la tubuline	49
2.2. Dynamique des microtubules	51
2.2.1. Cinétique d'assemblage/désassemblage des microtubules <i>in vitro</i>	51
2.2.2. Dynamique des microtubules <i>in vivo</i>	55
2.2.2.1. Les centres organisateurs de microtubules (COMT)	56
2.2.2.2. Les protéines régulatrices de la dynamique des microtubules	61
2.3. Fonctions des microtubules	65
2.3.1. Rôles des microtubules dans les cellules en interphase	65
2.3.2. Rôles des microtubules dans les cellules en mitose	66
2.3.2.1. Le fuseau microtubulaire mitotique	68
2.3.2.2. Attachement des chromosomes au fuseau mitotique et point de contrôle mitotique	69
2.4. Les agents ciblant les microtubules	71
2.4.1. Les agents stabilisateurs de microtubules	71
2.4.1.1. Domaine de liaison des taxoïdes	71
2.4.1.2. Domaine de liaison du laulimalide et du péloruside A	73
2.4.2. Les agents déstabilisateurs de microtubules	74
2.4.2.1. Domaine de liaison des colchicinoïdes	74
2.4.2.2. Domaine de liaison des vinca-alcaloïdes	75
2.4.2.3. Autres domaines de liaison des MDA	77
2.5. Résistances aux agents ciblant les microtubules	79
2.5.1. La surexpression de pompes membranaires d'efflux	80
2.5.2. L'altération qualitative ou quantitative des microtubules ou des protéines associées	81
2.5.3. L'altération des interactions entre les microtubules et les autres membres du cytosquelette	81
2.5.4. L'altération des processus apoptotiques	81
Objectifs du travail de thèse	83
Résultats	85
Conclusion	131
Bibliographie	133
Serment de galien	149

Index des Illustrations

Figures

Figure 1 : Taux d'incidence et de mortalité des cancers broncho-pulmonaires dans les différentes régions mondiales.....	12
Figure 2 : Evolution des taux de mortalité liée au cancer du poumon chez l'homme et la femme dans les différents pays.....	13
Figure 3 : Evolution de la consommation tabagique et des taux de mortalité des cancers broncho-pulmonaires chez l'homme et la femme aux Etats-Unis	14
Figure 4 : Estimation du nombre de cas et de décès par localisation en 2012 en France, chez l'homme et la femme.....	15
Figure 5 : Incidence des cancers broncho-pulmonaires selon le sexe et l'âge.....	16
Figure 6 : Représentation schématique des processus physiopathologiques impliqués dans la survenue d'une tumeur pulmonaire.....	23
Figure 7 : Les caractéristiques biologiques (ou hallmarks) d'une cellule cancéreuse, selon D. Hanahan et RA. Weinberg.....	24
Figure 8 : Représentation schématique des voies de signalisation intracellulaire altérées lors de la tumorigenèse.....	25
Figure 9 : Principales anomalies génétiques identifiées dans les adénocarcinomes et des carcinomes à cellules squameuses.....	26
Figure 10 : Représentation schématique des principaux acteurs des voies de signalisation intracellulaires altérés dans les CPNPC.....	27
Figure 11 : Les voies p16 ^{Ink4a} /Rb et p14 ^{ARF} /p53 impliquées dans la régulation du cycle cellulaire.....	29
Figure 12 : Arbre décisionnel pour le diagnostic des carcinomes indifférenciés.	32
Figure 13 : Score de performance établi par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)	33
Figure 14 : Arbre décisionnel résumant les modalités de prise en charge d'un CPNPC de stade I ou II.	36
Figure 15 : Arbre décisionnel résumant les modalités de prise en charge d'un CPNPC de stade IIIA.	37

Figure 16 : Arbre décisionnel résumant les modalités de prise en charge d'un CPNPC de stade IIIB	38
Figure 17 : Arbre décisionnel résumant les modalités de prise en charge d'un CPNPC de stade IV.	39
Figure 18 : Principales mutations de l'EGFR conférant une sensibilité ou une résistance aux EGFR-TKI.	41
Figure 19 : Principaux mécanismes de résistance aux EGFR-TKI de première génération (erlotinib, gefitinib).	42
Figure 20 : Les principaux composants du cytosquelette dans les cellules eucaryotes.	45
Figure 21 : Représentation schématique des microtubules.....	46
Figure 22 : Structure tridimensionnelle de l'hétérodimère d' α/β tubuline (diagramme Ribbon).	47
Figure 23 : Les domaines fonctionnels de l'hétérodimère de tubuline	48
Figure 24 : Localisation des principales modifications post-traductionnelles.....	51
Figure 25 : Représentation schématique de l'assemblage des microtubules in vitro par suivi turbidimétrique à 350nm.	52
Figure 26 : Représentation schématique d'un microtubule en cours d'élongation.....	53
Figure 27 : Représentation schématique du phénomène de tapis roulant.....	53
Figure 28 : L'instabilité dynamique des microtubules.	54
Figure 29 : Structure des centrosomes.....	57
Figure 30 : Les complexes de γ -tubuline (γ -TuRC) sont des agents nucléateurs de microtubules.....	58
Figure 31 : Le cycle de duplication des centrosomes.	59
Figure 32 : Structure des cils et des flagelles	60
Figure 33 : Les COMT non centrosomiaux.	60
Figure 34 : Représentation schématique du réseau microtubulaire interphasique.....	65
Figure 35 : Représentation schématique du transport intracellulaire des cargos par les MAPs motrices le long des microtubules.	66
Figure 36 : Représentation schématique des phases du cycle cellulaire dans les cellules eucaryotes.....	67
Figure 37 : Représentation schématique des 3 types de microtubules mitotiques.	68

Figure 38 : Représentation schématique des différentes configurations d'attachement des kinétochores au fuseau mitotique.....	69
Figure 39 : Mécanisme du SAC.	70
Figure 40 : Structure et domaine de liaison du paclitaxel sur la tubuline.....	73
Figure 41 : Structure et domaine de liaison du péloruside A sur la tubuline.....	73
Figure 42 : Structure et domaine de liaison de la colchicine sur la tubuline.....	75
Figure 43 : Structure et domaine de liaison de la vinblastine sur la tubuline.....	77
Figure 44 : Structure et domaine de liaison de la pironétine sur la tubuline.....	78
Figure 45 : Structure et domaine de liaison du PM060184 sur la tubuline.....	79
Figure 46 : Principaux mécanismes de résistance aux agents ciblant les microtubules.....	80

Tableaux

Tableau 1 : Classification des adénocarcinomes pulmonaires établie par l'International Association for the Study of Lung Cancer, l'American Thoracic society et l'European Respiratory Society.....	19
Tableau 2 : 7 ^{ème} édition de la classification TNM, établie en 2009.....	21
Tableau 3 : Taux de survie à 5 ans des CPNPC selon le sexe.	34
Tableau 4 : Taux de survie à 5 ans des CPNPC selon l'âge.....	34
Tableau 5 : Stade au diagnostic et taux de survie en fonction de l'extension d'un cancer bronchopulmonaire.	34
Tableau 6 : résumé des modalités thérapeutiques de prise en charge d'un CPNPC selon son stade.	35
Tableau 7 : Les principales modifications post-traductionnelles de la tubuline et des microtubules.....	50
Tableau 8 : Principaux constituants et régulateurs des γ -TuRC.....	58
Tableau 9 : Les principales MAPs stabilisatrices, leur localisation au niveau des microtubules et leurs fonctions biochimiques.....	62
Tableau 10 : Les principales MAPs déstabilisatrices, leur localisation au niveau des microtubules et leurs fonctions biochimiques.....	64
Tableau 11 : Les principaux taxanes et leurs indications thérapeutiques.....	72
Tableau 12 : La colchicine et ses indications thérapeutiques.....	74
Tableau 13 : Les vinca-alcaloïdes et leurs indications thérapeutiques.....	76
Tableau 14 : Sensibilité des agents ciblant les microtubules aux différents mécanismes de chimiorésistance.....	81

Liste des abréviations

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
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
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BPCO	BronchoPneumopathie Chronique Obstructive
BRAF	v-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B1
Bub1	Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1
BubR1	Budding Uninhibited by Benzimidazoles Related 1
CAMSAPs	CAIModulin-regulated Spectrin-Associated Proteins
CAP-Gly domain	Cytoskeleton-Associated Protein GLYcine-rich domain
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
del19	Délétion de l'exon 19 de l' <i>EGFR</i>
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGFR-TKI	Inhibiteurs de l'activité Tyrosine Kinase de l'EGFR
EML4	Echinoderm Microtubule Like protein 4
FGFR1	Fibroblast-Growth Factor Receptor 1
FHIT	Fragile Histidine Triad gene
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
GCP	γ -tubulin Complex Protein
GDP	Guanosine DiPhosphate
GTP	Guanosine 5'-TriPhosphate
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HER	Human Epidermal growth factor Receptor
HGFR	Hepatocyte Growth Factor Receptor
IARC	International Agency for Research on Cancer
IHC	ImmunoHistoChimie
JAK	JANus Kinase
K-RAS	Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog
L858R	Substitution de la Leucine en position 858 en arginine
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
MDR	MultiDrug Resistance
MET	Mesenchymal-to-Epithelial Transition gene
MRP1	Multidrug Resistance-associated Protein 1
MSA	Microtubule Stabilizing Agent
mTor	Mammalian Target Of Rapamycin
NEDD1	Neural precursor cell Expressed Developmentally Downregulated 1
NGS	Next-Generation Sequencing
NuSAP	NUcleolar and Spindle-Associated Protein
OBFR	Optogénétique BiFocale Rapide
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCM	PeriCentriolar Material
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
P-gp	P-glycoprotein
PI3K	PhosphoInositide 3-Kinase
PI3KCA	PhosphoInositide-3-Kinase, Catalytic Alpha polypeptide
PRC1	Protein Required for Cytokinesis 1
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
Rarβ	Retinoic Acid Receptor B
RASSF1	Ras ASSociation domain Family member 1
RB	RetinoBlastoma
RCP	Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
ROS1	C-ROS oncogene 1
SAC	Spindle Assembly Checkpoint
SCC	Carcinomes à Cellules Squameuses
SIDA	Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise

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
TTF-1	Thyroid Transcription Factor-1
TTL	Tubulin Tyrosine Ligase
TTLL	Tubulin Tyrosine Ligase- Like family members
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
XMAP215	Xenopus Microtubule-Associated Protein

Introduction

1. Les cancers broncho-pulmonaires

1.1. Généralités

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 monde (1). En France métropolitaine, on estime à 385 000 le nombre de nouveaux cancers en 2015 (2). En raison de l'accroissement et du vieillissement de la population française ainsi que de l'amélioration des outils diagnostiques, l'incidence des cancers (toutes localisations confondues) est en augmentation croissante (3). Les cancers les plus fréquemment diagnostiqués chez l'homme et la femme sont respectivement les cancers de la prostate et du sein.

Avec plus de 149 000 décès annuels, les cancers sont reconnus en France comme une priorité nationale de santé publique. Depuis 2003, 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 principaux (4):

- 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

1.1.1. Données épidémiologiques des cancers broncho-pulmonaires

En 2012, on recense à travers le monde plus de 1.8 millions de nouveaux cas de cancer du poumon (soit 13% de tous les cas de cancers) ce qui place cette néoplasie au 3^{ème} rang des cancers les plus fréquemment diagnostiqués. De surcroit, il s'agit de la principale cause de mortalité par cancer avec 1.6 millions de décès estimés (soit 1/5^{ème} de tous les décès par tumeur) (1). Comparativement aux autres localisations, le cancer bronchique a le ratio mortalité / incidence le plus élevé (0.87 en moyenne dans le monde) en raison d'un très faible taux de survie. Les taux d'incidence et de mortalité évoluent donc selon les mêmes tendances, indépendamment de l'indice de développement humain du pays (1). L'Amérique du Nord est le continent où le cancer broncho-pulmonaire est le plus fréquent (taux d'incidence standardisé à l'âge de 38.3/100 000 habitants), tandis que le taux d'incidence le plus faible est attribué à l'Afrique de l'Ouest (1.4/100 000 habitants) (5) (**figure 1**).

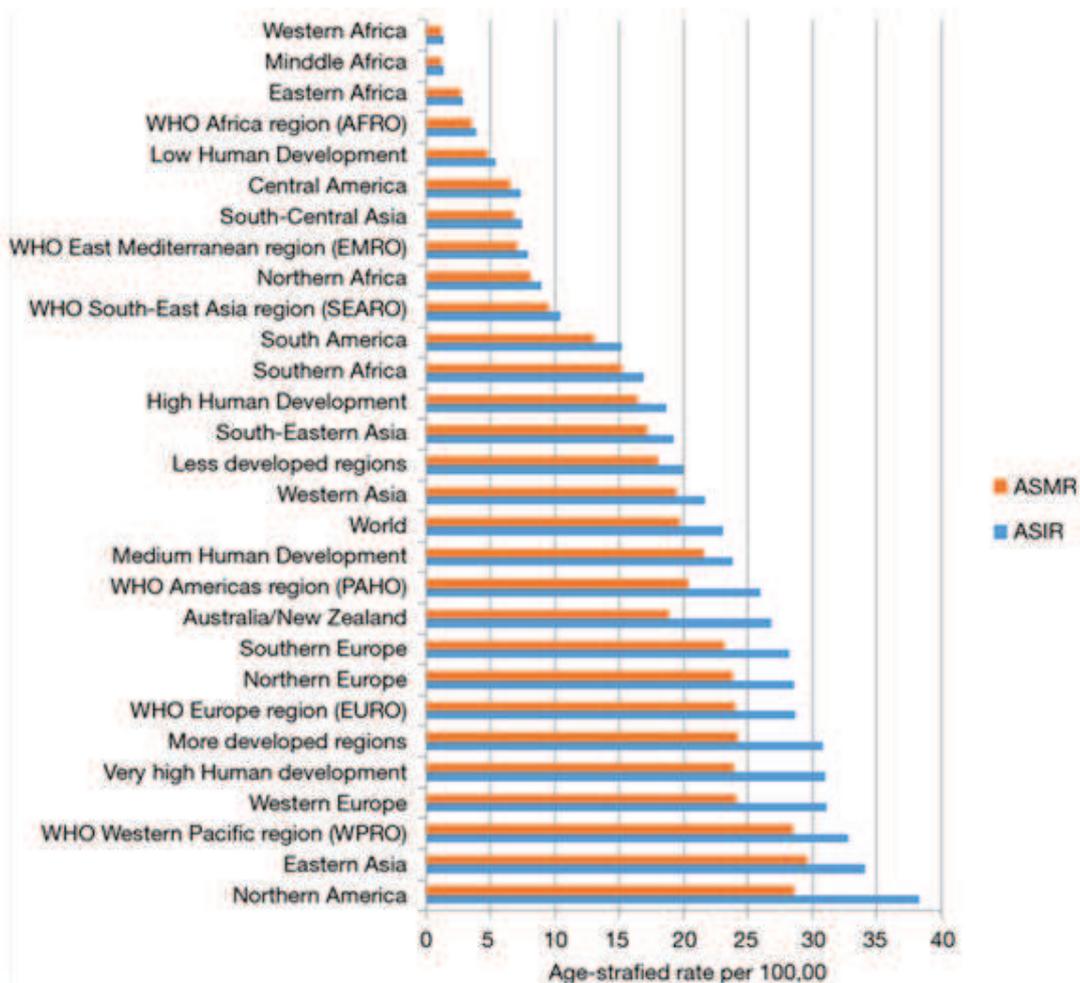


Figure 1: Taux d'incidence (ASIR, en bleu) et de mortalité (ASMR, en orange) des cancers broncho-pulmonaires dans les différentes régions mondiales (taux standardisé avec l'âge, tous sexes confondus) (5).

Avant 1980, l'incidence et la mortalité liées au cancer du poumon sont en constante augmentation chez les deux sexes dans les pays à fort indice de développement humain. On assiste depuis le milieu des années 1980 à une forte diminution de ces 2 paramètres chez l'homme (**Figure 2a**). Chez la femme, cette inversion de tendance semble décalée dans le temps, de près de 20 ans par rapport à celle de l'homme (**Figure 2b**). Elle semble déjà avoir débuté aux Etats-Unis et en Europe du Nord depuis les années 2000, tandis que dans les pays d'Europe de l'Est, de l'Ouest et du Sud, la mortalité par cancer bronchique chez la femme ne cesse de croître (6).

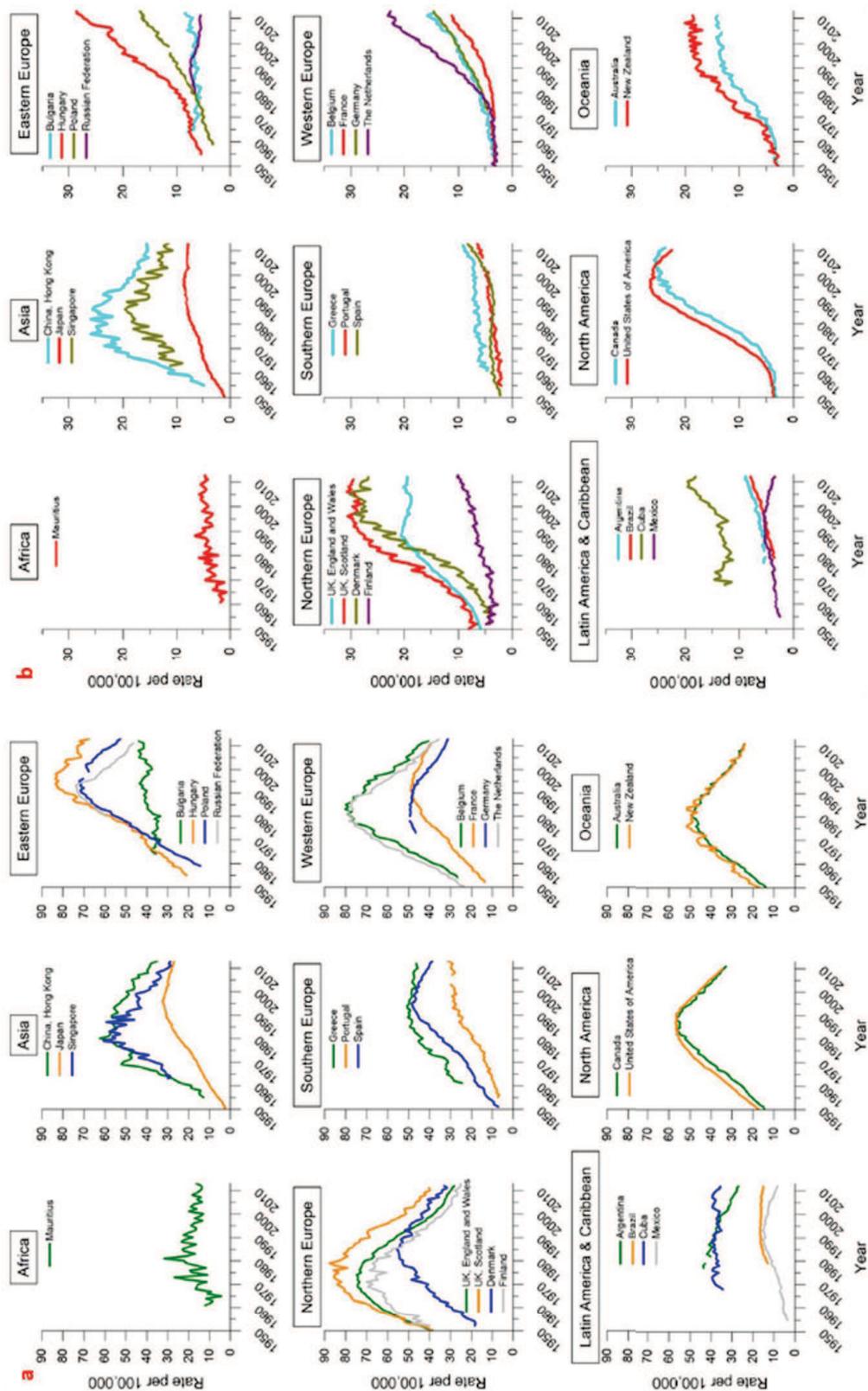
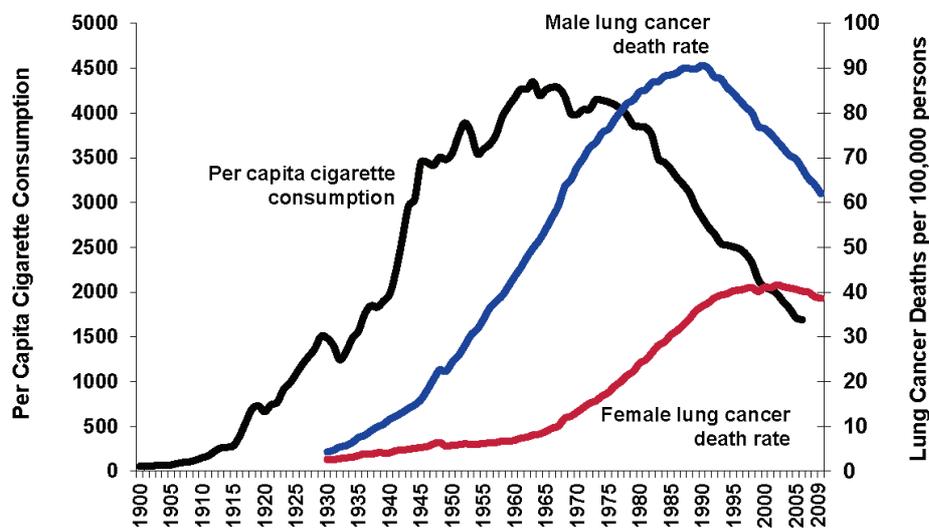


Figure 2 : Evolution des taux de mortalité liée au cancer du poumon chez l'homme (a) et la femme (b) dans les différents pays (taux standardisé avec l'âge) (6).

Ces données épidémiologiques font écho aux habitudes de consommation tabagique respectives des hommes et des femmes (**figure 3**, cf partie 1.1.2.1).



*Age-adjusted to 2000 US standard population.

Figure 3 : Evolution de la consommation tabagique (en noir) et des taux de mortalité des cancers broncho-pulmonaires chez l'homme (en bleu) et la femme (en rouge) aux Etats-Unis (taux standardisé avec l'âge) (7).

En 2012, le cancer du poumon est responsable de 39 500 nouveaux cas et 29 900 décès en France (3). La majorité des cas de tumeur bronchique concernent les hommes (71% des cas) (8). Le cancer du poumon se positionne au 2^{ème} rang des cancers les plus incidents chez l'homme derrière le cancer de la prostate. Il représente également le 3^{ème} cancer le plus fréquent chez la femme après les cancers du sein et du colon-rectum (**figure 4**). D'autre part, il représente de loin le cancer le plus meurtrier chez l'homme devant les cancers colorectaux et de la prostate. Chez la femme, il se positionne à la 2^{ème} place, derrière le cancer du sein.

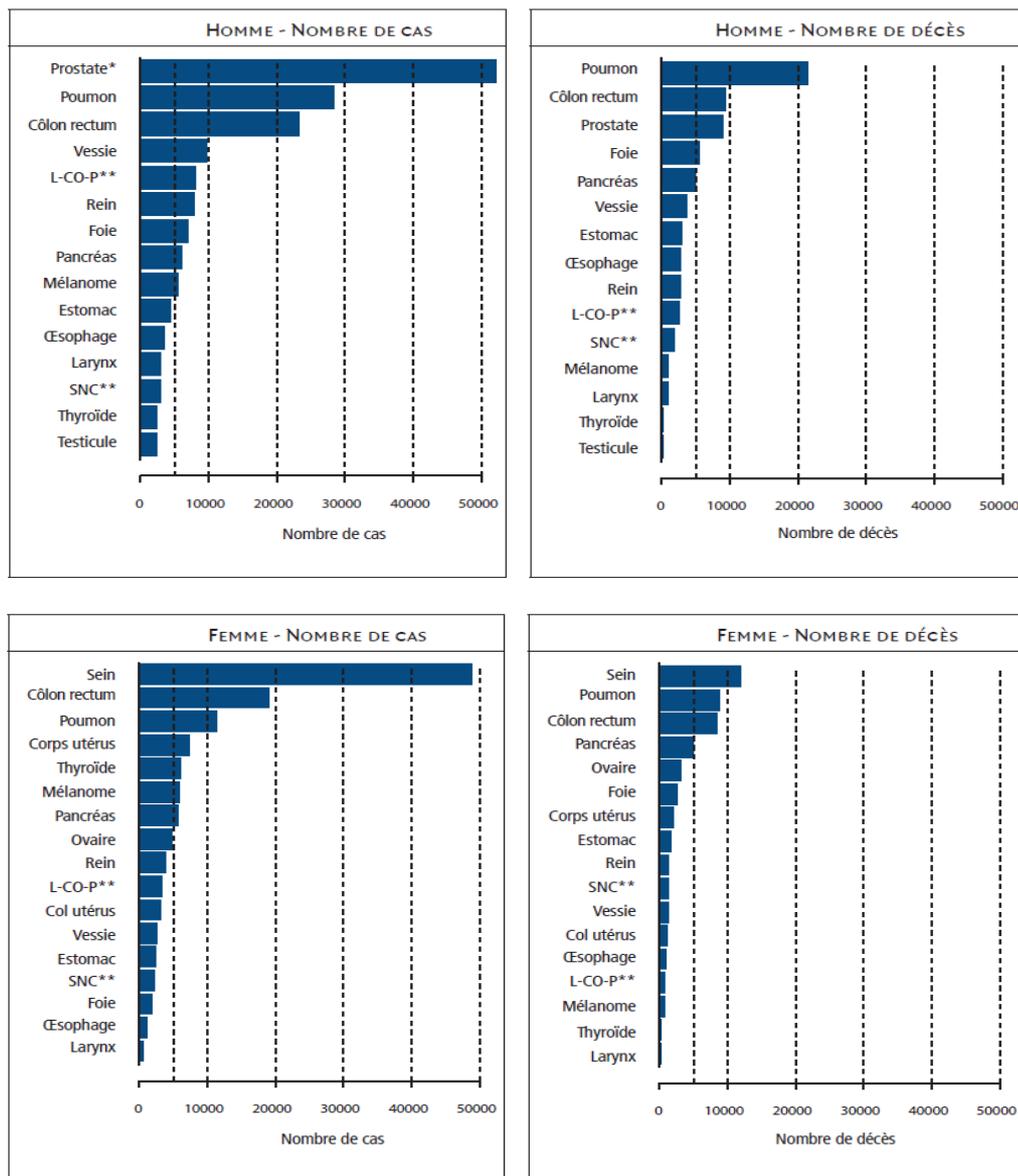


Figure 4 : Estimation du nombre de cas et de décès par localisation en 2012 en France, chez l'homme et la femme (9).

Le cancer du poumon se développe généralement chez les personnes adultes, de plus de 45 ans. L'âge médian des malades au moment du diagnostic est de 71 ans (**figure 5**) (10).

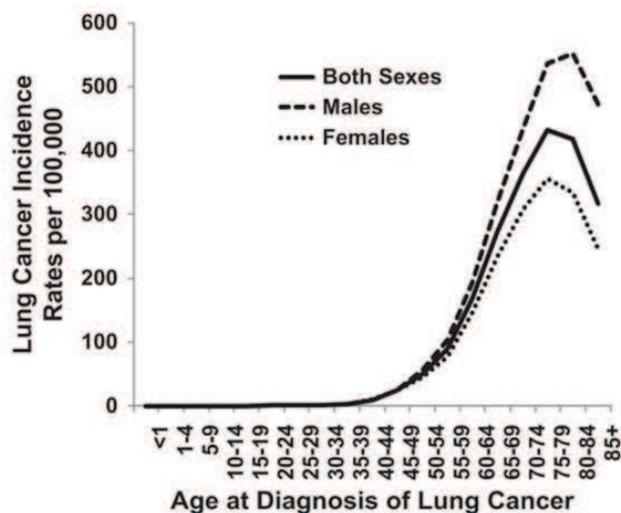


Figure 5 : Incidence des cancers broncho-pulmonaires selon le sexe et l'âge (10).

1.1.2. Facteurs étiologiques et facteurs de risque

Le cancer broncho-pulmonaire est une maladie multi-causale résultant de l'effet combiné de facteurs génétiques et environnementaux.

1.1.2.1. Le tabagisme

Le tabac est le principal facteur de risque de développer un cancer du poumon et représente la principale cause évitable de mortalité prématurée (11). Il est notamment à l'origine de 87% des décès par cancer du poumon (12). De nombreuses études épidémiologiques ont montré que les fumeurs ont 20 fois plus de risque de développer une tumeur pulmonaire que les non-fumeurs (13).

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 cigarette (14). 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) (15).

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 pulmonaires (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) (16) mais surtout de la durée du tabagisme (13). A l'arrêt du tabac, le risque de cancérogenèse pulmonaire décroît progressivement avec le temps (13). Il restera cependant supérieur à celui des personnes n'ayant jamais fumé (17). Le tabagisme passif augmente de 20 à 30% le risque de développer un cancer du poumon par rapport à une personne non exposée

(18,19).Quinze pourcents des cas de cancers pulmonaires surviennent chez les non-fumeurs (n'ayant jamais fumé) ce qui suggère l'existence d'autres facteurs de prédisposition au cancer bronchique (20).

1.1.2.2. Le radon

Le radon est classé comme le second facteur prédisposant aux cancers bronchiques. Historiquement, ce gaz radioactif présent dans les sols est à l'origine de nombreux cas de cancer pulmonaire chez les mineurs (21). L'exposition chronique au radon induit de façon indirecte de nombreuses mutations ponctuelles et lésions de l'ADN via l'émission de particules alpha ionisantes (22).

1.1.2.3. Autres substances cancérigènes

D'autres facteurs sont impliqués dans le développement des cancers pulmonaires : les cancérigènes à usage professionnel (l'amiante, le chrome, l'arsenic, le cadmium, la silice, le nickel) (23), en lien avec les habitudes domestiques (les fumées de charbon de bois, les vapeurs d'huiles de cuisson) (24), ou issus de la pollution atmosphérique (25).

1.1.2.4. Prédisposition génétique

Les facteurs héréditaires jouent un rôle non négligeable dans l'établissement des cancers pulmonaires. Les personnes ayant des antécédents familiaux de cancer bronchique ont entre 1.6 et 3.6 fois plus de risque de développer une tumeur (26).

1.1.2.5. Pathologies pulmonaires et systémiques

Certaines pathologies bronchiques (comme la bronchopneumopathie chronique obstructive ou BPCO (27)) et systémiques (tels que le syndrome d'immunodéficience acquise ou SIDA (28)) peuvent également favoriser la cancérogenèse pulmonaire.

1.1.3. Classification des cancers du poumon

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

La classification des tumeurs pulmonaires 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.

1.1.3.1. Classification histologique (OMS)

La classification établie par l'OMS consiste en la caractérisation des tumeurs selon des critères anatomo-pathologiques (29). La dernière version, publiée en 2015, intègre les données histochimiques et moléculaires dans la nomenclature (30). Histologiquement, on différencie 2 catégories de cancer du poumon : les cancers broncho-pulmonaires non-à-petites cellules (CBNPC) et les cancers broncho-pulmonaires à petites cellules (CBPC).

- **Les cancers broncho-pulmonaires à petites cellules (CBPC)**

Les CBPC, également connus sous le nom de carcinomes neuro-endocrines, représentent 15% des cas de cancer du poumon (31). Ils se développent à partir des cellules neuro-endocrines tapissant l'épithélium bronchique, le plus souvent au niveau des voies aériennes proximales. Ils représentent la forme la plus agressive de cancer pulmonaire en raison de leur fort potentiel mitotique, métastatique et nécrotique (32). Le tabagisme serait à l'origine de plus de 95% des cas de CBPC (8,33).

A l'examen cyto-pathologique, les CBPC se composent de petites cellules arrondies à rapport nucléo-cytoplasmique 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) (34).

La prise en charge du CBPC reste encore aujourd'hui un véritable challenge. L'efficacité de la chirurgie et de la radiothérapie est limitée en raison du diagnostic souvent tardif et du caractère hautement invasif de ces tumeurs. Ces tumeurs ont une bonne réponse initiale aux chimiothérapies mais développent rapidement de nombreuses résistances, ce qui explique leur très mauvais pronostic (taux de survie à 5 ans inférieur à 7%) (32).

- **Les cancers broncho-pulmonaires non-à-petites cellules (CBNPC)**

Les CBNPC sont la principale forme histologique de cancer pulmonaire (85% des cas de cancer pulmonaire) (31). Ils sont répartis en trois principaux sous-types : les adénocarcinomes, les carcinomes à cellules squameuses et les carcinomes à grandes cellules.

- **Les adénocarcinomes**

Les adénocarcinomes sont les formes les plus communes de CBNPC (40% des cas). La majorité des adénocarcinomes est liée au tabagisme. Ils représentent aussi le principal sous-type de cancer pulmonaire diagnostiqué chez les non-fumeurs (62% des cas) (35), les femmes (36) et les jeunes de moins de 40 ans (37). Ce sont des tumeurs épithéliales malignes caractérisées par une différenciation glandulaire ou la sécrétion de mucus (38). Contrairement aux CBPC et aux carcinomes épidermoïdes, ces tumeurs sont majoritairement localisées au niveau des voies aériennes périphériques (80% des cas) (39). Elles ont un taux de prolifération plus restreint que les autres sous-types histologiques de cancer pulmonaire mais ont un plus fort potentiel métastatique. Sur le plan immunohistochimique, les adénocarcinomes expriment les marqueurs spécifiques CK7 et TTF-1 (40).

En 2011, une nouvelle classification, spécifique des adénocarcinomes pulmonaires, a été établie afin de faciliter l'identification du type de tumeur, établir son pronostic et améliorer la prise en charge des patients (41) (**tableau 1**). Cette nomenclature classe les tumeurs selon leur organisation structurale, leur taille et leur potentiel invasif.

Tableau 1 : Classification des adénocarcinomes pulmonaires établie par l'International Association for the Study of Lung Cancer, l'American Thoracic society et l'European Respiratory Society (42).

Preinvasive lesions
Atypical adenomatous hyperplasia
Adenocarcinoma in situ (≤ 3 cm; formerly solitary BAC)
Nonmucinous
Mucinous
Mixed mucinous/nonmucinous
Minimally invasive adenocarcinoma (≤ 3 cm lepidic-predominant tumor with ≤ 5 mm invasion)
Nonmucinous
Mucinous
Mixed mucinous/nonmucinous
Invasive adenocarcinoma
Lepidic predominant (formerly nonmucinous BAC pattern with > 5 mm invasion)
Acinar predominant
Papillary predominant
Micropapillary predominant
Solid predominant with mucin production
Variants of invasive adenocarcinoma
Invasive mucinous adenocarcinoma (including formerly mucinous BAC)
Colloid
Fetal (low and high grade)
Enteric

Abbreviations: BAC, bronchioloalveolar carcinoma; IASLC/ATS/ERS, International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/ European Respiratory Society.

□ Les carcinomes à cellules squameuses

Les carcinomes à cellules squameuses (SCC) (ou carcinomes épidermoïdes ou carcinomes malpighiens) représentent environ 30% de l'ensemble des CBNPC. Ils sont généralement localisés au niveau central dans l'arbre respiratoire, au sein des grosses bronches (39). Ces cancers sont fortement en lien avec la consommation tabagique (43). Histologiquement, ils se caractérisent par la kératinisation des cellules à l'origine de structures caractéristiques (perles cornées, ponts d'union intercellulaires) (44). Ces carcinomes ont généralement une agressivité locale, ils métastasent moins fréquemment que les autres formes de CBNPC. Ces tumeurs sont caractérisées par l'expression notamment des marqueurs P40 (45), P63 et CK5/6 (40).

De nombreuses études portent actuellement sur l'identification de thérapies ciblées pour leur traitement (46).

□ Les carcinomes à grandes cellules

Les carcinomes à grandes cellules sont la forme la moins courante de CBNPC (environ 20% des cas). 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.

1.1.3.2. 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 majeurs (47) (**tableau 2a**):

- 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 2b**):

- 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 2 : 7^{ème} édition de la classification TNM, établie en 2009 (48).

a Description des critères TN et M. **b** Les 5 stades histopathologiques établis selon les critères TN et M.

Seventh tumour, node, metastasis classification of lung cancer: January 2010 ¹	
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 <i>in situ</i>
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, pleural 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
T4	Separate tumour nodule(s) in the same lobe 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

Une nouvelle version de la classification TNM devrait prochainement être publiée (fin 2016). Basée sur une étude épidémiologique à très large spectre, elle proposera une nouvelle subdivision des groupes T, N et M afin d'affiner la nomenclature et ainsi améliorer la prise en charge des patients (49,50).

Conclusion

Les cancers broncho-pulmonaires sont un problème majeur de santé publique avec plus de 1.8 millions de nouveaux cas et 1.6 millions de décès annuels estimés dans le monde. Leur incidence est fortement corrélée aux habitudes tabagiques de la population. Les cancers broncho-pulmonaires non-à-petites cellules représentent la forme la plus diagnostiquée (85% des cas de cancers pulmonaires). Ce type histologique sera l'objet d'étude de cette thèse et sera développé dans le paragraphe suivant.

1.2. Les CBNPC

1.2.1. Physiopathologie des CBNPC

La cancérogenèse pulmonaire est un long processus multi-étapes aboutissant à la transformation d'une cellule épithéliale 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 6**). 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.

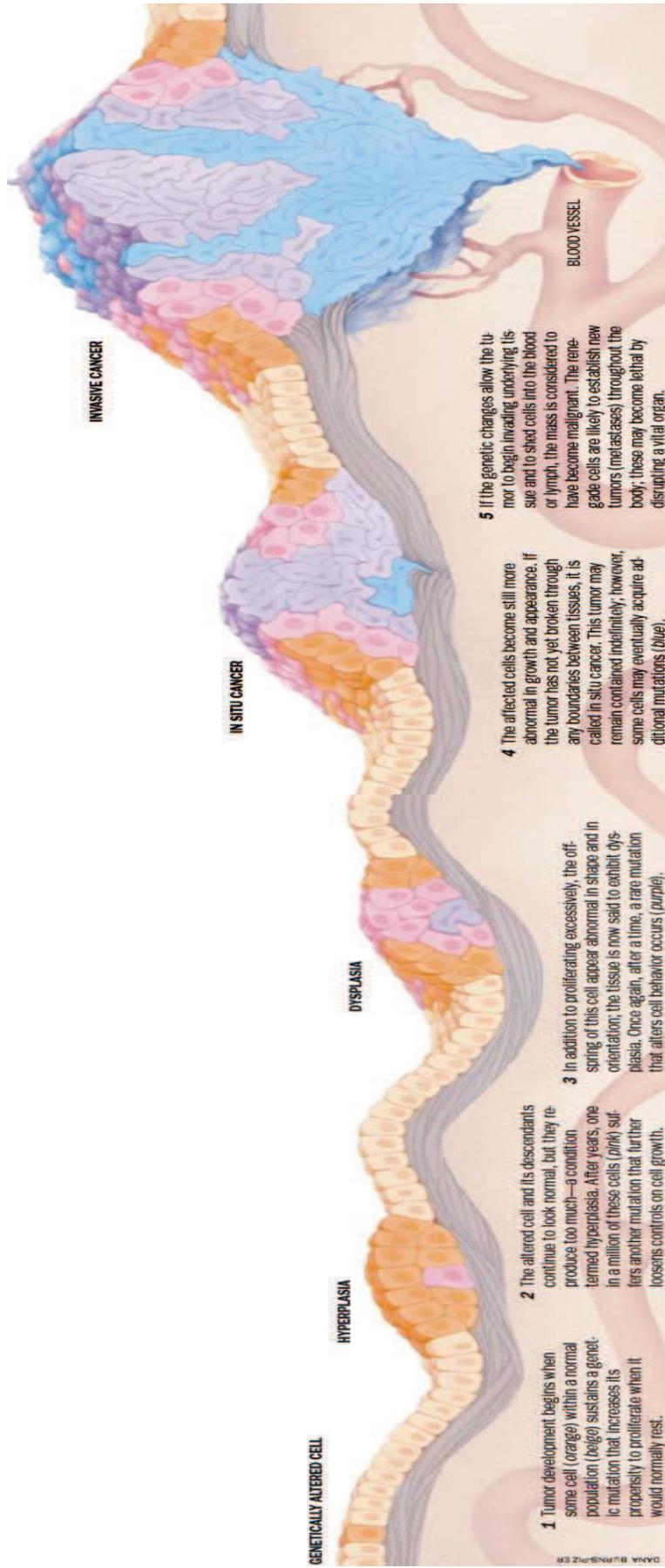


Figure 6 : Représentation schématique des processus physiopathologiques impliqués dans la survenue d'une tumeur pulmonaire(51).

Au terme de cette transformation, la cellule a acquis de nouvelles propriétés biologiques caractéristiques de la cellule cancéreuse (ou « hallmarks ») (52) (**Figure 7**):

- 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

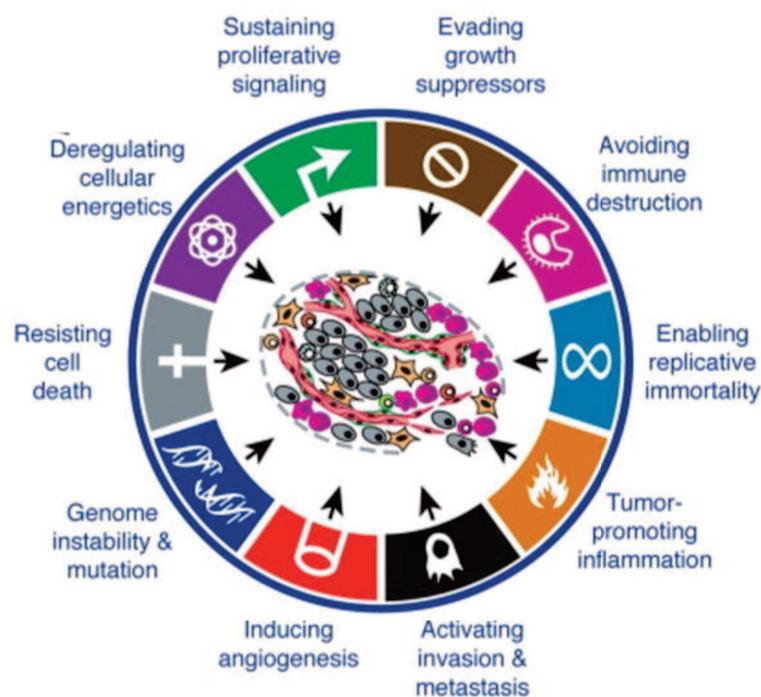


Figure 7 : Les caractéristiques biologiques (ou hallmarks) d'une cellule cancéreuse, selon D. Hanahan et R.A. Weinberg (52).

1.2.2. Caractéristiques moléculaires des CBNPC

Depuis plusieurs décennies, de nombreuses anomalies génétiques ont été mises en évidence dans les CBNPC. Lors de la tumorigenèse, 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 8**). 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.

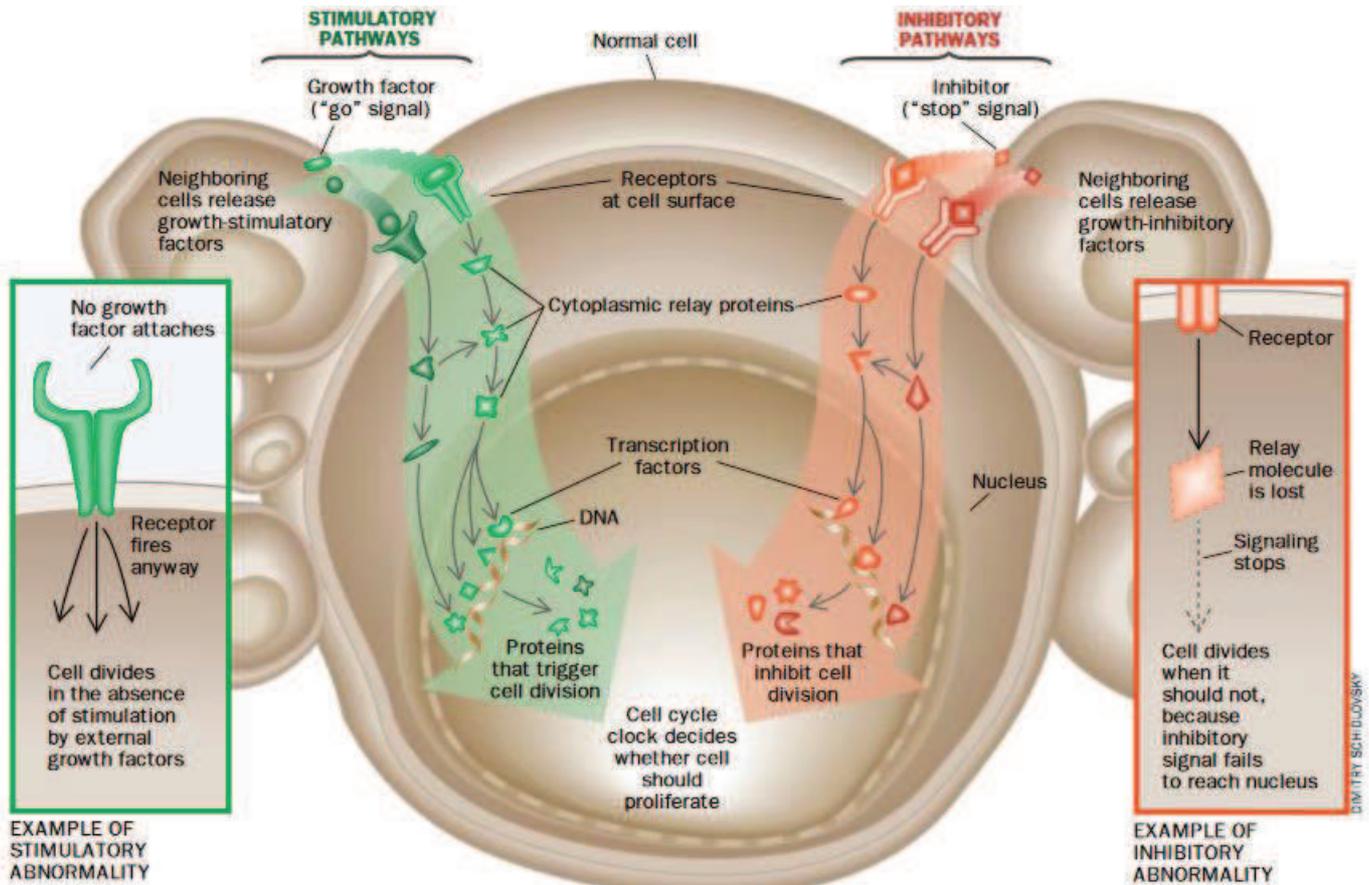


Figure 8 : Représentation schématique des voies de signalisation intracellulaires altérées lors de la tumorigenèse (51).

1.2.2.1. 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 aberrantes (53). Nous développerons ci-dessous seulement les oncogènes les plus fréquemment identifiés dans les adénocarcinomes (*KRAS*, *EGFR*, *ALK*, *MET*, *HER2* et *BRAF*) et les carcinomes à cellules squameuses (*PIK3CA* et *FGFR1*) (**Figure 9**).

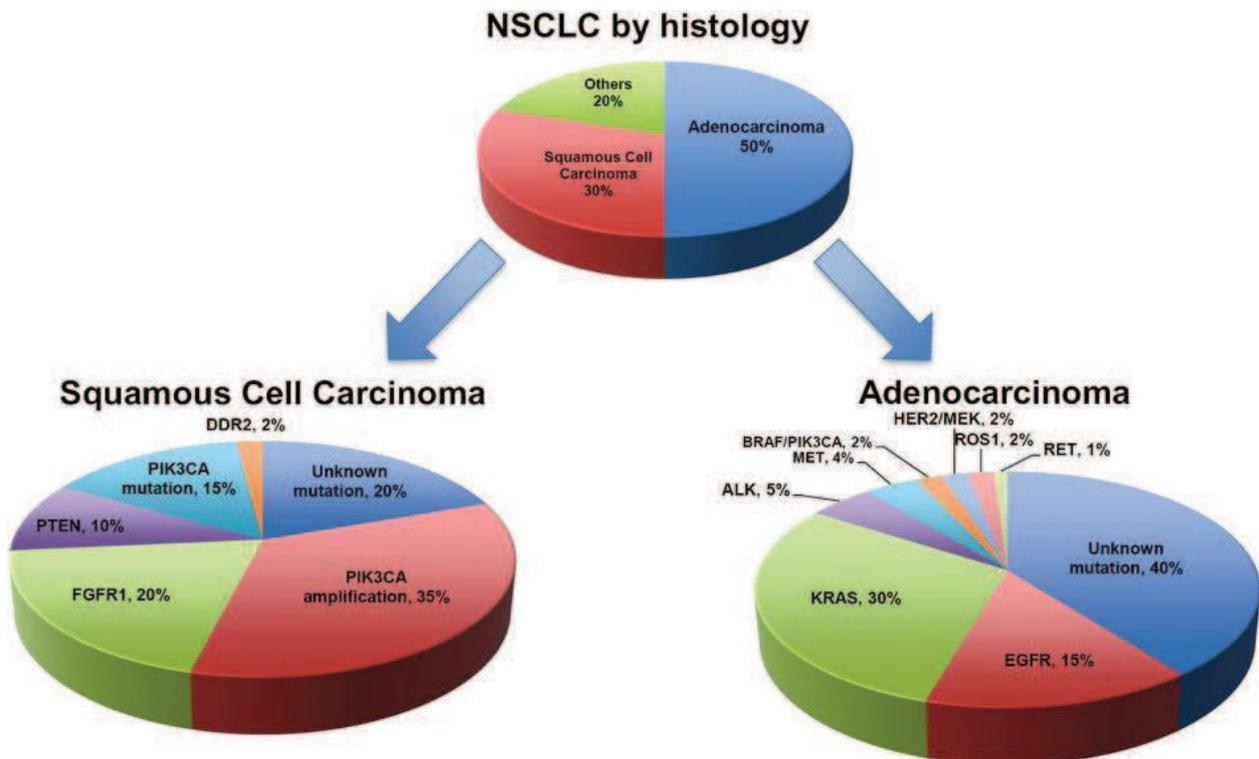


Figure 9 : Principales anomalies génétiques identifiées dans les adénocarcinomes et des carcinomes à cellules squameuses (54).

Soixante pourcents des adénocarcinomes et environ 50-80% des carcinomes à cellules squameuses présentent au moins une mutation oncogénique connue (54). 94% des mutations sont mutuellement exclusives c'est-à-dire que la présence d'une première mutation empêche l'acquisition d'une seconde anomalie.

- **KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)**

Les mutations de *KRAS* sont observées dans 20% des CBNPC, plus particulièrement dans les adénocarcinomes pulmonaires (30%) (39) (**figure 9**) et chez les consommateurs de tabac (55). Ces mutations ponctuelles affectent le plus souvent les codons 12, 13 et 61 et entraînent une activation constitutive de la protéine G sous-membranaire codée, avec une activation des voies de signalisation MAPK et PI3K en aval (56,57) (**figure 10**). Sauf quelques rares exceptions, les mutations de *KRAS* et les mutations de l'*EGFR* et ou/de *BRAF* sont mutuellement exclusives.

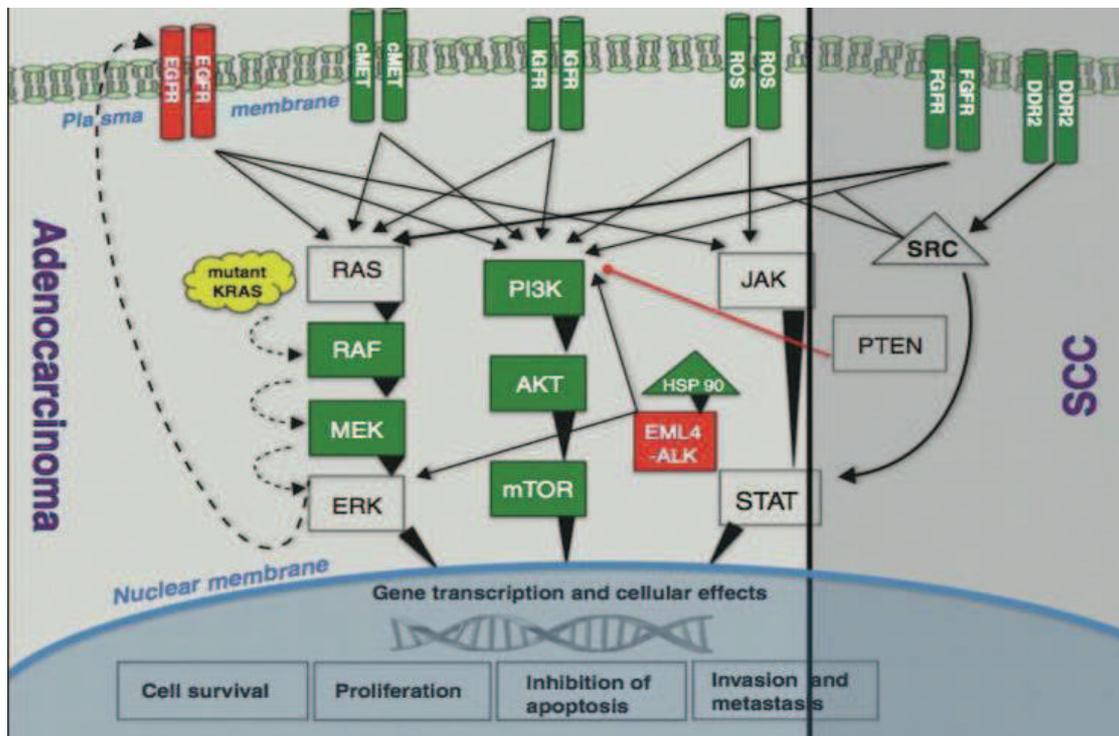


Figure 10 : Représentation schématique des principaux acteurs des voies de signalisation intracellulaires (de gauche à droite MAPK/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTor et JAK/STAT) altérés dans les CBNPC (58). Abréviations : carcinomes à cellules squameuses (SCC). Les anomalies moléculaires pour lesquelles il existe une thérapie ciblée approuvée sont en rouge. Les altérations pour lesquelles des nouvelles molécules sont testées en essai clinique sont en vert. Les anomalies pour lesquelles il n'existe pas actuellement d'inhibiteur disponible sont en jaune. Les flèches noires représentent les activations en aval dans les voies de signalisation tandis que les traits rouges indiquent un effet inhibiteur. Les flèches en pointillé représentent les mécanismes d'auto-activation de KRAS muté impliqués dans la résistance aux inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR TKI).

- **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. L'EGFR est souvent surexprimé dans les CBNPC (62% des cas) (59). Des mutations activatrices au niveau des exons 19 et 21 (délétion LREA et L858R respectivement) de l'EGFR sont présentes dans environ 15% des adénocarcinomes (54), ce sont également les plus fréquentes chez les non-fumeurs (44%) (55). Ces mutations entraînent une activation constitutive des voies de signalisation MAPK, PI3K et JAK/STAT en aval.

- **HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2)**

HER2 code pour un autre récepteur membranaire de la famille HER, en amont des voies MAPK, PI3K et JAK/STAT. L'amplification de *HER2*, dans 20% des CBNPC, aboutit à l'hyperexpression de la protéine HER2 (60). La mutation activatrice du domaine tyrosine kinase

de HER2 par insertion au niveau de l'exon 20 concerne 4% des CBNPC, et principalement des adénocarcinomes (57).

- **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) (39). Cette anomalie, exclusive des mutations de l'*EGFR* ou de *KRAS*, est fréquemment identifiée chez les jeunes patients non-fumeurs (57).

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

Les mutations BRAF, impliquées dans l'activation constitutive de la voie des MAPK, sont observées dans 2-3% des CBNPC, très majoritairement dans les adénocarcinomes et généralement chez les fumeurs (61–63). Ces mutations sont observées au niveau des exons 11 et 15 et le variant V600E représente plus de la moitié des anomalies BRAF. Il n'a pas été établi de corrélation entre la survie globale et le statut BRAF (63).

- **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). L'amplification génomique de MET est identifiée dans 4% des adénocarcinomes.

- **FGFR1 (fibroblast-growth factor receptor 1)**

L'amplification du gène *FGFR1* induit la surexpression du récepteur membranaire FGFR1 à activité tyrosine kinase. Cette anomalie est couramment observée dans les carcinomes à cellules squameuses (20%) (64) et est de bon pronostic (65).

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

PI3KCA code pour une sous-unité des protéines phosphoinositide-3-kinases (PI3K) sous-membranaires impliquée dans la transduction des signaux de croissance. L'incidence des altérations de PI3KCA dans les CBNPC est d'environ 2-5%, avec une forte prédominance dans les carcinomes à cellules squameuses. Les anomalies de *PI3KCA* résultent d'une amplification génique (35% des SCC) ou d'une mutation ponctuelle (15% des SCC) et ont pour conséquence une hyperstimulation de la voie de signalisation AKT en aval. Ces mutations ne sont pas exclusives, elles coexistent fréquemment avec les mutations KRAS, EGFR et ALK (66).

- **Autres anomalies**

Les réarrangements *KIF5B-RET* et *ROSI-FIG*, les mutations *DDR2*, *AKT* et *NRAS* représentent moins de 1% des anomalies génétiques des CBNPC.

1.2.2.2. 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, une perte de fonction de ces gènes favorise l'hypercroissance cellulaire et l'accumulation d'altérations génétiques (**figure 8**). 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 pulmonaire sont : *TP53*, *PTEN*, *RB*, *p16^{INK4a}*, *p14^{ARF}* et *LKB1* (**figures 10 et 11**).

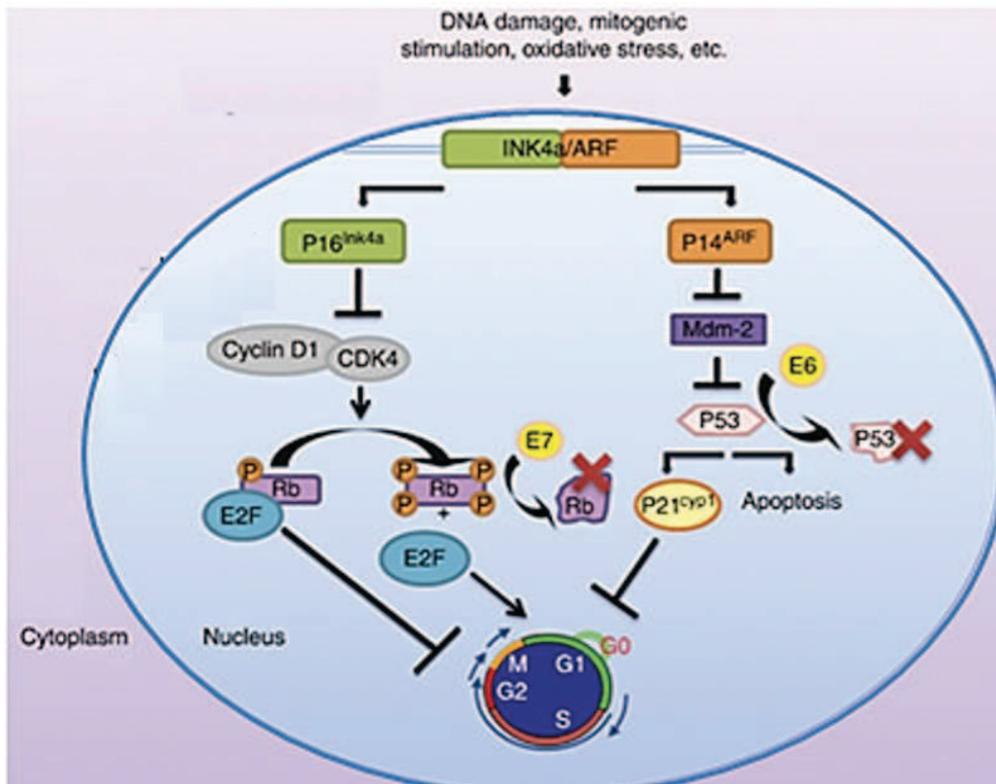


Figure 11 : Les voies *p16^{INK4a}/Rb* et *p14^{ARF}/p53* impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Adapté de (67).

- **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 possible (68). 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 cancers (69). 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 (39,70). Les altérations de *TP53* résultent majoritairement de mutations faux-sens et sont fortement corrélées à la consommation de tabac.

- **p14^{ARF}**

La perte d'expression de p14^{ARF} (par délétion du locus *INK4-ARF* codant p14), identifiée dans 20% des adénocarcinomes (70), aboutit à la surexpression de la protéine inhibitrice mdm2 et en conséquence l'inactivation fonctionnelle de p53 (**figure 11**).

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

Dans 50% des CBNPC, l'inactivation de la protéine p16^{Ink4a} (par délétion homozygote du locus *INK4-ARF* codant p16, 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 11**).

- **RB (retinoblastoma)**

La protéine Rb peut être altérée (par mutation ou délétion) dans 15-30% des CBNPC (71).

- **PTEN (Phosphatase and Tensin homolog)**

Les altérations de *PTEN* sont identifiées dans près de 5% des CBNPC, et principalement dans les carcinomes à cellules squameuses (10%) dans un contexte de consommation tabagique (72) (**figure 9**). *PTEN* code pour une tyrosine phosphatase inhibant la voie de signalisation PI3K/Akt/mTor en aval (73). Son inactivation (par mutations somatiques ou perte d'hétérozygotie) conduit à une hyperactivation de cette voie, indépendamment de la liaison d'un ligand. Un haut niveau d'expression de PTEN est souvent corrélé à un meilleur pronostic dans les CBNPC.

- **LKB1 (liver kinase B1)**

LKB1 code pour une sérine/thréonine kinase en amont de la voie des MAPK (68). 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 S (74). L'altération de *LKB1* coexiste fréquemment avec les mutations *KRAS* (75,76).

- **Autres**

D'autres gènes suppresseurs de tumeurs localisés au niveau du bras court du chromosome 3 ont été plus récemment mis en évidence. Nous citerons par exemple *FHIT* (Fragile histidine triad gene), *RASSF1* (Ras association domain family member 1) et *RARβ* (Retinoic acid receptor), qui sont altérés dans environ 40% des CBNPC (77).

1.2.3. Prise en charge thérapeutique des CBNPC

1.2.3.1. Diagnostic

A ce jour, il n'existe aucune technique efficace et aucun marqueur tumoral pour permettre le dépistage précoce des cancers du poumon. Généralement asymptomatique lors des premiers stades de la maladie, le diagnostic de cancer du poumon est souvent établi tardivement. Parfois, il est même découvert de manière fortuite lors d'un bilan d'imagerie réalisé pour une autre pathologie. Certains signes d'appels respiratoires peu spécifiques amènent parfois le patient à consulter : une toux persistante, une dysphonie, une dyspnée, une hémoptysie, des douleurs thoraciques, la survenue d'infections pulmonaires à répétition. Certaines manifestations systémiques évocatrices de tumeur (altération de l'état général, perte de poids et d'appétit, grande fatigue, adénopathie superficielle), des syndromes paranéoplasiques (78), 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...) peuvent aussi être le motif d'une consultation médicale (79).

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

Seul l'examen anatomopathologique permet d'établir le diagnostic (80). Il est réalisé à partir de biopsies pulmonaires ou de prélèvements au niveau des adénopathies et des métastases. Dans le cas des tumeurs sans différenciation malpighienne ou glandulaire apparente avec les colorations classiques HES, une recherche de mucines et des analyses histochimiques (détection de TTF1 et P40) sont nécessaires pour affiner le profil histologique de la tumeur (**figure 12**).

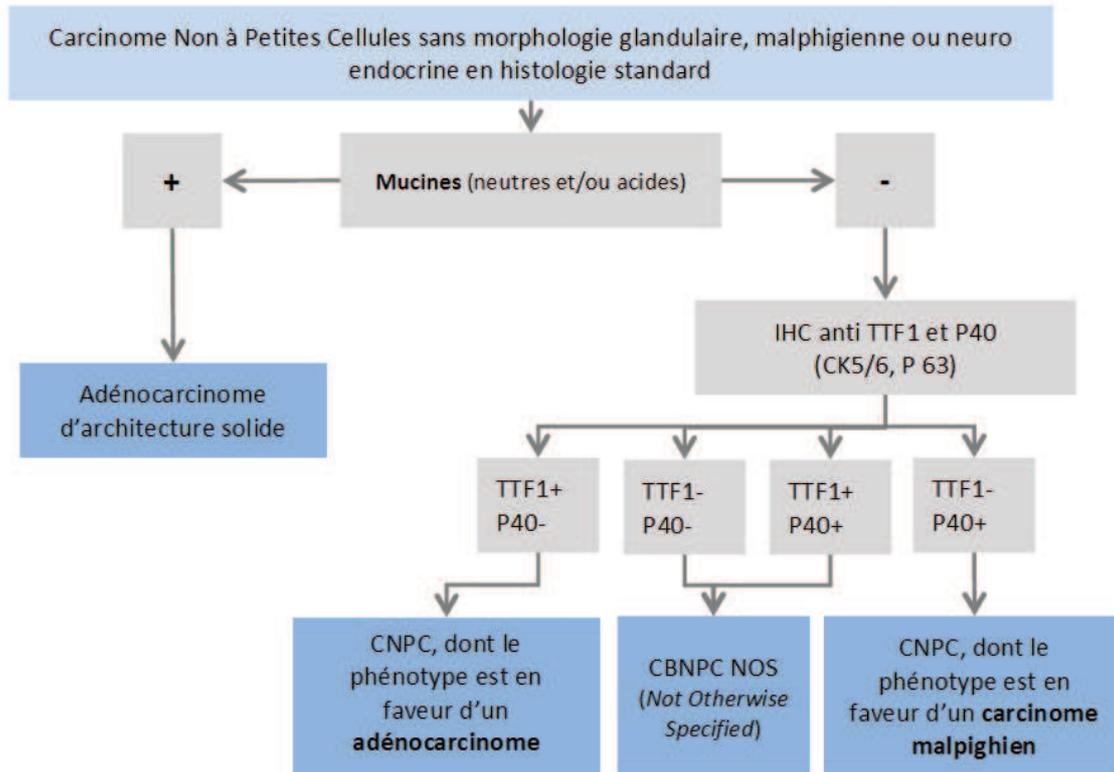


Figure 12 : Arbre décisionnel pour le diagnostic des carcinomes indifférenciés (45).

La détection immunohistochimique de la chromogranine, la synaptophysine et CD56 peut également être nécessaire selon les cas pour exclure un diagnostic de carcinome neuroendocrine. De la même façon, par techniques immunohistochimiques, on peut distinguer les adénocarcinomes primaires (CK7, TTF-1 et napsin A positifs) et les métastases pulmonaires d'adénocarcinome colorectal (CDX-2 et CK20 positives) (81).

Pour les CBNPC non squameux avancés ou les carcinomes squameux avancés chez les non-fumeurs, la recherche d'anomalies moléculaires est systématique (mutations *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *HER2*, *PI3KCA* et translocations *ALK* et *ROSI*). Ces analyses sont réalisées classiquement par technique FISH (pour identifier les translocations chromosomiques) et séquençage (pour identifier les mutations). De nouvelles techniques plus sensibles telles que le séquençage nouvelle génération (NGS) ou la PCR digitale sont actuellement en cours de validation ou sont utilisées depuis peu en routine dans les CHU français. 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).

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 thoraciques et/ou extra-thoraciques (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, **figure 13**), de l'état nutritionnel, des comorbidités, des fonctions respiratoires et cardiovasculaires).

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.

Figure 13 : Score de performance établi par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)

1.2.3.2. Pronostic

A ce jour, le taux de survie à 5 ans des cancers broncho-pulmonaires reste très faible (proche de 17%) en raison du diagnostic souvent tardif et de leur agressivité.

Le taux de survie du cancer du poumon est variable selon le sexe du patient, son âge et le stade de la maladie au moment du diagnostic. De façon générale, on peut retenir que les femmes ont de meilleures chances de survie (20%) que les hommes (16%) (**tableau 3**). 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 ans (**tableau 4**) (82). Enfin, lors du diagnostic, la majorité des patients (55%) présentent un cancer avancé métastatique associé à un taux de survie médiocre de 3.8% (**tableau 5**). Les cancers localisés (15-30% des cas) ont quant à eux un taux de survie à 5 ans de 52.6%. Ceci suggère la nécessité d'améliorer les techniques de dépistage et de diagnostic afin de détecter le plus tôt possible ce type de cancer (10).

Tableau 3 : Taux de survie à 5 ans des CBNPC selon le sexe. Adapté de (82).

sexe	Survie nette à 5 ans
hommes	16%
femmes	20%
Total	17%

Tableau 4 : Taux de survie à 5 ans des CBNPC selon l'âge. Adapté de (82).

Age (années)	Survie nette à 5 ans
[15 ; 45[25%
[45 ; 55[21%
[55 ; 65[19%
[65 ; 75[17%
75 ans et plus	10%
total	17%

Tableau 5 : Stade au diagnostic et taux de survie en fonction de l'extension d'un cancer bronchopulmonaire (80).

	Localisé Stades I et II	Localement avancé Stade III	Métastatique Stade IV
Fréquence au diagnostic	15 à 30 %	20 %	40 % à 55 %
Survie relative à 5 ans	52,6 %	23,7 %	3,8 %

1.2.3.3. 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 (**tableau 6**):

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

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

Tableau 6 : Résumé des modalités thérapeutiques de prise en charge d’un CBNPC selon son stade (80).

	Stade					
	IA	IB	II	IIIA	IIIB	IV ⁽³⁾
Chirurgie	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	RCP	-	-
Radiothérapie	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾	- ⁽²⁾	RCP	<input checked="" type="checkbox"/>	-
Traitement systémique⁽⁴⁾	-	RCP	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Modalité thérapeutique de référence, systématique sauf si contre-indication.

RCP : Modalité en option, à discuter en réunion de concertation pluridisciplinaire selon le malade et sa maladie.

(1) La radiothérapie peut être proposée comme une alternative à la chirurgie en cas de non-opérabilité.

(2) Une irradiation peut être discutée en complément de la chirurgie et de la chimiothérapie en cas d’atteinte pariétale ou d’exérèse incomplète.

(3) Stade IV – incluant les cas avec pleurésie maligne selon la nouvelle classification TNM. Le cas particulier des tumeurs avec un nombre limité de métastases (métastase pulmonaire ou surrénalienne unique, une à trois métastases cérébrales) n’est pas inclus ici.

(4) Cytotoxiques (stades II, III et IV) ou thérapies ciblées (stade IV) (en fonction du résultat des recherches de mutations : EGFR, etc.)

- **Stades I et II (15-30% des CBNPC)**

La prise en charge des CBNPC de stades I et II repose principalement sur l’exérèse chirurgicale complète anatomique (**figure 14**). Selon le volume de la tumeur, elle consiste en :

- une lobectomie (résection d’un lobe pulmonaire) pour les CBNPC périphériques de stade N0 ou N1 (70% des exérèses).
- une pneumonectomie (exérèse totale d’un poumon) pour les CBNPC centraux avec envahissement hilair ou scissural et pour les cancers périphériques avec dépassement scissural et/ou métastases ganglionnaires scissurales ou hilaires.

Dans tous les cas, l'exérèse est complétée par un curage ganglionnaire afin de limiter le risque de récurrence locale. En cas d'exérèse incomplète, une radiothérapie peropératoire concomitante (si résidus macroscopiques) ou non à la chimiothérapie est indiquée (45). Dans le cas de tumeurs inopérables (tumeurs non résecables ou comorbidités contre-indiquant la chirurgie), le traitement repose sur la radiothérapie à visée curative (si possible en conditions stéréotaxiques) associée ou non à une chimiothérapie.

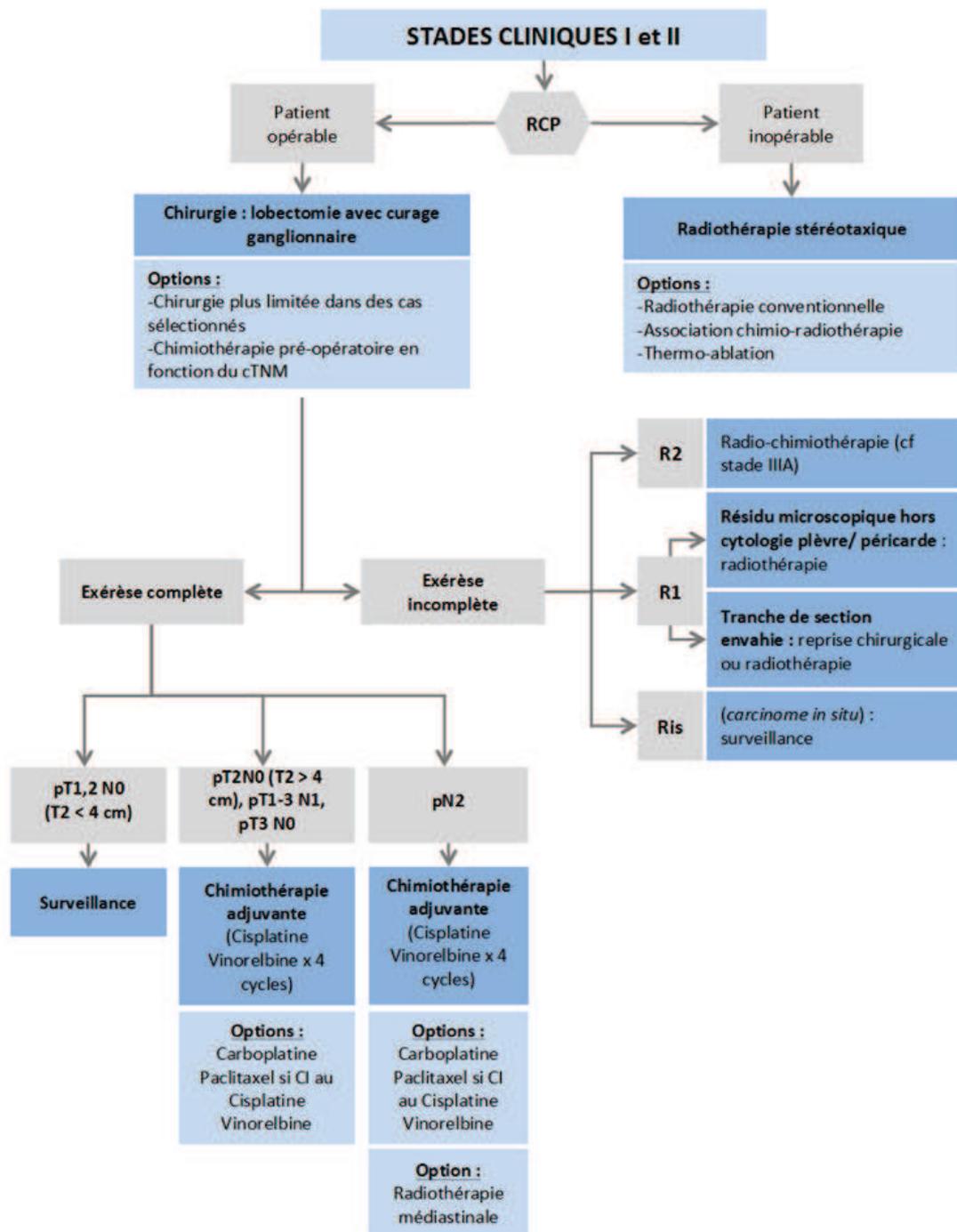


Figure 14 : Arbre décisionnel résumant les modalités de prise en charge d'un CBNPC de stade I ou II (45).

- **Stade III (20% des CBNPC)**

La prise en charge des CBNPC de stade III dépend de la possibilité d'opérer le patient et de réaliser une résection complète de la tumeur.

Seuls les CBNPC de stade IIIA sont considérés comme opérables (**figure 15**). Si la tumeur est résécable (stade N0 ou N1), le traitement de référence consiste en une chirurgie d'exérèse avec curage ganglionnaire suivie de 4 cures de chimiothérapie adjuvante (à base de cisplatine et vinorelbine) pour limiter le risque de récurrence et la formation de métastases. Dans d'autres cas, la chimiothérapie est dite néoadjuvante : elle précède l'acte chirurgical afin de réduire la taille de la tumeur et faciliter l'accès à celle-ci. Dans les 2 cas, si l'exérèse est incomplète, une radiothérapie peut être réalisée en fin de protocole thérapeutique.

Si le patient est inopérable (**figure 15**) ou dans le cas de CBNPC de stade IIIb (**figure 16**), le schéma thérapeutique consiste en une association de chimiothérapie (2 à 4 cures de cisplatine/vinorelbine, cisplatine/etoposide ou carboplatine/paclitaxel) et de radiothérapie (à une dose totale de 66 Gy) selon une approche séquentielle ou concomitante.

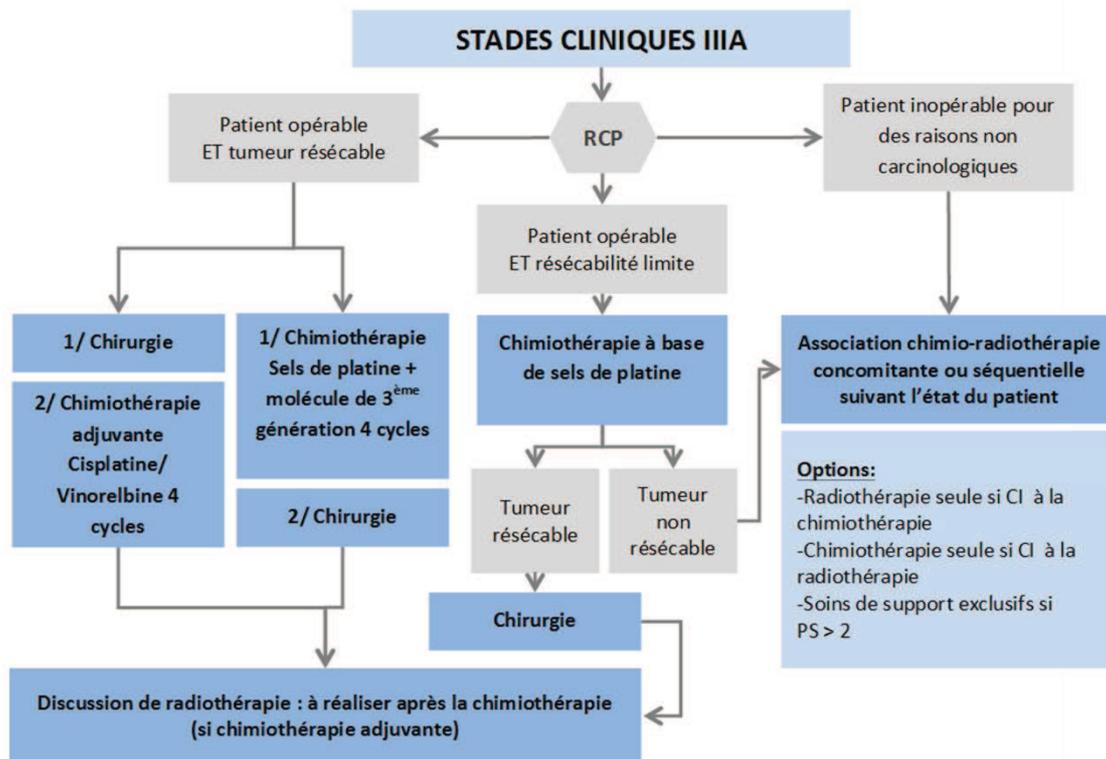


Figure 15: Arbre décisionnel résumant les modalités de prise en charge d'un CBNPC de stade IIIA (45).

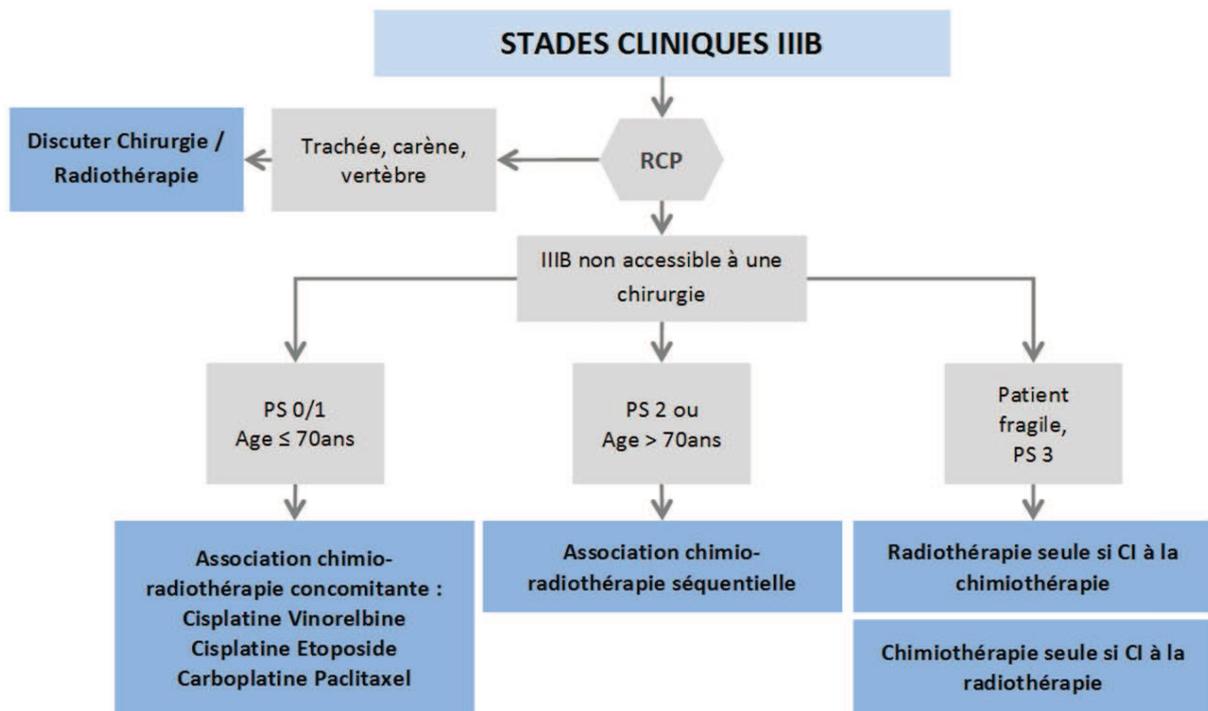
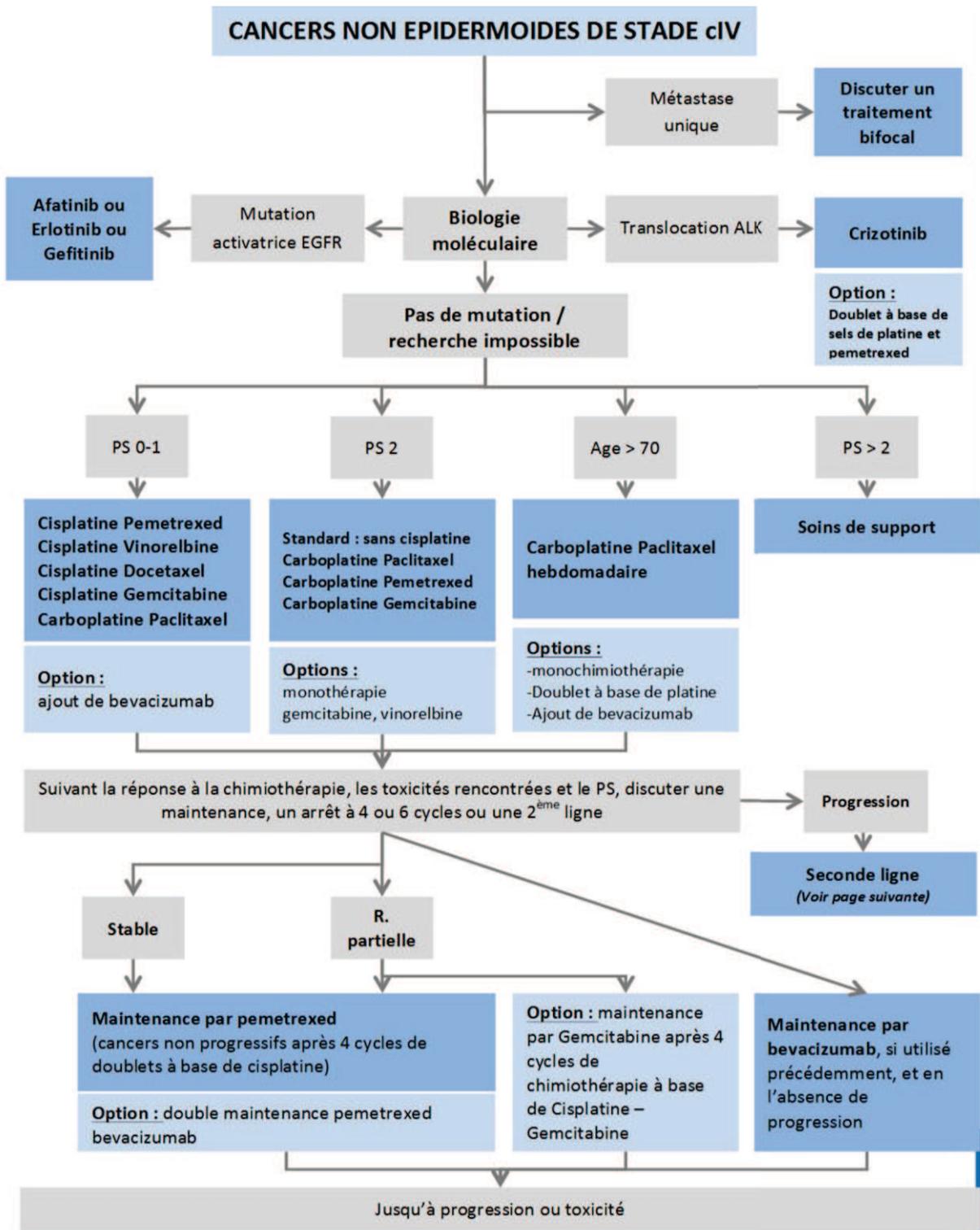


Figure 16: Arbre décisionnel résumant les modalités de prise en charge d'un CBNPC de stade IIIB (45).

- **Stade IV (40-55% des CBNPC)**

La prise en charge des CBNPC avancés métastatiques est fortement dépendante du type histologique de la tumeur ainsi que de son profil moléculaire (**figure 17**).



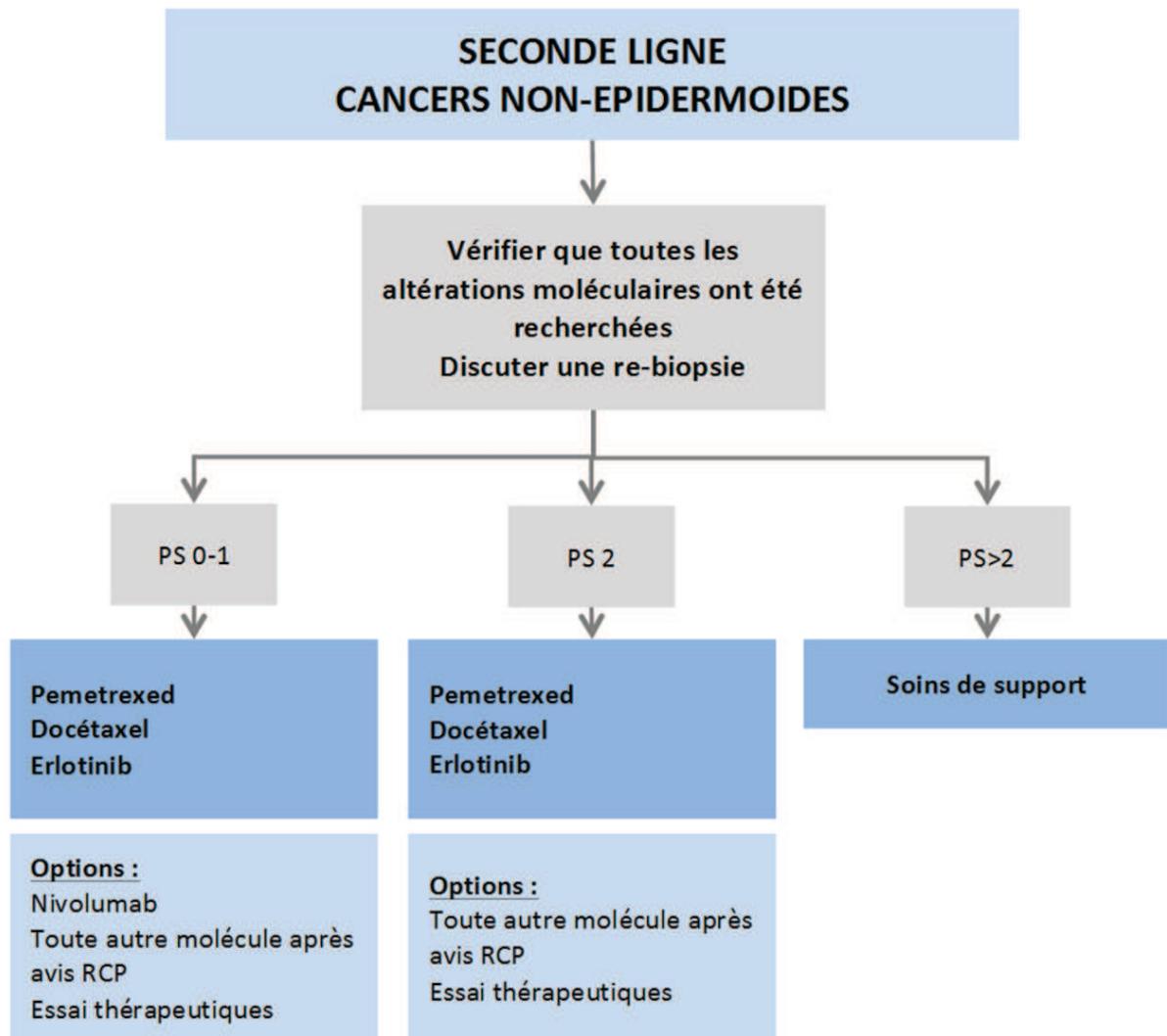


Figure 17: Arbre décisionnel résumant les modalités de prise en charge d'un CBNPC de stade IV (45).

Dans le cas des carcinomes squameux, le protocole thérapeutique est le plus souvent une polychimiothérapie associant des sels de platine (cisplatine, carboplatine) à un poison du fuseau (docetaxel, paclitaxel) ou un antimétabolite (gemcitabine).

Pour les carcinomes squameux sans contexte de consommation tabagique et les CBNPC non squameux, la recherche des mutations *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *HER2*, *PI3KCA* et des réarrangements *ALK* et *ROS1* est systématique.

- En l'absence de mutation ou si l'analyse moléculaire n'a pas pu être réalisée, le traitement de 1^{ère} ligne est une bithérapie, associant des sels de platine (cisplatine, carboplatine) et un poison du fuseau (vinorelbine, paclitaxel, docetaxel) ou un antimétabolite (pemetrexed, gemcitabine). Dans le cas des CBNPC non squameux, l'adjonction du bevacizumab (un anticorps anti-angiogénique ciblant le VEGF) à la polychimiothérapie a montré un réel bénéfice sur la survie des patients (83). En l'absence de progression ou d'intolérance, 4 à 6 cures de chimiothérapies sont réalisées puis un traitement de maintenance (par bevacizumab ou pemetrexed) est envisagé. En

cas de progression de la maladie, le traitement de 2^{ème} et de 3^{ème} ligne est généralement une monothérapie (pemetrexed, docétaxel, erlotinib, nivolumab). Le nivolumab (un anticorps anti-PD1 classé parmi les immunothérapies) a notamment démontré une survie globale supérieure au docétaxel dans les adénocarcinomes et les carcinomes squameux après échec de la première ligne de traitement (84) et a aujourd'hui l'AMM (autorisation de mise sur le marché) dans cette indication. L'association du nintedanib (un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant VEGFR, PDGFR et FGFR) et du docétaxel a également démontré un intérêt clinique pour le traitement en deuxième ligne des adénocarcinomes (85).

- Dans le cas des CBNPC avec mutations activatrices de l'EGFR (10 à 30 % des CBNPC (86)), le traitement de première intention des patients repose sur un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI) de première ou deuxième génération (gefitinib, erlotinib ou afatinib). Chez ces patients, les EGFR-TKI ont montré un taux de réponse et une survie sans progression supérieurs aux chimiothérapies (54). 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 18).

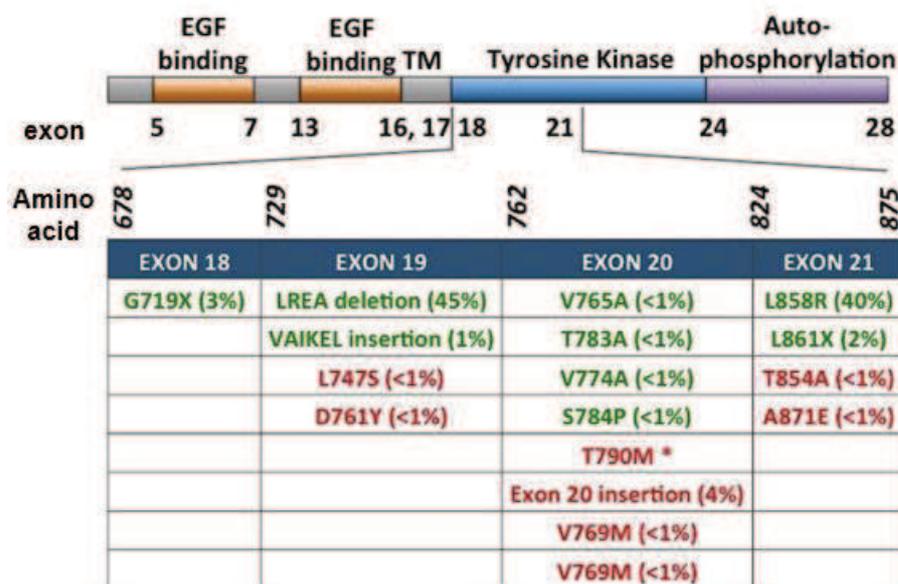


Figure 18 : Principales mutations de l'EGFR conférant une sensibilité (en vert) ou une résistance (en rouge) aux EGFR-TKI. Adapté de (86). Les mutations faux-sens sont représentées par l'acide aminé de référence suivi par le numéro d'acide aminé muté et l'acide aminé de substitution. La fréquence de 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.

Cependant, de nombreux mécanismes de résistances innée et acquise limitent l'efficacité des EGFR-TKI. Parmi les mutations primaires de l'EGFR conférant une résistance aux EGFR-TKI, nous pouvons citer les duplications et insertions de l'exon 20 (4 à 9% des mutations de l'EGFR) ainsi que la mutation T790M de l'exon 20 (5%). Les principaux mécanismes associés à une résistance acquise aux EGFR-TKI résultent de mutations secondaires de l'EGFR (T790M dans 55-60% des cas de résistance acquise (87), D761Y, T854A et L747S) (86,88), de l'amplification du gène HER2 (12%) (89) ou *MET* (5%) (90), de l'amplification de *MAPK1* (91), ou encore de mutations de *PIK3CA*(92) ou de *BRAF* (93) (**figure 19**).

En cas de progression sous traitement, un traitement par chimiothérapie (à base de sels de platine) associé ou non au bevacizumab est adopté.

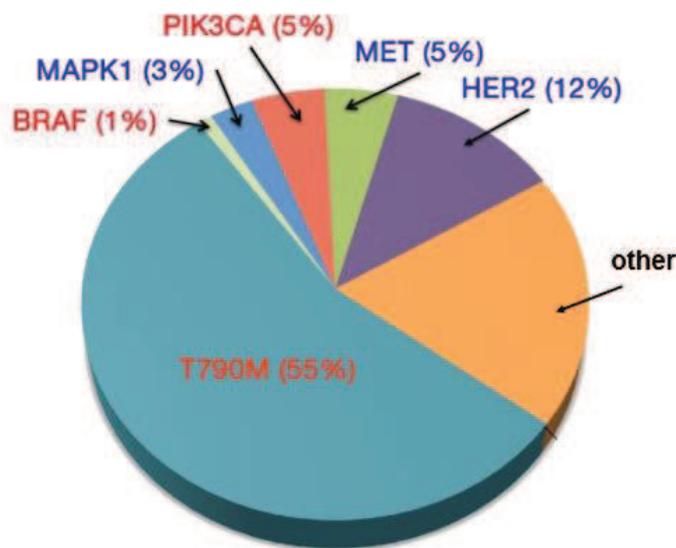


Figure 19 : Principaux mécanismes de résistance aux EGFR-TKI de première génération (erlotinib, gefitinib). Adapté de (86).

- Pour les CBNPC porteurs d'un réarrangement chromosomique de *ALK*, le crizotinib (un inhibiteur de *ALK*, *MET* et *ROS1*) a démontré une amélioration importante de la survie des patients et est aujourd'hui indiqué en première ligne(94). Le ceritinib (un inhibiteur de *ALK* de seconde génération) est utilisé en seconde ligne, en cas de résistance développée lors du traitement par crizotinib (95).
- Dans le cadre de CBNPC avec une mutation autre que dans l'*EGFR* ou qu'un réarrangement de *ALK*, le patient peut être inclus dans un essai clinique ciblant cette altération (programme AcSé, Accès Sécurisé à des thérapies ciblées innovantes). Ces dernières années, de nombreux inhibiteurs de *MET* sont développés et font l'objet d'essais cliniques pour évaluer leur efficacité sur les CBNPC (<https://clinicaltrials.gov/>, évaluation du capmatinib lors de l'essai clinique NCT02750215, évaluation de l'effet combiné d'un inhibiteur de c-MET et d'un inhibiteur pan-HER pour le traitement des CBNPC dans le cadre de l'essai (96) NCT01121575). Des essais cliniques sont

également en cours pour évaluer l'intérêt de différents inhibiteurs de BRAF (en association ou non) dans le traitement des CBNPC BRAF muté (<https://clinicaltrials.gov/>, évaluation du dabrafénib dans les essais NCT01336634 et NCT02672358 ; évaluation du vemurafénib dans le cadre des essais NCT02304809, NCT01531361 et NCT01596140). De nouvelles molécules inhibant spécifiquement PI3K sont aussi à l'essai pour le traitement des CBNPC avec altération de PI3KCA (https://clinicaltrials.gov, exemple des essais cliniques NCT01911325, NCT01570296 évaluant le buparlisib). Enfin, des essais cliniques de phase II sont actuellement menés pour évaluer l'efficacité thérapeutique des inhibiteurs sélectifs de HER2 dans les CBNPC avec HER2 amplifié ou muté (https://clinicaltrials.gov; le trastuzumab est testé dans le cadre des essais NCT00004883, NCT00758134, NCT00003881 ; le pertuzumab est évalué dans l'essai NCT00063154). Certains inhibiteurs panHER (inhibant l'EGFR/HER, HER2 et HER4) (afatinib (97), dacomitinib (98)) ont déjà montré des effets prometteurs pour le traitement des CBNPC avec altération de HER2.

Les mutations de *KRAS* sont prédictives d'un mauvais pronostic (99) et d'une sensibilité réduite aux thérapies ciblées inhibant l'activité tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI) (100). A ce jour, il n'existe pas de thérapie ciblant spécifiquement cette anomalie.

1.2.3.4. Suivi des patients porteurs de CBNPC

A ce jour, aucun consensus n'existe concernant les modalités et la fréquence de suivi des patients porteurs de CBNPC. L'efficacité du traitement est généralement appréciée par imagerie thoracique et examen clinique. 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 rechutes (101). Le clinicien conseille systématiquement un sevrage tabagique chez les patients fumeurs afin de limiter le risque de récurrence et de survenue de seconds cancers (102).

En cas de rechute ou de récurrence, un nouveau bilan diagnostique est réalisé et la stratégie thérapeutique à adopter est discutée en RCP.

Conclusion

Les cancers broncho-pulmonaires non-à-petites cellules sont associés à un très mauvais pronostic notamment en raison de leur diagnostic souvent tardif et de leur fort potentiel prolifératif. Les thérapies ciblées sont actuellement le traitement de 1^{ère} ligne des CBNPC avancés avec mutations de l'EGFR ou réarrangement de ALK. Cependant, en l'absence de mutation ciblable ou en cas de résistance aux thérapies ciblées, le traitement de référence reste les chimiothérapies, à base de sels de platine et de poisons du fuseau principalement. Les microtubules constituent une cible privilégiée des chimiothérapies en raison de leur rôle essentiel dans la division cellulaire.

2. Microtubules

Les microtubules constituent, avec les filaments d'actine et les filaments intermédiaires, les composants majeurs du cytosquelette des cellules eucaryotes (**figure 20**). Ceux-ci sont en étroite coopération afin d'assurer l'intégrité cellulaire.

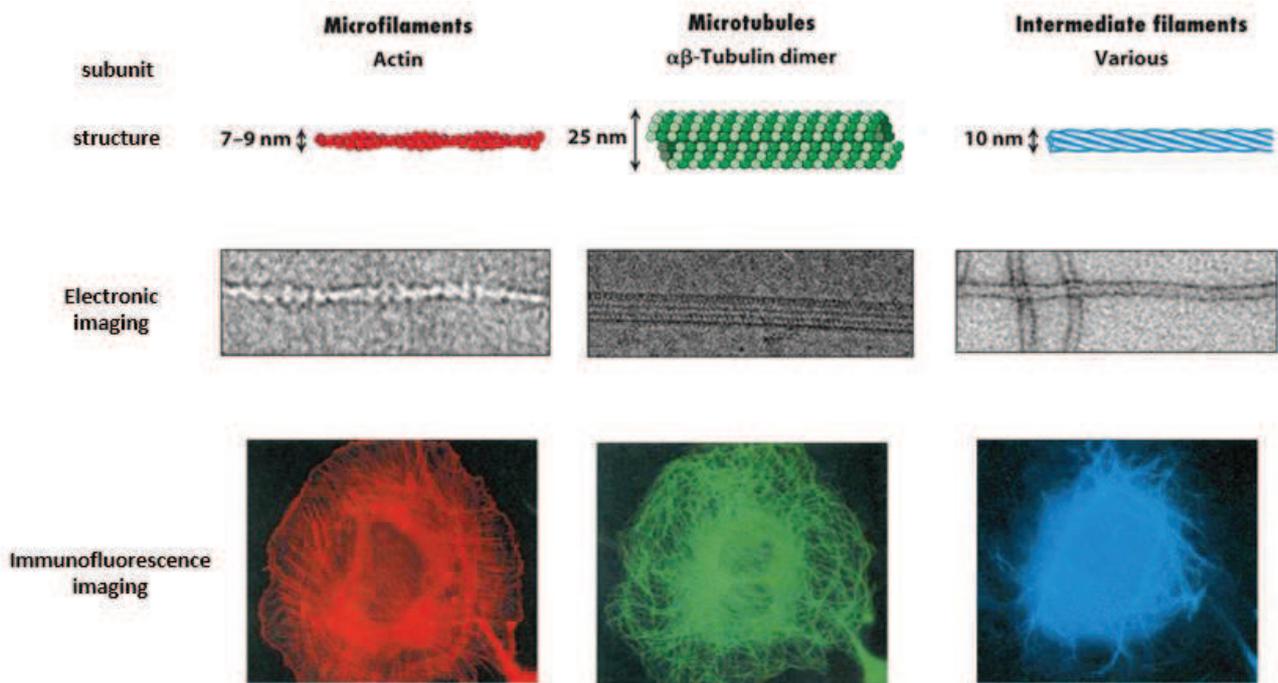


Figure 20 : Les principaux composants du cytosquelette dans les cellules eucaryotes. Adapté de (103).

2.1. Structure des microtubules

2.1.1. Structure générale

L'unité structurale de base des microtubules est un hétérodimère de tubuline (**figure 21**). 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* (104). 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 nm (105).

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 » (106). Cette ligne de suture provient du repliement du feuillet de tubuline lors de la formation du microtubule (107). 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) (108).

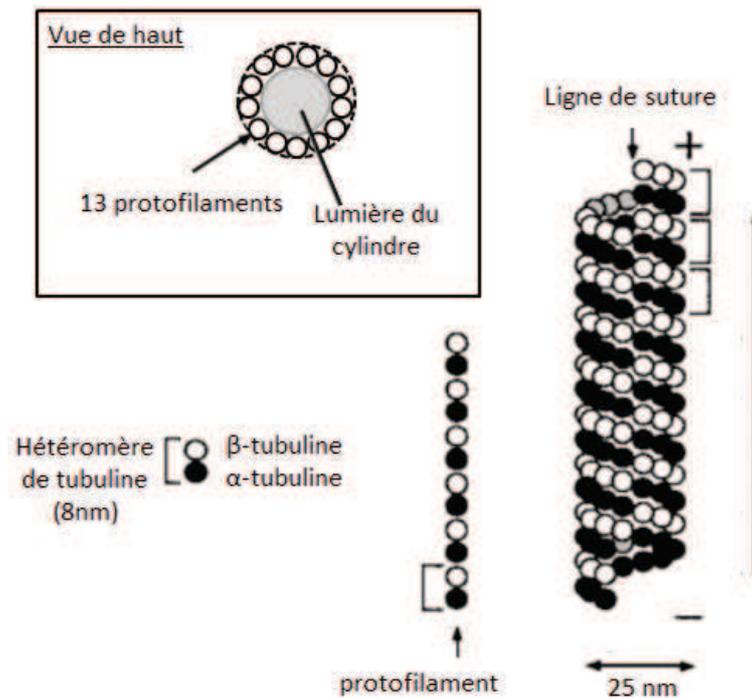


Figure 21: Représentation schématique des microtubules adaptée de (109).

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 (110).

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 biochimiques (111). 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* (112). 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 (113), ϵ (114), ζ (115)) (116).

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.

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) (117,118). 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 Å (119) (**Figure 22**). Concernant la structure secondaire, chaque monomère possède deux feuillettes β centraux entourés de 12 hélices α .

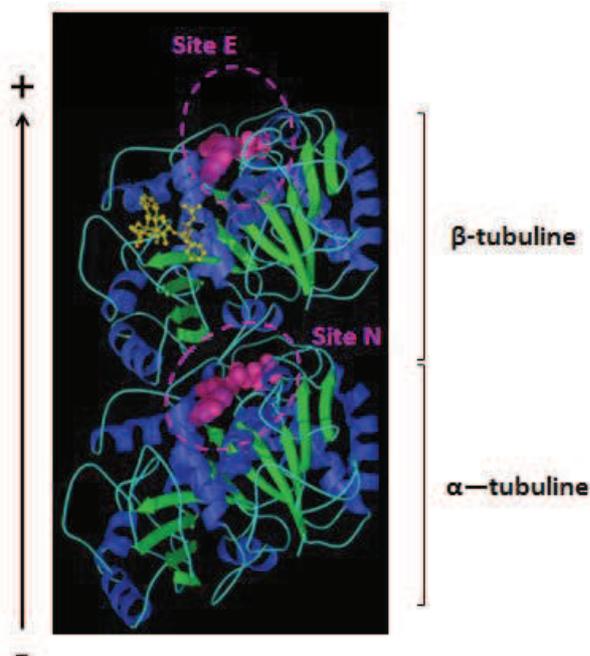
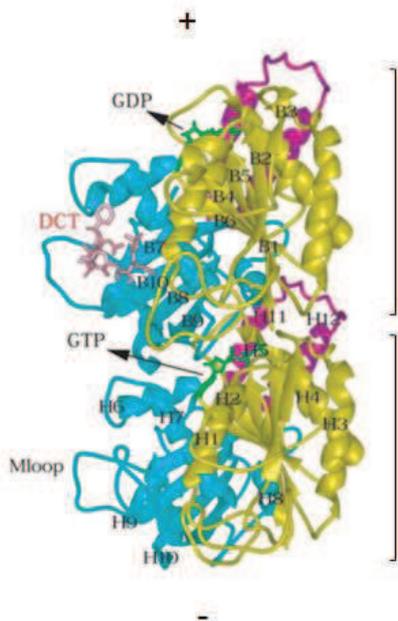


Figure 22: Structure tridimensionnelle de l'hétérodimère d' α/β tubuline (diagramme Ribbon). Adapté de (120). La structure secondaire figure sur la représentation schématique : les feuillettes β sont en vert et les hélices α en bleu. Le nucléotide guanosine se liant à chaque monomère est représenté en rose tandis que le paclitaxel apparaît en jaune.

Chaque sous-unité est structurée en 3 domaines fonctionnels (**figure 23**) :



β-tubuline *Figure 23* : 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 (121).

α-tubuline

- Un domaine N-terminal : l'extrémité N-terminale forme un pli de Rossmann permettant la liaison de nucléotides GTP (guanosine 5'-triphosphate) (122). Un cation magnésium Mg^{2+} est impliqué dans la liaison du GTP au niveau de chaque monomère (123). Dans la sous-unité α , le nucléotide, enfoui à l'interface entre les 2 monomères de tubuline, est non échangeable (site N) (124). 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 protofilaments (118). 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, polyglutamylatation, polyglycylation).

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-ci (125) 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) (126). 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 cellulaire (127).

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 identifiés (128). 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 interchangeables (129,130) et, à ce jour, seul le rôle spécifique d'un petit nombre d'isotypes a pu être établi (131–134).

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 détyrosination (134). 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) (135). Enfin, l'expression différentielle d'isotypes module la sensibilité de la cellule vis-à-vis des agents ciblant les microtubules (136,137).

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 7**). 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 24**). 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 microtubules (138).

Par exemple, les processus de détyrosination/tyrosination régulent l'organisation neuronale (138,139). 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 (140,141). 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 7: Les principales modifications post-traductionnelles de la tubuline et des microtubules (139). 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	α/β		
Glycylation	α/β	Add γ -linked Gly to C-terminal Glu	TTLL3 and 8
Polyglycylation	α/β	Addition to γ -linked Gly C-terminal	TTLL10
Deglycylation	α/β		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	Protein

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

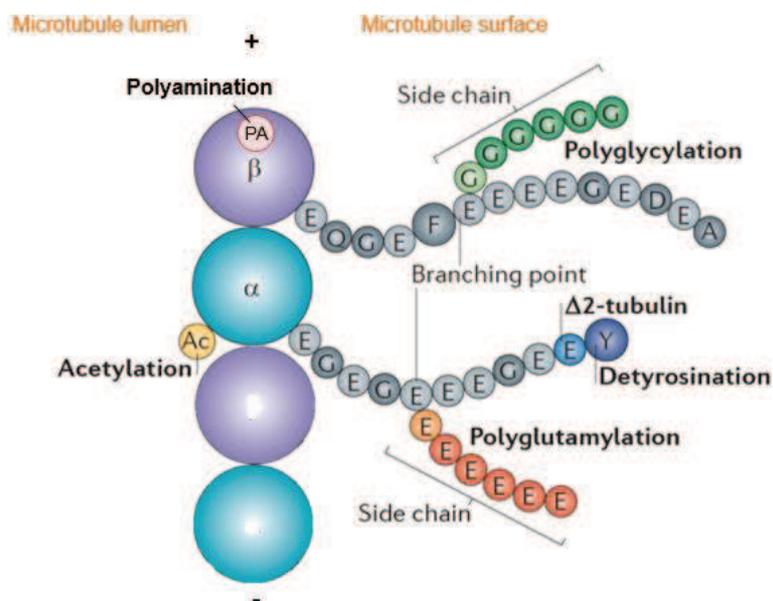


Figure 24 : Localisation des principales modifications post-traductionnelles. Adapté de (138).

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) (143) sur le monomère β et son hydrolyse.

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-GTP (144). 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 E (145) 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 25**).

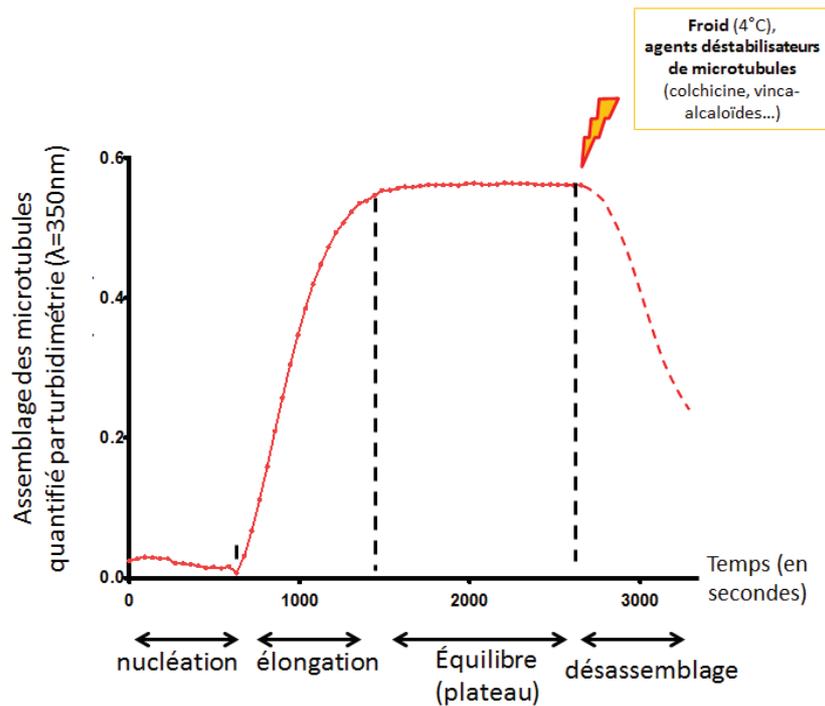


Figure 25: Représentation schématique de l'assemblage des microtubules *in vitro* par suivi turbidimétrique à 350 nm.

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 microtubules (146). *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 $25\mu\text{M}$). 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 26**) (147). *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-GTP (148).

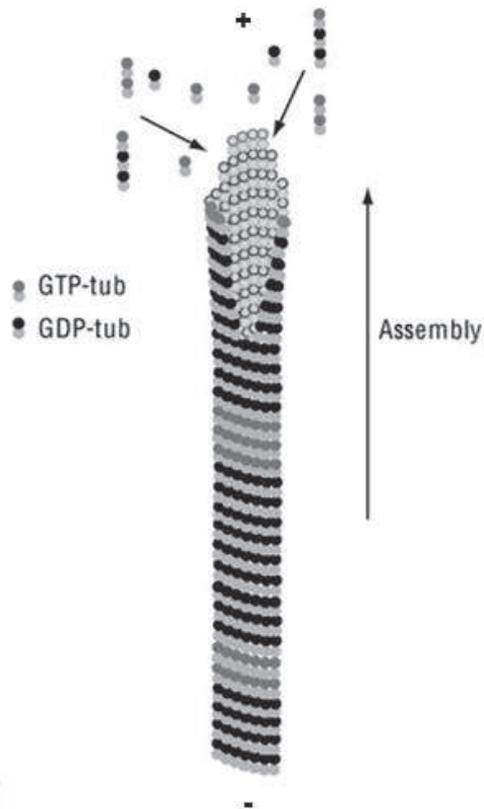


Figure 26: Représentation schématique d'un microtubule en cours d'élongation (149).

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 27**): 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 roulant (150).

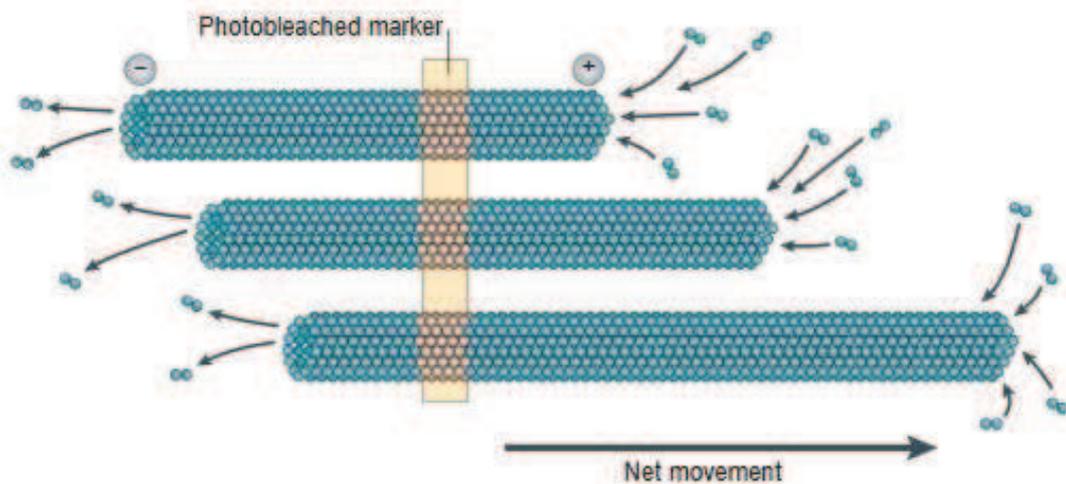
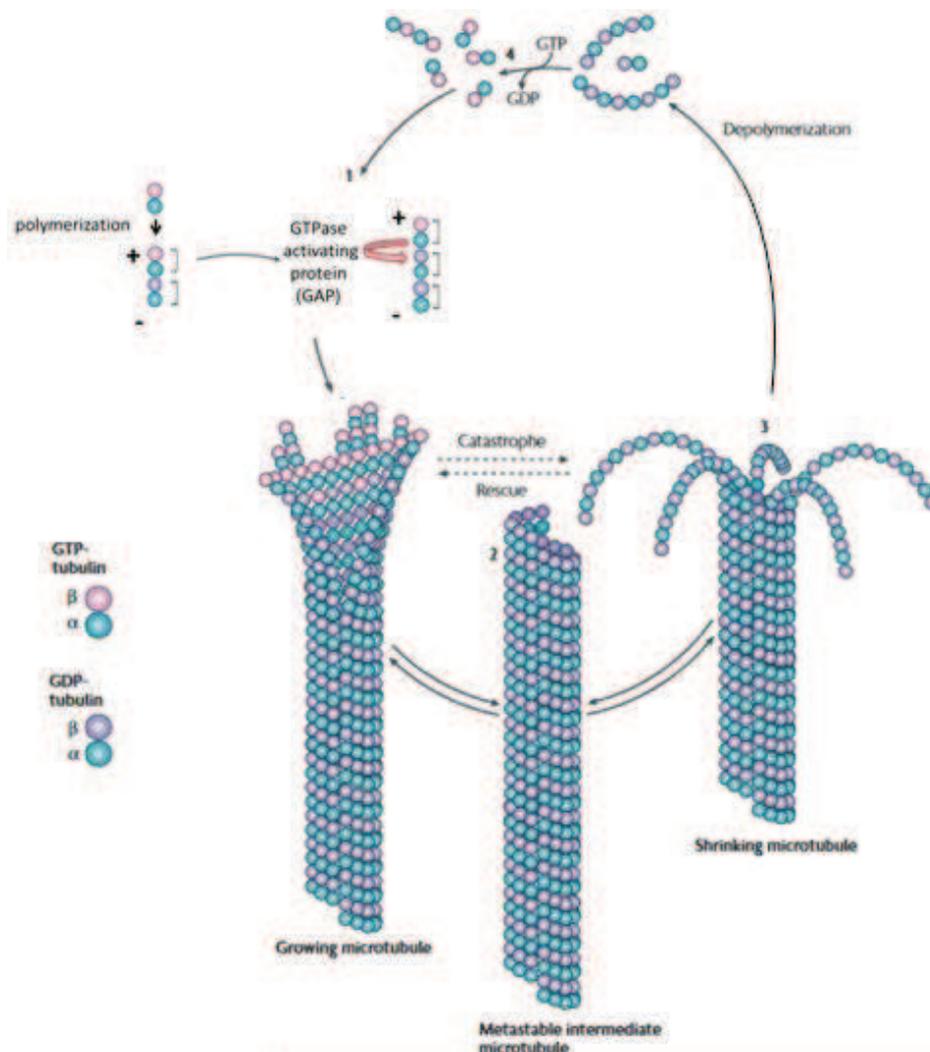


Figure 27: Représentation schématique du phénomène de tapis roulant (151).

- la forte instabilité dynamique des microtubules (142): les microtubules alternent des phases de croissance lente, de pause et de désassemblage rapide de façon totalement aléatoire (**figure 28**) (142,152). 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 microtubulaire (153). 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) (154). 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 microtubule (155). 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 microtubule (156). En cas de perte de cette coiffe, le microtubule se dépolymérise très rapidement (phénomène de catastrophe) (157), 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).

a



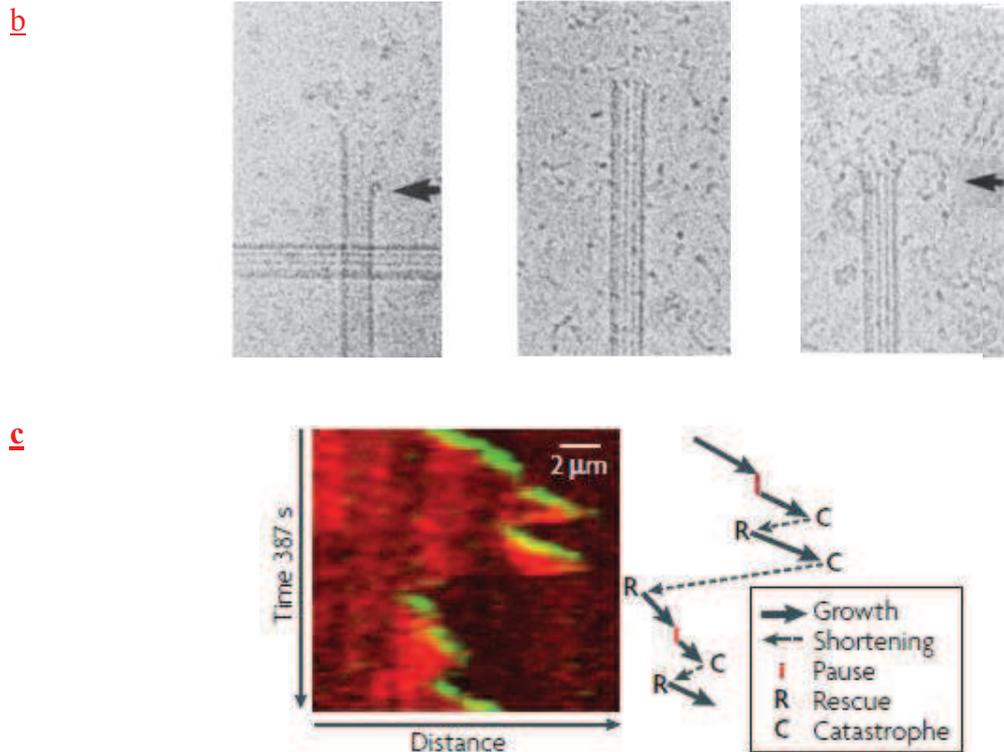


Figure 28 : L'instabilité dynamique des microtubules. **a** Représentation schématique illustrant l'alternance des phases de croissance et de désassemblage des microtubules. Adaptée de (119). **b** Images de microscopie électronique représentant (de gauche à droite) un microtubule en cours d'élongation 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 (158). **c** 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.

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 élevée (159), les microtubules sont plus souvent à l'état de pause (état métastable durant lequel il n'y a ni croissance ni désassemblage) (160) et les phénomènes de transition (catastrophe et sauvetage) sont plus fréquemment observés (148). 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 cellulaire (161) 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) (109,162).

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.

- **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 29**). 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.

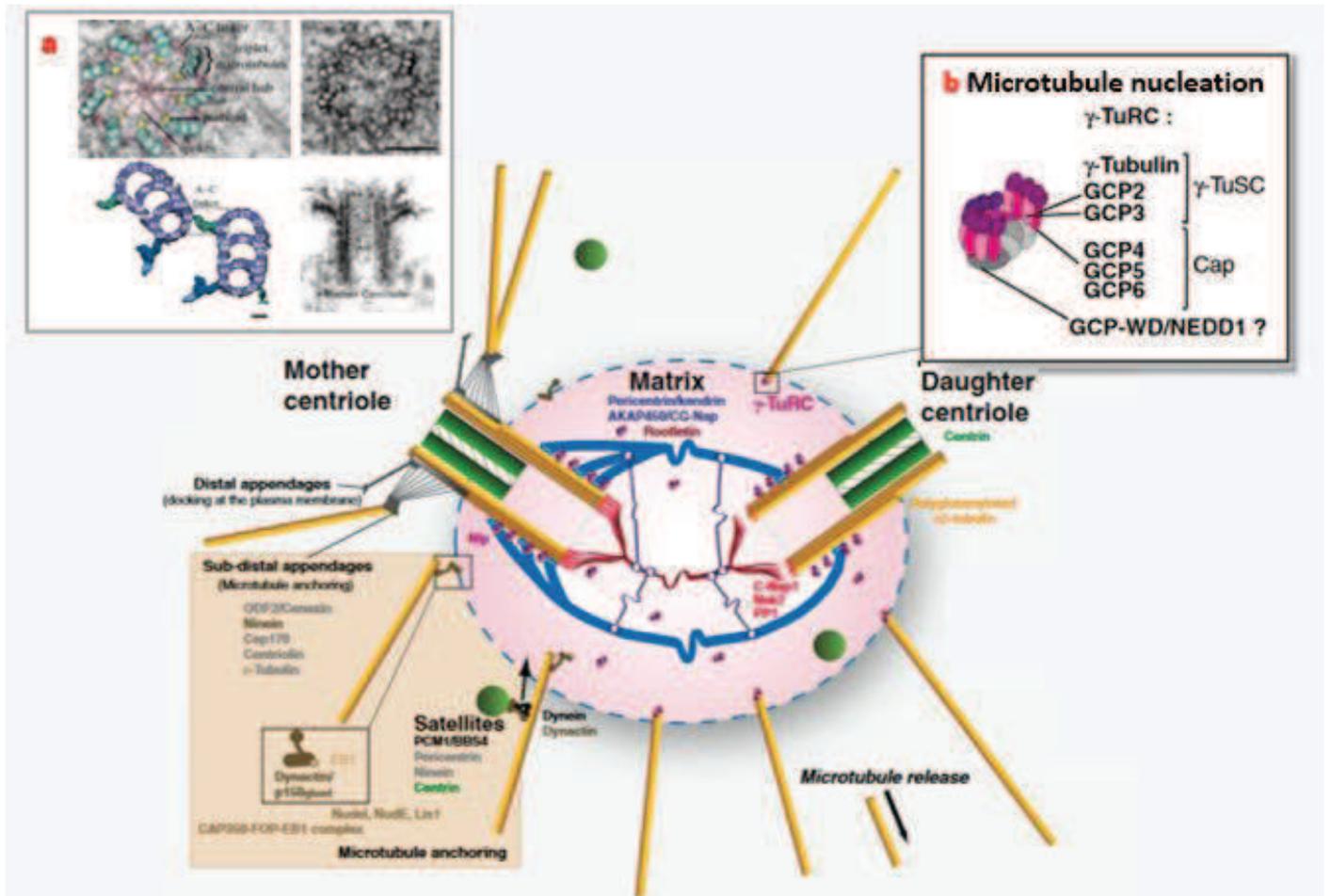


Figure 29: Structure des centrosomes, adapté de (163). Les centrosomes sont composés de 2 centrioles (un centriole père et un centriole fils) entourés de matériel péri-centriolaire (en rose). **a** coupe transversale de centriole. **b** Structure des γ -TuRC. Les γ -TuSC (γ -tubulin small complex) sont 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 péri-centrine/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, péri-centrine, 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 30**).

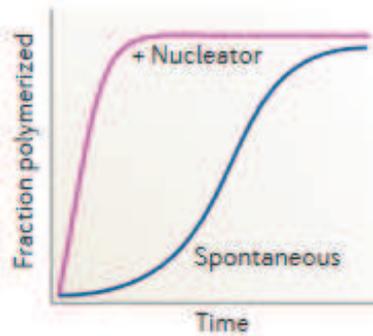


Figure 30 : Les complexes de γ -tubuline (γ -TuRC) sont des agents nucléateurs de microtubules : ils ne sont pas indispensables pour la nucléation des microtubules mais ils accélèrent de façon très significative le processus.

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 8**).

Tableau 8: Principaux constituants et régulateurs des γ -TuRC (164).

		Protein family	Biochemical functions	H. sapiens representative proteins	
Microtubule Nucleators	γ -Tubulin Ring Complex (γ -TuRC)	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 irradiée 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 31**). 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.

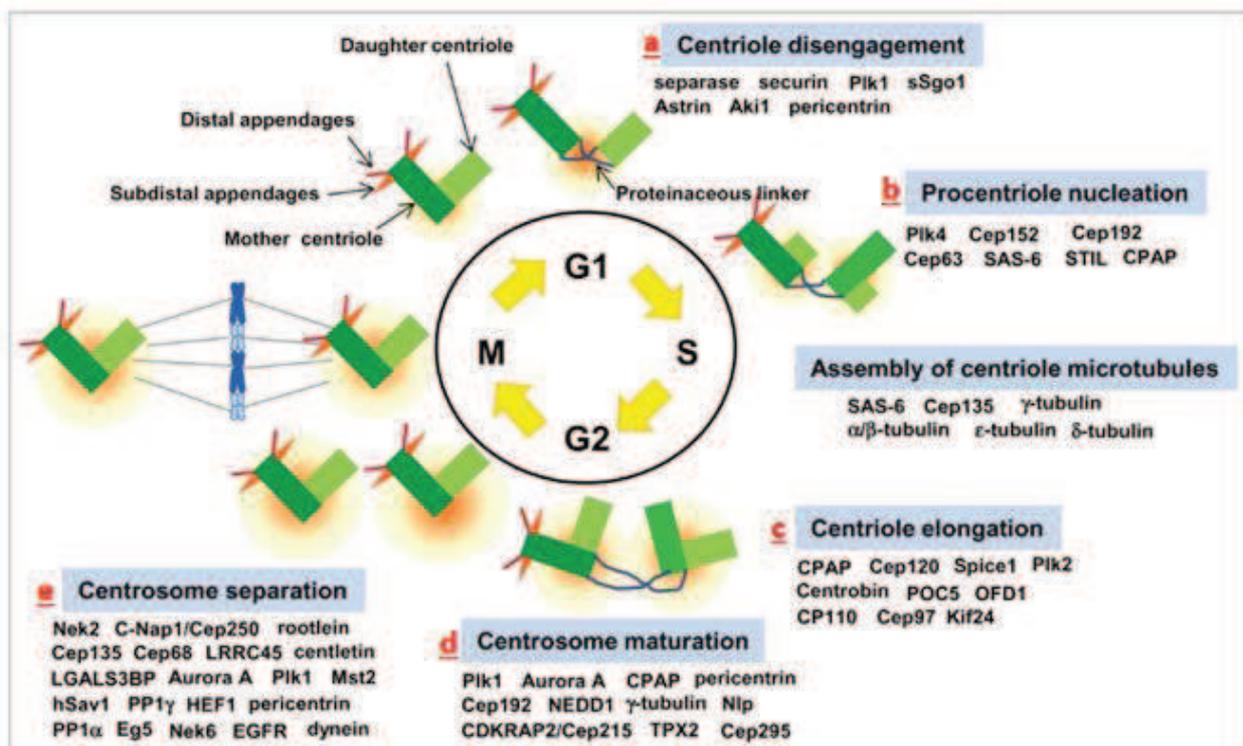


Figure 31 : Le cycle de duplication des centrosomes. Adapté de (165). **a** En fin de mitose/début de phase G1, les centrioles perdent leur conformation orthogonale sous l'action d'une séparase (désengagement des centrioles). Ils restent liés par une connexion faible. **b** En fin de phase G1/début de 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.

- **Les COMT non centrosomiaux**

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 32**).

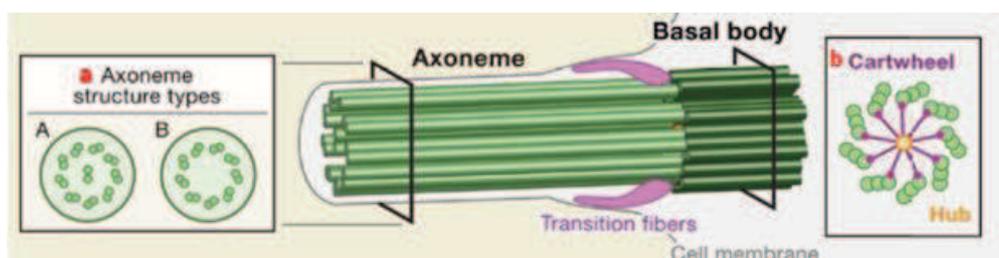


Figure 32: Structure des cils et des flagelles (166). *a* Coupe transversale de l'axonème. L'axonème, de forme cylindrique, est composé de 9 doublets de microtubules entourant une paire centrale de microtubules (structure 9+2) ou sans doublet central (structure 9+0). *b* Coupe transversale du corpuscule basal (ou basal body). Le corpuscule basal est constitué de 9 triplets de microtubules organisés radialement.

D'autres sites non-centrosomiaux d'organisation des microtubules sont observés au niveau des myotubes, des cellules épithéliales et des neurones (**figure 33**).

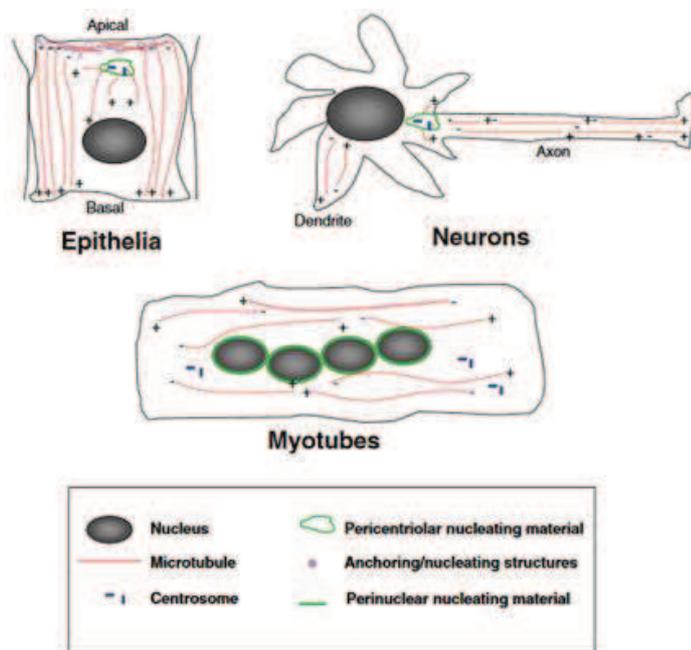


Figure 33: Les COMT non centrosomiaux (167). Le centrosome est toujours présent mais n'est plus l'organisateur principal des microtubules. Dans les cellules épithéliales polarisées, les microtubules s'orientent selon l'axe apical-basal, le bout plus étant exposé au niveau basal. Dans les neurones, les 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.

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 (microtubules-associated proteins ou MAPs) (168). 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 2 .1.2.4) (139,169). 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.

- **Les protéines stabilisatrices**

Tableau 9 : 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	Références
Sur toute la longueur des microtubules	MAPs classiques	MAP1	MAP1A, MAP1B, MAP1S	Stabilisation des microtubules neuronaux	(170)
		MAP2/ Tau	MAP2 et Tau (neuronaux), MAP4 (non neuronale)	Augmentation de la rigidité des microtubules, inhibition de la dépolymérisation	(171)
Autres MAPs	STOP (Stable-Tubule-Only-Peptide) ou MAP6	double corinne	E-STOP, N-STOP, SL21 DCX (neuronale)	Protection des microtubules contre la dépolymérisation induite par le froid ou les agents dépolymérisateurs Inhibition de la dépolymérisation, réduction de la fréquence des catastrophes	(172,173) (174)
		Proteïnes 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
+TTPs (Microtubule plus-end tracking proteins)	Proteïnes 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	(176,180)
		spectraplakines CLASPs (CLIP associated proteins)	MACF1/ACF7 CLASP1, CLASP2	stabilisation des microtubules via l'interaction avec le cortex cellulaire et le réseau d'actine filamentaire stabilisation des microtubules via l'interaction avec le cortex cellulaire, augmentation de la fréquence des sauvetages, suppression des événements de catastrophe	(176,181) (176,182)
Proteïnes 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	(182)	

Localisation des MAPs		Classification des MAPs		Famille de protéines		Protéines représentatives chez l'homme		Fonctions biochimiques		Références	
+TIPs (Microtubule plus-end tracking proteins)	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	(183)				
		NuSAP		NuSAP		Stabilisation des microtubules près des chromosomes, nécessaire pour l'alignement correct des chromosomes en métaphase	(184-186)				
	Kinesin-5		Eg5		Stabilisation par interaction des microtubules antiparallèles émanant des pôles opposés (microtubules interpaires en métaphase ou au niveau du midbody)	(187,188)					
	MAP65		PRC1		Induction de la croissance des microtubules, réduction de la fréquence des catastrophes	(189,190)					
Autres MAPs	protéines EB (End-binding)			EB1, EB2, EB3		Liaison aux dimères de tubuline et promotion de l'assemblage des microtubules	(191,192)				
		CRMPs (Collapsin response mediator proteins)		CRMP2		Stabilisation par interaction avec le cortex cellulaire, réduction des phénomènes de catastrophe, interaction avec des vésicules pour le trafic intracellulaire	(193)				
	dyncéine		dyncéine		Nucléation des microtubules, stabilisation de l'extrémité moins des microtubules	Cf partie 2.2.2.1					
	γ -TURC		ninein BICDI NDEL1		Ancre de l'extrémité moins des microtubules	(164)					
-TIPs (microtubule minus-end targeting proteins)	MAPs d'ancrage à l'extrémité moins	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)	(194)				
		NuMA (Nuclear protein that associates with the Mitotic Apparatus)		MCRS1 (Microspherule protein 1)			(195)				
	RHAMM (Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility)		NUMA			(196)					
	TACC (Transforming Acidic Coiled-Coil)		RHAMM		Stabilisation des microtubules aux pôles des fuseaux mitotiques nécessaire pour l'assemblage correct du fuseau mitotique et une division cellulaire normale	(197)					
TPX2 (Targeting Protein for Xbp2)		TACC-1, TACC-2 TACC-3			(198)						
				TPX2 (Targeting Protein for Xbp2)			(199)				

- **Les protéines déstabilisatrices**

Tableau 10 : 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	Références
Le long des microtubules	Protéines fragmentant les microtubules	Katanine	Katanine p60 et p80	<p>ATPases et dépolymérasas :</p> <p>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»)</p>	(200,201)
		spastine fidgetine	SPAST FIGN, FIGNL1, FIGNL2		
+TIPS et/ou TIPs	Kinésines	Oncoprotéine18 ou stathmine	Op18/stathmine	<p>-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</p>	(202)
		Kinésines 8	Kif18A, Kif18B, Kif19		
	Kinésines	Kinésines 13	Kif2A, Kif2B, Kif2C/MCAK, Kif24	<p>Diffusion bidirectionnelle sur le microtubule, dépolymérisation ATP-dépendante d'une extrémité du microtubule en courbant les protofilaments, augmentation de la fréquence des catastrophes</p>	(203)

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 microtubules (169) et l'activité de MAPs (204).

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 34**). Ils contribuent également au positionnement du noyau et des organelles dans le cytoplasme (205). Disposant d'une polarité intrinsèque, les microtubules sont impliqués dans la polarité et la motilité (206) cellulaires et servent de rails directeurs pour le transport intracellulaire des macromolécules et des organites (ou cargos) par les MAPs motrices (**Figure 35**). 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 (207–209). Les microtubules sont particulièrement indispensables pour le développement et la différenciation des neurones (210).

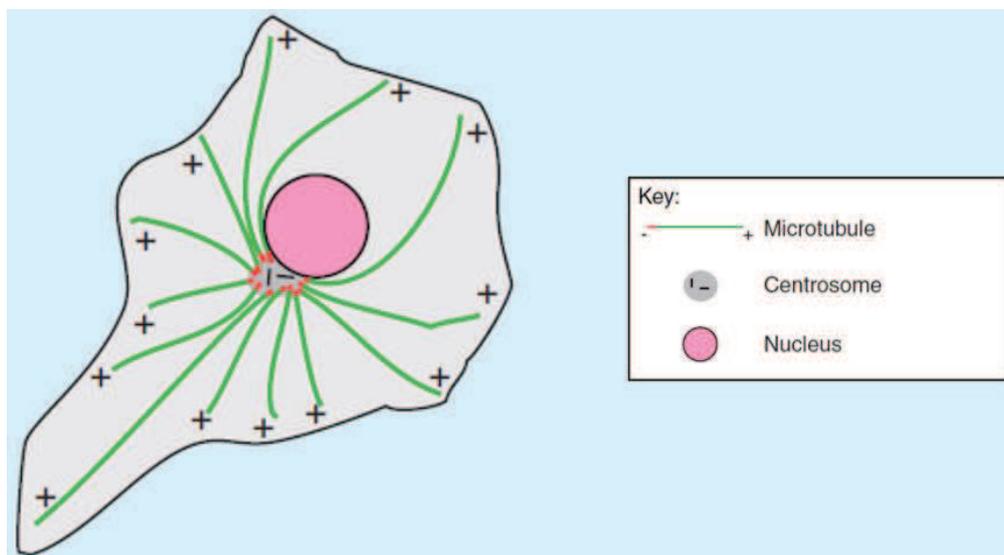


Figure 34 : Représentation schématique du réseau microtubulaire interphasique (211).

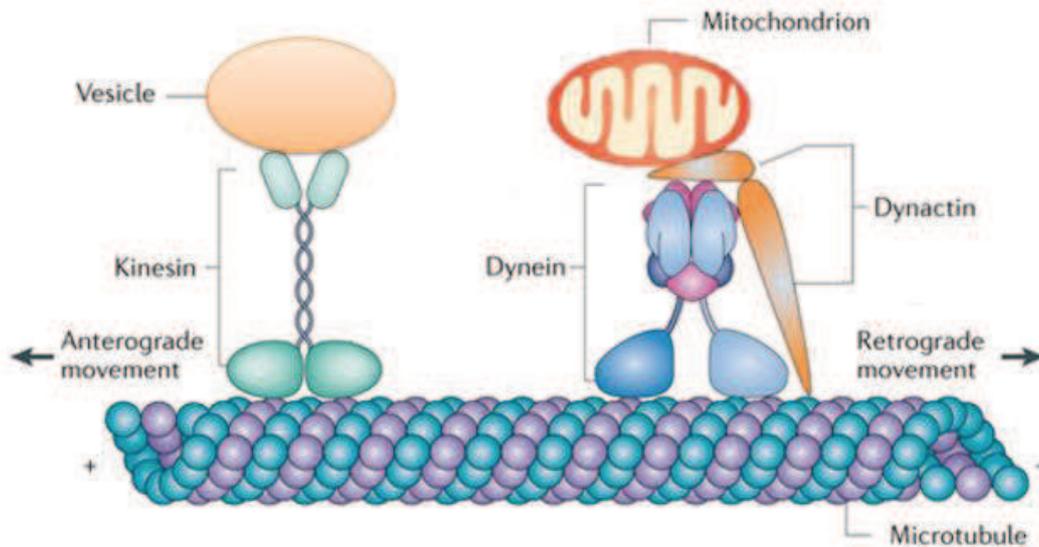
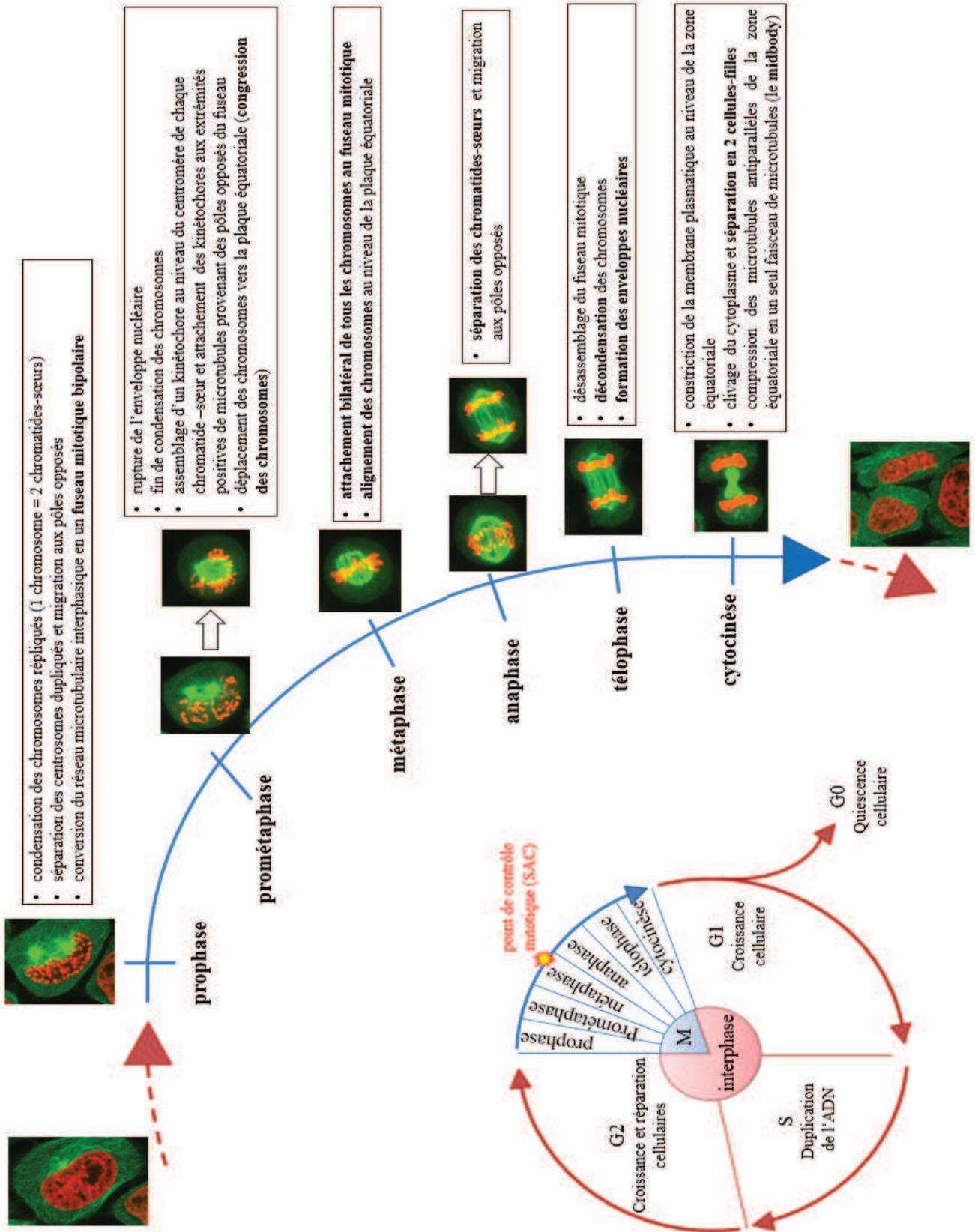


Figure 35 : Représentation schématique du transport intracellulaire des cargos par les MAPs motrices le long des microtubules. Il existe deux types de moteurs moléculaires : la dynéine associée à la dynactine qui transporte les cargos vers l'extrémité moins des microtubules (mouvement rétrograde), et 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. Adapté de (212).

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 3.2.2.2), ils s'organisent en fuseau bipolaire afin d'assurer la motilité et la séparation des chromosomes homologues lors de la mitose (**figure 36**) (213).

Figure 36 : 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.



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 37**) :

- 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) (214). 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 congession 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 fuseau (215).

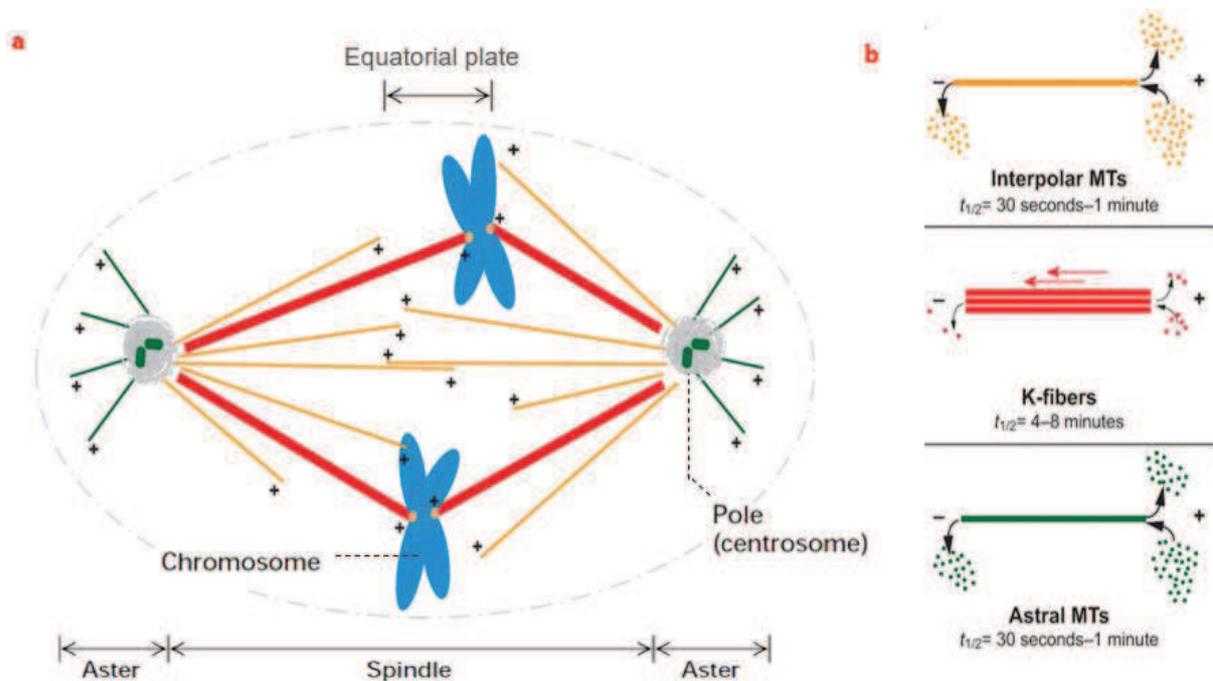


Figure 37 : Représentation schématique des 3 types de microtubules mitotiques. Adapté de (216). **a** Fuseau bipolaire montrant les 3 types de microtubules mitotiques: les microtubules interpolaire (en orange), les fibres K (en rouge) et les microtubules astraux (en vert). Les « + » indiquent l'extrémité 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.

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 38**). 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.

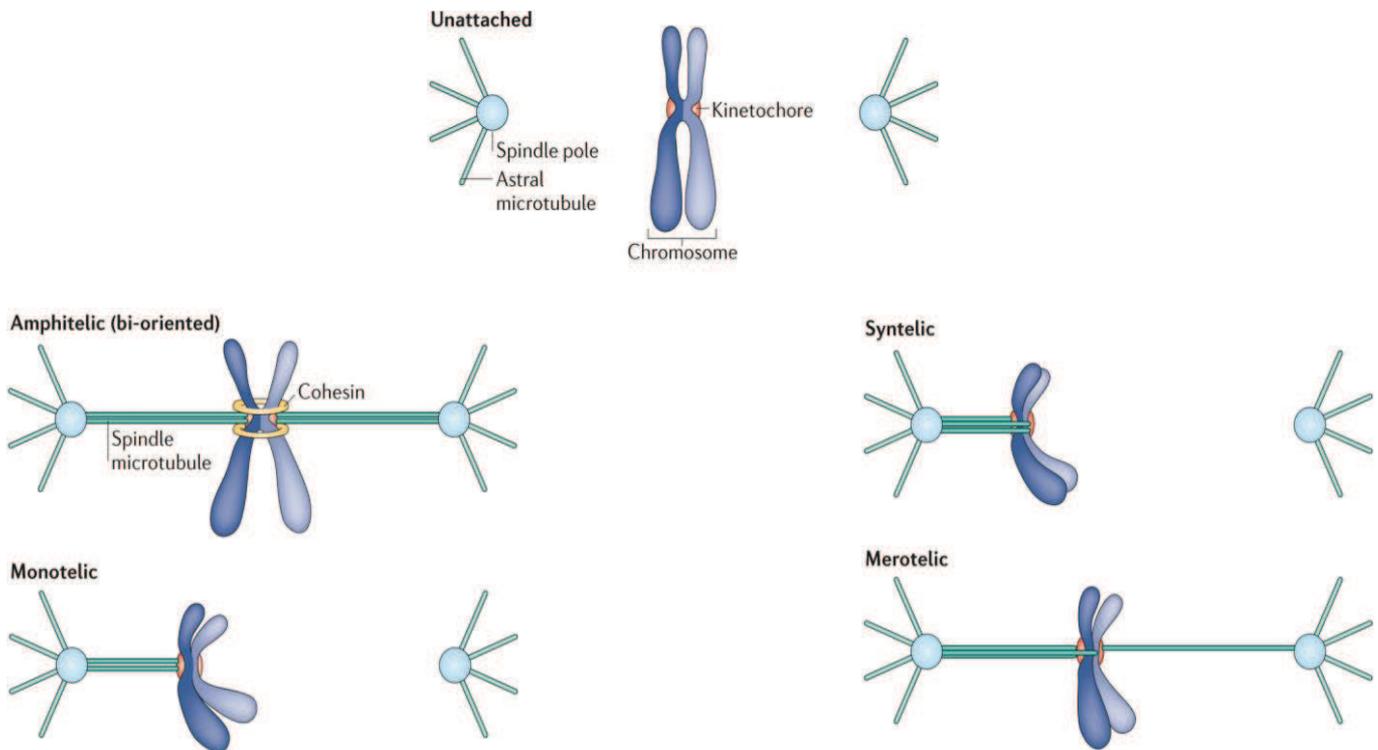


Figure 38 : Représentation schématique des différentes configurations d'attachement des kinétochores au fuseau mitotique (217). Chaque chromosome a 2 kinétochores, situés au niveau du centromère de ses 2 chromatides-sœurs. On parle d'attachement amphitélétique bi-orienté lorsque chaque kinétochore-frère est attaché à un pôle distinct du fuseau mitotique. L'attachement amphitélétique consiste en la liaison d'un seul kinétochore à un pôle mitotique. Les chromosomes peuvent être attachés aux 2 pôles (Lorsque les 2 kinétochores sont liés au même pôle, on parle d'attachement syntélique. Enfin, un attachement mérotélique 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 36**) (218). 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) (219). 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 39**) (220).

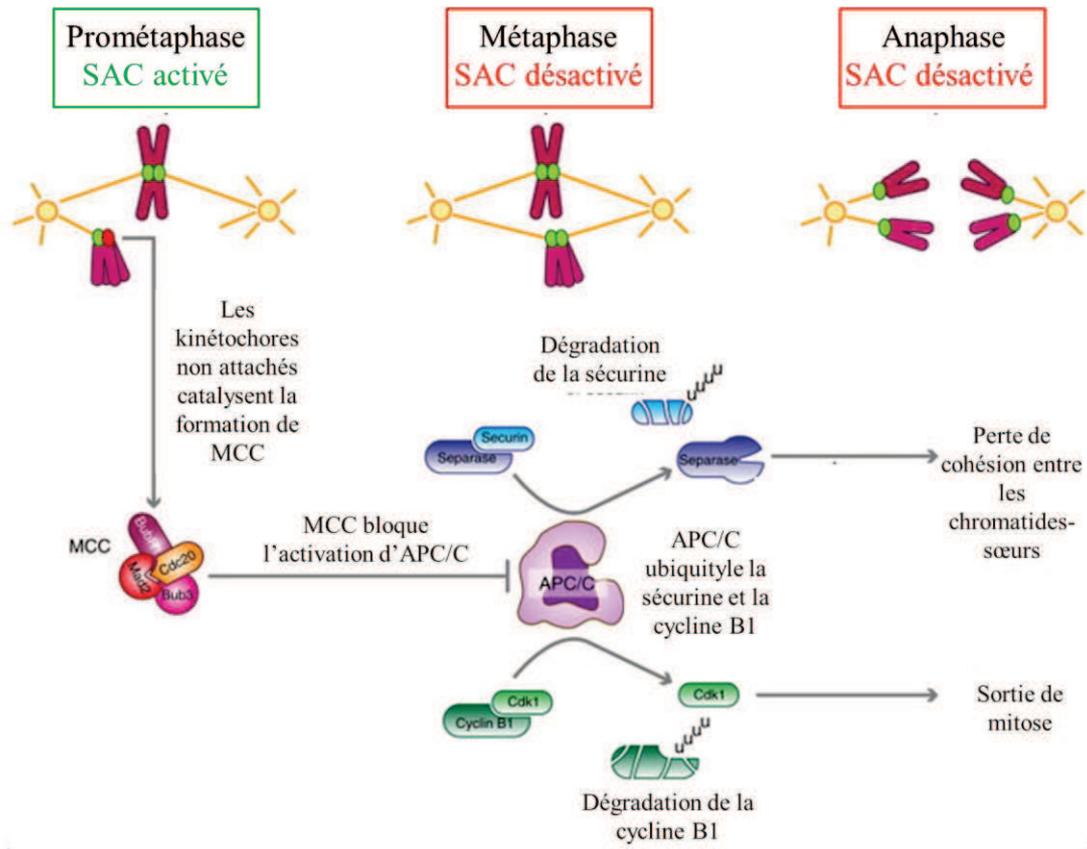


Figure 39 : Mécanisme du SAC. Adapté de (221). En prométaphase les kinétochores non attachés (en rouge) induisent l'activation du SAC. Il en résulte la formation du complexe MCC (l'effecteur du SAC) composé des protéines BubR1, Bub3, Mad2 et Cdc20. Le MCC lie et inhibe l'activité de l'APC/C (Anaphase 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.

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 antimitotique.

Les antimitotiques 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 microtubules (222–224).

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 (225,226). 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) (227,228). Actuellement, 2 sites de liaison aux MSA ont été identifiés : le domaine de liaison des taxoïdes et le domaine de liaison du laulimalide/péloruside A.

2.4.1.1. Domaine de liaison des taxoïdes

Initialement isolé de l'écorce de l'If (*Taxus brevifolia*), le paclitaxel fut le premier MSA identifié (229). 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 11**).

Tableau 11 : 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 taxoïdes se situe sur la tubuline β entre la boucle M et une poche hydrophobe, au niveau de la partie luminale des microtubules (**figure 40**). Ce site est accessible dans les microtubules préformés (230) et la cinétique de liaison du ligand à la tubuline est rapide (231) 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 (232,233). Les composés se lient aux microtubules avec une stœchiométrie de 1:1 (soit 1 molécule fixée par hétérodimère, les 2 sites étant mutuellement exclusifs) (234,235).

D’autres MSA, de structures chimiques très différentes, entrent en compétition avec les taxanes pour le même site de liaison : ce sont notamment les epothilones (236), 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.

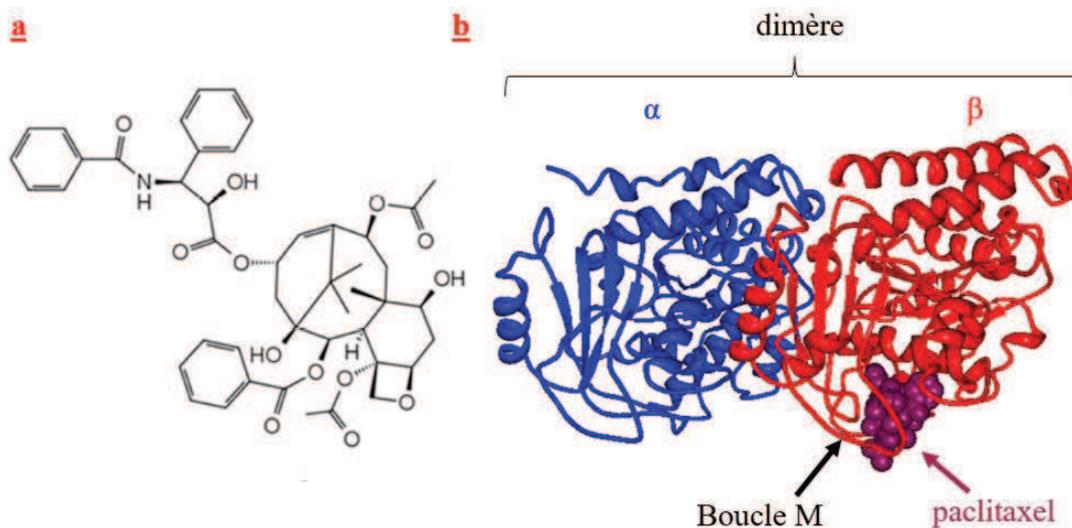


Figure 40 : Structure et domaine de liaison du paclitaxel sur la tubuline. **a** Structure chimique du paclitaxel. **b** Diagramme Ribbon montrant la structure cristalline du dimère d' α/β tubuline stabilisé par le paclitaxel. Les structures secondaires des sous-unités α - et β -tubuline sont représentées en bleu et en rouge respectivement. Le paclitaxel est représenté par des sphères violettes. Structure extraite du site web Protein Data Bank (1JFF).

2.4.1.2. Domaine de liaison du laulimalide et du péloruside A

Le laulimalide (237) et le péloruside A (238) 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 microtubules (226) (figure 41). Ces molécules se lient à la tubuline avec une stoechiométrie de 1:1. Le laulimalide/péloruside A et les taxoïdes peuvent être simultanément présents sur le même hétérodimère (239).

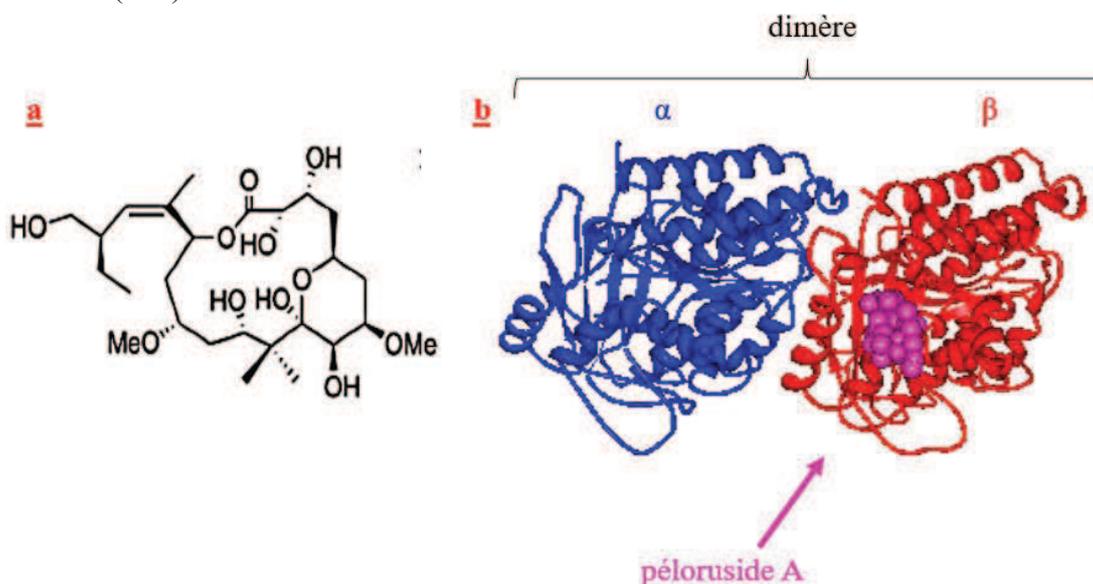


Figure 41 : Structure et domaine de liaison du péloruside A sur la tubuline. **a** Structure chimique du péloruside A. **b** Diagramme Ribbon montrant la structure cristalline du dimère d' α/β tubuline stabilisé par le péloruside A. Les structures secondaires des sous-unités α - et β -tubuline sont représentées en bleu et en rouge respectivement. Le péloruside A est représenté par des sphères roses. Structure extraite de Protein Data Bank (4O4L).

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).

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 antimitotique et antiangiogénique importante, la colchicine n'est pas utilisée dans le traitement des cancers car elle présente un indice thérapeutique très étroit (**tableau 12**).

Tableau 12 : 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 libres (240), se situe à l'interface entre les 2 sous-unités d'un même dimère (**figure 42**). 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 microtubules (241). 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 dépolymérisation (242).

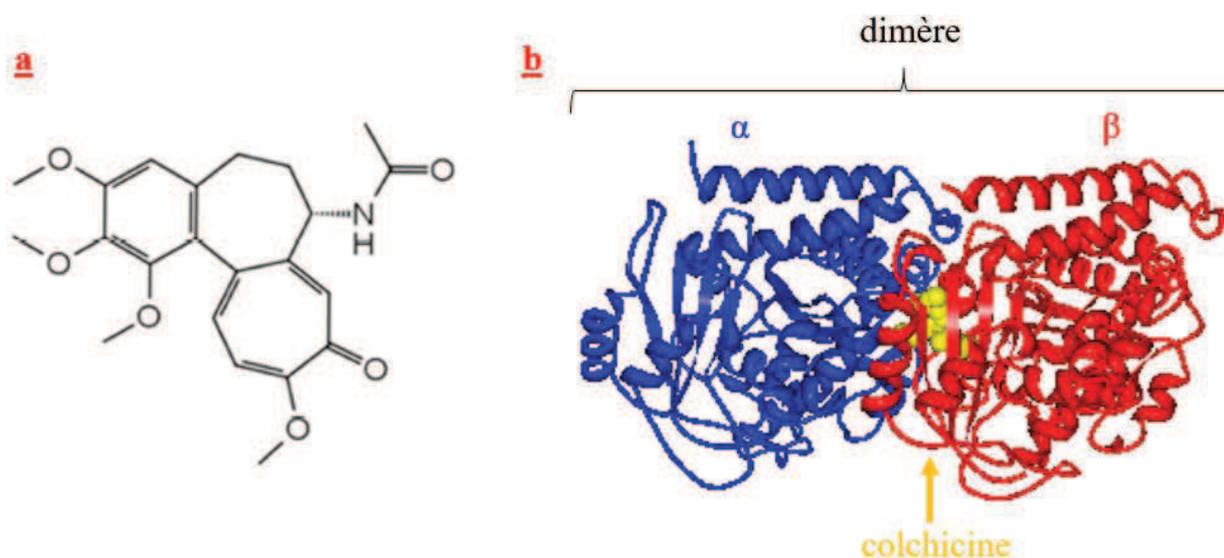


Figure 42: Structure et domaine de liaison de la colchicine sur la tubuline. **a** Structure chimique de la colchicine. **b** Diagramme Ribbon montrant la structure cristalline du dimère d' α/β tubuline déstabilisé par la colchicine. Les structures secondaires des sous-unités α - et β -tubuline sont 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 et sont actuellement en cours d'évaluation préclinique ou clinique. Ce sont notamment le nocodazole, la podophyllotoxine, la combretastatine A4, le 2-méthoxyoestradiol, l'ombrabuline, l'indibuline, la lexibuline, la plinabuline, le tivantinib, les phenylahistines, la steganacine, les chalcones et la curacine A (223,243–246).

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 possèdent une activité de dépolymérisation des microtubules. Ces composés naturels ou semi-synthétiques sont très largement utilisés comme chimiothérapies (**tableau 13**).

Tableau 13 : 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 43**) (247). 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) (246,247).

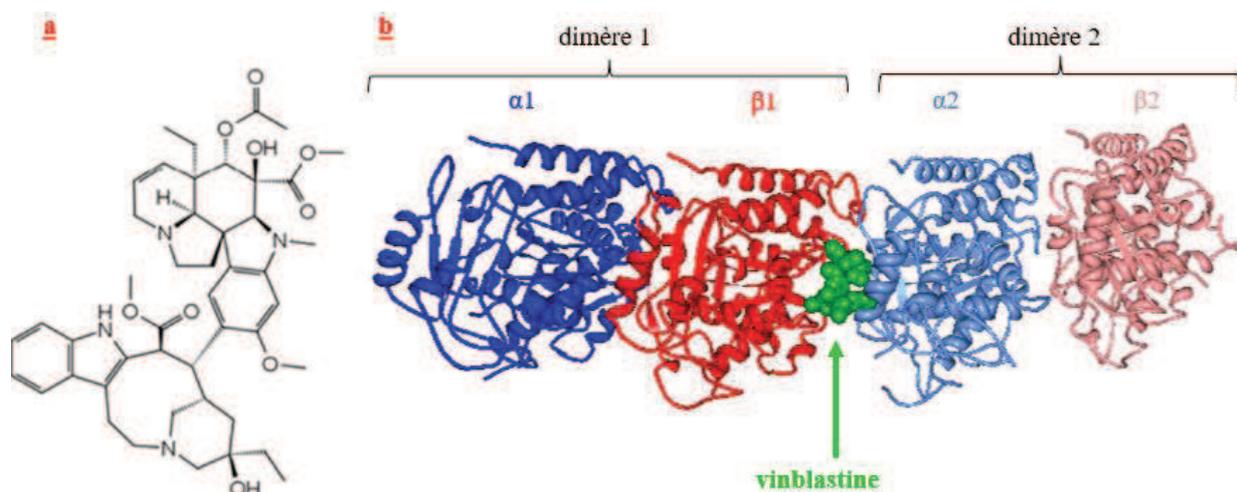


Figure 43: Structure et domaine de liaison de la vinblastine sur la tubuline. **a** Structure chimique de la vinblastine. **b** Diagramme Ribbon montrant la structure cristalline du dimère d' α/β tubuline déstabilisé par la vinblastine. Les structures secondaires des sous-unités α - et β -tubuline sont 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 (246,248). 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 (249,250). La phomopsine A, la dolastatine, la cryptophycine et les spongistatines représentent les principaux ligands de ce site.

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 -tubuline (251) par établissement d'une liaison covalente irréversible (252,253). La liaison de la pironétine à la tubuline, à proximité de l'interface interdimerique (**figure 44**), interfère avec l'assemblage des microtubules et induit un blocage cellulaire en mitose (253,254).

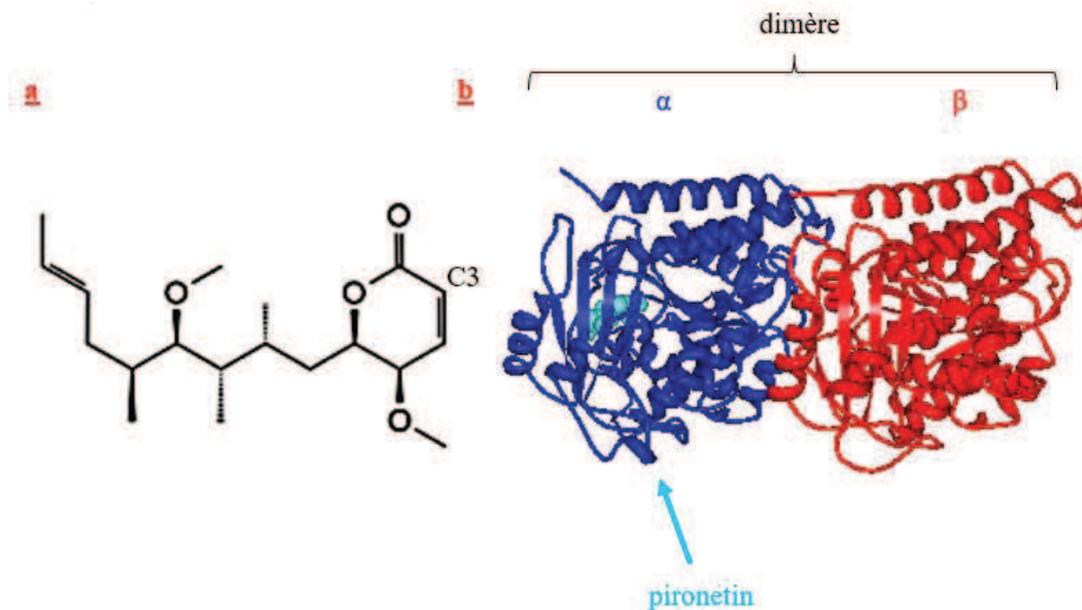


Figure 44: Structure et domaine de liaison de la pironétine sur la tubuline. **a** Structure chimique de la pironétine. **b** Diagramme Ribbon montrant la structure cristalline du dimère d' α/β tubuline déstabilisé par la pironétine. Les structures secondaires des sous-unités α - et β -tubuline sont 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/GTP (255). 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 microtubules (256).

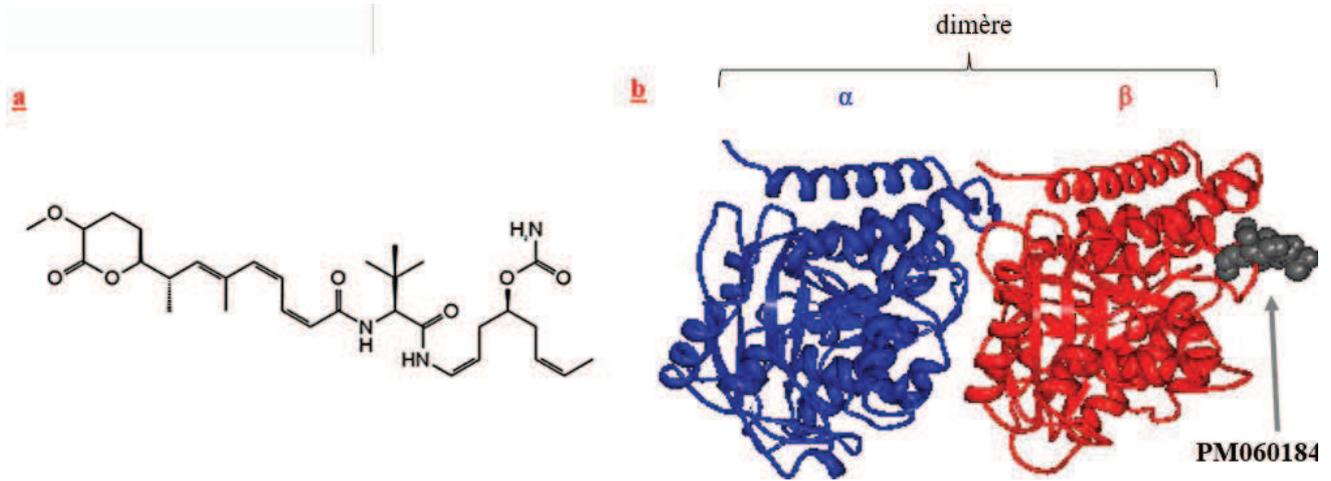


Figure 45 : Structure et domaine de liaison du PM060184 sur la tubuline. **a** Structure chimique du PM060184. **b** Diagramme Ribbon montrant la structure cristalline du dimère d' α/β tubuline déstabilisé par le PM060184. Les structures secondaires des sous-unités α - et β -tubuline sont représentées en bleu et en rouge respectivement. Le péloruside A est représenté par des sphères grises. Structure extraite de Protein Data Bank (4TV9).

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 CBNPC 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 Resistance » (MDR). La résistance aux chimiothérapies est un processus multifactoriel médié par (**figure 46**) :

- 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

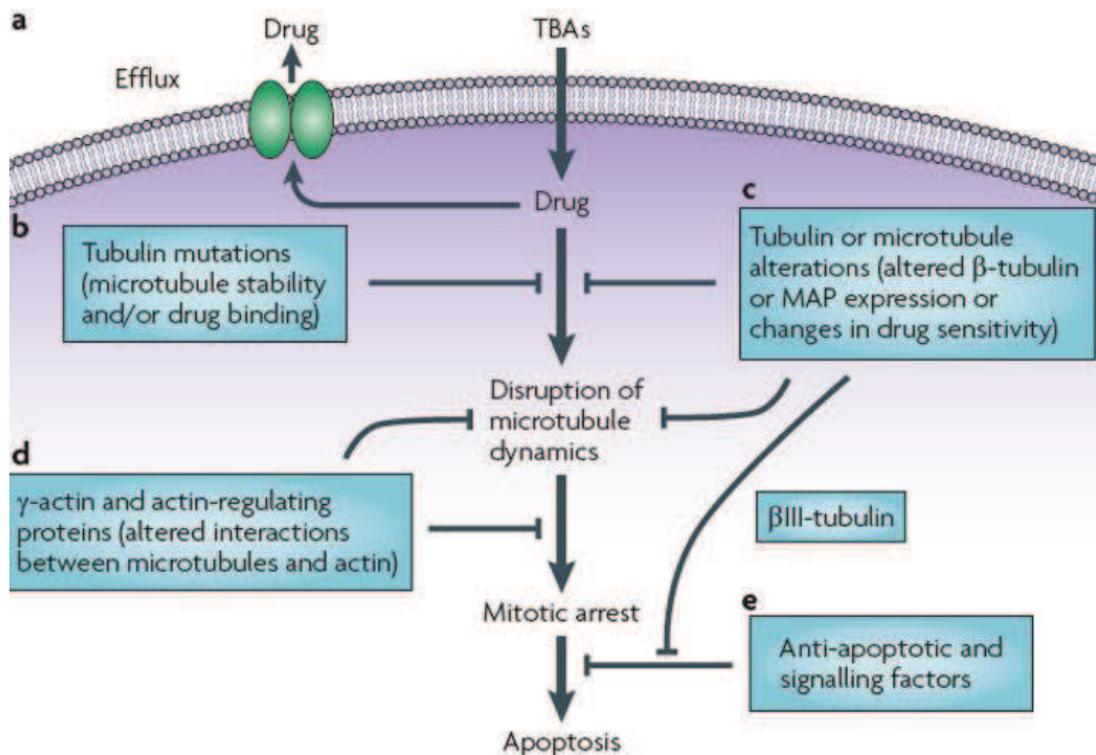


Figure 46 : Principaux mécanismes de résistance aux agents ciblant les microtubules (222).

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 microtubules (223). L'activité accrue de ces protéines d'efflux ATP-dépendantes à large spectre limite sensiblement l'accumulation intracellulaire des chimiothérapies et ainsi, leur efficacité (257,258). Parmi les protéines ABC, on peut notamment citer (**tableau 14**) :

- 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 topo-isomérasés (258,259)

Des inhibiteurs de protéines d'efflux sont en développement mais n'ont pas pour le moment montré de bénéfice clinique (260). La stratégie la plus prometteuse à ce jour est l'identification de nouveaux agents non transportés (ou faiblement transportés) par ces protéines d'efflux (259) (**tableau 14**).

Tableau 14 : 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.

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 antimitotiques pour leur cible. Ces altérations résultent soit d'une mutation (261) soit d'une modification de l'expression de ces protéines (262,263). L'inversion de composition des microtubules en ces différentes 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 (136,264–267).

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 (268,269).

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'apoptose (270).

Conclusion

Les microtubules sont des polymères de tubuline très dynamiques impliqués dans de nombreux processus biologiques. En adoptant la conformation d'un fuseau bipolaire, ils assurent notamment la ségrégation des chromosomes homologues lors de la mitose. Dans ce contexte, les microtubules 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 : ce sont les « poisons du fuseau ». Ces molécules sont cependant très toxiques et leur efficacité thérapeutique est limitée par des mécanismes de chimiorésistance.

Objectifs du travail **de thèse**

Les cancers pulmonaires sont classés au premier rang des cancers les plus meurtriers dans le monde, et de ce fait, ils représentent un problème majeur de santé publique. Les Cancers Broncho-pulmonaires Non-à-Petites Cellules (CBNPC) sont la forme histologique majoritaire (85 % des cas de cancers bronchiques) et sont associés à un pronostic médiocre ainsi qu'à une forte résistance à l'apoptose. A ce jour, la prise en charge des CBNPC avancés repose sur 2 principales stratégies thérapeutiques : les thérapies dites « ciblées » et les chimiothérapies. Le recours aux thérapies ciblées est restreint aux tumeurs présentant une mutation oncogénique validée. De plus, des mécanismes de résistance apparaissent de façon quasi inéluctable quelques mois après l'instauration du traitement, ce qui limite fortement leur efficacité et oblige le clinicien à changer de stratégie thérapeutique. Les chimiothérapies, associant majoritairement des sels de platine à un poison du fuseau, sont quant à elles fortement toxiques et soumises aux phénomènes de chimiorésistance. Un des enjeux actuels est donc d'identifier de nouveaux agents anticancéreux actifs sur les CBNPC qui soient bien tolérés.

Dans cette optique, notre équipe a réalisé, en collaboration avec l'Institut Curie (Laboratoire de Pharmaco-chimie, CNRS UMR9187/U1196, Paris), un criblage cellulaire à haut-débit sur un modèle de CBNPC résistant à l'apoptose, et sélectionné 15 dérivés pyrrolo-pyrimidine restaurant l'apoptose de cellules de CBNPC résistantes. Mes travaux de thèse ont pour but de caractériser *in vitro* et *in vivo* ces dérivés afin d'identifier un éventuel candidat-médicament pour le traitement des CBNPC. Dans ce contexte, 3 axes de recherche ont été développés. Nous avons dans un premier temps évalué le potentiel anticancéreux de ces dérivés sur différents modèles cellulaires de CBNPC ainsi que d'autres cancers représentatifs. Ces résultats préliminaires ont permis de sélectionner les 3 composés les plus prometteurs, afin de déterminer leur mécanisme d'action. Les études d'interactions entre ces composés pyrrolo-pyrimidine et leur(s) cible(s) ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr Jose Fernando Diaz Pereira (Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid). Enfin, nous avons évalué l'efficacité anti-tumorale de ces molécules dans des modèles *in vivo* de xénogreffes de CBNPC. Parmi les 3 molécules étudiées, une de celles – ci nous semble d'un intérêt tout particulier en raison de son fort potentiel anticancéreux et de son mécanisme d'action. Cette molécule, nommée PP-13 (Pyrrolo-Pyrimidine 13), sera l'objet de mes travaux de thèse d'exercice en pharmacie. Les 2 autres seront abordés dans le cadre de ma thèse d'Université.

Les résultats portant sur la molécule PP-13 sont soumis pour publication dans Cancer Research et sont présentés dans la 2^{ème} partie de ce rapport de thèse.

Résultats

Présentation de l'article scientifique (en cours de soumission)

The pyrrolo-pyrimidin derivative PP-13 as a novel microtubule-targeting agent with anticancer properties in Non-Small Cell Lung Cancers

P Gilson^{1,2}, F Josa Prado³, C Beauvineau⁴, L Vanwonthergem¹, F Mahuteau⁴, A Moreno⁵, P Falson⁵, L Lafanechère¹, V Frachet¹, JL Coll¹, JF Diaz³, A Hurbin^{1*§}, B Busser^{1,2*}

Contexte scientifique :

En dépit de l'arsenal thérapeutique à la disposition des cliniciens, la prise en charge des CBNPC avancés reste un véritable challenge en raison du développement par les cellules tumorales de nombreux mécanismes de résistance. Dans ce contexte, notre équipe a mis au point un criblage à haut débit afin d'identifier de nouvelles molécules bioactives capables de restaurer la mort programmée dans un modèle cellulaire de CBNPC résistant à l'apoptose. Cette approche sans a priori 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'action de ce composé, d'identifier sa cible moléculaire, et d'évaluer son efficacité thérapeutique dans des CBNPC résistants.

Méthodes:

Dans le cadre de nos travaux de recherche, nous disposons d'un large panel de lignées cellulaires cancéreuses humaines incluant des lignées de CPNPC (de statut p53, *KRAS* et *EGFR* varié). 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 respectivement. 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 CPNPC sur la membrane chorio-allantoïdienne d'œuf embryonné de poule.

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 cancéreuses représentatives suggérant un mécanisme d'action non spécifique des CBNPC. 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. PP-13 présente une activité anti-tumorale et anti-métastatique significative *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de xénogreffe de CBNPC sur œuf embryonné de poule, sans induire de toxicité apparente sur l'embryon.

Conclusions

Grâce à un criblage cellulaire à haut débit, nous avons identifié un nouvel agent ciblant les microtubules ayant une bonne efficacité anti-tumorale et des effets toxiques faibles sur l'embryon. Nos résultats font envisager PP-13 comme une bonne alternative pour le traitement des CBNPC résistants, et de manière plus générale, sur les cancers solides.

1 **The pyrrolopyrimidine derivative PP-13 as a novel microtubule-targeting**
2 **agent with anticancer properties in Non–Small Cell Lung Cancers**

3 P Gilson^{1,2}, F Josa Prado³, C Beauvineau⁴, L Vanwonthergem¹, F Mahuteau⁴, A Moreno⁵, P
4 Falson⁵, L Lafanechère¹, V Frachet¹, JL Coll¹, JF Diaz³, A Hurbin^{1*§}, B Busser^{1,2*}

5
6 ¹ Cancer Target and Experimental Therapeutics, Institute for Advanced Biosciences, INSERM
7 U1209, CNRS UMR5309, Grenoble Alpes University, Grenoble, France

8 ² Biochemistry, Toxicology and Pharmacology Department, Grenoble University Hospital,
9 Grenoble, France

10 ³ Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas,
11 Madrid, Spain.

12 ⁴ CNRS UMR9187/U1196, Curie Institute, Paris, France

13 ⁵ Drug Resistance Mechanisms and Membrane Proteins Laboratory, BMSSI UMR 5086 CNRS/
14 Lyon 1 University, Institute of Biology and Chemistry of Proteins, Lyon, France.

15
16 * co-last authors

17 § corresponding author

18
19 **Abstract**

20 The potency of conventional anticancer agents for the treatment of Non-Small Cell Lung
21 Cancer (NSCLC) is considerably limited by the emergence of resistances, including resistance
22 to apoptosis. This highlights the need for identifying new therapeutic strategies in order to
23 improve NSCLC prognosis. To that aim, we designed a high-throughput cell-based screen and
24 probed > 7500 chemical molecules for their ability to restore apoptosis in a resistant NSCLC
25 cell model. We identified the molecule PP-13, a new compound belonging to the
26 pyrrolopyrimidine family, and evaluated its antitumor effects both *in vitro* and *in vivo*. We
27 demonstrated that PP-13 exerted strong cytotoxic effects on various NSCLC cancer cells,
28 including those resistant to current NSCLC therapies. PP-13 induced a transient mitotic
29 blockade by interfering with both mitotic spindle organization and microtubules dynamics and
30 finally led to mitotic slippage, aneuploidy and direct apoptotic death. Mechanistic
31 investigations revealed that PP-13 directly targeted tubulin and bound to the colchicine site.

1 Interestingly, *in vitro* experiments highlighted a reduced potential of cell migration in response
2 to PP-13 treatment. Lastly, we showed *in vivo* that PP-13 significantly reduced NSCLC tumor
3 growth and metastasis invasiveness without any noticeable toxicity. Overall, our data defined
4 PP-13 as a new microtubule-targeting agent with clinical potential for the treatment of resistant
5 NSCLC cancers.

6

7

8 **Introduction**

9 With 1.8 million of new cases and 1.6 million of death estimated in 2012, lung cancers remain
10 one of the third most common cancers worldwide and the leading cause of cancer-related death,
11 making them a major global health problem^{1,2}. Non-Small Cell Lung Cancers (NSCLC)
12 represent the major histopathological type of lung cancers and account for 85% of all cases³.
13 Due to non-specific preliminary symptoms, most patients with NSCLC are diagnosed at
14 advanced stage (locally advanced stage III or metastatic stage IV disease) associated with poor
15 prognosis and reduced clinical benefits⁴. In the last two decades, advances in understanding the
16 lung carcinogenesis underpinnings have revolutionized the management of patients⁵. Genetic
17 alterations (such as epidermal growth factor receptor (*EGFR*) activating mutations or anaplastic
18 lymphoma kinase (*ALK*) gene rearrangement) leading to different subcellular signals of tumor
19 growth and progression are identified in subsets of NSCLC⁶. Based on this paradigm, drugs
20 selectively targeting the oncogenic driver mutations have been developed as anticancer
21 therapies for patients harboring such anomalies^{7,8}. However, despite initial response, resistance
22 mechanisms almost inevitably ensue and limit targeted therapies potency⁹. Moreover, efforts
23 are still needed for the management of patients without targetable oncogenic marker (60% of
24 cases)¹⁰.

25 Thus, non-selective chemotherapy remains a gold-standard treatment for almost all patients
26 with advanced NSCLC. Spindle poisons interfere with microtubule dynamics and represent a
27 major class of conventional chemotherapy commonly used in combination for NSCLC
28 treatments¹⁰. Among approved microtubule-targeting agents, taxanes and vinca-alcaloids that
29 respectively stabilize and depolymerize microtubules are widely used. However, their

1 troublesome side effects (especially myelosuppression and peripheral neurotoxicity) and the
2 emergence of chemoresistance make essential the development of alternative agents¹¹.

3 With the aim to identify chemical compounds able to interact with resistance to apoptosis in
4 EGFR wild-type (EGFR-WT) NSCLC cells, we conducted a high-throughput cell-based screen.
5 We evaluated the ability of more than 7500 chemical molecules to induce apoptosis in resistant
6 EGFR-WT NSCLC cells. We selected a small molecule belonging to the pyrrolopyrimidine
7 family (PP-13) that strongly induced apoptosis. PP-13 appeared to be highly cytotoxic for a
8 large panel of human cancer cell lines. PP-13 molecule induced mitotic cell blockade by
9 impairing both mitotic microtubules organization and dynamics and was identified as a
10 microtubule-targeting agent that selectively binds to the colchicine-binding site. This molecule
11 showed *in vivo* antitumor activity, since it decreased tumor growth and metastasis invasiveness
12 in EGFR-WT NSCLC cell model, without any noticeable toxicity for the chick embryo. These
13 results suggest that PP-13 is a pyrrolopyrimidine derivative that could be a promising
14 alternative to anticancer microtubule-targeting therapies for the clinical management of
15 resistant NSCLC.

16

17 **Material and Methods**

18 Chemicals

19 Molecule PP-13 belongs to Institute Curie/CNRS Chemical Library (compound reference: L-
20 017-H05, Curie Institute, Paris) and was checked for integrity and purity (> 95%) by liquid
21 chromatography–mass spectrometry. The compound was dissolved in anhydrous dimethyl
22 sulphoxide (DMSO) and stored as a 10 mmol/L stock solution.

23 Chemicals reagents used in the present study include DMSO (Carl Roth, Karlsruhe, Germany);
24 Paclitaxel (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France); colchicine (Sigma); Formaldehyde
25 (Sigma); Hoechst 33 342 (Sigma).

26 The anti- α -tubulin and anti-actin antibodies were purchased from Santa Cruz (Clinisciences,
27 Montrouge, France). Anti- γ -tubulin antibody was from Sigma. The anti-phospho-histone H3
28 and anti-cleaved caspase 3 (Asp 175) antibodies were purchased from Cell signaling (OZYME,
29 Saint Quentin Yvelines, France). Anti-centrin-2 antibodies were from Merck Millipore

1 (Molsheim, France). Goat anti-mouse Alexa Fluor-488 and anti-rabbit Alexa Fluor-568
2 secondary antibodies were obtained from Life Technologies (Saint-Aubin, France).

3 Cell lines

4 NSCLC (H358, H322, A549, H1975, H1650, H3255, PC9 and H460), other human cancer cell
5 lines from different organs (HCT116, HT29, MCF7, PC3, HeLa, colo829, A375, A7, Skmel-2)
6 and human fetal lung fibroblast MRC5 cells were obtained from the American Type Culture
7 Collection, Manassas, VA, USA), routinely tested and authenticated by the ATCC, and cultured
8 as recommended. HeLa cells expressing mEGFP- α -tubulin and mCherry-H2B were a generous
9 gift from Dr D. Gerlich¹². HeLa cells expressing GFP-BubR1 were kindly provided by Pr A.
10 Musacchio¹³. H358 cells stably expressing RFP-Histone H2B were generated and selectionned
11 in the laboratory. All cells were mycoplasma free, cultured at 37°C in the appropriate medium
12 in a 5% CO₂ humidified atmosphere and used within 6 months after resuscitation.

13

14 Cell proliferation assay

15 Cell viability was analyzed using MTT assay as described previously¹⁴.

16

17 Cell-cycle analysis

18 Cells were harvested, pooled, fixed in 70% ethanol at 4°C, incubated with anti-phospho-histone
19 3 Alexa Fluor 488-labeled antibodies (for quantitation of mitotic cells) diluted in 1% Fetal
20 Bovine Serum (FBS)/0.25% triton X100/PBS for 1h at room temperature, before being stained
21 with 20 μ g/mL propidium iodide (for DNA staining) in RNase A/phosphate buffer saline (PBS),
22 as described previously¹⁵. The percentage of cells in the specific cell cycle phases (G₀/G₁, S, G₂,
23 and M) was determined using an Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson, Le Pont-de-
24 Claix, France).

25

26 Apoptosis assays

27 Apoptotic cells with hypodiploid DNA staining were counted in “sub-G₁” peak using flow
28 cytometry. Cleavage of caspase-3 was also detected by immunoblotting as previously¹⁶, using
29 antibodies against cleaved caspase-3 (Asp¹⁷⁵) and actin..

30

1 Immunofluorescence analyses

2 For microtubules organization analysis, cells were grown on glass coverslips coated with
3 1 µg/mL fibronectin, incubated for 24h with PP-13 at IC50 or vehicle, fixed and permeabilized
4 with either 4% paraformaldehyde followed by 0.1% Triton X100 incubation or with methanol
5 at -20°C. After washing and saturation with 5% BSA/PBS, cells were incubated for 1h with
6 primary antibodies (anti- α -tubulin, anti- γ -tubulin, anti-centrin-2 antibodies), washed twice, and
7 incubated with Alexa Fluor 488 and/or Alexa Fluor 568 secondary antibodies for 45 min at RT.
8 DNA was stained with 20 µmol/L Hoechst 33342, and coverslips were mounted with
9 fluorescence mounting medium (DAKO, Trappes, France,). Fluorescent images were captured
10 using a multiphoton confocal laser-scanning microscope (LSM 510, Carl Zeiss, Jena, Germany)
11 equipped with a Plan Aplanachromat 100×/1.4 NA oil objective and acquisition software LSM
12 510. All images are z-stacked.

13

14 Time lapse videomicroscopy

15 HeLa cells expressing alpha-tubulin-EGFP H2B-mCherry and HeLa cells expressing GFP-
16 BubR1 were seeded in 2-well labtek slides (Nunc, D. Dutscher, Brumath, France) coated with
17 1 µg/mL fibronectin and allowed to grow for 24 hours prior to imaging. After addition of PP-
18 13 or vehicle, the microslide was placed on a 37°C heated stage (at 5 % CO₂) and images were
19 acquired every 3 min by a spinning disk confocal laser microscope (Andromeda iMIC, FEI,
20 Munich, Germany), equipped with a Plan-Apochromat 40x/1,4 Oil objective and an EMCCD
21 camera (iXon3897, Andor, Belfast, UK). For each time point, a stack of 15 planes (thickness:
22 2µm) was recorded. Acquisition (LA) and off-line analysis (OA) softwares were used.

23 Kinase assay (supplementary material and methods)

24 The kinase assay was performed by the KINOMEscan screening platform (LeadHunter™
25 Discovery Services, DiscoverX Corp., Fremont, United States). This active site-directed
26 competition binding assay allowed to measure the interactions between PP-13 and more than
27 450 kinases as previously described¹⁷.

28 Tubulin polymerization assay

29 Tubulin was isolated from bovine brain as described¹⁸. Half-area 96-well plate (Greiner Bio-
30 one, Courtaboeuf, France) was charged with pure tubulin in PIPES and MgCl₂-based
31 polymerization buffer (Polymerization buffer 5X, Ecrins therapeutics, La Tronche, France).

1 After addition of 1 mmol/L GTP, tubulin assembly was followed at 37°C in the presence of
2 colchicine, paclitaxel or increasing concentrations of PP-13, by turbidimetry variation at 350
3 nm (FLUOstar Omega, BMG Labtechnologies). Negative control contained an equivalent
4 quantity of DMSO as the sample with higher concentration of PP-13. Previous to the test,
5 compounds solubility in the polymerization buffer was checked.

6 MTC-displacement assay

7 The tubulin target site of PP-13 and its associated binding affinity constant (K_b) were
8 determined by competitive assay, using a fluorescent colchicine analogue MTC (2-methoxy-5-
9 (2,3,4-trimethoxyphenyl)-2,4,6-cycloheptatrien-1-one), that reversibly binds to the colchicine-
10 binding site^{19,20}. Tubulin purification from calf brain was performed as previously
11 described^{21,22}. Equal amounts of pure tubuline and MTC (10 μmol/L) were mixed in a
12 phosphate-based buffer (10mM NaPi, 0.1mM GTP). After addition of increasing concentrations
13 of PP-13, displacement of MTC binding to tubulin was measured by fluorescence changes using
14 Varioskan (excitation wavelength: 350nm, emission spectra: 372 – 525nm). Tubulin and MTC
15 alone served as negative controls for fluorescence normalization. Assuming 0.8 MTC sites per
16 tubulin heterodimer and 4.7x10⁵ M⁻¹ as the MTC binding constant²³, PP-13 binding affinity
17 constant was evaluated using the Equigra v5 program²⁴.

18 Wound-healing assay

19 Cells were seeded in culture inserts (ibidi, Clinisciences, Montrouge, France) and allowed to
20 grow for 48 hours until confluence. Inserts were then removed and PP-13 or vehicle was added
21 in the medium. Recovery of the wound was recorded by videomicroscopy using Plan-Neofluar
22 10x/0,3 objective and MetaMorph acquisition software. Images were acquired every 5 min for
23 12h.

24 In vivo experiment

25 Chick embryo tumor growth and metastasis assay was performed as previously described with
26 slight differences²⁵. Briefly, fertilized White Leghorn eggs (SFPA, Hendrix Genetics group,
27 Saint Brieu) were incubated at 38°C with 60% relative humidity for 9 days. The
28 chorioallantoic membrane (CAM) was then dropped and a 1 cm² window was cut in the
29 eggshell above the CAM (at day 9). H358 cell lines were harvested by trypsinization, washed
30 with complete medium, suspended in serum free DMEM and inoculated onto the CAM of each
31 egg. At day 10, when tumors began to be detectable, eggs were treated during 10 days every

1 two days with paclitaxel, PP-13 or vehicle onto the tumor. At day 19, the upper portion of the
2 CAM was removed, transferred in PBS and the tumors were carefully cut away from normal
3 CAM tissue and weighed. In parallel, a 1 cm² portion of the lower CAM was collected to
4 evaluate the number of H358 cells. To count these cells, genomic DNA was extracted, and
5 qPCR analysis was performed by using primers specific for genomic human Alu/repetitive
6 sequences²⁶. Finally, the toxicity of the treatment was evaluated by scoring the number of dead
7 embryos and looking for morphological or functional abnormalities on surviving embryos (see
8 supplementary figure S7).

9

10 Statistical analysis

11 Statistical analyses were performed by using the non-parametric Mann-Whitney test (GraphPad
12 Prism 5 software). Statistical significance was defined as p values ≤ 0.05 .

13

14 Results

15 • *Identification of a new molecule inhibiting proliferation of human lung cancer cells*

16 To identify new potent chemical molecules able to induce apoptosis in resistant NSCLC cell
17 model, we designed a high-throughput cell-based assay on EGFR-WT NSCLC H358 cells that
18 were previously described as a model of resistance to apoptosis induced by serum starvation²⁷.
19 7520 compounds were screened at a final concentration of 2.5 $\mu\text{mol/L}$. All compounds restoring
20 more than 49% of apoptosis were selected as potential hits (data not shown). Among the 71
21 chemical molecules identified, one pyrrolopyrimidine derivative, PP-13, was finally selected
22 for further biological and biochemical characterization (figure 1A).

23 We first evaluated the ability of PP-13 to inhibit growth of human NSCLC cell lines (H358,
24 H322, A549, H1975, H3255, H1650, PC9 and NCI-H460) harboring various *TP53*, *KRAS* and
25 *EGFR* status (see supplementary Table S1) using MTT assays. NSCLC cells were treated with
26 increasing concentrations of PP-13, which drastically inhibited the viability of all NSCLC cell
27 lines regardless of their *EGFR* or *KRAS* mutational status, with concentration values inhibiting
28 cell growth by 50% (IC_{50}) in the nanomolar range (figure 1B). Interestingly, PP-13 was effective
29 both on NSCLC cell lines resistant to anti-EGFR-targeted therapies (H1650, H1975) and on
30 their sensitive counterparts (PC9, H3255). To determine if PP-13 had a specific activity toward
31 NSCLC cells, we tested PP-13 activity on other representative human cancer cell lines

1 (colorectal cancer cell lines HCT116 and HT29; breast cancer cell line MCF7; prostate cancer
2 cell line PC3; cervical cancer cell line HeLa; melanoma cell lines colo829, A375, A7 and
3 SkMel-2) (figure 1C). Similarly to NSCLC cells, the IC₅₀ concentrations for PP-13 were in the
4 nanomolar range, except for A375, A7 and SkMel-2 melanoma cell lines (micromolar range).
5 PP-13 also reduced the viability of normal human fetal lung fibroblastic cell line MRC5, though
6 its effects were almost 7 times less than those of antimetabolic chemotherapy paclitaxel currently
7 used for NSCLC treatment (supplementary figure S2). Taken together, these data suggest that
8 PP-13 exerted a strong cytotoxic activity in a wide panel of cancer cell lines. The rest of the
9 study was performed using 2 cell lines from different organs both presenting susceptibility to
10 PP-13 (H358 initial cell model and HeLa carcinoma cell line).

11

12

- 13 • *PP-13* induces mitotic blockade in cancer cells

14 We assessed the effects of PP-13 on cell cycle distribution by flow cytometry in H358 and HeLa
15 cells (figure 2 and supplementary figure S3). Both H358 and HeLa cells treated with PP-13 at
16 IC₅₀ transiently accumulated in mitosis (figure 2A, 2B). Thirty two percents of cells were found
17 in mitosis after 18h of PP-13 exposure, as compared to about 2 % of vehicle-treated cells (figure
18 2A, 2B, supplementary figure S3). Subsequently, the percentage of mitotic cells gradually
19 decreased, concomitantly with the accumulation of apoptotic cells (sub-G₁ fraction) (figure 2A,
20 2B). After 72h of PP-13 treatment, about 20% of cells underwent apoptosis compared to only
21 1% of the vehicle- treated cells. Consistently with the progressive increase of apoptotic cells,
22 PP-13 strongly induced the cleavage of caspase-3 in both H358 and HeLa cells (figure 2C).
23 These results showed that PP-13 induced mitotic cell arrest, suggesting that this molecule is a
24 strong cytostatic agent that ultimately led to caspase-dependent apoptosis.

25

26

- 27 • *PP-13 interferes with both mitotic microtubule organization and spindle pole integrity*

28 Since any perturbation of microtubule dynamics balance can lead to microtubules
29 disorganization and mitotic cell cycle arrest²⁸, we investigated the effects of PP-13 on
30 microtubule array in HeLa cells after 24h of treatment. Once exposed to PP-13, HeLa cells
31 visually presented normal microtubule pattern in interphase similar to that of control cells
32 (figure 3A). During metaphase, untreated cells typically showed 2 symmetrical and fusiform
33 bipolar spindles with well-aligned chromosomes at the mid-plate (figure 3B). In contrast, PP-

1 13-driven mitotically-arrested cells showed short and multipolar spindles associated with strong
2 defects in chromosome congression and alignment suggesting a prometaphase blockade (figure
3 3B). As observed by flow cytometry analysis, the percentage of cells in interphase decreased in
4 response to PP-13 treatment, whereas the percentage of abnormal mitotic cells (with a mean of
5 2-4 spindle poles)²⁹ and polynucleated cells in G1-like pseudo-interphase strongly increased
6 (figure 3C and 3D). Similar observations were made in PP-13-treated H358 cells, however cells
7 mostly showed more than 5 spindle poles and no significant augmentation of polynucleated
8 cells was reported (supplementary figure S4). Since aberrant multipolar spindles are frequently
9 associated with supernumerary centrosomes³⁰, we quantified these microtubule-organizing
10 centers (MTOC) in mitotic cells using γ -tubulin staining (figure 3E and 3F). Upon PP-13
11 treatment, HeLa cells displayed variable number of γ -tubulin dots (with an average of 2-3 γ -
12 tubulin dots per cell) while control cells normally harbored 2 γ -tubulin dots (figure 3E and 3F).
13 To investigate the genesis of the additional spindle poles³¹, we examined the centrosome
14 composition with a specific marker for centrioles (centrin-2). In control cells, each centrosome
15 displayed a pair of cohesive centrioles (figure 3F). Conversely, treated cells with more than 2
16 spindle poles presented variable numbers of centrin-2 dots (0, 1 or 2 dots per MTOC) likely
17 due to centriole pairs disengagement. Interestingly, in H358 cells, the number of γ -tubulin dots
18 is comparable to that of control cells (supplementary figure S4E). Overall, these observations
19 showed that PP-13 induced mitotic spindle multipolarity and microtubules disorganization,
20 resulting in prometaphase arrest.

21

22

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

25 Spindle assembly checkpoint (SAC) is a safety mechanism assuring faithful chromosome
26 segregation during cell division. SAC is typically activated during prometaphase and delays
27 anaphase onset until all chromosomes are well aligned and correctly attached to the mitotic
28 spindle by kinetochores. Since SAC complex is frequently involved in prometaphase arrest³²,
29 we evaluated the impact of PP-13 on SAC activation by following the activation of BubR1, a
30 major component of SAC, with time lapse videomicroscopy using HeLa cells stably expressing
31 BubR1-EGFP. BubR1 was activated on average 4 times longer in treated cells compared to
32 control cells, suggesting that SAC activation contributed to PP-13-induced mitotic arrest (figure
33 4A and 4B). The fate of transiently-arrested cells was investigated using HeLa cells stably

1 expressing α -tubulin-EGFP and histone H2B-RFP by time-lapse videomicroscopy. In control
2 cells, mitotic population represented only a small fraction of total cells (2% in average) and
3 exhibited typical mitotic features (figure 4C). Upon PP-13 exposure, the fate of arrested cells
4 was greatly variable. In HeLa cells, some mitotic cells directly underwent apoptosis as
5 evidenced by the emergence of membrane blebbing, chromatin condensation or apoptotic
6 bodies (figure 4C). Following prometaphase blockade, others initiated aberrant cytokinesis with
7 asymmetric cytoplasmic and chromosomal division along more than 2 midbodies. This resulted
8 in cell aneuploidy (figure 4C) with generation of non viable cells or re-clustering leading to the
9 generation of polynucleated pseudo-interphase cells, that in turn underwent cell death (as
10 indicated with the presence of micronuclei, nucleus hyperfragmentation or blebbing) or moved
11 forward into mitosis. Similar defects were obtained with H358 H2B-RFP cells (supplementary
12 figure S5) with mainly induction of mitotic slippage (exit out of mitosis without cytokinesis)
13 and direct apoptotic death. Altogether, these data showed that PP-13 induced SAC-dependent
14 prometaphase blockade leading to aneuploidy, mitotic slippage and cell death.

15

16

- 17 • *PP-13 directly targets tubulin and competes with colchicine for the binding*

18 As PP-13 induced a SAC-dependent prometaphase blockade, by impairing the mitotic
19 apparatus, 2 main types of molecular targets had to be considered: kinases (especially mitotic
20 kinases) and tubulin. We first performed a kinome assay to test PP-13 ability to inhibit a panel
21 of more than 450 human protein kinases including mitotic kinases and relevant cancer mutant
22 kinases. No kinase was inhibited at 1 or 10 $\mu\text{mol/L}$, suggesting that PP-13 does not act as a
23 kinase inhibitor (see supplementary figure S6). To test whether tubulin is a target of PP-13, we
24 performed an *in vitro* tubulin polymerization assay using pure tubulin. PP-13 did not delay
25 microtubule assembly, but significantly reduced microtubules polymerization speed and
26 maximal polymerized tubulin rate in a dose-dependent manner (figure 5A). After 60 minutes,
27 5 $\mu\text{mol/L}$ PP-13 decreased as much the tubulin polymer mass as did 2.5 $\mu\text{mol/L}$ colchicine.
28 These observations indicated that PP-13 directly targets tubulin and exerts potent
29 depolymerizing effects.

30 Because colchicine binding site is a major pocket for most of the microtubule destabilizers³³,
31 we investigated whether PP-13 was able to bind to the colchicine binding site by competitive
32 experiments with a reversible fluorescent colchicine analogue (MTC) whose binding gives rise
33 to a fluorescence signal^{34,35}. In presence of increasing concentrations of PP-13, the amplitude

1 of the fluorescence spectra decreased in a dose-dependent manner (Figure 5B). Fifty $\mu\text{mol/L}$ of
2 PP-13 reduced fluorescence intensity by 56%. Knowing MTC binding constant ($4.7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$),
3 the binding constant of PP-13 was calculated to be $9.3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (figure 5C). Such displacement
4 of MTC by PP-13 demonstrated its ability to bind to the colchicine binding site.
5

- 6 • *PP-13 decreases cell motility in vitro and reduces tumor growth and metastasis*
7 *invasion in vivo*

8 As microtubules are notably involved in cell motility, we evaluated the ability of PP-13 to
9 reduce cell migration. In order not to take cell proliferation into account in this assay, we
10 followed the wound closure during the first 12h. Because H358 cells do not represent an
11 appropriate model for wound healing assay, we performed the experimentation with HeLa cells.
12 We found that 120 nmol/L and 1 $\mu\text{mol/L}$ PP-13 significantly reduced HeLa migration potential
13 compared to control cells (10 and 15% decrease respectively) (figure 6A).

14 To evaluate both the *in vivo* antitumor activity and toxicity of PP-13, we used NSCLC H358
15 cells xenografted on chicken chorioallantoic membranes (CAM). PP-13 significantly inhibited
16 H358 tumor growth as compared to negative control (figure 6B). Moreover, the toxicity was
17 also evaluated by measuring both chicken embryos mortality and possible morphological or
18 functional defects (see supplementary figure S7). Interestingly, no toxicity on the chicken
19 embryos was noted, indicating that, PP-13 was well tolerated at a dose sufficient to induce an
20 anti-tumor effect, in this model.

21 Analysis by RT-qPCR of the presence of NSCLC cells at the lower CAM allowed for the
22 accurate detection of the metastatic dissemination of tumor cells. PP-13 strongly reduced H358
23 metastasis ability (figure 6C). Importantly, 0.17 $\mu\text{mol/L}$ PP-13 showed similar anti-tumor and
24 anti-metastatic effects than 50 $\mu\text{mol/L}$ paclitaxel.
25
26
27
28
29

1 **Discussion**

2 In this study, we described a small cell-permeable molecule PP-13 that inhibits cell growth of
3 a wide range of cancer cell types, including NSCLC and cervical cancer. Interestingly, PP-13
4 overcomes tumor resistance mechanisms to apoptosis and those limiting activity of targeted
5 therapies, suggesting that PP-13 could be a potent anticancer agent with clinical interest. In
6 order to characterize PP-13 anticancer effects, we used 2 cancer cell lines from different organs:
7 H358 NSCLC cells as the initial cell model of resistance to apoptosis and HeLa cervical cancer
8 cells that are optimal to visualize properly the microtubule pattern by immunofluorescence.

9 We showed that PP-13 anticancer effects were correlated with the induction of spindle
10 multipolarity, chromosomes missegregation and subsequent transient mitotic arrest in
11 prometaphase. Treated cells displayed supernumerary spindle poles likely due to a loss of
12 spindle pole integrity and premature centriole pairs disengagement given the atypical
13 composition of MTOC (0-2 centrioles per pole). This aberrant phenotype following mitotic
14 blockade was already described under nocodazole, colcemid or nitrous oxide treatment³¹.
15 Besides, it was reported that the longer the cells were arrested in mitosis, the more probable
16 cells exposed spindle multipolarity³⁶. Consequences of PP-13 treatment on the number of
17 mitotic spindles and spindle poles were highly variable depending on the cell type. Treated
18 HeLa cells exhibited an average number of 2-4 mitotic spindles and 2-3 MTOC while H358
19 cells exposed more than 5 mitotic spindles and a number of γ -tubulin dots comparable as in
20 control cells. The highly aberrant number of mitotic spindles in H358 cells might be correlated
21 with p53 deletion as p53 is a well-known sensor of mitotic failure³⁷. In HeLa cells (wild-type
22 p53 status), PP-13 induced an accumulation of polynucleated cells in G1-like stage
23 concomitantly with the increase of aberrant mitotically-arrested cells. This phenotype of
24 polynucleated cells that was not observed in H358 cells could be correlated with p53 action in
25 response to mitotic failure³⁷.

26 In treated HeLa and H358 cells, spindle multipolarity led to defects in chromosomes alignment
27 and spindle-kinetochore attachment. The lack of tension between the two sister kinetochores
28 did not satisfy the spindle assembly checkpoint (SAC)³⁸ that promoted prolonged mitotic arrest
29 as observed in live cell imaging of HeLa cells stably expressing GFP-BubR1 (a major
30 component of the SAC). By time-lapse videomicroscopy using mEGFP- α -tubulin mCherry-
31 H2B HeLa cells and RFP-Histone H2B H358 cells, we showed that cells finally exited from
32 prolonged mitosis according to various cell fates in a cell-type dependent manner³⁹. Some HeLa

1 cells directly died in mitosis (mitotic catastrophe⁴⁰ as evidenced by blebs, chromatin
2 condensation and apoptotic bodies release) while others escaped from the mitotic block through
3 asymmetric division generating non-viable aneuploid cells. In H358 cells, cellular outcomes
4 following mitotic arrest were fairly different. A large fraction of cells exited mitosis without
5 cell division and further died in interphase or during a second mitosis.

6 *In vitro* tubulin polymerization experiments in a MAP (Microtubules-Associated Proteins)-free
7 system revealed that PP-13 is a tubulin-binding agent. As PP-13 did not modify the delay phase
8 of tubulin assembly but significantly decreased the microtubule polymer mass in a dose-
9 dependent manner, we believed that PP-13 probably inhibited microtubules elongation from
10 tubulin nuclei. PP-13 competed with colchicine for the binding on the same tubulin site and
11 exhibits an apparent binding affinity constant ($K_b = 9.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) differing from about a factor
12 of 20 comparatively to podophyllotoxin ($1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$)⁴¹ and colchicine. The toxicity induced by
13 colchicine and podophyllotoxin treatments hampers their use as anti-cancer drugs and K_b has
14 been shown to be correlated with compound cytotoxicity²⁴ suggesting that PP-13 could be better
15 tolerated. Moreover, K_b of PP-13 was fairly similar to that of other well-known colchicine-
16 binding site ligands MTC ($4.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)²³ and nocodazole ($4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)⁴² probably indicating
17 that PP-13 displayed a great affinity towards tubulin and might be an interesting agent to target
18 mitosis. Currently, there is no drug with approved clinical use that targets the colchicine-
19 binding site of tubulin. Some colchicine-site binding agents are in preclinical development^{33,43–}
20 ⁴⁶ but exhibit completely different chemical structure from PP-13 suggesting that PP-13 is an
21 interesting drug candidate for further studies. As previously shown, spindle poisons (both
22 microtubules-stabilizing and destabilizing agents) alter the tubulin polymer mass at high
23 concentrations, however *in vivo* doses that are classically 10-100 less concentrated are sufficient
24 to block cells in mitosis due to the interference with microtubule dynamic instability^{45,47,48}. In
25 this context, PP-13 likely attenuated microtubules dynamic instability resulting in
26 disorganization of mitotic spindles and subsequently cell cycle arrest. Considering that
27 microtubule dynamics in interphase cells is 10- to 100-fold lower than in mitosis⁴⁹, it seems
28 conceivable that loss of dynamicity did not induced any perceptible difference in microtubules
29 organization at this stage between treated- and control cells. Thus, PP-13 would have more
30 selective effects on highly proliferating cells than taxanes and vinca-alcaloids that are notably
31 responsible for neurotoxic events. Interference of PP-13 with tubulin
32 polymerization/depolymerization balance has serious consequences on cells in mitosis, given
33 the essential role of microtubules in ensuring faithful chromosomes segregation in 2 sister cells

1 by forming dynamic mitotic bipolar spindles such as tracks along which chromosomes congress
2 through treadmilling.

3 *In ovo* experiments are definitely accepted as a potential alternative to mammalian models for
4 the *in vivo* assessment of drug toxicity and pharmacokinetics⁵⁰. This model gains its spurs
5 especially in the cancerology field as tumor implantation is facilitated by CAM physiological
6 immunodeficiency^{25,51-54}. Taxanes are widely used in advanced NSCLC and were previously
7 shown as probably toxic in the chicken embryos⁵⁵, arguing the need for alternative better-
8 tolerated anticancer agents. We showed that only 0.17 $\mu\text{mol/L}$ PP-13 were as efficient to inhibit
9 tumor growth and invasion as 50 $\mu\text{mol/L}$ paclitaxel. PP-13 displays a remarkable tumor cell
10 selectivity in *in ovo* model, with no detectable toxicity for the growing embryo. Besides, *in ovo*
11 system also allows the evaluation of tumor metastatic invasion due to the intense
12 vascularization of the egg. Most spindle poisons exert antimetastatic effects given the role of
13 microtubules in cell motility. Accordingly, PP-13 does not escape the rule as it significantly
14 reduced cell mobility *in vitro* and metastasis invasion *in vivo*.

15 In summary, PP-13 could represent a promising alternative to conventional spindle poisons
16 used in clinic (taxans, vinca-alcaloids) because of its more selective activity and reduced
17 toxicity. We could also consider drug delivery system (coupling to vector or specific antibody)
18 as a way to improve further selectivity as it was previously experimented for taxans⁵⁶.

19

20 **Conflict of interest**

21 The authors declare no conflict of interest.

22

23 **Acknowledgements**

24 This work was supported by the Curie Institute, the INSERM, and by grants from the Fondation
25 de France and La Ligue contre le Cancer (comité de l'Isère).

26

27

28

References

1. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* 66, 7–30 (2016).
2. Torre, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* 65, 87–108 (2015).
3. Ettinger, D. S. *et al.* Non-small cell lung cancer. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* 10, 1236–1271 (2012).
4. Miller, K. D. *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* (2016). doi:10.3322/caac.21349
5. Riessk, J. Shifting paradigms in non-small cell lung cancer: an evolving therapeutic landscape. *Am. J. Manag. Care* 19, s390-397 (2013).
6. Biomarkers (BM) France: Results of routine EGFR, HER2, KRAS, BRAF, PI3KCA mutations detection and EML4-ALK gene fusion assessment on the first 10,000 non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (pts). | 2013 ASCO Annual Meeting | Virtual Meeting | Meeting Library. Available at: <http://meetinglibrary.asco.org/content/81146>. (Accessed: 7th July 2016)
7. 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).
8. Travis, W. D., Brambilla, E. & Riely, G. J. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 992–1001 (2013).
9. Maione, P. *et al.* Overcoming resistance to targeted therapies in NSCLC: current approaches and clinical application. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 7, 263–273 (2015).
10. Olausson, 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).
11. Ferrara, R. *et al.* Tubulin inhibitors in non-small cell lung cancer: looking back and forward. *Expert Opin. Pharmacother.* 17, 1113–1129 (2016).
12. Steigemann, P. *et al.* Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell* 136, 473–484 (2009).
13. Overlack, K. *et al.* A molecular basis for the differential roles of Bub1 and BubR1 in the spindle assembly checkpoint. *eLife* 4, e05269 (2015).
14. 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).
15. 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).
16. 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).

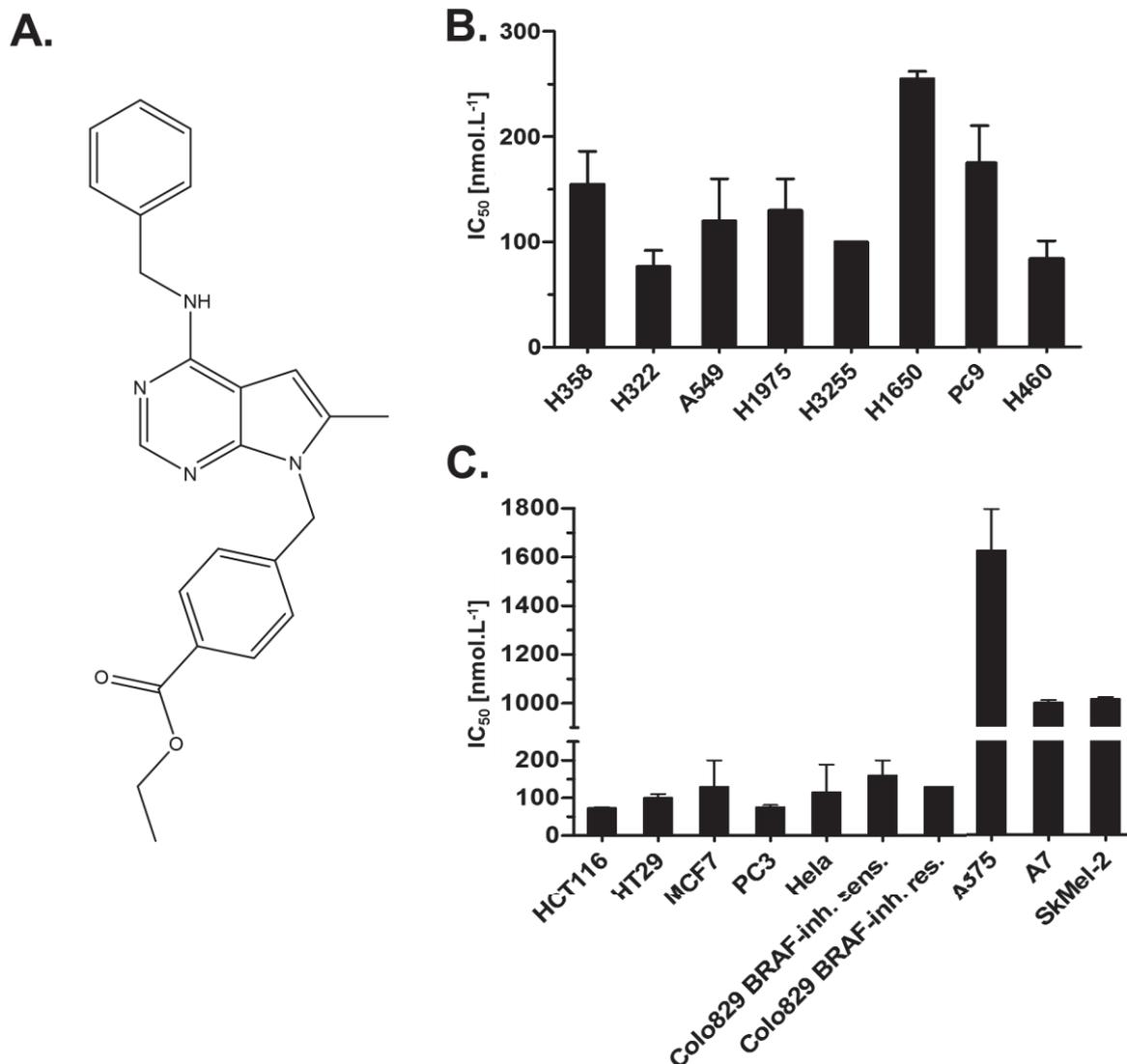
17. Fabian, M. A. *et al.* A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat. Biotechnol.* 23, 329–336 (2005).
18. Castoldi, M. & Popov, A. V. Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expr. Purif.* 32, 83–88 (2003).
19. Alejandre-García, I. *et al.* Cytotoxic Activity and Chemical Composition of the Root Extract from the Mexican Species *Linum scabrellum*: Mechanism of Action of the Active Compound 6-Methoxypodophyllotoxin. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2015, 298463 (2015).
20. 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).
21. Andreu, J. M. Large scale purification of brain tubulin with the modified Weisenberg procedure. *Methods Mol. Med.* 137, 17–28 (2007).
22. 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).
23. 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).
24. Díaz, J. F. & Buey, R. M. Characterizing ligand-microtubule binding by competition methods. *Methods Mol. Med.* 137, 245–260 (2007).
25. 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).
26. 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).
27. 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).
28. Singh, P., Rathinasamy, K., Mohan, R. & Panda, D. Microtubule assembly dynamics: an attractive target for anticancer drugs. *IUBMB Life* 60, 368–375 (2008).
29. 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).
30. 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).

31. Maiato, H. & Logarinho, E. Mitotic spindle multipolarity without centrosome amplification. *Nat. Cell Biol.* 16, 386–394 (2014).
32. Alfieri, C. *et al.* Molecular basis of APC/C regulation by the spindle assembly checkpoint. *Nature* 536, 431–436 (2016).
33. 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).
34. 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).
35. 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).
36. Brinkley, B. R. & Rao, P. N. Nitrous oxide: effects on the mitotic apparatus and chromosome movement in HeLa cells. *J. Cell Biol.* 58, 96–106 (1973).
37. Meek, D. W. The role of p53 in the response to mitotic spindle damage. *Pathol. Biol. (Paris)* 48, 246–254 (2000).
38. 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).
39. 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).
40. Castedo, M. *et al.* Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23, 2825–2837 (2004).
41. Cortese, F., Bhattacharyya, B. & Wolff, J. Podophyllotoxin as a probe for the colchicine binding site of tubulin. *J. Biol. Chem.* 252, 1134–1140 (1977).
42. Xu, K., Schwarz, P. M. & Ludueña, R. F. Interaction of nocodazole with tubulin isotypes. *Drug Dev. Res.* 55, 91–96 (2002).
43. 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).
44. 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).
45. Dumontet, C. & Jordan, M. A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 790–803 (2010).
46. Massarotti, A., Coluccia, A., Silvestri, R., Sorba, G. & Brancale, A. The Tubulin Colchicine Domain: a Molecular Modeling Perspective. *ChemMedChem* 7, 33–42 (2012).
47. Kavallaris, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat. Rev. Cancer* 10, 194–204 (2010).

48. Jordan, M. A. & Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* 4, 253–265 (2004).
49. 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).
50. 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).
51. Ribatti, D. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. *Exp. Cell Res.* 328, 314–324 (2014).
52. Sys, G. M. L. *et al.* The in ovo CAM-assay as a xenograft model for sarcoma. *J. Vis. Exp. JoVE* e50522 (2013). doi:10.3791/50522
53. Klingenberg, M., Becker, J., Eberth, S., Kube, D. & Wilting, J. The chick chorioallantoic membrane as an in vivo xenograft model for Burkitt lymphoma. *BMC Cancer* 14, 339 (2014).
54. Li, M. *et al.* The In Ovo Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay as an Efficient Xenograft Model of Hepatocellular Carcinoma. *J. Vis. Exp. JoVE* (2015). doi:10.3791/52411
55. Scialli, A. R., DeSesso, J. M. & Goeringer, G. C. Taxol and embryonic development in the chick. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 14, 23–30 (1994).
56. Zhao, P. & Astruc, D. Docetaxel nanotechnology in anticancer therapy. *ChemMedChem* 7, 952–972 (2012).

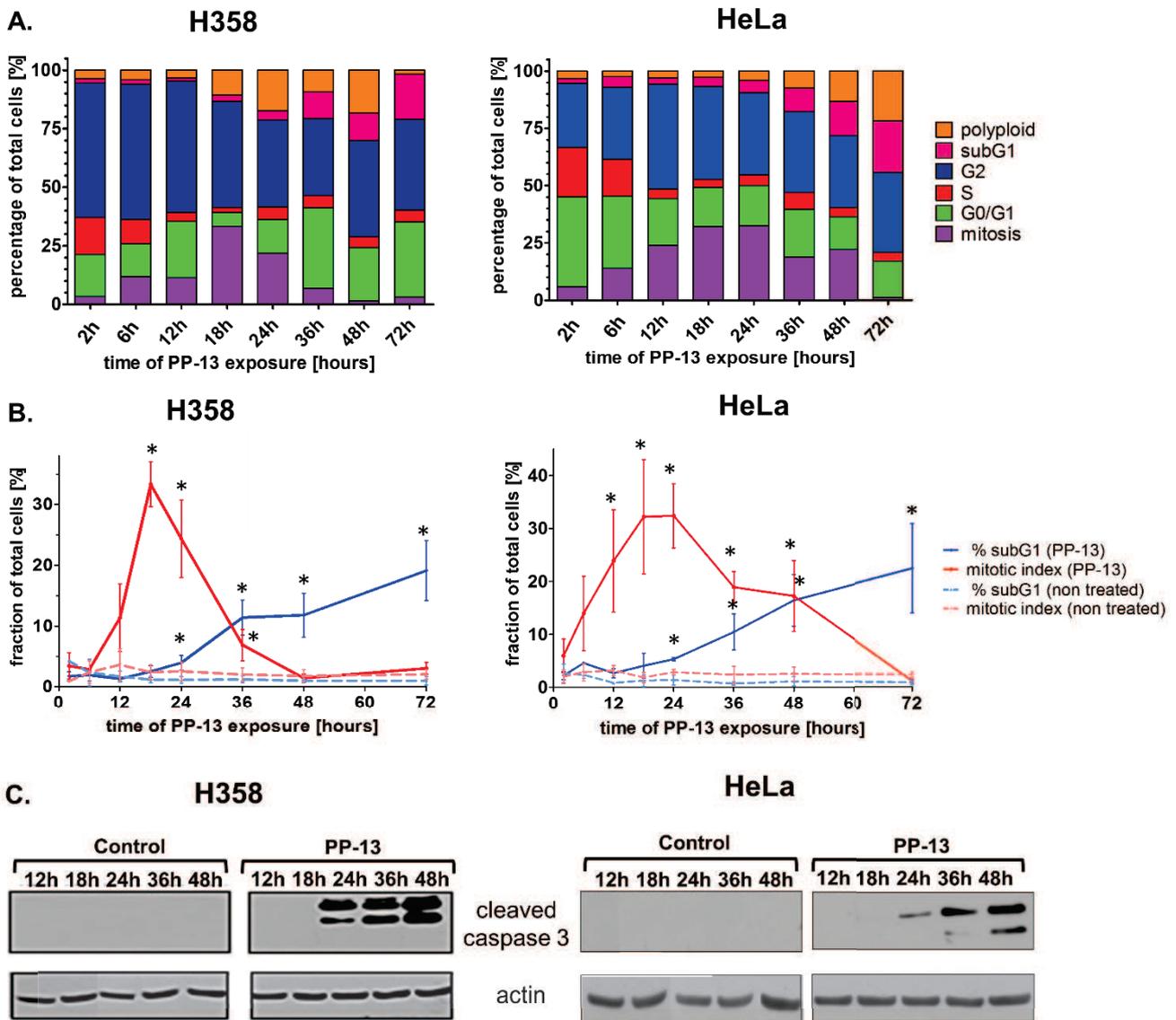
Figures

Figure 1



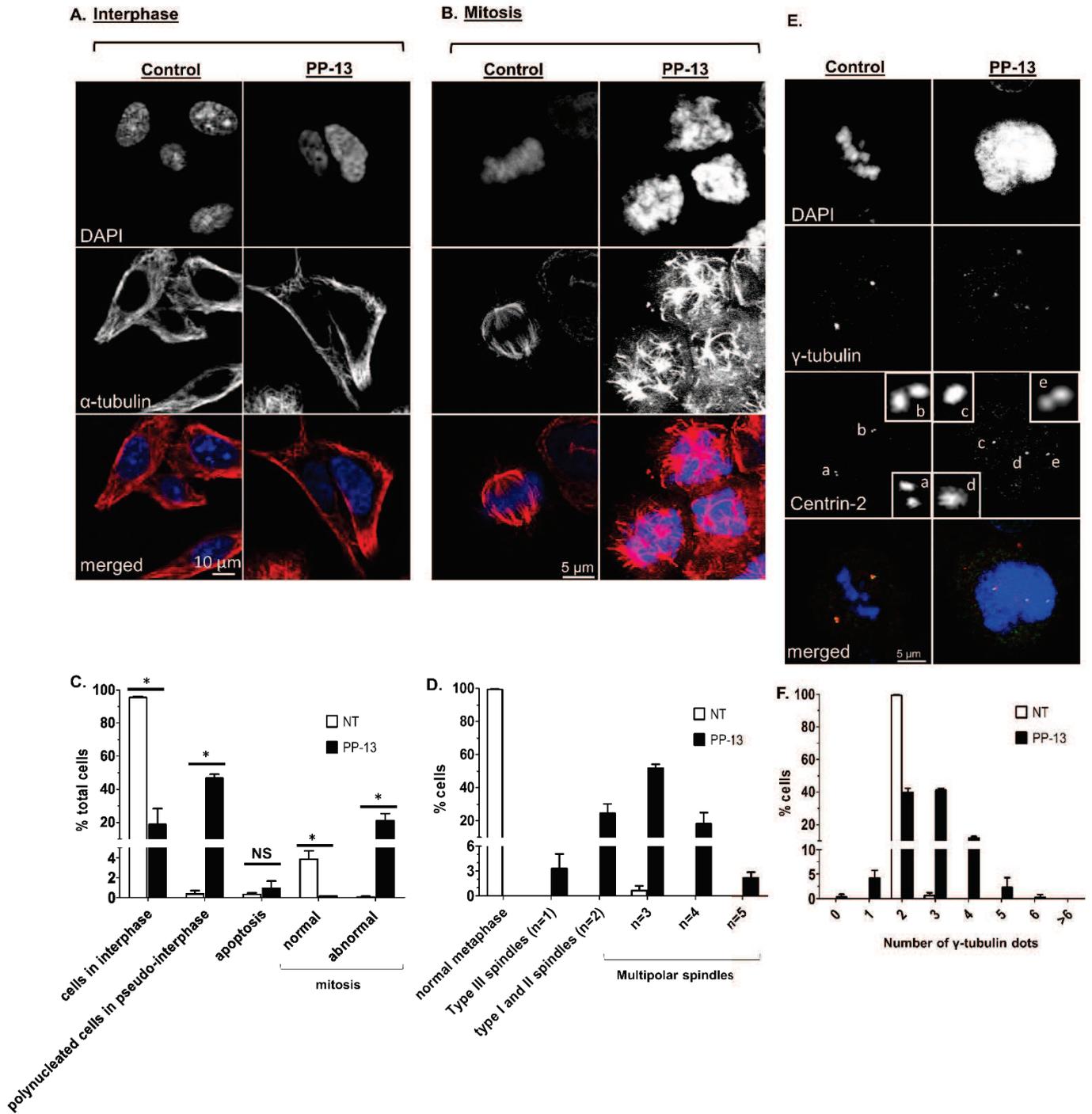
PP-13 significantly inhibited cell proliferation of several human cancer cell lines. A. Chemical structure of PP-13: ethyl 4-((4-(benzylamino)-6-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-7-yl)methyl)benzoate. **B-C.** PP-13 concentrations required to inhibit cell growth by 50% (IC₅₀) at 72h were determined by MTT assays in NSCLC cells (**B.**), or in other representative cancer cell lines from various origin (**C.**). Data represent the mean \pm SD of three independent experiments (in nmol/L).

Figure 2



PP-13 interferes with mitotic progression of H358 NSCLC and HeLa cells. H358 and HeLa cells were treated with PP-13 at IC₅₀ (170 nmol/L H358, 120 nmol/L HeLa). The cell-cycle phases were determined by flow cytometry over the time as indicated **A**. The histograms represent the percentage of cells in each phase of the cell-cycle. **B**. Graphical representation of the percentage of mitotic and apoptotic cells in control and PP-13-treated cells. Data are presented as the mean \pm SD of ≥ 3 independent experiments (*, $p < 0.05$ compared to control cells). **C**. Cleaved caspase 3 was evaluated by western Blotting.

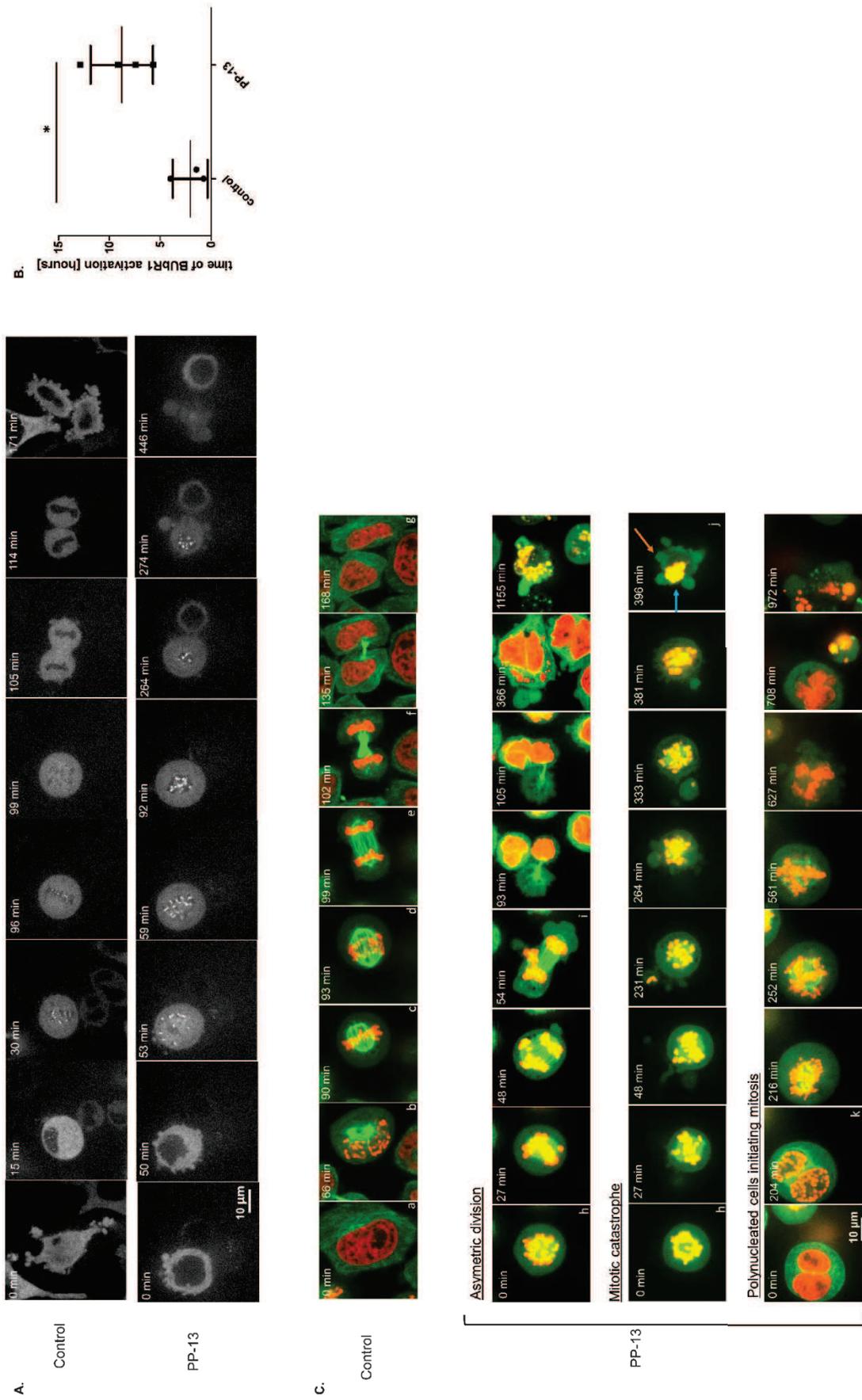
Figure 3



PP-13 interferes with mitotic spindle architecture and centrosome formation. HeLa cells were treated or not with 120 nmol/L PP-13 for 24h as indicated. **A-B.** Representative confocal images of microtubules (α -tubulin staining in red) and DNA (DAPI staining in blue) in untreated and PP-13-treated cells in interphase (**A.**) or in mitosis (**B.**). **C.** Quantification of interphase, mitotic, apoptotic and polynucleated cells (*, $p < 0.05$). At least 550 cells were randomly chosen and scored in each condition. **D.** Quantification of mitotic spindles per mitotic cell in control and treated samples. Based on a well-accepted classification nomenclature²⁷, type I and II spindles are bipolar ($n=2$) with one or more uncongressed chromosomes, type III are monopolar spindles with chromosomes arranged around the spindle ($n=1$), multipolar spindles displayed more than two poles ($n > 2$). At least 100 mitotic cells were randomly chosen and scored in each sample. **E.** Confocal images showing DNA (in blue), centrosome organization (α -tubulin staining in red) and centrin-2 repartition (in green) in mitotic non-treated and PP-13-treated cells. Insets represent a zoom of the boxed area. **F.** Quantification of α -tubulin dots per mitotic cell in control and treated samples. At least 100 mitotic cells were randomly chosen and scored in each sample.

Abbreviations: n: number of mitotic spindles; NS, Not significant.

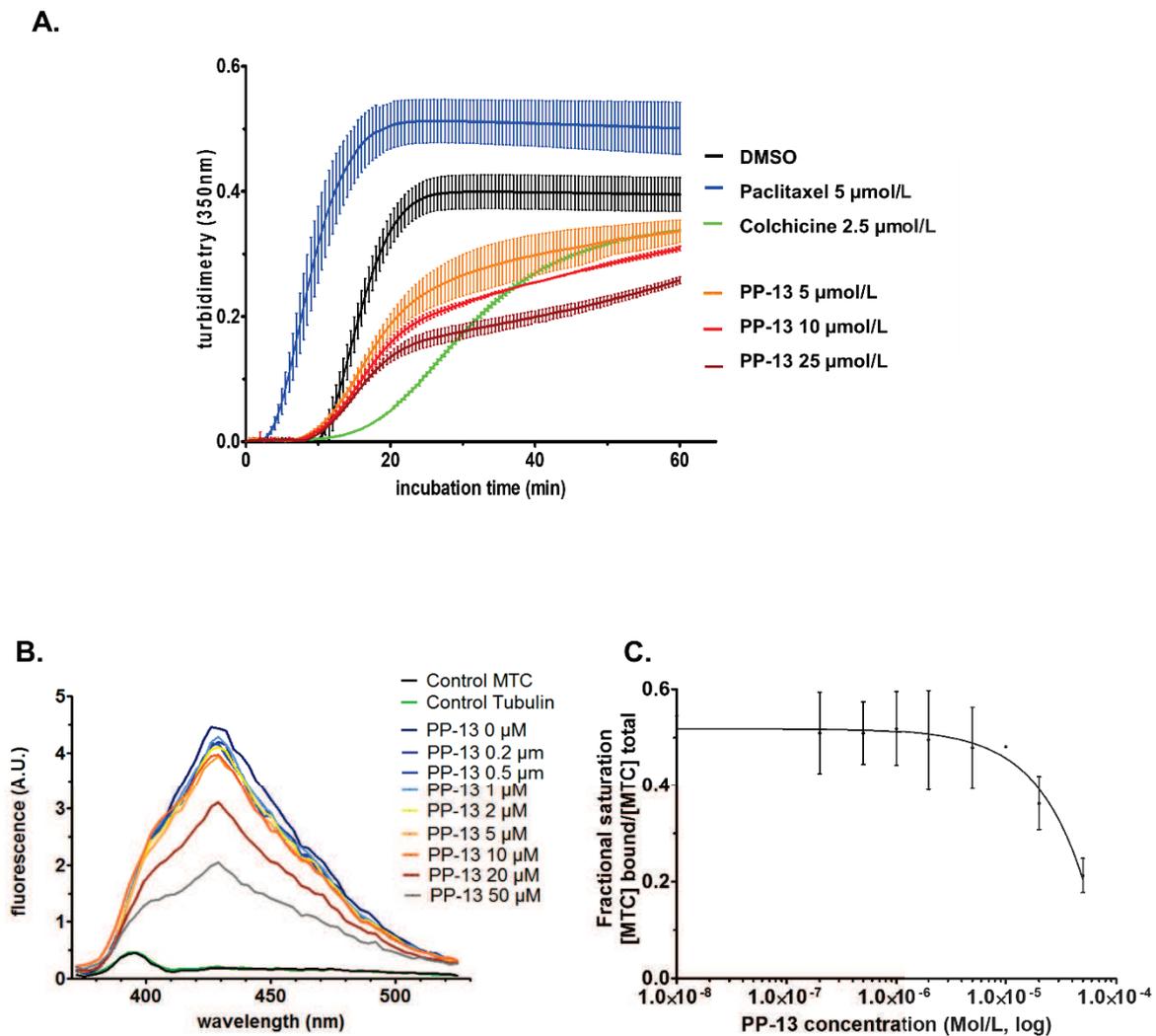
Figure 4



PP-13 blocks cells in prometaphase following asymmetric division or direct apoptotic death.

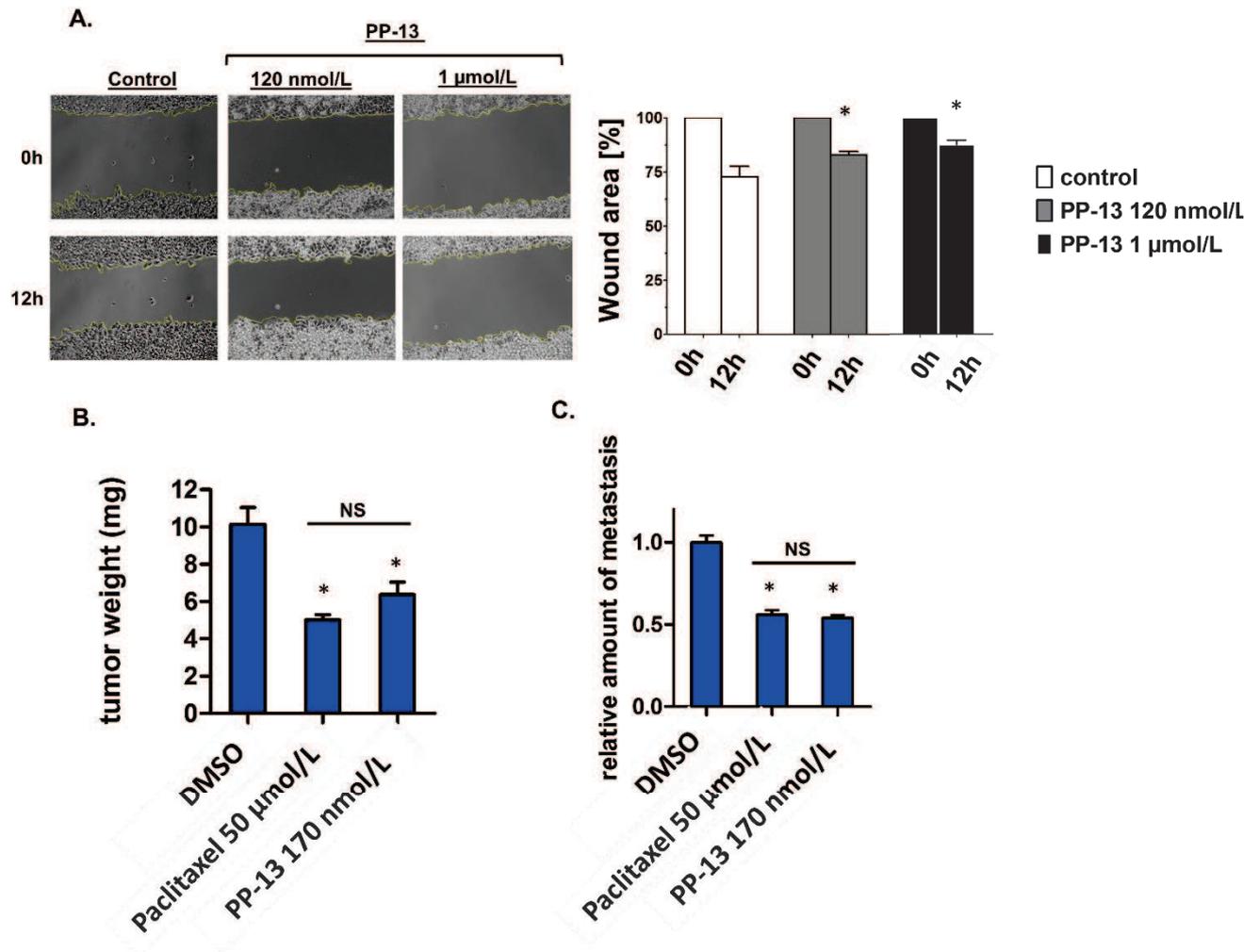
BubR1-EGFP HeLa cells (**A.**, **B.**) or α -tubulin-EGFP H2B-RFP HeLa cells (**C.**) were treated or not with 120 nmol/L PP-13 and cells were followed over the time with time-lapse videomicroscopy. **A.** Spindle assembly checkpoint (SAC) activation was analyzed over the time by following the activation of BubR1 (a major SAC component). **B.** Mean time of BubR1 activation was estimated by time lapse videomicroscopy (*, $p < 0.05$). At least 3 cells for each condition were followed over the time. Data are expressed as mean \pm SD. **C.** Cell division process was followed over the time. Non treated 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).

Figure 5



PP-13 is a microtubule-depolymerizing agent that competes with colchicine for tubulin binding. **A.** Effect of PP-13 on microtubule dynamics by *in vitro* tubulin polymerization assay. Assembly of pure tubulin (40 $\mu\text{mol/L}$) in presence of increasing concentrations of PP-13 (0 to 25 $\mu\text{mol/L}$) was followed by turbidimetry at 350nm. DMSO, paclitaxel (5 $\mu\text{mol/L}$) and colchicine (2.5 $\mu\text{mol/L}$) were used as vehicle control, polymerizing and depolymerizing agents respectively. Each turbidity value represents the mean \pm SD from 3 experimentations. **B.** Displacement of MTC from colchicine site by PP-13. MTC is a fluorescent colchicine analogue that interacts with the colchicine binding site of tubulin heterodimer. Fluorescence emission spectra (372-525 nm) of 10 $\mu\text{mol/L}$ MTC and 10 $\mu\text{mol/L}$ tubulin in presence of increasing concentrations of PP-13 (0 to 50 $\mu\text{mol/L}$) are showed. Each fluorescence intensity value (in arbitrary unit) represents the mean from 2 independent assays. **C.** Displacement isotherm of MTC by PP-13. MTC fractional saturation was calculated knowing the concentration of MTC binding sites (0.8 per tubulin dimer) and the MTC binding constant ($4.7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$).

Figure 6



PP-13 exerts anti-tumor effects. A. Confluent HeLa cells were scratched and treated with vehicle (DMSO) or PP-13 then wound healing was followed by videomicroscopy. In microscopy images, yellow lane delineates the edges of the wound. The histograms represent the percentage of wound area at 0h and 12h compared to control sample (mean \pm SD of 3 independent experiments). B-C. H358 NSCLC cells were xenografted on chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). After treatment with vehicle (DMSO 0.5%), paclitaxel (50 μ mol/L) or PP-13 (170 nmol/L), tumors were excised and weighed. The presence of H358 cells in the lower CAM was also evaluated by RT-qPCR as described in material and methods section. Effects of treatments on H358 tumor weight (mean \pm SEM of at least 17 samples) (B.) and tumor metastasis invasion in the lower CAM (mean \pm SEM of 15 samples) (C.) were evaluated (*, $p < 0.05$ significantly different from control).

Abbreviations: NS, Not significantly different).

Supplementary figures

Supplementary figure S1

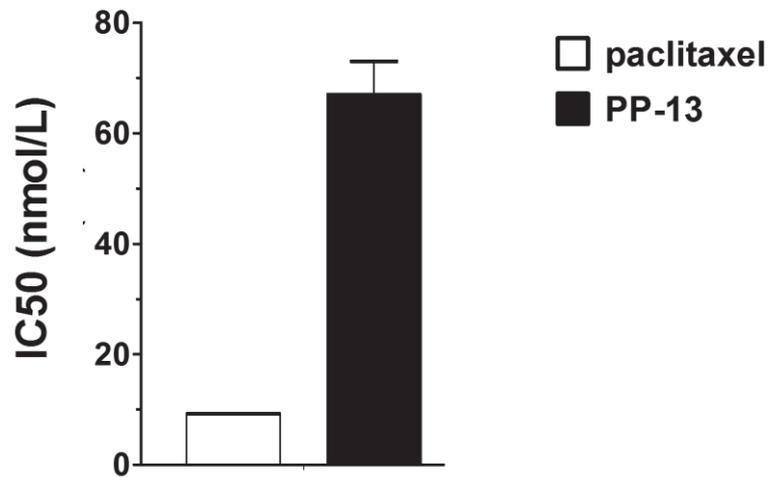
cell line	gene	TP53	KRAS	EGFR	others
A549		WT	Mutant G12S	WT	
H460		WT	Mutant Q61H	WT	
H1650		Mutant p.?	WT	Mutant delE746_A750 (exon 19)	PTEN loss conferring resistance to EGFR-TKI
H1975		Mutant R273H	WT	Mutant: L858R (exon 21), T790M (exon 20) conferring resistance to EGFR-TKI	
H358		P53 deleted	Mutant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

Genotypic features of NSCLC cell lines used in the study. Amino acid mutation are precised.

Abbreviations: WT: wild-type, EGFR-TKI: inhibitor of EGFR tyrosine kinase activity,

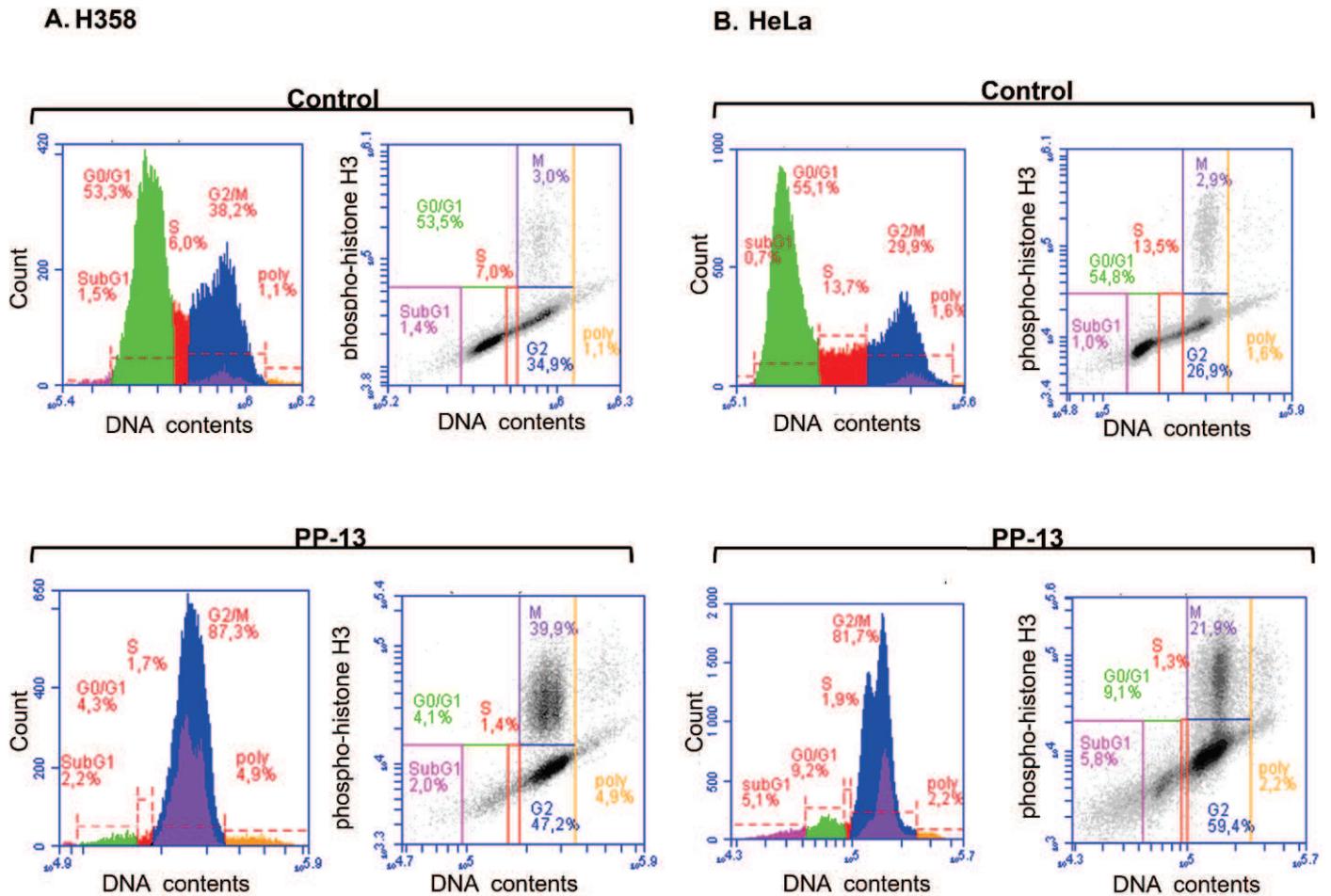
p.?: not defined

Supplementary figure S2



PP-13 reduces proliferation of MRC5 cells but has an IC₅₀ 7 times less than paclitaxel. PP-13 concentration required to inhibit cell growth by 50% (IC₅₀) at 72h was determined by MTT assays in human fetal lung fibroblast MRC5 cells. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments (in nmol/L).

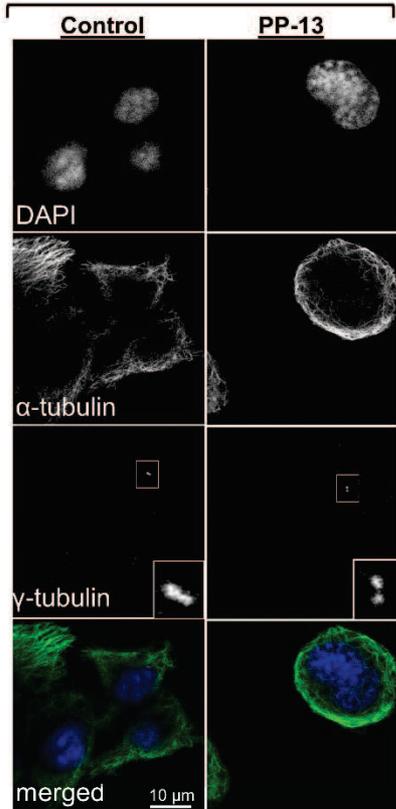
Supplementary figure S3



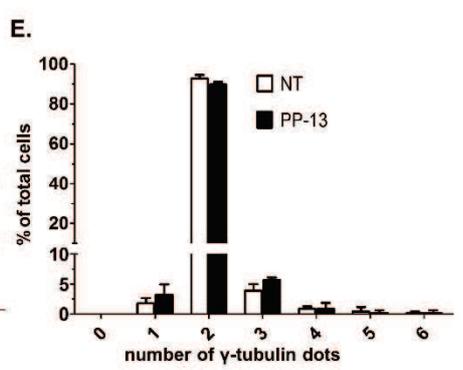
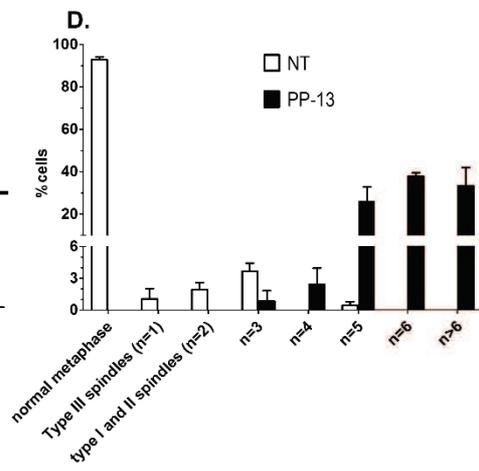
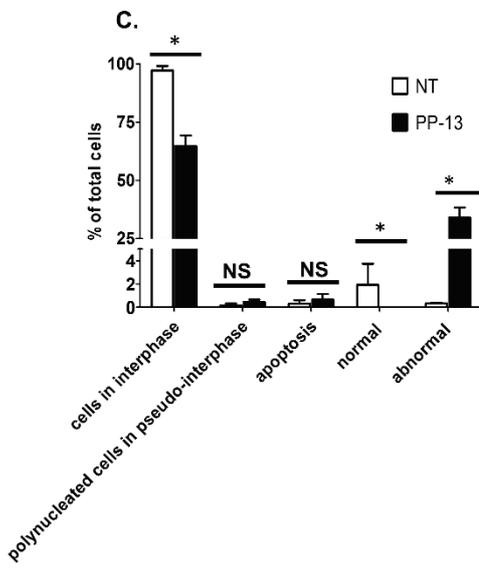
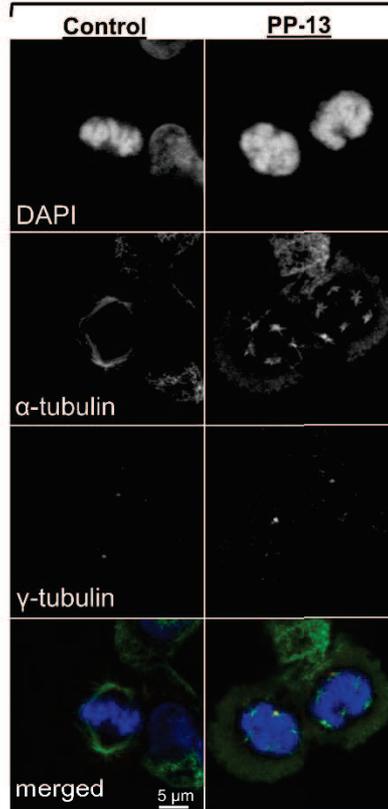
PP-13 interferes with mitotic progression of H358 NSCLC and HeLa cells. H358 (A.) and HeLa (B.) cells were treated with PP-13 at IC_{50} (170 nmol/L for H358 cells, 120 nmol/L for HeLa cells) for 18h. The percentage of cells in each phase of the cell-cycle was determined by flow cytometry. Representative 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 depending on 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 contents.

Supplementary figure S4

A. Interphase



B. Mitosis

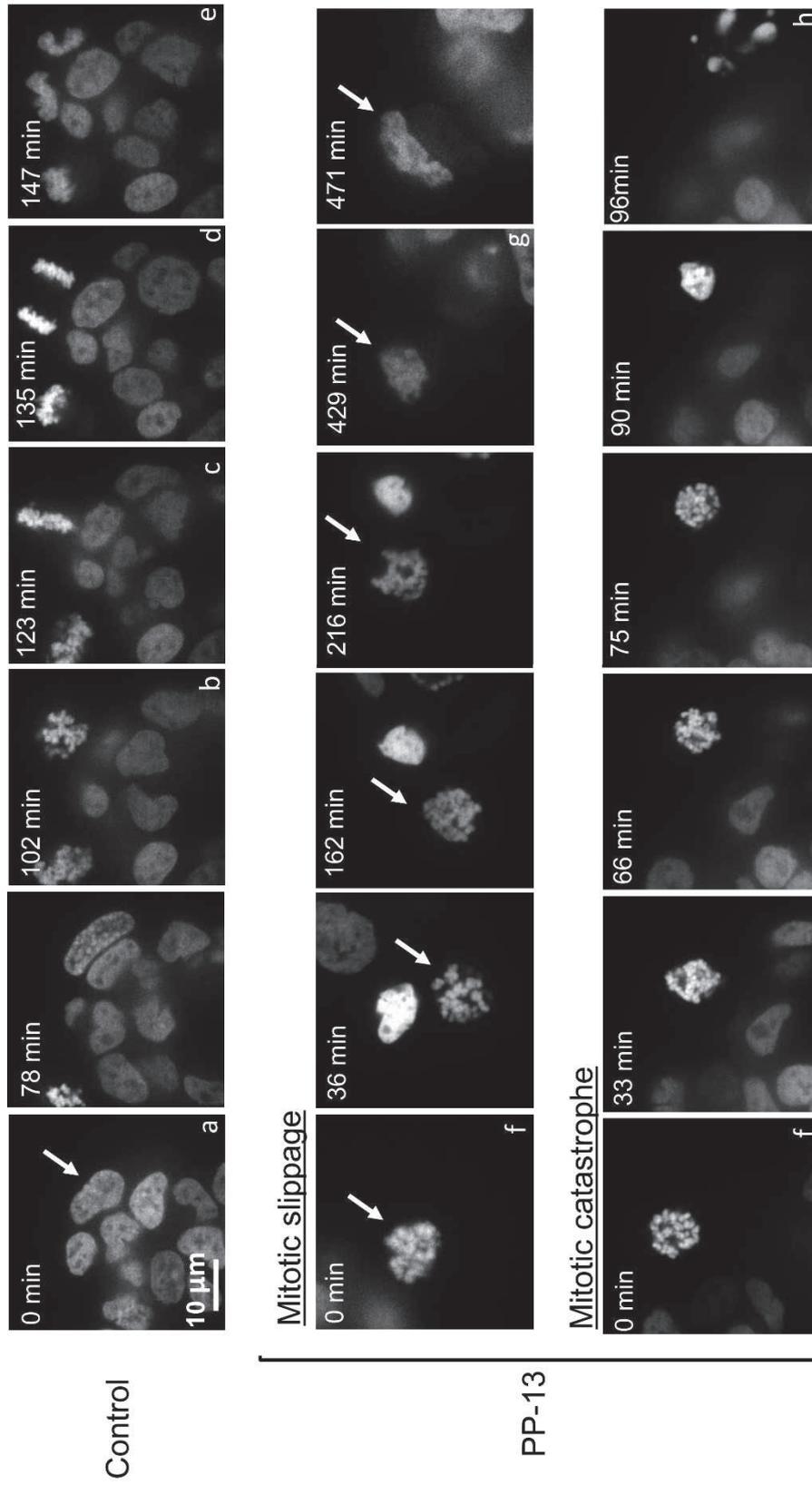


PP-13 interferes with mitotic spindle architecture and centrosome formation in H358 cells.

H358 cells were treated or not with 170 nmol/L PP-13 for 24h as indicated. **A-B.** Representative confocal images of microtubules (α -tubulin staining in green) centrosomes (β -tubulin staining in red) and DNA (DAPI staining in blue) in interphase (**A.**) or in mitotic (**B.**) cells. Insets represent a zoom of the boxed area. **C.** Quantification of interphase, mitotic, apoptotic and polynucleated cells (*, $p < 0.05$). Results for 300 cells randomly chosen and assigned. Quantification of mitotic spindles (**D.**) and β -tubulin spots (**E.**) per mitotic cell in control and treated samples. At least 100 mitotic cells were randomly chosen and scored in each sample. Mitotic spindles were classified according to a well-accepted nomenclature²⁷: type I and II spindles are bipolar ($n=2$) with one or more uncongressed chromosomes, type III are monopolar spindles with chromosomes arranged around the spindle ($n=1$), multipolar spindles displayed more than two poles ($n > 2$).

Abbreviations: NS, Not significant.

Supplementary figure S5

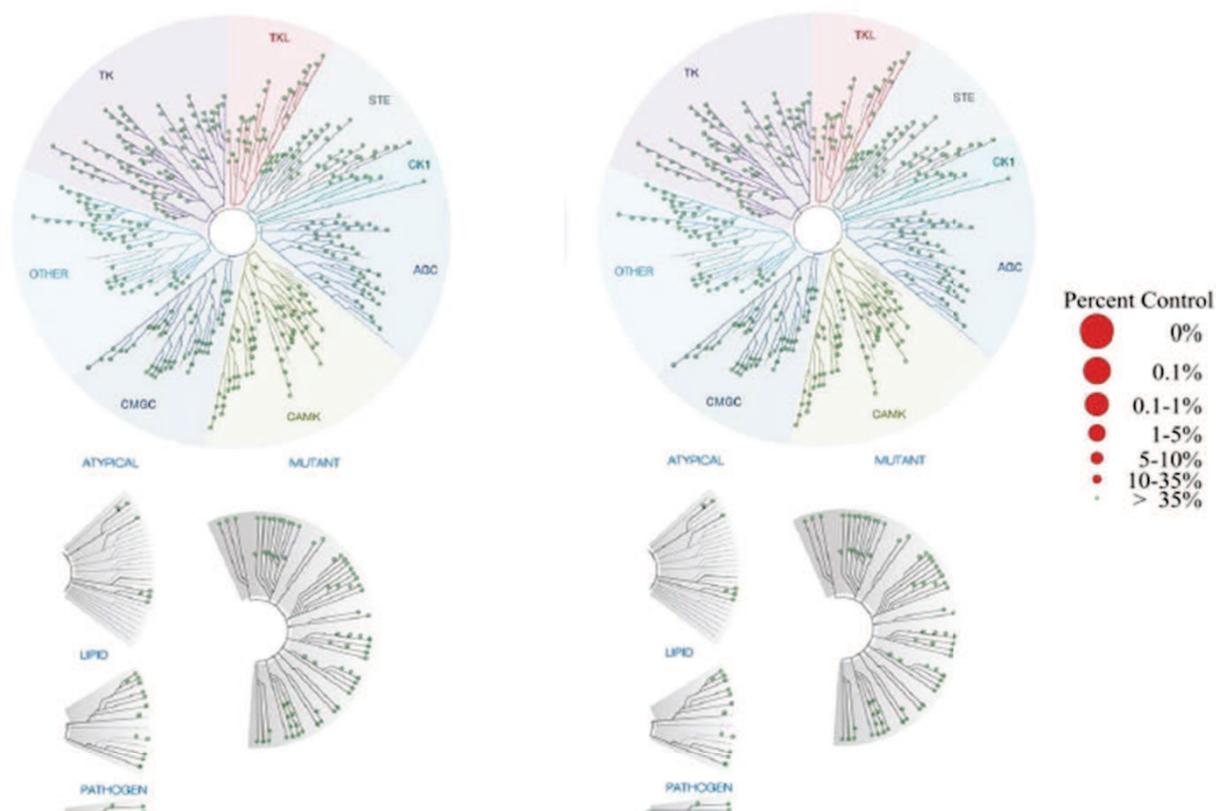


PP-13 blocks H358 cells in prometaphase following mitotic slippage or direct apoptotic death. H2B-RFP H358 cells were treated or not with 170 nmol/L PP-13 and cell division process was followed over the time using time-lapse videomicroscopy. Non treated cells undergoing mitosis exhibit typical features 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) or direct apoptotic death (h). White arrows show the cell of interest.

Supplementary figure S6

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

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



PP-13 is not a kinase inhibitor. Interactions between PP-13 and more than 450 human kinases and disease relevant mutant variants was evaluated by a kinome array. PP-13 was screened at 1 $\mu\text{mol/L}$ (A.) and 10 $\mu\text{mol/L}$ (B.). Red dots show significant kinase inhibition. The percentage represent the resultant kinases activity in presence of PP-13 compared to negative control.

Supplementary figure S7

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

PP-13 does not induce noticeable toxicity on chicken embryos. List of 22 checkpoints that were probed on chicken embryos to evaluate toxicity.

Conclusion

THESE SOUTENUE PAR : Pauline GILSON

TITRE :

EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTICANCEREUSE D'UN NOUVEAU DERIVE PYRROLO-PYRIMIDINE (PP-13) CIBLANT LES MICROTUBULES DANS LES CANCERS BRONCHO-PULMONAIRES NON-A-PETITES CELLULES RESISTANTS

CONCLUSION :

Responsables de 1.6 million de décès annuels dans le monde, les cancers bronchiques représentent un problème majeur de santé publique. Les Cancers Broncho-pulmonaires Non-à-Petites Cellules (CBNPC) sont le sous-type histologique majoritaire (85% des cancers bronchiques) et sont associés à un pronostic médiocre, en raison notamment de l'émergence de nombreux mécanismes de résistance. Dans ce contexte, la prise en charge des CBNPC est un réel challenge thérapeutique et il apparait essentiel d'identifier de nouveaux agents anticancéreux actifs sur les formes résistantes de cancers pulmonaires.

En dépit de l'avènement des thérapies ciblées et de l'immunothérapie, les chimiothérapies restent un des traitements de référence des CBNPC et de nombreux autres cancers avancés en l'absence de mutation oncogénique validée (65% des cas de CBNPC) ou en cas de rechute sous traitement ciblé. Les cures de chimiothérapies proposées aux patients consistent généralement en une association de drogues, incluant notamment des poisons du fuseau. Les taxanes et les vinca-alkaloïdes sont à ce jour les principaux agents ciblant les microtubules utilisés en clinique et induisent respectivement la stabilisation et la dépolymérisation des microtubules. Les microtubules constituent en effet une cible de choix pour le traitement des cancers en raison de leurs rôles-clés dans de nombreux processus biologiques tels que la ségrégation homologue des chromatides-sœurs lors de la mitose, la migration cellulaire et l'angiogenèse. Cependant, l'efficacité thérapeutique de ces antimitotiques est fortement limitée par leur toxicité systémique et le développement de chimiorésistance (par surexpression de pompes d'efflux principalement). Dans ce contexte, le développement de nouveaux agents mieux tolérés et moins sensibles aux transporteurs membranaires est indispensable.

Par une approche par criblage cellulaire à haut-débit, nous avons identifié un nouveau composé pyrrolo-pyrimidine (PP-13) ayant un fort potentiel cytotoxique sur une large gamme de lignées cellulaires cancéreuses humaines incluant des lignées cancéreuses résistantes à l'apoptose et aux thérapies ciblées. Des essais de polymérisation de la tubuline *in vitro* ont montré que PP-13 cible directement la tubuline et induit un effet dépolymérisant des microtubules, et ceci de façon dose-dépendante. En dépit d'une structure chimique très

différente de la colchicine, la molécule PP-13 entre en compétition avec elle pour une liaison au niveau du colchicine-binding-site de la tubuline. Les résultats de polymérisation de la tubuline en présence de ces agents suggèrent cependant un mécanisme d'action différent. Contrairement à la colchicine, il semble que PP-13 permette la nucléation de la tubuline mais réduise de façon significative l'élongation des polymères de tubuline. Nous confirmons cette hypothèse par analyse en microscopie électronique de l'assemblage de la tubuline *in vitro*. De plus, la constante d'affinité de PP-13 pour la tubuline est 20 fois inférieure à celle de la colchicine ce qui suggère une cytotoxicité moins importante que la colchicine(271).

Au niveau cellulaire, PP-13 réduit l'instabilité dynamique des microtubules nécessaire à leurs fonctions biologiques et perturbe l'organisation des fuseaux mitotiques. Il en résulte la formation de cellules multipolaires aberrantes et un blocage mitotique en prométaphase dépendant du point de contrôle de l'assemblage du fuseau (SAC). Le devenir de ces cellules bloquées en mitose est très variable : beaucoup sont soumises à une mort directe par apoptose tandis que d'autres échappent initialement à la mort cellulaire par glissement mitotique ou division asymétrique et aboutissent à la formation de cellules aneuploïdes non viables.

In vivo, nous avons démontré l'efficacité thérapeutique de PP-13 sur la croissance tumorale et l'invasion métastatique dans un modèle de xéno greffes de CBNPC résistants dans des œufs de poule embryonnés, sans induire d'effet toxique notable sur l'embryon. PP-13 représente donc une alternative pharmacologique intéressante dans le traitement des CBNPC résistants (et potentiellement d'autres cancers solides) en combinaison avec les thérapies anticancéreuses actuelles. De nombreux agents ciblant les microtubules et se liant spécifiquement au site de liaison de la colchicine sont en développement préclinique pour le traitement de certains cancers mais à ce jour, aucun ne présente une structure chimique comparable à celle de PP-13.

Ces résultats positionnent PP-13 comme un agent anticancéreux avec un réel intérêt clinique. Actuellement, nous cherchons à déterminer si PP-13 est susceptible d'être un substrat pour les principales protéines d'efflux impliquées dans les mécanismes de chimiorésistance et si PP-13 affecte le transport des autres molécules par ces transporteurs.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

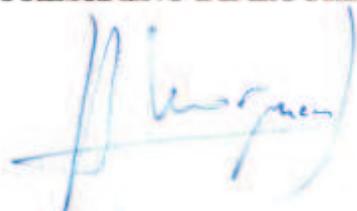
Grenoble, le : 12/12/16.

LE DOYEN


Président
et par délégation
Le Doyen de Pharmacie
Pr. Michel SEVE

Pr. Michel SEVE

LE PRESIDENT DE LA THESE



Pr Jean-Luc Lenormand

Bibliographie

1. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 [Internet]. [cité 23 août 2016]. Disponible sur: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
2. Les cancers en France en 2015 - L'essentiel des faits et chiffres. Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 23 août 2016]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Les-cancers-en-France-en-2015-L-essentiel-des-faits-et-chiffres>
3. Binder-Foucard F, Bossard N, Delafosse P, Belot A, Woronoff A-S, Remontet L. Cancer incidence and mortality in France over the 1980–2012 period: Solid tumors. *Rev D'Épidémiologie Santé Publique*. avr 2014;62(2):95-108.
4. Plan cancer 2014-2019 : priorités et objectifs - Plan cancer | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 23 août 2016]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Plan-cancer/Plan-cancer-2014-2019-priorites-et-objectifs>
5. Rafiemanesh H, Mehtarpour M, Khani F, Hesami SM, Shamlou R, Towhidi F, et al. Epidemiology, incidence and mortality of lung cancer and their relationship with the development index in the world. *J Thorac Dis*. juin 2016;8(6):1094-102.
6. Islami F, Torre LA, Jemal A. Global trends of lung cancer mortality and smoking prevalence. *Transl Lung Cancer Res*. août 2015;4(4):327-38.
7. American Cancer Society. Cancer Statistics 2013 [Internet]. [cité 30 juill 2016]. Disponible sur: <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2013/cancer-statistics-2013-slide-presentation.pdf>
8. Youlden DR, Cramb SM, Baade PD. The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. août 2008;3(8): 819-31.
9. 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 [Internet]. [cité 29 août 2016]. Disponible sur: <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>
10. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med*. déc 2011;32(4):605-44.
11. 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 [Internet]. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2014 [cité 28 sept 2016]. (Reports of the Surgeon General). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK179276/>
12. Tonini G, D'Onofrio L, Dell'Aquila E, Pezzuto A. New molecular insights in tobacco-induced lung cancer. *Future Oncol*. mai 2013;9(5):649-55.
13. Le Faou A-L, Scemama O. [Epidemiology of tobacco smoking]. *Rev Mal Respir*. déc 2005;22(6 Pt 2):8S27-32.
14. Hecht SS. More than 500 trillion molecules of strong carcinogens per cigarette: use in product labelling? *Tob Control*. 1 sept 2011;20(5):387-387.
15. Hecht SS, Kassie F, Hatsukami DK. Chemoprevention of lung carcinogenesis in addicted smokers and ex-smokers. *Nat Rev Cancer*. juill 2009;9(7):476-88.
16. Ridge C, McErlean A, Ginsberg M. Epidemiology of Lung Cancer. *Semin Interv Radiol*. 28 mai 2013;30(02):093-8.

17. Doll R. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ*. 26 juin 2004;328(7455):1519-0.
18. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ*. 18 oct 1997;315(7114):980-8.
19. IARC Monographs- Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans [Internet]. [cité 28 sept 2016]. Disponible sur: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol83/>
20. Sisti J, Boffetta P. What proportion of lung cancer in never-smokers can be attributed to known risk factors? *Int J Cancer*. 15 juill 2012;131(2):265-75.
21. Axelson O, Josefson H, Rehn M, Sundell L. [Swedish pilot study on lung cancer among miners]. *Lakartidningen*. 1 déc 1971;68(49):5687-93.
22. Melloni BBM. Lung cancer in never-smokers: radon exposure and environmental tobacco smoke. *Eur Respir J*. 1 oct 2014;44(4):850-2.
23. Planchard D, Besse B. Lung cancer in never-smokers. *Eur Respir J*. mai 2015;45(5):1214-7.
24. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. mars 2015;65(2):87-108.
25. Hamra GB, Guha N, Cohen A, Laden F, Raaschou-Nielsen O, Samet JM, et al. Outdoor Particulate Matter Exposure and Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ Health Perspect* [Internet]. 6 juin 2014 [cité 30 juill 2016]; Disponible sur: <http://ehp.niehs.nih.gov/1408092>
26. Lissowska J, Foretova L, Dąbek J, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, et al. Family history and lung cancer risk: international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. *Cancer Causes Control*. juill 2010;21(7):1091-104.
27. Schwartz AG, Lusk CM, Wenzlaff AS, Watza D, Pandolfi S, Mantha L, et al. Risk of lung cancer associated with COPD phenotype based on quantitative image analysis. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 6 juill 2016;
28. Mena Á, Meijide H, Marcos PJ. Lung Cancer in HIV-Infected Patients. *AIDS Rev*. 19 juill 2016;18(3).
29. Beasley MB, Brambilla E, Travis WD. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol*. avr 2005;40(2):90-7.
30. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J Thorac Oncol*. sept 2015;10(9):1243-60.
31. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung Cancer. *N Engl J Med*. 25 sept 2008;359(13):1367-80.
32. Semanova EA, Nagel R, Berns A. Origins, genetic landscape, and emerging therapies of small cell lung cancer. *Genes Dev*. 15 juill 2015;29(14):1447-62.
33. Pesch B, Kendzia B, Gustavsson P, Jöckel K-H, Johnen G, Pohlmann H, et al. Cigarette smoking and lung cancer – relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of case-control studies. *Int J Cancer J Int Cancer*. 1 sept 2012;131(5):1210-9.
34. Van Meerbeeck JP, Fennell DA, De Ruysscher DK. Small-cell lung cancer. *The Lancet*. nov 2011;378(9804):1741-55.
35. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers — a different disease. *Nat Rev Cancer*. oct 2007;7(10):778-90.

36. Quoix E, Mennequier B. [Lung cancer in women]. *Rev Mal Respir.* déc 2005;22(6 Pt 2):8S55-62.
37. Skarin AT, Herbst RS, Leong TL, Bailey A, Sugarbaker D. Lung cancer in patients under age 40. *Lung Cancer Amst Neth.* juin 2001;32(3):255-64.
38. Petersen I. The Morphological and Molecular Diagnosis of Lung Cancer. *Dtsch Ärztebl Int.* août 2011;108(31-32):525-31.
39. Brambilla E, Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *Eur Respir J.* 1 juin 2009;33(6):1485-97.
40. Wang X-N, Wang S-J, Pandey V, Chen P, Li Q, Wu Z-S, et al. Trefoil Factor 3 as a Novel Biomarker to Distinguish Between Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 22 mai 2015 [cité 31 juill 2016];94(20). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4602872/>
41. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary. *Proc Am Thorac Soc.* sept 2011;8(5):381-5.
42. Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 mars 2013;31(8):992-1001.
43. Kenfield SA, Wei EK, Stampfer MJ, Rosner BA, Colditz GA. Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer. *Tob Control.* 19 févr 2008;17(3):198-204.
44. 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.* oct 2012;13(10):e418-26.
45. Référentiel interrégional: Cancer bronchique non à petites cellules | Réseau Espace Santé Cancer Rhône-Alpes Auvergne 2016 [Internet]. [cité 28 sept 2016]. Disponible sur: <http://espacecancer.sante-ra.fr/Pages/referentiel-cnadc.aspx>
46. Kim CH. Druggable Targets of Squamous Cell Lung Cancer. *Tuberc Respir Dis.* 2013;75(6):231.
47. 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.* août 2015;4(4):415-23.
48. Mirsadraee S. The 7th lung cancer TNM classification and staging system: Review of the changes and implications. *World J Radiol.* 2012;4(4):0.
49. El Masri J, Ren S, Zhang J. Getting familiar with the forthcoming eighth edition of TNM classification of lung cancer: from the T to N and M descriptors. *Ann Transl Med.* févr 2016;4(4):67.
50. Detterbeck F, Chansky K, Groome P, Bolejack V, Crowley J, Shemanski L, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Methodology and Validation Used in the Development of Proposals for Revision of the Stage Classification of Non-Small Cell Lung Cancer in the Forthcoming (8th) Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 20 juill 2016;
51. Weinberg RA. How cancer arises. *Sci Am.* sept 1996;275(3):62-70.
52. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* mars 2011;144(5):646-74.
53. Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes - Molecular Cell Biology - NCBI Bookshelf [Internet]. [cité 31 juill 2016]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21662/>

54. Chan BA, Hughes BGM. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Transl Lung Cancer Res.* févr 2015;4(1):36-54.
55. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, Debievre D, Mosser J, Lena H, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *The Lancet.* avr 2016;387(10026):1415-26.
56. Raparia K, Villa C, DeCamp MM, Patel JD, Mehta MP. Molecular profiling in non-small cell lung cancer: a step toward personalized medicine. *Arch Pathol Lab Med.* avr 2013;137(4):481-91.
57. Califano R, Abidin A, Tariq N-A, Economopoulou P, Metro G, Mountzios G. Beyond EGFR and ALK inhibition: Unravelling and exploiting novel genetic alterations in advanced non small-cell lung cancer. *Cancer Treat Rev.* mai 2015;41(5):401-11.
58. Alamgeer M, Ganju V, Watkins DN. Novel therapeutic targets in non-small cell lung cancer. *Curr Opin Pharmacol.* juin 2013;13(3):394-401.
59. Hirsch FR. Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Small-Cell Lung Carcinomas: Correlation Between Gene Copy Number and Protein Expression and Impact on Prognosis. *J Clin Oncol.* 8 sept 2003;21(20):3798-807.
60. Heinmöller P, Gross C, Beyser K, Schmidtgen C, Maass G, Pedrocchi M, et al. HER2 status in non-small cell lung cancer: results from patient screening for enrollment to a phase II study of herceptin. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 nov 2003;9(14):5238-43.
61. Marchetti A, Felicioni L, Malatesta S, Grazia Sciarrotta M, Guetti L, Chella A, et al. Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring BRAF Mutations. *J Clin Oncol.* 10 sept 2011;29(26):3574-9.
62. Sánchez-Torres JM, Viteri S, Molina MA, Rosell R. BRAF mutant non-small cell lung cancer and treatment with BRAF inhibitors. *Transl Lung Cancer Res.* juin 2013;2(3):244-50.
63. Tissot C, Couraud S, Tanguy R, Bringuier P-P, Girard N, Souquet P-J. Clinical characteristics and outcome of patients with lung cancer harboring BRAF mutations. *Lung Cancer.* janv 2016;91:23-8.
64. Naidoo J, Drilon A. Molecular Diagnostic Testing in Non-Small Cell Lung Cancer. *Am J Hematol Oncol [Internet].* 1 sept 2014 [cité 28 sept 2016];10(4). Disponible sur: <http://www.gotoper.com/publications/ajho/2014/2014sep/molecular-diagnostic-testing-in-non-small-cell-lung-cancer>
65. Tran TN, Selinger CI, Kohonen-Corish MRJ, McCaughan BC, Kennedy CW, O'Toole SA, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) copy number is an independent prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* sept 2013;81(3):462-7.
66. Chaft JE, Arcila ME, Paik PK, Lau C, Riely GJ, Pietanza MC, et al. Coexistence of PIK3CA and other oncogene mutations in lung adenocarcinoma-rationale for comprehensive mutation profiling. *Mol Cancer Ther.* févr 2012;11(2):485-91.
67. Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, Mazo A, Leonart ME, Castellvi J, et al. p16Ink4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene.* 5 mai 2011;30(18):2087-97.
68. Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer.* mai 2014;14(5):359-70.
69. Olivier M, Petitjean A, Marcel V, Pétré A, Mounawar M, Plymoth A, et al. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther.* janv 2009;16(1):1-12.

70. Cortot AB, Younes M, Martel-Planche G, Guibert B, Isaac S, Souquet P-J, et al. Mutation of TP53 and Alteration of p14arf Expression in EGFR- and KRAS-Mutated Lung Adenocarcinomas. *Clin Lung Cancer.* mars 2014;15(2):124-30.
71. Burkhardt DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer.* sept 2008;8(9):671-82.
72. Jin G, Kim MJ, Jeon H-S, Choi JE, Kim DS, Lee EB, et al. PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers. *Lung Cancer.* sept 2010;69(3):279-83.
73. Li X, Yang Y, Zhang H, Yue W, Zhang T, Lu B, et al. High levels of Phosphatase and Tensin Homolog Expression Predict Favorable Prognosis in Patients with Non-small Cell Lung Cancer. *Cell Biochem Biophys.* déc 2015;73(3):631-7.
74. 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.* janv 2010;9(2):156-60.
75. Skoulidis F, Byers LA, Diao L, Papadimitrakopoulou VA, Tong P, Izzo J, et al. Co-occurring genomic alterations define major subsets of KRAS-mutant lung adenocarcinoma with distinct biology, immune profiles, and therapeutic vulnerabilities. *Cancer Discov.* août 2015;5(8):860-77.
76. Ji H, Ramsey MR, Hayes DN, Fan C, McNamara K, Kozlowski P, et al. LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature.* 16 août 2007;448(7155):807-10.
77. Duarte RL de M, Paschoal MEM. Molecular markers in lung cancer: prognostic role and relationship to smoking. *J Bras Pneumol.* févr 2006;32(1):56-65.
78. Paraschiv B, Diaconu CC, Toma CL, Bogdan MA. Paraneoplastic syndromes: the way to an early diagnosis of lung cancer. *Pneumol Buchar Rom.* 2015;64(2):14-9.
79. American cancer society - Signs and symptoms of lung cancer [Internet]. [cité 28 sept 2016]. Disponible sur: <http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/moreinformation/lungcancerpreventionandearlydetection/lung-cancer-prevention-and-early-detection-signs-and-symptoms>
80. Haute Autorité de Santé - Guide du parcours de soins - Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hémato-poïétique cancers broncho-pulmonaires - juillet 2013 [Internet]. [cité 28 sept 2016]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/plugins/ModuleXitiKLEE/types/FileDocument/doXiti.jsp?id=c_1652171
81. Barbareschi M, Murer B, Colby TV, Chilosi M, Macri E, Loda M, et al. CDX-2 homeobox gene expression is a reliable marker of colorectal adenocarcinoma metastases to the lungs. *Am J Surg Pathol.* févr 2003;27(2):141-9.
82. 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 [Internet]. [cité 28 sept 2016]. Disponible sur: <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>
83. Zhou C, Wu Y-L, Chen G, Liu X, Zhu Y, Lu S, et al. BEYOND: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter, Phase III Study of First-Line Carboplatin/Paclitaxel Plus Bevacizumab or Placebo in Chinese Patients With Advanced or Recurrent Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 juill 2015;33(19):2197-204.
84. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 22 oct 2015;373(17):1627-39.

85. Reck M, Kaiser R, Mellegaard A, Douillard J-Y, Orlov S, Krzakowski M, et al. Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (LUME-Lung 1): a phase 3, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* févr 2014;15(2): 143-55.
86. Stewart EL, Tan SZ, 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.* févr 2015;4(1):67-81.
87. The mechanism of acquired resistance to irreversible EGFR tyrosine kinase inhibitor-afatinib in lung adenocarcinoma patients. *Oncotarget* [Internet]. 14 mars 2016 [cité 11 sept 2016]; Disponible sur: <http://www.oncotarget.com/abstract/7189>
88. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med.* mars 2005;2(3):e73.
89. Wang SE, Narasanna A, Perez-Torres M, Xiang B, Wu FY, Yang S, et al. HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Cell.* juill 2006;10(1):25-38.
90. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med.* 23 mars 2011;3(75):75ra26.
91. Ercan D, Xu C, Yanagita M, Monast CS, Pratilas CA, Montero J, et al. Reactivation of ERK Signaling Causes Resistance to EGFR Kinase Inhibitors. *Cancer Discov.* 1 oct 2012;2(10):934-47.
92. Engelman JA, Mukohara T, Zejnullahu K, Lifshits E, Borrás AM, Gale C-M, et al. Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *J Clin Invest.* 2 oct 2006;116(10):2695-706.
93. Ohashi K, Sequist LV, Arcila ME, Moran T, Chmielecki J, Lin Y-L, et al. Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31 juill 2012;109(31):E2127-2133.
94. Shaw AT, Yeap BY, Solomon BJ, Riely GJ, Gainor J, Engelman JA, et al. Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* oct 2011;12(11):1004-12.
95. Shaw AT, Kim D-W, Mehra R, Tan DSW, Felip E, Chow LQM, et al. Ceritinib in ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 27 mars 2014;370(13):1189-97.
96. Jänne PA, Shaw AT, Camidge DR, Giaccone G, Shreeve SM, Tang Y, et al. Combined Pan-HER and ALK/ROS1/MET Inhibition with Dacomitinib and Crizotinib in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Results of a Phase I Study. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* mai 2016;11(5): 737-47.
97. De Grève J, Teugels E, Geers C, Decoster L, Galdermans D, De Mey J, et al. Clinical activity of afatinib (BIBW 2992) in patients with lung adenocarcinoma with mutations in the kinase domain of HER2/neu. *Lung Cancer.* avr 2012;76(1):123-7.
98. Engelman JA, Zejnullahu K, Gale C-M, Lifshits E, Gonzales AJ, Shimamura T, et al. PF00299804, an Irreversible Pan-ERBB Inhibitor, Is Effective in Lung Cancer Models with EGFR and ERBB2 Mutations that Are Resistant to Gefitinib. *Cancer Res.* 15 déc 2007;67(24):11924-32.
99. Meng D, Yuan M, Li X, Chen L, Yang J, Zhao X, et al. Prognostic value of K-RAS mutations in patients with non-small cell lung cancer: A systematic review with meta-analysis. *Lung Cancer.* juill 2013;81(1): 1-10.

100. Mao C, Qiu L-X, Liao R-Y, Du F-B, Ding H, Yang W-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*. sept 2010;69(3):272-8.
101. 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*. avr 2016;11(4):S57.
102. Fiches repère - Publications sur le cancer | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 13 déc 2016]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Collections/Fiches-repere>
103. Uzman A. *Molecular Cell Biology, Sixth Edition*. *Biochem Mol Biol Educ*. 1 janv 2010;38(1):60-1.
104. Chretien D. Lattice defects in microtubules: protofilament numbers vary within individual microtubules. *J Cell Biol*. 1 juin 1992;117(5):1031-40.
105. Metz F, Arnal I, Wade RH. Tomography without Tilt: Three-Dimensional Imaging of Microtubule/Motor Complexes. *J Struct Biol*. mars 1997;118(2):159-68.
106. 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*. déc 1994;127(6 Pt 2):1965-71.
107. Chrétien D, Fuller SD, Karsenti E. Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J Cell Biol*. juin 1995;129(5):1311-28.
108. Nogales E. Structural Insights into Microtubule Function. *Annu Rev Biochem*. 2000;69(1):277-302.
109. Desai A, Mitchison TJ. Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1997;13:83-117.
110. Wade RH, Hyman AA. Microtubule structure and dynamics. *Curr Opin Cell Biol*. févr 1997;9(1):12-7.
111. Weisenberg RC, Broisy GG, Taylor EW. Colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. *Biochemistry (Mosc)*. déc 1968;7(12):4466-79.
112. Oakley CE, Oakley BR. Identification of γ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*. 20 avr 1989;338(6217):662-4.
113. Dutcher SK, Trabuco EC. 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*. juin 1998;9(6):1293-308.
114. 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*. janv 2000;2(1):30-5.
115. Vaughan S, Attwood T, Navarro M, Scott V, McKean P, Gull K. New tubulins in protozoal parasites. *Curr Biol CB*. 6 avr 2000;10(7):R258-259.
116. Findeisen P, Muhlhausen S, Dempewolf S, Hertzog J, Zietlow A, Carlomagno T, et al. Six Subgroups and Extensive Recent Duplications Characterize the Evolution of the Eukaryotic Tubulin Protein Family. *Genome Biol Evol*. 16 sept 2014;6(9):2274-88.
117. Little M, Seehaus T. Comparative analysis of tubulin sequences. *Comp Biochem Physiol B*. 1988;90(4):655-70.
118. Downing KH, Nogales E. Crystallographic structure of tubulin: implications for dynamics and drug binding. *Cell Struct Funct*. oct 1999;24(5):269-75.
119. Akhmanova A, Steinmetz MO. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol*. avr 2008;9(4):309-22.

120. Nogales E, Wolf SG, Downing KH. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*. 8 janv 1998;391(6663):199-203.
121. Keskin O, Durell SR, Bahar I, Jernigan RL, Covell DG. Relating Molecular Flexibility to Function: A Case Study of Tubulin. *Biophys J*. août 2002;83(2):663-80.
122. Löwe J, Li H, Downing K., Nogales E. Refined structure of $\alpha\beta$ -tubulin at 3.5 Å resolution. *J Mol Biol*. nov 2001;313(5):1045-57.
123. Correia JJ, Beth AH, Williams RC. Tubulin exchanges divalent cations at both guanine nucleotide-binding sites. *J Biol Chem*. 5 août 1988;263(22):10681-6.
124. Spiegelman BM, Penningroth SM, Kirschner MW. Turnover of tubulin and the N site GTP in Chinese hamster ovary cells. *Cell*. nov 1977;12(3):587-600.
125. Oakley BR. An abundance of tubulins. *Trends Cell Biol*. déc 2000;10(12):537-42.
126. Aldaz H, Rice LM, Stearns T, Agard DA. Insights into microtubule nucleation from the crystal structure of human γ -tubulin. *Nature*. 26 mai 2005;435(7041):523-7.
127. Oakley BR, Paolillo V, Zheng Y. γ -Tubulin complexes in microtubule nucleation and beyond. *Mol Biol Cell*. 1 sept 2015;26(17):2957-62.
128. Dutcher SK. Long-lost relatives reappear: identification of new members of the tubulin superfamily. *Curr Opin Microbiol*. déc 2003;6(6):634-40.
129. Bond JF, Fridovich-Keil JL, Pillus L, Mulligan RC, Solomon F. A chicken-yeast chimeric beta-tubulin protein is incorporated into mouse microtubules in vivo. *Cell*. 14 févr 1986;44(3):461-8.
130. Lewis SA, Gu W, Cowan NJ. Free intermingling of mammalian beta-tubulin isotypes among functionally distinct microtubules. *Cell*. 22 mai 1987;49(4):539-48.
131. Joshi HC, Cleveland DW. Differential utilization of beta-tubulin isotypes in differentiating neurites. *J Cell Biol*. août 1989;109(2):663-73.
132. Pucciarelli S, Ballarini P, Sparvoli D, Barchetta S, Yu T, Detrich HW, et al. Distinct Functional Roles of β -Tubulin Isotypes in Microtubule Arrays of *Tetrahymena thermophila*, a Model Single-Celled Organism. Pelling A, éditeur. *PLoS ONE*. 22 juin 2012;7(6):e39694.
133. Feng R, Sang Q, Kuang Y, Sun X, Yan Z, Zhang S, et al. Mutations in *TUBB8* and Human Oocyte Meiotic Arrest. *N Engl J Med*. 21 janv 2016;374(3):223-32.
134. Ludueña RF, Banerjee A. The Isotypes of Tubulin. In: Fojo T, éditeur. *The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2008 [cité 30 août 2016]. p. 123-75. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-336-3_6
135. Panda D, Miller HP, Banerjee A, Ludueña RF, Wilson L. Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 nov 1994;91(24):11358-62.
136. Gan PP, McCarroll JA, Byrne FL, Garner J, Kavallaris M. Specific β -Tubulin Isotypes Can Functionally Enhance or Diminish Epothilone B Sensitivity in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. Giannakakou P, éditeur. *PLoS ONE*. 29 juin 2011;6(6):e21717.
137. Derry WB, Wilson L, Khan IA, Ludueña RF, Jordan MA. Taxol Differentially Modulates the Dynamics of Microtubules Assembled from Unfractionated and Purified β -Tubulin Isotypes. *Biochemistry (Mosc)*. mars 1997;36(12):3554-62.
138. Janke C, Chloë Bulinski J. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 16 nov 2011;12(12):773-86.

139. Song Y, Brady ST. Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. *Trends Cell Biol.* mars 2015;25(3):125-36.
140. Erck C, Peris L, Andrieux A, Meissirel C, Gruber AD, Vernet M, et al. A vital role of tubulin-tyrosinase for neuronal organization. *Proc Natl Acad Sci.* 31 mai 2005;102(22):7853-8.
141. Marcos S, Moreau J, Backer S, Job D, Andrieux A, Bloch-Gallego E. Tubulin Tyrosination Is Required for the Proper Organization and Pathfinding of the Growth Cone. Hendricks M, éditeur. *PLoS ONE.* 30 avr 2009;4(4):e5405.
142. Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* 15 nov 1984;312(5991):237-42.
143. Hyman AA, Salsler S, Drechsel DN, Unwin N, Mitchison TJ. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol Biol Cell.* oct 1992;3(10):1155-67.
144. Valiron O, Arnal I, Caudron N, Job D. GDP-tubulin incorporation into growing microtubules modulates polymer stability. *J Biol Chem.* 4 juin 2010;285(23):17507-13.
145. David-Pfeuty T, Erickson HP, Pantaloni D. Guanosinetriphosphatase activity of tubulin associated with microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* déc 1977;74(12):5372-6.
146. Ohi R, Zanic M. Ahead of the Curve: New Insights into Microtubule Dynamics. *F1000Research.* 10 mars 2016;5:314.
147. Mozziconacci J, Sandblad L, Wachsmuth M, Brunner D, Karsenti E. Tubulin dimers oligomerize before their incorporation into microtubules. *PloS One.* 2008;3(11):e3821.
148. Walker RA, O'Brien ET, Pryer NK, Soboeiro MF, Voter WA, Erickson HP, et al. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol.* oct 1988;107(4):1437-48.
149. Valiron O. New insights into microtubule elongation mechanisms. *Commun Integr Biol.* 2011;4(1):10-3.
150. Margolis RL, Wilson L. Microtubule treadmills--possible molecular machinery. *Nature.* 29 oct 1981;293(5835):705-11.
151. Lloyd C, Chan J. Microtubules and the shape of plants to come. *Nat Rev Mol Cell Biol.* janv 2004;5(1):13-22.
152. 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* [Internet]. Elsevier; 2010 [cité 11 sept 2016]. p. 189-206. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X10950115>
153. Valiron O, Caudron N, Job D. Microtubule dynamics: *Cell Mol Life Sci.* déc 2001;58(14):2069-84.
154. Müller-Reichert T, Chrétien D, Severin F, Hyman AA. Structural changes at microtubule ends accompanying GTP hydrolysis: information from a slowly hydrolyzable analogue of GTP, guanylyl (alpha,beta)methylenediphosphonate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31 mars 1998;95(7):3661-6.
155. Wang H-W, Nogales E. Nucleotide-dependent bending flexibility of tubulin regulates microtubule assembly. *Nature.* 16 juin 2005;435(7044):911-5.
156. 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.* mai 2013;35(5):452-61.

157. Walker RA, Inoué S, Salmon ED. Asymmetric behavior of severed microtubule ends after ultraviolet-microbeam irradiation of individual microtubules in vitro. *J Cell Biol.* mars 1989;108(3):931-7.
158. Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo- electron microscopy study. *J Cell Biol.* 1 sept 1991;114(5):977-91.
159. Cassimeris L, Pryer NK, Salmon ED. Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *J Cell Biol.* déc 1988;107(6 Pt 1):2223-31.
160. Sammak PJ, Borisy GG. Direct observation of microtubule dynamics in living cells. *Nature.* 21 avr 1988;332(6166):724-6.
161. Sheldon E, Wadsworth P. Observation and quantification of individual microtubule behavior in vivo: microtubule dynamics are cell-type specific. *J Cell Biol.* févr 1993;120(4):935-45.
162. McNally FJ. Modulation of microtubule dynamics during the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol.* févr 1996;8(1):23-9.
163. Azimzadeh J, Bornens M. Structure and duplication of the centrosome. *J Cell Sci.* 1 juill 2007;120(13):2139-42.
164. Lyle K, Kumar P, Wittmann T. SnapShot: Microtubule Regulators I. *Cell.* janv 2009;136(2):380.e1-380.e2.
165. Fujita H, Yoshino Y, Chiba N. Regulation of the centrosome cycle. *Mol Cell Oncol.* 3 mars 2016;3(2):e1075643.
166. Bettencourt-Dias M, Glover DM. SnapShot: Centriole Biogenesis. *Cell.* janv 2009;136(1):188.e1-188.e2.
167. Bartolini F, Gundersen GG. Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *J Cell Sci.* 15 oct 2006;119(20):4155-63.
168. Mandelkow E, Mandelkow EM. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol.* févr 1995;7(1):72-81.
169. Wloga D, Gaertig J. Post-translational modifications of microtubules. *J Cell Sci.* 15 oct 2010;123(20):3447-55.
170. Halpain S, Dehmelt L. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 2006;7(6):224.
171. Dehmelt L, Halpain S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 2005;6(1):204.
172. Guillaud L, Bosc C, Fourest-Lieuvin A, Denarier E, Pirolet F, Lafanechère L, et al. STOP Proteins are Responsible for the High Degree of Microtubule Stabilization Observed in Neuronal Cells. *J Cell Biol.* 13 juill 1998;142(1):167-79.
173. Bosc C, Andrieux A, Job D. STOP Proteins †. *Biochemistry (Mosc).* oct 2003;42(42):12125-32.
174. Moores CA, Perderiset M, Kappeler C, Kain S, Drummond D, Perkins SJ, et al. Distinct roles of doublecortin modulating the microtubule cytoskeleton. *EMBO J.* 4 oct 2006;25(19):4448-57.
175. Arnal I, Heichette C, Diamantopoulos GS, Chrétien D. CLIP-170/Tubulin-Curved Oligomers Coassemble at Microtubule Ends and Promote Rescues. *Curr Biol.* déc 2004;14(23):2086-95.
176. Akhmanova A, Steinmetz MO. Microtubule +TIPs at a glance. *J Cell Sci.* 15 oct 2010;123(Pt 20):3415-9.

177. Lomakin AJ, Semenova I, Zaliapin I, Kraikivski P, Nadezhdina E, Slepchenko BM, et al. CLIP-170-Dependent Capture of Membrane Organelles by Microtubules Initiates Minus-End Directed Transport. *Dev Cell*. sept 2009;17(3):323-33.
178. Fukata M, Watanabe T, Noritake J, Nakagawa M, Yamaga M, Kuroda S, et al. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell*. 28 juin 2002;109(7):873-85.
179. Lazarus JE, Moughamian AJ, Tokito MK, Holzbaur ELF. Dynactin Subunit p150Glued Is a Neuron-Specific Anti-Catastrophe Factor. Pellman D, éditeur. *PLoS Biol*. 16 juill 2013;11(7):e1001611.
180. Kita K. Adenomatous Polyposis Coli on Microtubule Plus Ends in Cell Extensions Can Promote Microtubule Net Growth with or without EB1. *Mol Biol Cell*. 15 févr 2006;17(5):2331-45.
181. Kodama A, Karakesisoglou I, Wong E, Vaezi A, Fuchs E. ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics. *Cell*. 31 oct 2003;115(3):343-54.
182. Al-Bassam J, Chang F. Regulation of microtubule dynamics by TOG-domain proteins XMAP215/Dis1 and CLASP. *Trends Cell Biol*. oct 2011;21(10):604-14.
183. Gardner MK. CENP-E hangs on at dynamic microtubule ends. *Nat Cell Biol*. 2 sept 2013;15(9):1030-2.
184. Ribbeck K. NuSAP, a Mitotic RanGTP Target That Stabilizes and Cross-links Microtubules. *Mol Biol Cell*. 15 mars 2006;17(6):2646-60.
185. Ribbeck K, Raemaekers T, Carmeliet G, Mattaj IW. A Role for NuSAP in Linking Microtubules to Mitotic Chromosomes. *Curr Biol*. févr 2007;17(3):230-6.
186. Li C, Zhang Y, Yang Q, Ye F, Sun SY, Chen ES, et al. NuSAP modulates the dynamics of kinetochore microtubules by attenuating MCAK depolymerisation activity. *Sci Rep*. 6 janv 2016;6:18773.
187. Chen Y, Hancock WO. Kinesin-5 is a microtubule polymerase. *Nat Commun*. 6 oct 2015;6:8160.
188. Wojcik EJ, Buckley RS, Richard J, Liu L, Huckaba TM, Kim S. Kinesin-5: Cross-bridging mechanism to targeted clinical therapy. *Gene*. déc 2013;531(2):133-49.
189. Bechstedt S, Brouhard GJ. Motors and MAPs Collaborate to Size Up Microtubules. *Dev Cell*. juill 2013;26(2):118-20.
190. Walczak CE, Shaw SL. A MAP for Bundling Microtubules. *Cell*. août 2010;142(3):364-7.
191. Fukata Y, Itoh TJ, Kimura T, Ménager C, Nishimura T, Shiromizu T, et al. CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol* [Internet]. 15 juill 2002 [cité 20 sept 2016]; Disponible sur: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncb825>
192. Lin P-C, Chan PM, 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*. 2 déc 2011;286(48):41466-78.
193. Hendricks AG, Lazarus JE, Perlson E, Gardner MK, Odde DJ, Goldman YE, et al. Dynein Tethers and Stabilizes Dynamic Microtubule Plus Ends. *Curr Biol*. avr 2012;22(7):632-7.
194. Akhmanova A, Hoogenraad CC. Microtubule Minus-End-Targeting Proteins. *Curr Biol*. févr 2015;25(4):R162-71.
195. Meunier S, Vernos I. K-fibre minus ends are stabilized by a RanGTP-dependent mechanism essential for functional spindle assembly. *Nat Cell Biol*. 13 nov 2011;13(12):1406-14.
196. Haren L, Gnadt N, Wright M, Merdes A. NuMA is required for proper spindle assembly and chromosome alignment in prometaphase. *BMC Res Notes*. 2009;2(1):64.

197. Maxwell CA. RHAMM Is a Centrosomal Protein That Interacts with Dynein and Maintains Spindle Pole Stability. *Mol Biol Cell*. 21 févr 2003;14(6):2262-76.
198. Thakur HC, Singh M, Nagel-Steger L, Prumbaum D, Fansa EK, Gremer L, et al. Role of centrosomal adaptor proteins of the TACC family in the regulation of microtubule dynamics during mitotic cell division. *Biol Chem [Internet]*. 1 janv 2013 [cité 20 sept 2016];394(11). Disponible sur: <http://www.degruyter.com/view/j/bchm.2013.394.issue-11/hsz-2013-0184/hsz-2013-0184.xml>
199. Wadsworth P. TPX2. *Curr Biol*. déc 2015;25(24):R1156-8.
200. Sharp DJ, Ross JL. Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *J Cell Sci*. 1 juin 2012;125(11):2561-9.
201. Yu W, Qiang L, Solowska JM, Karabay A, Korulu S, Baas PW. The Microtubule-severing Proteins Spastin and Katanin Participate Differently in the Formation of Axonal Branches. *Mol Biol Cell*. avr 2008;19(4):1485-98.
202. Gupta KK, Li C, Duan A, Alberico EO, Kim OV, Alber MS, et al. Mechanism for the catastrophe-promoting activity of the microtubule destabilizer Op18/stathmin. *Proc Natl Acad Sci*. 17 déc 2013;110(51):20449-54.
203. Walczak CE, Gayek S, Ohi R. Microtubule-Depolymerizing Kinesins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 6 oct 2013;29(1):417-41.
204. Etienne-Manneville S. From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players. *Curr Opin Cell Biol*. févr 2010;22(1):104-11.
205. Bornens M. Organelle positioning and cell polarity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. nov 2008;9(11):874-86.
206. Etienne-Manneville S. Microtubules in Cell Migration. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 6 oct 2013;29(1):471-99.
207. Gundersen GG, Cook TA. Microtubules and signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*. févr 1999;11(1):81-94.
208. Liu L-Z, Cheung SCK, Lan L-L, Ho SKS, Chan JCN, Tong PCY. Microtubule network is required for insulin-induced signal transduction and actin remodeling. *Mol Cell Endocrinol*. janv 2013;365(1):64-74.
209. Jo H, Loison F, Luo HR. Microtubule dynamics regulates Akt signaling via dynactin p150. *Cell Signal*. août 2014;26(8):1707-16.
210. Breuss M, Keays DA. Microtubules and Neurodevelopmental Disease: The Movers and the Makers. In: Nguyen L, Hippenmeyer S, éditeurs. *Cellular and Molecular Control of Neuronal Migration [Internet]*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014 [cité 22 sept 2016]. p. 75-96. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7687-6_5
211. Dammermann A, Desai A, Oegema K. The minus end in sight. *Curr Biol*. août 2003;13(15):R614-24.
212. Millecamps S, Julien J-P. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. mars 2013;14(3):161-76.
213. McIntosh JR. Mitosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. sept 2016;8(9):a023218.
214. McEwen BF, Heagle AB, Cassels GO, Buttle KF, Rieder CL. Kinetochore fiber maturation in PtK1 cells and its implications for the mechanisms of chromosome congression and anaphase onset. *J Cell Biol*. 30 juin 1997;137(7):1567-80.
215. Rosenblatt J. Spindle assembly: asters part their separate ways. *Nat Cell Biol*. mars 2005;7(3):219-22.

216. Meunier S, Vernos I. Microtubule assembly during mitosis – from distinct origins to distinct functions? *J Cell Sci.* 15 juin 2012;125(12):2805-14.
217. London N, Biggins S. Signalling dynamics in the spindle checkpoint response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10 oct 2014;15(11):736-48.
218. Musacchio A. The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Curr Biol.* oct 2015;25(20):R1002-18.
219. Tanaka TU. Kinetochore–microtubule interactions: steps towards bi-orientation. *EMBO J.* 15 déc 2010;29(24):4070-82.
220. Etemad B, Kuijt TEF, Kops GJPL. Kinetochore–microtubule attachment is sufficient to satisfy the human spindle assembly checkpoint. *Nat Commun.* 1 déc 2015;6:8987.
221. Lara-Gonzalez P, Westhorpe FG, Taylor SS. The Spindle Assembly Checkpoint. *Curr Biol.* nov 2012;22(22):R966-80.
222. Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer.* mars 2010;10(3):194-204.
223. Dumontet C, Jordan MA. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* oct 2010;9(10):790-803.
224. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer.* avr 2004;4(4):253-65.
225. Snyder JP, Nettles JH, Cornett B, Downing KH, Nogales E. The binding conformation of Taxol in α -tubulin: A model based on electron crystallographic density. *Proc Natl Acad Sci.* 24 avr 2001;98(9):5312-6.
226. Prota AE, Bargsten K, Northcote PT, Marsh M, Altmann K-H, Miller JH, et al. Structural Basis of Microtubule Stabilization by Laulimalide and Peloruside A. *Angew Chem Int Ed.* 3 févr 2014;53(6):1621-5.
227. Zhao Y, Mu X, Du G. Microtubule-stabilizing agents: New drug discovery and cancer therapy. *Pharmacol Ther.* juin 2016;162:134-43.
228. Schiff PB, Horwitz SB. Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine 5'-triphosphate or microtubule-associated proteins. *Biochemistry (Mosc).* 26 mai 1981;20(11):3247-52.
229. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature.* 22 févr 1979;277(5698):665-7.
230. Diaz JF. Molecular Recognition of Taxol by Microtubules. KINETICS AND THERMODYNAMICS OF BINDING OF FLUORESCENT TAXOL DERIVATIVES TO AN EXPOSED SITE. *J Biol Chem.* 18 août 2000;275(34):26265-76.
231. Diaz JF. Fast Kinetics of Taxol Binding to Microtubules. EFFECTS OF SOLUTION VARIABLES AND MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEINS. *J Biol Chem.* 28 févr 2003;278(10):8407-19.
232. Diaz JF, Barasoain I, Souto AA, Amat-Guerri F, Andreu JM. Macromolecular Accessibility of Fluorescent Taxoids Bound at a Paclitaxel Binding Site in the Microtubule Surface. *J Biol Chem.* 4 févr 2005;280(5):3928-37.
233. Barasoain I, García-Carril AM, Matesanz R, Maccari G, Trigili C, Mori M, et al. Probing the Pore Drug Binding Site of Microtubules with Fluorescent Taxanes: Evidence of Two Binding Poses. *Chem Biol.* mars 2010;17(3):243-53.

234. Nogales E, Grayer Wolf S, Khan IA, Ludueña RF, Downing KH. Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. *Nature*. 1 juin 1995;375(6530):424-7.
235. Field JJ, Díaz JF, Miller JH. The Binding Sites of Microtubule-Stabilizing Agents. *Chem Biol*. mars 2013;20(3):301-15.
236. Bollag DM, McQueney PA, Zhu J, Hensens O, Koupal L, Liesch J, et al. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res*. 1 juin 1995;55(11):2325-33.
237. Pryor DE, O'Brate A, Bilcer G, Díaz JF, Wang Y, Wang Y, 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)*. 23 juill 2002;41(29):9109-15.
238. Gaitanos TN. Peloruside A Does Not Bind to the Taxoid Site on α -Tubulin and Retains Its Activity in Multidrug-Resistant Cell Lines. *Cancer Res*. 1 août 2004;64(15):5063-7.
239. Gapud EJ. Laulimalide and Paclitaxel: A Comparison of Their Effects on Tubulin Assembly and Their Synergistic Action When Present Simultaneously. *Mol Pharmacol*. 1 juill 2004;66(1):113-21.
240. Ravelli RBG, Gigant B, Curmi PA, Jourdain I, Lachkar S, Sobel A, et al. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*. 11 mars 2004;428(6979):198-202.
241. 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*. janv 2008;28(1):155-83.
242. Peng LX, Hsu MT, Bonomi M, Agard DA, Jacobson MP. The Free Energy Profile of Tubulin Straight-Bent Conformational Changes, with Implications for Microtubule Assembly and Drug Discovery. *Alber MS, éditeur. PLoS Comput Biol*. 6 févr 2014;10(2):e1003464.
243. Lu Y, Chen J, Xiao M, Li W, Miller DD. An Overview of Tubulin Inhibitors That Interact with the Colchicine Binding Site. *Pharm Res*. nov 2012;29(11):2943-71.
244. Wang Y, Zhang H, Gigant B, Yu Y, Wu Y, Chen X, et al. Structures of a diverse set of colchicine binding site inhibitors in complex with tubulin provide a rationale for drug discovery. *FEBS J*. janv 2016;283(1):102-11.
245. Massarotti A, Coluccia A, Silvestri R, Sorba G, Brancale A. The Tubulin Colchicine Domain: a Molecular Modeling Perspective. *ChemMedChem*. 2 janv 2012;7(1):33-42.
246. Stanton RA, Gemert KM, Nettles JH, Aneja R. Drugs that target dynamic microtubules: A new molecular perspective. *Med Res Rev*. mai 2011;31(3):443-81.
247. Gigant B, Wang C, Ravelli RBG, Roussi F, Steinmetz MO, Curmi PA, et al. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature*. 26 mai 2005;435(7041):519-22.
248. Chen S-M, Meng L-H, Ding J. New microtubule-inhibiting anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs*. mars 2010;19(3):329-43.
249. Cormier A, Marchand M, Ravelli RBG, Knossow M, Gigant B. Structural insight into the inhibition of tubulin by vinca domain peptide ligands. *EMBO Rep*. nov 2008;9(11):1101-6.
250. Boukari H, Sackett DL, Schuck P, Nossal RJ. Single-walled tubulin ring polymers. *Biopolymers*. 5 août 2007;86(5-6):424-36.
251. Kobayashi S, Tsuchiya K, Kurokawa T, Nakagawa T, Shimada N, Iitaka Y. Pironetin, a novel plant growth regulator produced by *Streptomyces* sp. NK10958. II. Structural elucidation. *J Antibiot (Tokyo)*. 1994;47(6):703-7.

252. Prota AE, Setter J, Waight AB, Bargsten K, Murga J, Diaz JF, 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.* juill 2016;428(15):2981-8.
253. Yang J, Wang Y, Wang T, Jiang J, Botting CH, Liu H, et al. Pironetin reacts covalently with cysteine-316 of α -tubulin to destabilize microtubule. *Nat Commun.* 30 juin 2016;7:12103.
254. Usui T, Watanabe H, Nakayama H, Tada Y, Kanoh N, Kondoh M, et al. The Anticancer Natural Product Pironetin Selectively Targets Lys352 of α -Tubulin. *Chem Biol.* juin 2004;11(6):799-806.
255. Prota AE, Bargsten K, Diaz JF, Marsh M, Cuevas C, Liniger M, et al. A new tubulin-binding site and pharmacophore for microtubule-destabilizing anticancer drugs. *Proc Natl Acad Sci.* 23 sept 2014;111(38):13817-21.
256. Pera B, Barasoain I, Pantazopoulou A, Canales A, Matesanz R, Rodriguez-Salarichs J, et al. New Interfacial Microtubule Inhibitors of Marine Origin, PM050489/PM060184, with Potent Antitumor Activity and a Distinct Mechanism. *ACS Chem Biol.* 20 sept 2013;8(9):2084-94.
257. Li J, Li Z-N, Du Y-J, Li X-Q, Bao Q-L, Chen P. Expression of MRP1, BCRP, LRP, and ERCC1 in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Correlation With Response to Chemotherapy and Survival. *Clin Lung Cancer.* nov 2009;10(6):414-21.
258. Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhu P, Deng M, Huang C, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett.* 1 janv 2016;370(1):153-64.
259. Westover D, Li F. New trends for overcoming ABCG2/BCRP-mediated resistance to cancer therapies. *J Exp Clin Cancer Res [Internet].* déc 2015 [cité 28 sept 2016];34(1). Disponible sur: <http://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-015-0275-x>
260. Lhommé C, Joly F, Walker JL, Lissoni AA, Nicoletto MO, Manikhas GM, 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.* 1 juin 2008;26(16):2674-82.
261. Monzó M, Rosell R, Sánchez JJ, Lee JS, O'Brate A, González-Larriba JL, 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.* juin 1999;17(6):1786-93.
262. Rosell R, Scagliotti G, Danenberg KD, Lord RVN, Bepler G, Novello S, et al. Transcripts in pretreatment biopsies from a three-arm randomized trial in metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncogene.* 5 juin 2003;22(23):3548-53.
263. Rouzier R, Rajan R, Wagner P, Hess KR, Gold DL, Stec J, et al. Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7 juin 2005;102(23):8315-20.
264. Gan PP, Pasquier E, Kavallaris M. Class III β -Tubulin Mediates Sensitivity to Chemotherapeutic Drugs in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* 1 oct 2007;67(19):9356-63.
265. Sève P, Dumontet C. Is class III beta-tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents? *Lancet Oncol.* févr 2008;9(2):168-75.
266. Sève P, Dumontet C. [Class III beta tubulin expression in nonsmall cell lung cancer]. *Rev Mal Respir.* avr 2010;27(4):383-6.
267. Kavallaris M, Burkhart CA, Horwitz SB. Antisense oligonucleotides to class III beta-tubulin sensitize drug-resistant cells to Taxol. *Br J Cancer.* juin 1999;80(7):1020-5.

268. Verrills NM, Walsh BJ, Cobon GS, Hains PG, Kavallaris M. Proteome Analysis of Vinca Alkaloid Response and Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia Reveals Novel Cytoskeletal Alterations. *J Biol Chem.* 14 nov 2003;278(46):45082-93.
269. Verrills NM, Po'uha ST, Liu MLM, Liaw TYE, Larsen MR, Ivery MT, et al. Alterations in gamma-actin and tubulin-targeted drug resistance in childhood leukemia. *J Natl Cancer Inst.* 4 oct 2006;98(19):1363-74.
270. 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.* sept 2003;163(3):1109-16.
271. Díaz JF, Buey RM. Characterizing ligand-microtubule binding by competition methods. *Methods Mol Med.* 2007;137:245-60.



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :



D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.



D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.



De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.



Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

PAULINE GILSON

**EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTICANCEREUSE D'UN NOUVEAU DERIVE
PYRROLO-PYRIMIDINE (PP-13) CIBLANT LES MICROTUBULES DANS LES
CANCERS BRONCHO-PULMONAIRES NON-A-PETITES CELLULES
RESISTANTS**

RESUME :

Les cancers broncho-pulmonaires non-à-petites cellules (CBNPC) représentent 85 % des cancers bronchiques et sont associés à un pronostic médiocre. L'efficacité des thérapies anticancéreuses actuelles est notamment limitée par l'émergence de nombreuses résistances, incluant les mécanismes de résistance à l'apoptose. Dans ce contexte, notre équipe a sélectionné, par criblage cellulaire à haut-débit, une famille de dérivés pyrrolo-pyrimidine actifs sur les formes de CBNPC résistantes à l'apoptose. Notre objectif est de caractériser ces dérivés afin d'identifier un potentiel candidat-médicament pour le traitement des CBNPC résistants.

Parmi ces composés, la molécule PP-13 présente un grand potentiel thérapeutique en raison de ses effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques sur un large panel de lignées cancéreuses pulmonaires, avec une IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire. PP-13 induit un blocage mitotique transitoire en perturbant l'organisation et la dynamique des microtubules. Il en résulte un glissement mitotique, une aneuploïdie ou la mort cellulaire directe par apoptose. Nos études mécanistiques ont mis en évidence la liaison directe de PP-13 sur la tubuline, au niveau du site de liaison de la colchicine. De façon intéressante, nous avons observé *in vivo* que PP-13 réduit la croissance tumorale et l'invasion métastatique sans induire d'effet toxique détectable.

Nous avons ainsi identifié un agent ciblant les microtubules capables de restaurer l'apoptose dans des modèles résistants de CBNPC. L'efficacité thérapeutique de PP-13 sur de nombreuses lignées représentatives d'autres cancers humains renforcent son intérêt clinique pour le traitement de nombreux cancers.

LES MOTS CLES : cancers broncho-pulmonaires non-à-petites cellules (CBNPC), résistance, apoptose, dérivés pyrrolo-pyrimidine, criblage cellulaire à haut débit, antimitotique.

ADRESSE : [Données à caractère personnel]

FILIERE : Pharmacie, D.E.S Innovation Pharmaceutique et Recherche