

UE11 –Parcours Biologie et génétiq ue – cours n° 2 24 octobre 2018 Pr Christian Poüs christian.pous@u-psud.fr	RT : Victoire Lenormand et Xavier Wagner RL : Juliette Vernay
---	---

Dynamique microtubulaire : physiologie et ciblage thérapeutique

Plan :

I. Introduction

II. Bases du système

- A. Définitions
- B. Instabilité dynamique
- C. Le centrosome
- D. Molécules associées au microtubule

III. Agents pharmaceutiques

- A. Inhibiteurs des microtubules
- B. Agents mitotiques
- C. Dynamique des microtubules en mitose

IV. Ciblage thérapeutique de la dynamique microtubulaire dans les cancers

- A. Ciblage de la néoangiogenèse et de la migration cellulaire
- B. Microfilaments d'actine et structure du cytosquelette
- C. Expériences relatives à la dynamique microtubulaire
- D. Les agents antimitotiques, entre effets indésirables et perspectives thérapeutiques nouvelles

OBJECTIFS DU COURS :

→Comprendre les notions de dynamique du cytosquelette de microtubules et de microfilaments en lien avec les événements de la vie cellulaire ; en connaître les acteurs.

→Aborder la notion de ciblage et d'innovation thérapeutique concernant la dynamique microtubulaire dans les cancers, ainsi que le problème soulevé en thérapeutique par le phénomène de résistance aux agents antimitotiques.

I. Introduction

Nous allons parler de physiopathologie et de ciblage thérapeutique à propos de médicaments qui sont des antimitotiques en thérapie anticancéreuse. Ils ciblent un réseau du cytosquelette : les microtubules, dont on va étudier le fonctionnement.

Dans la cellule on a des composants du cytosquelette qui sont en interaction les uns avec les autres, permettant de déterminer de nombreuses propriétés (architecture, morphologie, différenciation, interactions...). Le cytosquelette est constitué :

- Du réseau microtubulaire
- Des filaments d'actine (associées aux microtubules)
- Des filaments intermédiaires

Les microtubules permettent à la cellule d'explorer son cytoplasme, nécessaire pour assurer les fonctions biologiques. Cela permet **d'organiser les organites** (Golgi, mitochondries). Cette fonction repose sur des activités motrices de **polymérisation et dépolymérisation**. Les microtubules peuvent aussi former un **fuseau mitotique**, qui permet d'aligner et ségréger les chromosomes lors de la division cellulaire (mitose).

Les microtubules sont étudiés en tant que **cibles thérapeutiques**, ce qui est complexe car les molécules utilisées en thérapeutique sont très diverses. Même si la tubuline est la cible, au cœur de l'architecture, elle possède aussi des sites de liaisons et ces sites impactent sur le comportement du réseau. De plus il existe une grande diversité des mécanismes mis en jeu et qui touchent les systèmes. Il faut alors connaître la façon dont la cible thérapeutique fonctionne sur le plan physiologique tout d'abord.

II. Bases du système

A. Définitions

Les microtubules sont des **polymères de tubuline**. La tubuline est elle-même un dimère composé de deux molécules de tubulines α et β , associées au moment de leur biogénèse et non dissociées par la cellule jusqu'à sa dégradation.

L'organisation spatiale des **molécules α et β** ont une poche pour lier le GTP ou le GDP :

- L' α -tubuline est associée au GTP et la poche est refermée, le GTP ne peut plus la quitter.
- Sur la β -tubuline, le GTP peut partir de la poche qui est un **site échangeable (site de liaison disponible)**

Deux états coexistent : l'état tubuline-GTP et tubuline-GDP. Cette tubuline à l'état GTP est la forme nécessaire à l'assemblage des microtubules sous forme de polymères : elle permet de former une structure.

Cette organisation est un cylindre creux constitué par l'assemblage latéral de **protofilaments**. Il faut en moyenne 13 protofilaments dans la cellule pour former un microtubule et ces protofilaments sont exposés de façon linéaire dans le même sens : l'extrémité (-) expose l' α -tubuline et l'extrémité (+), favorable à l'assemblage, expose la β -tubuline. Il existe donc une **polarité**.

B. Instabilité dynamique

Lorsqu'une nouvelle molécule est ajoutée au polymère, elle s'ajoute à la chaîne, elle forme un contact et ce contact stimule l'hydrolyse du GTP fixé à la β -tubuline précédente. Les molécules de tubuline in fine seront toutes en état GDP, sauf les tubulines à l'extrémité qu'on appelle la **coiffe tubuline-GTP**.

La structure du microtubule est en fait aplatie et ouverte au bout, c'est un feuillet qui recrute les tubulines GTP. Les bords de ce feuillet vont se rapprocher au fur et à mesure de la croissance pour former le cylindre.

Les tubulines ne sont pas recrutées indéfiniment, il est possible de perdre la coiffe et cela mène vers un état de dépolymérisation : c'est la **catastrophe** (la dépolymérisation est plus rapide que l'assemblage). Les microtubules ont alors une structure plus labile, se courbent vers l'extérieur, libèrent des tubulines et GTP. Après la catastrophe on va régénérer le GTP. La dépolymérisation peut être interrompue pour repartir en croissance : c'est le **sauvetage**.

Exemple : on a in vitro une cellule avec des microtubules marqués avec de la fluorescence. On enregistre au cours du temps des variations : des microtubules croissent et décroissent.

Les phases de polymérisation et de dépolymérisation se succèdent, et ce de façon **indépendante**. Le comportement est **dynamique**, représenté de manière simple sur un graphique : **phase de croissance, catastrophe, sauvetage puis dépolymérisation (dynamisme instable)**. Cela n'a pas lieu de manière infinie, on peut remplacer un microtubule par un autre.

Ce phénomène d'instabilité est observé à la fois in vitro et in vivo. En étudiant les longueurs des microtubules, il est possible de déterminer des **paramètres d'instabilité dynamique** :

- La vitesse d'assemblage
- La vitesse de dépolymérisation
- La fréquence des catastrophes
- La fréquence des sauvetages

On propose alors un modèle simple d'instabilité dynamique : un microtubule en phase de croissance recrute des tubulines et du GTP, on forme le microtubule et la coiffe. La perte de cette coiffe entraîne la dépolymérisation.

C. Le centrosome

Le **centrosome** est un petit organite comprenant deux structures, les centrioles, organisées de manière complémentaire et perpendiculaire. Autour de ces deux centrioles qui contrôlent le cycle cellulaire et la différenciation, se trouvent du matériel **péri-centriolaire**, contenant des protéines accessoires et des **complexes annulaires de γ -tubulines**. La γ -tubuline est utilisée par la cellule comme matrice pour permettre l'initiation de la polymérisation de nouveaux microtubules : c'est la **nucléation**. L'interaction entre les anneaux de γ -tubuline et les microtubules s'effectuent par un contact entre les tubulines. L'extrémité (-) ne peut donc pas se dépolymériser à cet endroit (ce qui se passerait s'il était libre dans la cellule) car il interagit avec les anneaux (possédant 13 sous-unités de γ -tubuline, d'où les 13 protofilaments).

Les anneaux sont donc concentrés autour du centrosome mais peuvent être recrutés au Golgi par exemple, ils ont des propriétés particulières quant à la migration cellulaire.

D. Molécules associées au microtubule

- **Régulateurs de la dynamique** : Une fois que les microtubules sont en place, d'autres protéines peuvent interagir avec.
 - **MAPs structurales** : ce sont des molécules qui vont co-polymériser avec la tubuline afin de la stabiliser. Elles peuvent interagir avec plusieurs sous-unités de tubuline voisines, cela agit comme un « ciment ».
 - **MAPs motrices** : elles peuvent marcher sur le corps du microtubule, soit vers l'extrémité (+) et on parle alors des **kinésines**, soit vers l'extrémité (-) et on parle alors des **dynéines**. Ces protéines régulent le comportement dynamique des microtubules dans la cellule.
 - **+TIPs** : ce sont des protéines qui peuvent suivre l'extrémité (+) des protéines. Elles ont un comportement particulier in vivo. Elles régulent la dynamique et peuvent contrôler la fermeture du tube, les catastrophes, les sauvetages... **EB1** (end binding protein 1) est une +TIP importante qui peut recruter des MAPs. Celles-ci fonctionnent en recrutant des protéines possédant un **domaine EBH (SXIP)** pour les recruter vers l'extrémité (+). De plus, EB dans son domaine C-ter a aussi un **domaine EEY/F** qui mime l'extrémité C-ter du microtubule et qui peut recruter des protéines possédant un **domaine CAP-Gly**.

Propriété du « Treadmilling » : il s'agit d'une propriété particulière des microtubules. A un moment une rupture interne a lieu dans le microtubule : cela génère une nouvelle extrémité (+) et un fragment libre avec deux nouvelles extrémités. A l'extrémité (+) on va polymériser et à l'extrémité (-) on va dépolymériser : cela forme un « tapis roulant », cela donne l'impression qu'il y a une onde de polymérisation qui se propage vers la périphérie mais les molécules de tubuline restent en fait au même endroit (pas de propagation vers le cytoplasme) et sont libérées au même endroit.

Des enzymes dans le cadre du treadmilling favorisent le clivage des microtubules : la **katanine** et la **spastine** peuvent créer des brèches dans le microtubule. On pense que ces deux molécules accrochent l'extrémité C-ter et permettent de réaliser une hydrolyse.

Illustration : si on fait exprimer EB1 à des cellules vivantes, on a l'impression d'avoir des « comètes » qui se propagent à l'extrémité (+), la protéine EB1 réalise en fait un treadmilling également.

- **EB** est un facteur anti-catastrophe et peut participer à la stabilisation d'autres microtubules, en présence d'**APC** : APC est un gène muté dans les cancers du colon et peut s'associer à une formine (mDia) impliquée dans l'assemblage des microfilaments d'actine. Elle peut constituer un système de coiffe pour bloquer l'extrémité des microtubules. L'APC peut être également acheminée à l'extrémité (+) par les kinésines.
- **CLIP-170**, recrutée par le domaine C-ter d'EB, est un facteur de sauvetage qui permet de continuer la polymérisation. Dans les cellules sans CLIP-170, les microtubules dépolymérisent de façon irréversible jusqu'à sortir du réseau. Ce sauvetage permet de promouvoir la re-polymérisation dans une autre direction et de changer la direction de migration d'une cellule.
- Il existe des molécules qui peuvent promouvoir la déstabilisation :
 - La **stathmine** va séquestrer la tubuline soluble. Elle séquestre deux dimères de tubulines-GTP. C'est un facteur défavorable à l'assemblage.
 - **MCAK** est une kinésine déstabilisant les microtubules. Au moment de la dépolymérisation, les protofilaments se recourbent grâce à MCAK qui recrute la **kinésine-13**. Elles vont recourber le microtubule vers la périphérie afin de mieux le déconstruire. MCAK se concentre aux deux extrémités, qui se rapprochent.

La formation des microtubules est donc le résultat de nombreux facteurs, et la cellule est maintenue par ce facteur.

III. Agents pharmaceutiques

A. Inhibiteurs des microtubules

Nous verrons d'abord là où ils agissent (sur le corps des tubulines et sur leurs extrémités), puis nous verrons leurs propriétés.

- La **colchicine** forme un complexe avec RB3. **RB3** (analogue de la stathmine) est constitué de nucléotides liés à α et β et va interagir à l'intérieur même du dimère. Lorsque cette molécule de colchicine est présente entre α et β du même dimère, on a un arc imposé par la liaison avec RB3, or la tubuline a besoin de se redresser pour être compétente en matière d'assemblage. La colchicine est **anti-polymérisante**. A la faveur des catastrophes, des microtubulines dépolymérisent : les sous-unités sont libérées par les protéines colchicine et la croissance s'arrête. La colchicine peut être incorporée dans les microtubules pendant leur polymérisation puis la bloquer, mais il faut avoir une quantité suffisante de drogues pendant un temps assez long dans la cellule pour que cela ait lieu. Cependant il suffit d'une quantité faible de drogues pour pouvoir séquestrer des tubulines.
- Le **taxol**, très connu, est utilisé pour créer des cristaux de tubuline. Le taxol est une molécule se lie à la β -tubuline et a une action **pro-polymérisante**. Le taxol augmente la concentration de microtubules et on observe alors des aiguilles caractéristiques dans la

cellule, qui sont des accumulations de microtubules. Encore une fois les concentrations utilisées sont fortes.

- **La vinblastine**, extraite de la pervenche de madagascar et très utilisé dans le traitement contre les cancers, est logée entre α et β de deux dimères voisins et **bloque leur interaction**. Cela génère des **anneaux spiralés de tubuline**, permettant l'assemblage des molécules de tubuline. La vinblastine se comporte comme un agent **anti-polymérisant** (comme la colchicine ou le nocodazole). En présence de vinblastine on diminue la masse du réseau et après une exposition longue on finit par faire quand même disparaître le réseau.

De plus, les chercheurs envisagent d'utiliser le **nocodazole** à plus faible dose. Les chercheurs traitent les cellules avec et on observe que les microtubules se sont stabilisés (cela rejoint l'effet du taxol) mais ne sont pas détruits : ces effets sont observés avec des **concentrations submicromolaires**.

Exemple 1 : une à deux molécules de vinblastine dans les microtubules suffisent à réduire de 50% le treadmilling et l'instabilité dynamique.

*Exemple 2 : une molécule se lie à un endroit entre une tubuline α et une tubuline β du dimère suivant : c'est l'**éribuline**. On observe la molécule d'éribuline fluorescente et on voit qu'une extrémité des microtubules est porteuse de la fluorescence, c'est l'extrémité (+). L'éribuline bloque la tubuline β et se comporte comme une coiffe pour empêcher une nouvelle incorporation mais en même temps **elle stabilise le microtubule**. Cette incorporation est observée avec d'autres molécules comme le taxol.*

B. Agents mitotiques

Concernant les **molécules antimitotiques**, les mêmes inhibiteurs sont utilisés mais pendant la mitose. Quand les cellules sont traitées à des concentrations très faibles en inhibiteurs et qu'elles entrent en mitose, des chromosomes ne sont pas ségrégués ou organisés en même temps que les autres. Cela empêche la cellule à passer le point de contrôle mitotique, qui est un signal. Si ce signal pour passer à l'anaphase, à savoir la **ségrégation**, n'est pas activé, alors la cellule est bloquée et entre en apoptose, sauf si la cellule est tumorale avec un matériel génétique anormalement réparti (aneuploïdie).

Rappel :

- *prophase = mise en place du fuseau mitotique*
- *métaphase = alignement des chromosomes dupliqués à la plaque équatoriale*
- *anaphase = séparation des deux chromatides de chaque chromosome qui migrent vers les pôles cellulaires*
- *télophase = constitution des deux cellules filles*

Un moteur moléculaire (**kinésine 1**) va se déplacer vers une extrémité (+) en transformant l'énergie chimique de l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique. Elle possède des têtes

motrices, les chaînes lourdes, qui lient l'ATP et peuvent l'hydrolyser, ce qui change leur conformation. Ce sont les « pieds », permettant de se déplacer sur le corps du microtubule. On a des chaînes légères qui permettent le transport de vésicules.

Les kinésines sont une famille de protéines codées par 45 gènes, et donnant MCAK et la kinésine 1 entre autres. La kinésine 1 est homotétramérique et intervient surtout au cours de la mitose. Elle peut « marcher » sur deux microtubules simultanément vers l'extrémité (+).

C. Dynamique des microtubules en mitose

Concernant la **dynamique microtubulaire en mitose**, il existe des remaniements qui augmentent d'abord l'intensité de la dynamique des microtubules, ce qui est nécessaire pour leur réorganisation pour former un fuseau mitotique et leur capacité à être capturé par des chromosomes dupliqués.

Dans les régions centromériques, il y a deux **kinétochores** par chromosome : ces kinétochores vont accrocher des faisceaux de microtubules.

A propos du centrosome : au moment de la métaphase, il y a la **séparation de deux asters** organisés autour du centrosome qui aura été dupliqué pendant la phase S.

A propos des microtubules : au moment de la prométaphase, l'enveloppe nucléaire s'ouvre et les microtubules entrent en contact avec les chromosomes. Les microtubules pourraient accrocher les chromosomes par les kinétochores mais en fait Ran-GTP **active les anneaux de γ -tubuline**, et c'est cette action qui génère des extrémités (+) qui peuvent s'accrocher aux kinétochores. Des interactions s'opèrent alors latéralement entre ces extrémités (+). Les microtubules peuvent ensuite s'allonger et accrocher les chromosomes aux asters du fuseau.

Au milieu du fuseau mitotique, les microtubules sont **anti-parallèles** par rapport à leurs extrémités (+). A cet endroit, entre les microtubules, se trouvent des kinésines tétramériques avec 4 têtes motrices, qui appartiennent à la famille des **kinésines 5** permettant la mise en place du fuseau. Les têtes des kinésines vont se déplacer vers l'extrémité (+) sur chaque microtubule, cela va **éloigner les microtubules** qui glissent l'un par rapport à l'autre. Les pôles du fuseau sont alors écartés les uns des autres, cela minimise le risque d'embarquer un morceau de chromosome dans la mauvaise cellule fille.

A l'extrémité (-) se trouvent des dynéines qui permettent de rapprocher ces extrémités entre elles et de tracter le fuseau vers la périphérie. La **protéine NUMA** permet d'associer deux moteurs dynéines entre eux pour rendre leur action plus efficace.

Du treadmilling a alors lieu grâce à la **katanine**, générant ainsi de nombreuses extrémités (-). Les extrémités des microtubules à cet endroit sont donc plus libres : ce phénomène pendant la mitose est appelé le **flux polaire de tubuline**. Du côté de l'extrémité (+) on assemble les microtubules et à l'extrémité (-) on réalise du treadmilling : les molécules de tubulines bougent d'une extrémité à l'autre tandis que les microtubules restent immobiles. **L'incorporation génère un flux vers les pôles**. Il faut faire attention au fait que le treadmilling est sensible aux drogues antimitotiques, il faut donc vérifier que chaque brin est associé à un microtubule avant de continuer en vue de l'anaphase.

IV. Ciblage thérapeutique de la dynamique microtubulaire dans les cancers

A. Ciblage de la néoangiogenèse et de la migration cellulaire

Quelles que soient leurs propriétés à plus forte concentration, **les agents antimitotiques ont un effet stabilisateur sur les microtubules quand ils sont à des concentrations submicromolaires (0,1 - 1 μ M)**, impactant négativement le treadmilling et l'instabilité dynamique des microtubules. En particulier, le flux polaire de tubulines s'en trouve affecté au cours de la mitose, ce qui pose problème pour le passage du point de contrôle métaphase-anaphase du fait d'un défaut de répartition des chromosomes (aneuploïdie) qui peut être à l'origine d'une mort cellulaire retardée si la cellule résiste à l'apoptose.

En passant en revue la littérature scientifique par des méta-analyses, on peut constater que **l'index mitotique** (= nombre de cellules en mitose / 1000 cellules) moyen est extrêmement faible ($\sim 5/1000$), quel que soit le cancer (sein, ovaire, cervix, prostate).

Il existe donc un fossé entre l'efficacité de certaines molécules comme les taxanes sur les cellules en mitose et leur capacité réelle à impacter la progression d'un cancer in vivo, d'où la publication de l'article suivant : « Mitosis is not a key target of microtubule agents in patient tumors » (Nature Reviews Clinical Oncology, 2011).

Ainsi, s'il faut toujours chercher à agir sur les cellules en mitose, ce sont maintenant les fonctions cellulaires dépendant des microtubules chez les cellules en interphase que l'on cherche à cibler davantage par les Microtubules Targetting Agents (MTA) : signalisation, autophagie, trafic vésiculaire, apoptose mais aussi et surtout **vascularisation tumorale et migration cellulaire**.

Les tumeurs en phase de croissance sont capables de néoangiogenèse pour permettre leur alimentation en nutriments et en oxygène. En effet, des cellules attractrices sont à l'origine d'une signalisation médiée par **VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)**, qui entraîne la **prolifération et la migration coordonnées de cellules endothéliales** de façon à créer des néovaisseaux et capillaires rejoignant la vascularisation préexistante.

En induisant une néoangiogenèse in vitro, on observe la formation de tubes composés de cellules endothéliales pour former des structures arborescentes essentielles à la croissance tumorale. En effet, si les cellules tumorales situées en périphérie ont une alimentation suffisante en oxygène et en nutriments, celles situées au centre ne sont que faiblement alimentées et sont plus à risque de nécrose. On comprend alors le **rôle-clef de la néoangiogenèse dans la survie et la prolifération des cellules tumorales**, et par conséquent dans l'augmentation de la masse tumorale.

La vascularisation tumorale repose sur les propriétés des cellules endothéliales recrutées par les cellules épithéliales à l'origine des adénocarcinomes. Or les cellules endothéliales disposent elles aussi d'un réseau de microtubules. Pourtant, à la surprise des chercheurs, elles ne présentent pas nécessairement la même réponse aux agents que les cellules cancéreuses. Cette

réponse cellulaire diffère aussi en fonction de la concentration en Microtubules Targeting Agents (MTA) utilisée.

La **cilbretastatine** et le **N-acétylcolchicinol-O-phosphate** (dérivé de la colchicine) sont des composés qui se lient au site de liaison de la colchicine sur la tubuline. Ces molécules, actuellement en essai clinique, présentent surtout un **effet antivasculaire** plutôt qu'un effet antitumoral à proprement parler, mais pour des concentrations du même ordre de grandeur, c'est-à-dire submicromolaires. Elles entraînent la dépolymérisation des microtubules des cellules endothéliales, perturbent considérablement la néoangiogenèse, engendrent un phénomène de blebbing avec détachement de la matrice extra-cellulaire et entraînent une mort particulière des cellules sans apoptose (les cellules dans ce dernier cas présentent toutefois des caractéristiques apoptotiques). Quand on traite des cellules animales par des composés de cette nature, on observe très rapidement une réduction considérable du flux sanguin à travers les néovaisseaux : **in vitro, 1h de traitement suffit à réduire de plus de 95% le débit sanguin.**

B. Microfilaments d'actine et structure du cytosquelette

L'actine G globulaire lie l'ATP et se polymérise en actine F. Il y a alors formation de structures à **deux protofilaments** avec une certaine plasticité dans l'assemblage selon la nature des protéines liant les filaments entre eux. On constate en effet une **modulation de la viscosité du cytoplasme** selon que les microfilaments d'actine sont liés en réseaux lâches, en faisceaux (structures plus rigides), en réseaux arborescents lors de la migration cellulaire...

Comme pour les microtubules, on constate une polarité des microfilaments d'actine : **polymérisation d'actine-ATP à l'extrémité (+)** d'aspect barbé qui part en pointes, hydrolyse de l'ATP et libération d'actine-ADP à l'extrémité (-). Par ces polymérisations et dépolymérisations, les microfilaments d'actine sont capables de **treadmilling** mais, contrairement aux microtubules, elles ne sont pas concernées par le phénomène d'instabilité dynamique.

La plasticité de l'agencement des microfilaments d'actine à l'intérieur de la cellule permet une grande variation de l'organisation cellulaire. Une cellule adhérente à son support, présente au repos des fibres de stress ou fibres de tension, sortes de câbles pour renforcer les points d'ancrage de la cellule à son support. En réponse à des stimuli, on constate des vagues ondulantes d'actine polymérisée qui se propagent sous la membrane, affectant la morphologie cellulaire de façon importante. **Les vagues d'actine sous-membranaire sont caractérisées par un mouvement d'ondulation, tandis que les fibres de stress demeurent immobiles.** Il est à noter que les microfilaments d'actine sont assemblés grâce à des **facteurs de nucléation et d'élongation** (par l'extrémité (+)) comme les **formines (mDia)** qui jouent ainsi un rôle important dans la formation de ces vaguelettes sous-membranaires.

La disposition de l'actine est complètement différente lors de la migration cellulaire : **l'actine est alors concentrée au niveau du front de migration sous la membrane plasmique, à l'extrémité du lamellipode.** Il y a constitution d'un réseau anastomosé d'actine grâce à l'activation de certains facteurs se liant aux microfilaments préexistants puis nucléation et élongation de nouveaux microfilaments d'actine avec un angle bien précis (**70°**) permettant la formation d'une structure arborescente : on parle de **polymérisation dendritique de l'actine.**

L'actine s'assemble ainsi à l'avant du front de migration et, par la mise en place d'un recyclage de l'actine-ADP en actine-ATP à l'arrière, le treadmilling de l'actine permet le maintien de la direction de migration, assuré par la coordination entre la poussée membranaire (formation de lamellipodes) et la capacité de la cellule à créer de nouveaux sites d'ancrage à la matrice extracellulaire. La contraction de la myosine II dans les fibres de stress permet ensuite la migration cellulaire de telle sorte que les adhésions les plus récentes se situent à l'avant de la cellule et les plus anciennes à l'arrière. Ces **régions d'adhérence focale** à la matrice extracellulaire, **situées à l'extrémité des fibres de stress**, sont le fait de molécules de type **intégrines présentes à la membrane cellulaire** qui s'accrochent à des protéines de la matrice extracellulaire. Dans le cas des tumeurs, la migration cellulaire est d'autant plus importante qu'elle concerne la néoangiogenèse par migration coordonnée et prolifération des cellules endothéliales, mais aussi les cellules tumorales et les fibroblastes qui leur sont associés dans un contexte de croissance tumorale et potentiellement de dissémination métastatique.

L'orientation de la migration cellulaire se fait par repositionnement du noyau par rapport au centrosome (pour ce faire, des dynéines tirent l'enveloppe nucléaire le long des microtubules) avec coordination par une petite protéine G appartenant à la famille CDC42. Le repositionnement du centrosome et de l'appareil de Golgi se fait entre le noyau et le front de migration (dont la direction est déterminée par chimiotaxie, par exemple). On ne sait pas encore très bien s'il y a mouvement du centrosome et de l'appareil de Golgi ou si c'est le noyau qui recule (ou les deux ?) mais le résultat est le suivant :

AXE DE MIGRATION = ----**NOYAU**-----**CENTROSOME+GOLGI**-----**FRONT DE MIGRATION**---->

Les microtubules émis par le centrosome et par l'appareil de Golgi vont venir cibler les adhésions focales (sites d'ancrage permettant à la cellule de se tracter) en cours de construction. Les microtubules recrutent **APC** et s'associent aux fibres de stress. L'adhérence focale est d'abord naissante, puis en cours de maturation par recrutement de **ACF7 (famille des spectraplakines)** qui sert à unir différents éléments du cytosquelette, puis **CLASP (partenaire de CLIP-170)** permet l'interaction des microtubules avec les protéines des adhésions focales (ex. zixin, paxillin, cf. immunofluorescences) de sorte que les microtubules restent assez longtemps au contact de ces adhésions focales en cours de maturation. **Les microtubules ont pour rôle d'acheminer le matériel nécessaire pour la construction et la dissociation des adhésions focales** et donc globalement contribuent au turnover de ces adhésions, capacité de la cellule à faire disparaître les anciennes adhésions focales pour en créer de nouvelles (cf. vidéogramme d'immunofluorescence où l'on voit des microtubules cibler systématiquement des adhésions focales dans un laps de temps très court, de l'ordre de la minute).

C. Expériences relatives à la dynamique microtubulaire

Afin de mesurer la migration cellulaire, on réalise un **test de blessure** : on raye avec une pointe de pipette une monocouche de cellules en culture de manière à arracher des cellules et générer un espace vide qui doit être colonisé de nouveau par les cellules au cours du temps. On mesure

la fermeture de la blessure (par migration cellulaire) à des temps différents, sans conclure toutefois à propos de la vitesse de leur déplacement.

Expérience témoin : Fermeture de la blessure en quelques dizaines de minutes.

+ Taxol à faible concentration : Pas de grande différence avec le témoin.

+ Taxol à forte concentration : Inhibition de la migration cellulaire.

N.B. : Dans les expériences suivantes, on emploie indifféremment le **Taxol**/paclitaxel (USA) et le **Taxotère**/docétaxel (France) qui se lient au même site des taxanes sur la tubuline et présentent des propriétés assez similaires malgré quelques petites différences.

On analyse ensuite la **trajectoire des noyaux au cours du temps** et l'on observe, de manière dose-dépendante, une baisse de la distance mais aussi de la direction de la migration (cf. *distance parcourue perpendiculairement à la blessure (en μm)*). On constate en outre une diminution de la vitesse de migration (en $\mu\text{m}/\text{min}$), là encore de manière dose-dépendante.

Immunofluorescence avec anticorps anti-Paxillin (marqueur des adhérences focales) :

De manière dose-dépendante, les microtubules ne vont plus jusqu'à la périphérie des cellules et s'organisent différemment. Il y a alors changement de morphologie de la cellule, qui s'arrondit. On constate aussi que les adhérences focales, petites et punctiformes à l'état basal, voient leur taille s'accroître de manière dose-dépendante. Cela témoigne d'un **défaut de dissociation des adhérences focales (du fait que les microtubules n'achèment plus du matériel pour ce faire), empêchant la migration**. La cellule s'arrondit alors car elle devient incapable d'émettre des prolongements cytoplasmiques.

Le taxol n'a en revanche **pas d'influence sur le positionnement du centrosome et de l'appareil de Golgi** selon l'axe de migration cellulaire.

Après traitement par la vinflunine (1nM), on constate une perte complète des « comètes » EB1 du fait de son influence sur la dynamique microtubulaire. Ainsi, il y a perte du ciblage des adhérences focales par les microtubules au cours de la migration, et donc plus de dissociation des adhérences focales, ce qui impacte négativement la migration cellulaire.

Ainsi, les **taxanes et vinca-alkaloïdes** impactent non seulement la dynamique microtubulaire mais aussi, de manière indirecte, le fonctionnement des adhérences focales dans un contexte de migration.

Après traitement par vinflunine ou paclitaxel à très faible concentration (2-5nM), on constate une accélération de la dynamique des microtubules dans les cellules endothéliales. À des concentrations plus importantes (submicromolaires, de l'ordre de 100 nM), on observe une stabilisation des microtubules.

Une trop grande accélération de la dynamique microtubulaire peut être aussi délétère que son trop grand ralentissement. On peut parfois observer une **résistance des lignées cellulaires à certains Microtubules Targetting Agents (MTA)** : in vitro, on peut rendre des cellules dépendantes au taxol en les exposant à de toutes petites doses de taxol augmentées régulièrement (et pas trop fréquemment) de manière à ce que l'on soit toujours sous l'IC50 (= concentration inhibitrice médiane, concentration tuant 50% des animaux à 7 jours). On observe

alors une accélération de la dynamique microtubulaire, comme pour compenser les effets stabilisateurs du taxol.

Mais si l'on prive brusquement ces cellules de taxol, on observe une rupture de l'équilibre qui s'était fait avec le taxol et la dynamique cellulaire alors trop accélérée (par la modification de l'expression de protéines qui contrôlent cette dynamique) entraîne la mort cellulaire.

On peut donc conclure que des concentrations submicromolaires (« stabilisatrices ») de taxanes ou de vinca-alcaloïdes (**>10 nM et <1µM**) entraînent une **diminution de la dynamique microtubulaire** par stabilisation des microtubules, une perturbation des fonctions mitotiques, l'inhibition de la prolifération cellulaire ainsi que la mort cellulaire.

À de très faibles concentrations (« antiangiogéniques ») de taxanes ou de vinca-alcaloïdes (**<10 nM**), on constate en revanche une **augmentation de la dynamique microtubulaire** qui perturbe le fonctionnement cellulaire non seulement en mitose mais aussi en interphase, une altération de la morphologie et de la mobilité des cellules, ainsi que des effets antiangiogéniques.

D. Les agents antimittotiques, entre effets indésirables et perspectives thérapeutiques nouvelles

Les agents antimittotiques présentent un risque **d'effets indésirables au niveau neurologique**, à cause de l'importance du transport antérograde entre corps cellulaire et extrémité synaptique des neurones, fortement basé sur l'action du cytosquelette et en particulier des microtubules du fait de la nécessité de vectoriser des organites et des vésicules de transport de neurotransmetteurs le long d'un axone pouvant atteindre l'ordre du mètre. Même si l'on tue des cellules cancéreuses en cours de prolifération, on risque de beaucoup affecter les neurones. On peut ainsi observer des **neuropathies axonales périphériques** cumulatives en fonction de la dose reçue, avec une aggravation possible si le patient présente un terrain favorable comme l'alcoolisme ou le diabète. Les agents antimittotiques peuvent aussi provoquer des effets indésirables intestinaux (ex. constipation du fait d'une paralysie intestinale) liés à des effets sur le système nerveux autonome. Ces effets indésirables constituent des causes d'arrêt et, le cas échéant, de changement du traitement. Ils sont en principe **réversibles en quelques mois, voire quelques semaines après l'arrêt du traitement, de manière spontanée.**

En revanche, les agents antimittotiques n'ont que peu d'effet sur les neurones du système nerveux central, du fait de la barrière hémato-encéphalique. En effet, ils sont substrats des pompes *MultiDrug Resistant* (MDR) de type **Pgp/MDR1 (protéine d'efflux de la famille des transporteurs ABC)**. Ces systèmes d'exfiltration des xénobiotiques hors des cellules sont responsables d'un phénomène de résistance thérapeutique. Les agents antimittotiques peuvent occasionner une toxicité myéloïde comme toutes les chimiothérapies. On soupçonne aussi un risque de cancer induit, encore à confirmer.

On connaît par expérience certaines spécificités des agents antimittotiques, sans toutefois avoir d'explications biochimiques précises à ce sujet : par exemple, le taxol est très efficace sur les tumeurs ovariennes, sur les cancers du sein et sur les cancers du poumon à petites cellules mais il est inopérant dans le cancer du colon, le cancer du rein...

De même, les vinca-alcaloïdes sont particulièrement efficaces sur les tumeurs hématologiques, mais pas sur les tumeurs solides. Est-ce là une question de biodisponibilité, de pénétration dans la cellule ciblée, d'efflux? Il ne s'agit vraisemblablement pas que de problèmes liés à la pharmacocinétique.

Il faut aussi distinguer résistance intrinsèque et résistance acquise en considérant :

- les phénomènes de surexpression des transporteurs ABC dont la P-glycoprotéine (gène MDR1),
- l'altération de tout un ensemble de modifications post-traductionnelles de la tubuline (altérations structurales),
- les mutations et modifications dans le profil d'expression des divers isotopes de tubuline (les tubulines α et β sont codées par 6 ou 7 gènes différents) qui ne présentent pas la même sensibilité aux médicaments (constantes d'affinité différentes),
- les mutations et modifications de l'expression de certains facteurs régulateurs de la dynamique des microtubules comme la stathmine ou MAP4...

En ce qui concerne les agents antiméiotiques, il y a toujours de gros efforts de recherche et développement dans l'industrie pharmaceutique : **screening (beaucoup de molécules abandonnées en cours de route, études de relation structure-activité** pour faire émerger des molécules d'intérêt (candidats médicaments), sélection de molécules présentant des **propriétés d'intérêt vis-à-vis des facteurs de résistance** (ex. insensibilité à l'efflux provoqué par Pgp), etc. Beaucoup de molécules sont abandonnées en cours de route et peu d'entre elles atteignent la phase 3 (éribuline).

Selon la nature de la molécule, une action sur un même site d'une même protéine peut avoir des effets différents (hétérogénéité). La difficulté qu'il y a à cibler de façon efficace et reproductible la tubuline et de traiter un maximum de cancers différents a fait envisager à certains auteurs la question du ciblage alternatif de la dynamique du microtubule : pourquoi utiliser des drogues se liant à la tubuline plutôt qu'à des protéines régulatrices de son fonctionnement? L'exemple phare dans la littérature scientifique de ce ciblage alternatif est **Eg5 (=Kinesin-5** humaine qui possède quatre têtes motrices qui écartent les deux pôles du fuseau mitotique). Au moment de la proméphase, Eg5 se lie à des microtubules voisins antiparallèles et « marche » simultanément sur ces microtubules antiparallèles de façon à écarter les pôles du fuseau mitotique.

Dans une cellule sans Kinesin-5, au lieu d'observer des chromosomes correctement alignés en métaphase sous l'action du fuseau mitotique, on obtient deux asters incapables de se séparer pour former un fuseau, avec deux centrosomes quasiment confondus formant une structure circulaire nommée **fuseau mono-astral** (= mono-polaire plutôt que bipolaire, comme s'il n'y avait qu'un seul aster entouré de microtubules).

Le domaine moteur de la Kinésine-5 (=Eg5) présente une hélice $\alpha 2$ en continuité avec une autre structure en hélice. Or la structure du domaine moteur est très conservée dans la famille des kinésines, à l'exception d'Eg5 où il y a une interruption de cette hélice alpha pour laisser place à une poche, région déstructurée contenant une boucle (loop) L5. Si on arrive à loger une petite

molécule dans cette région spécifique d'Eg5, on peut inhiber spécifiquement l'activité motrice de la kinésine 5 sans toucher aux autres molécules.

C'est sur la base de ce raisonnement que fut conçu le **monastrol** dont l'utilisation, comme son nom l'indique, provoque le même phénotype cellulaire qu'observé dans les cellules dépourvues de kinesin-5, c'est-à-dire un fuseau mono-astral en métaphase.

Il existe aussi des phénomènes de résistance cellulaire à des molécules ciblant des cibles alternatives. Dans le cas des cellules tumorales HGS et HT29 soumises pendant 48h à un traitement par du monastrol, les cellules HGS ressemblent aux cellules non traitées (interphasiques).

Il est important de savoir analyser un histogramme de cycle cellulaire : en abscisse, intensité de fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN dans la cellule et en ordonnée, nombre de cellules détectées par **cytométrie de flux**.

Dans une population cellulaire normale, on trouve des cellules interphasiques et des cellules en mitose (cf. index mitotique). Un premier pic correspond à une sous-population cellulaire présentant 2N chromosomes (**phases G0/G1**), une région intermédiaire correspond aux cellules en train de répliquer leur matériel génétique (**phase S**) et un pic à 4N correspond aux cellules ayant déjà répliqué leur matériel génétique (**phases G2/M**).

Après traitement des cellules HT29 par du monastrol, on constate une augmentation considérable de la population cellulaire présentant un contenu en ADN doublé. Cela est dû au fait qu'**une cellule présentant un fuseau mono-astral est incapable de se diviser correctement** (blocage dans un état pseudo-mitotique au point de contrôle mitotique métaphase-anaphase). Ce type d'anomalies est délétère et conduit généralement à la mort cellulaire.

Quant aux cellules HGS, on observe une quantité d'ADN doublée mais dans des cellules d'apparence interphasique (post-mitotiques) deux fois plus grosses que la normale (cf. témoin). On en déduit qu'il s'agit de **cellules tétraploïdes ayant subi une endomitose**, c'est-à-dire qu'il y a bien eu répllication du matériel chromosomique en phase S, mais pas de division cellulaire ensuite. Bref, les chercheurs cherchent encore.

Abréviations :

GTP : guanosine triphosphate

GDP : guanosine diphosphate

ATP : adénosine triphosphate

Mot du RT :

Toutes les concentrations mentionnées dans les expériences décrites sont extracellulaires, c'est-à-dire telles que mises en laboratoire au-dessus des cellules. La cellule pouvant concentrer ou exfiltrer en partie les agents médicamenteux, on ne maîtrise pas avec précision leur concentration efficace à l'intérieur des cellules.

Ainsi, si la solution à laquelle on expose les cellules a une concentration initiale de 100 nM en médicament, on ignore si la concentration intracellulaire de ce dernier sera de 10 ou de

200 nM à l'intérieur de la cellule. Ce que l'on sait avec exactitude, c'est sa concentration dans le milieu auquel les cellules sont exposées.

Fiche récapitulative : dynamique microtubulaire

Le cytosquelette est entre autres constitué des **microtubules**. Les microtubules ont un rôle dans l'organisation de la cellule, sa structure et son trafic cellulaire. Ce sont des assemblages de tubulines α et β associés au GTP, formant des **protofilaments**.

Grâce à une polarité, les microtubules possèdent une propriété **d'instabilité dynamique** : les polymérisations et dépolymérisations se succèdent de façon indépendante. Cela forme un cycle : phase de croissance (**polymérisation**), **catastrophe** (le microtubule décroît), **sauvetage** (nouvelle coiffe de tubuline-GTP formée) puis **dépolymérisation**. On peut alors définir les propriétés d'instabilité dynamique comme la vitesse d'assemblage ou la fréquence de chaque événement. Ces phénomènes n'ont lieu qu'à l'extrémité (+) du microtubule, l'extrémité (-) étant fixée au centrosome et aux complexes annulaires de **γ -tubuline**.

Des molécules peuvent réguler la dynamique des microtubules :

- **MAPs** motrices : kinésines (vers +) et dynéines (vers -) transportent des organites
- MAPs structurales : stabilisation des microtubules
- **+TIPs** : favorise le sauvetage et la polymérisation (EB1 \rightarrow anticatastrophe, en présence d'APC ; CLIP-170 \rightarrow pro-polymérisation)
- Stathmine : séquestre la tubuline donc défavorable à l'assemblage
- **MCAK** + kinésine 13 : favorise la dépolymérisation

« **Treadmilling** » : après avoir coupé le microtubule avec la katanine et la spastine, il y a un effet de « tapis roulant » sur le microtubule libre. A l'extrémité (-) on dépolymérise, à l'extrémité (+) on polymérise : le microtubule avance. EB1 favorise ce phénomène.

Effet des agents pharmaceutiques :

- **Colchicine** + RB3 : anti-polymérisante
- Taxol : pro-polymérisante
- **Vinblastine** : bloque la liaison entre tubulines, anti-polymérisante
- Nocodazole : anti-polymérisant

A forte dose, ces agents font disparaître totalement le réseau des microtubules, à faible dose ils le déstabilisent et font disparaître le phénomène de treadmilling.

En mitose, la dynamique des microtubules est très importante et accélérée pour former le fuseau mitotique, accrocher les chromosomes dupliqués et passer en anaphase. Des kinésines (1 et 5) permettent d'accrocher les microtubules anti-parallèles et de former le fuseau. Des dynéines agissent avec NUMA dans ce but. Ces phénomènes sont importants dans les cancers, on cherche alors à les inhiber.

Les tumeurs en phase de croissance, sont capables de néoangiogenèse, médiée par **VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)**, qui entraîne la **prolifération et la migration coordonnées de cellules endothéliales** de façon à créer des néovaisseaux et capillaires rejoignant la vascularisation préexistante et entraînant alors **la survie et la prolifération des cellules tumorales**.

La **cilbretastatine** et le **N-acétylcolchicinol-O-phosphate** ont un effet **anti-vasculaire**. Elles entraînent la dépolymérisation des microtubules des cellules endothéliales, perturbent considérablement la néoangiogenèse, engendrent un phénomène de blebbing avec détachement de la matrice extra-cellulaire et entraînent une mort particulière des cellules sans apoptose.

L'actine G globulaire lie l'ATP et se polymérise en actine F. Il y a alors formation de structures à **deux protofilaments** avec une certaine plasticité dans l'assemblage menant à une **modulation de la viscosité du cytoplasme**. Comme le microtubule, les filaments d'actine se polymérisent (grâce aux formines = facteurs de nucléation) et se dépolymérisent, et sont capable de treadmilling également. Les vagues d'actine sous-membranaire sont caractérisées par un mouvement d'ondulation, tandis que les fibres de stress demeurent immobiles.

Lors de la migration cellulaire: **l'actine est alors concentrée au niveau du front de migration sous la membrane plasmique, à l'extrémité du lamellipode** (= polymérisation dendritique de l'actine).

Les **régions d'adhérence focale** à la matrice extracellulaire, **situées à l'extrémité des fibres de stress**, sont le fait de molécules de type **intégrines présentes à la membrane cellulaire** qui s'accrochent à des protéines de la matrice extracellulaire.

AXE DE MIGRATION = ----**NOYAU**-----**CENTROSOME+GOLGI**-----**FRONT DE MIGRATION**—>

Les microtubules émis par le centrosome et par l'appareil de Golgi vont venir cibler les adhérences focales. Les microtubules ont pour rôle d'acheminer le matériel nécessaire pour la construction et la dissociation des adhérences focales.

On peut parfois observer une **résistance des lignées cellulaires à certains Microtubules Targetting Agents (MTA)** : exemple des cellules in vitro dépendantes au taxol. Mais **si l'on prive brusquement ces cellules de taxol, on observe une rupture de l'équilibre** entraînant la mort cellulaire.

Concentrations submicromolaires de taxanes ou de vinca-alcaloïdes (>10 nM et <1µM) : **diminution de la dynamique microtubulaire** (perturbation des fonctions mitotiques et du treadmilling, inhibition de la prolifération cellulaire, mort cellulaire)

Très faibles concentrations de taxanes ou de vinca-alcaloïdes (<10 nM) : **augmentation de la dynamique microtubulaire** (dysfonctionnement en mitose mais aussi en interphase, altération de la morphologie et de la mobilité des cellules, effets antiangiogéniques)

Les agents antimitotiques présentent un risque **d'effets indésirables au niveau neurologique** (neuropathie axonale périphérique) favorisés par certains terrains (diabète, alcoolisme) ou au

niveau intestinal. Ils sont en principe réversibles en quelques mois, voire quelques semaines après l'arrêt du traitement, de manière spontanée.

En revanche, les agents antimétaboliques n'ont que peu d'effet sur les neurones du système nerveux central, du fait de la barrière hémato-encéphalique (**Pgp/MDR1 : protéine d'efflux de la famille des transporteurs ABC**).

Selon la nature de la molécule, une action sur un même site d'une même protéine peut avoir des effets différents (hétérogénéité).

Exemple de l'inhibition de **Eg5 =Kinesin-5** → cellule avec un fuseau mono-astral incapable de se diviser correctement (utilisation de monastrol).