



Application des méthodes de chemogénomique à la recherche d'effecteurs du cytosquelette microtubulaire

Emilie Vassal

► To cite this version:

Emilie Vassal. Application des méthodes de chemogénomique à la recherche d'effecteurs du cytosquelette microtubulaire. Chimie thérapeutique. Université Joseph Fourier - Grenoble 1, 2008. Français. ⟨NNT : 2008GRE10084⟩. ⟨tel-04624455⟩

HAL Id: tel-04624455

<https://hal.science/tel-04624455v1>

Submitted on 29 Oct 2024

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.



HAL Authorization

THESE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Spécialité : Modèles, méthodes et algorithmes en biologie, santé et environnement

Présentée et soutenue par

Emilie VASSAL

Le 24 juin 2008

**Application des méthodes de chemogénomique à la recherche
d'effecteurs du cytosquelette microtubulaire**

Sélection par criblage automatisé d'agents régulateurs de la dynamique des
microtubules, caractérisation de leurs effets cellulaires et analyse de leurs
propriétés de toxicité sur des cellules tumorales

JURY

M. Pascal DUMY	Président
Mme Martine KNIBIEHLER	Rapporteur
M. Didier LEROY	Rapporteur
M. Jean CROS	Examineur
M. Jean Claude FLORENT	Examineur
Mme Laurence LAFANECHERE	Directrice de Thèse

Thèse préparée au Centre de Criblage pour Molécules Bio-Actives,
Institut de Recherche en Technologies et Sciences pour le Vivant,
CEA-Grenoble

Résumé

Les microtubules sont des agrégats tubulaires creux constitués d'une protéine unique, la tubuline. Ce sont des structures dynamiques, impliquées dans de nombreux processus cellulaires, notamment au cours de la mitose. L'altération de la fonction des microtubules peut avoir des effets drastiques sur la viabilité des cellules causant un arrêt du cycle cellulaire et pouvant même induire la mort de la cellule. La recherche d'agents ciblant la dynamique microtubulaire reste donc un enjeu important en cancérologie. Habituellement, la recherche systématique de tels agents par criblage automatisé fait appel soit à des tests de cytotoxicité, soit à des tests d'assemblage de la tubuline *in vitro*. En nous fondant sur les propriétés de substrat des enzymes du cycle de tyrosination de la tubuline, nous avons développé un test phénotypique multiparamétrique adapté à une utilisation robotique, permettant la sélection de molécules ciblant la dynamique des microtubules. Suite au criblage de plusieurs collections de composés chimiques, nous avons identifié des molécules, appartenant à trois familles structurales distinctes, régulant cette dynamique et présentant des propriétés cytotoxiques vis-à-vis de lignées cancéreuses. Nous avons ainsi montré qu'une molécule était capable de ralentir la dynamique microtubulaire et de générer des phénotypes mitotiques aberrants avec un mécanisme d'action différent de celui d'agents stabilisants comme le taxol®. Nous avons aussi mis en évidence deux familles de composés capables de dépolymériser les microtubules, l'une par action directe sur la tubuline, l'autre en interagissant probablement avec des effecteurs du cytosquelette microtubulaire.

Mots clés : microtubules, dynamique microtubulaire, tubuline détyrosinée, cancer, chimogénomique, criblage à haut débit, test phénotypique.

Abstract

Microtubules are long, hollow, cylindrical protein polymers composed of tubulin subunits. They are highly dynamic polymers involved in a wide variety of cellular processes including the formation of the mitotic spindle. Defects in microtubule function can have severe consequences on cell viability, leading to a disruption of cell division and, consequently, to an induction of cell death. Therefore, the search for new agents that disrupt the tubulin/microtubule system is still an important challenge in anticancer therapy. Usually, such agents were discovered either via inhibition of cancer cell cultures or by direct screening for the inhibition of tubulin assembly *in vitro*. We designed an automated multi-parametric cell-based assay that allows the selection of agents which modify microtubule dynamics. The rationale of this assay is based on the unique substrate properties of the tubulin modifying enzymes involved in the tubulin tyrosination cycle. Following several screening campaigns, we have discovered a set of compounds from three structurally unrelated classes, acting on these dynamics and showing antiproliferative activity towards various cancer cell lines. Then, we demonstrated that one compound was able to slow down the microtubule dynamics and induce abnormal mitosis with a mechanism of action different from those of other microtubule-stabilizers like taxol®. We have also identified two classes of microtubule polymerization inhibitors. The first class acts by direct interaction within the tubulin whereas the second class probably interacts with microtubule effectors.

Keywords : microtubules, microtubule dynamics, detyrosinated tubulin, cancer, chemogenomic, High Throughput Screening, phenotypic test

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance à tous les membres du jury : Mme Martine Knibiehler et M. Didier Leroy pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'évaluer ce travail; M. Jean Cros, M. Pascal Dumy et M. Jean Claude Florent pour accepter de le juger.

Ces trois années de thèse se sont déroulées au sein du Centre de Criblage pour Molécules Bio-Actives sous la direction de Laurence Lafanechère. Je tiens à la remercier vivement pour m'avoir fait confiance en me proposant ce sujet de recherche. Je remercie Caroline Barette et Emmanuelle Sans-Soleilhac avec qui j'ai partagé le quotidien du laboratoire et qui m'ont aidée tout au long de ce travail de thèse. Je n'oublie pas Catherine Pillet qui avec ses sourires, sa gentillesse et sa disponibilité, a rendu la vie au laboratoire plus agréable. Je remercie Sylvaine Roy pour ses recommandations et les discussions toujours enrichissantes que nous avons eues. Je souhaite aussi adresser mes remerciements à Samia Aci-Seche pour ses précieux conseils, sa disponibilité, son amitié et pour nos conversations sur l'avenir après-thèse. Je remercie Marjorie Mollaret pour s'être pleinement investie dans le projet de recherche et pour sa joie de vivre communicative. Je voudrais également remercier chaleureusement Céline Charavay, Xavier Fonrose et Samuel Wieczorek pour leur sympathie et pour nos longues discussions, pas seulement scientifiques.

Cette thèse a été effectuée en partie avec l'équipe de Didier Job que je tiens à remercier pour son accueil et son aide. Je remercie plus particulièrement Yasmina Saoudi pour les analyses en vidéomicroscopie et Christophe Bosc pour s'être intéressé à mes travaux de recherche.

Je remercie Michel Ferrand pour m'avoir guidée et soutenue dans mes démarches de valorisation.

Je tiens également à remercier les nombreuses équipes qui ont collaboré avec nous.

Enfin, je voudrais dire un grand merci à Yannick, à mes parents et à toute ma famille pour m'avoir soutenue tout au long de ce doctorat.

Sommaire

<u>LISTE DES ILLUSTRATIONS</u>	13
<u>LISTE DES TABLEAUX</u>	15
<u>INTRODUCTION</u>	17
<u>CHAPITRE I : LE CYTOSQUELETTE MICROTUBULAIRE</u>	19
I.1 La tubuline	20
I.1.1 L'hétérogénéité de la tubuline	20
I.1.1.1 Les différents membres de la famille tubuline	20
I.1.1.1.1 La tubuline α et β	20
I.1.1.1.2 La tubuline γ	20
I.1.1.1.3 Autres tubulines	21
I.1.1.2 Les modifications post-traductionnelles	21
I.1.1.2.1 Le cycle détyrosination/tyrosination.....	22
I.1.1.2.2 Les polymodifications : la glycylation et la glutamylation.....	23
I.1.1.2.3 L'acétylation	24
I.1.1.2.4 Autres modifications	24
I.1.2 Structure de la tubuline.....	25
I.1.3 Formation de l'hétérodimère de tubuline	26
I.2 Les microtubules	27
I.2.1 Organisation structurale.....	27
I.2.2 La dynamique des microtubules	28
I.2.2.1 Dynamique <i>in vitro</i>	28
I.2.2.2 Dynamique <i>in vivo</i>	30
I.2.3 Organisation du cytosquelette microtubulaire dans la cellule.....	31
I.2.3.1 Le centrosome.....	31
I.2.3.2 Le réseau interphasique	32
I.2.3.3 Le fuseau mitotique	32
I.2.4 Les effecteurs de la dynamique des microtubules.....	33
I.2.4.1 Effecteurs favorisant la stabilisation des microtubules	33
I.2.4.1.1 Famille des MAP1.....	33
I.2.4.1.2 Famille MAP2/MAP4/Tau	34
I.2.4.1.3 La protéine STOP	35
I.2.4.1.4 La doublecortine	36
I.2.4.1.5 Autres protéines	36
I.2.4.2 Effecteurs favorisant la déstabilisation des microtubules.....	37
I.2.4.2.1 MCAK/XKCM1	37
I.2.4.2.2 La stathmine.....	37
I.2.4.3 Les protéines qui se lient à l'extrémité des microtubules.....	39
I.2.5 Le contrôle pharmacologique des microtubules.....	39
I.2.5.1 Les molécules qui stabilisent les microtubules.....	40
I.2.5.1.1 Les taxanes.....	40
I.2.5.1.2 Les épothilones.....	42

1.2.5.1.3 <i>Le discodermolide</i>	43
1.2.5.1.4 <i>Autres molécules</i>	44
1.2.5.2 Les molécules qui déstabilisent les microtubules	44
1.2.5.2.1 <i>Les alcaloïdes de la pervenche</i>	44
1.2.5.2.2 <i>La colchicine</i>	46
1.2.5.2.3 <i>La combretastatine</i>	47
1.2.5.2.4 <i>Le nocodazole</i>	48
1.2.5.2.5 <i>Les cryptophycines</i>	48
1.2.5.2.6 <i>La dolastatine</i>	49
 <u>CHAPITRE II : LE CRIBLAGE A HAUT DEBIT</u>	<u>50</u>
 II.1 Le processus de criblage	50
II.1.1 Le criblage à l'échelle moléculaire	51
II.1.2 Le criblage à l'échelle cellulaire	51
 II.2 La génétique chimique	52
II.2.1 Les chimiothèques.....	54
II.2.2 Les tests phénotypiques.....	56
II.2.3 Identification des protéines cibles	59
 <u>CHAPITRE III : OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE</u>	<u>61</u>
 <u>MATERIELS ET METHODES</u>.....	<u>63</u>
 <u>CHAPITRE IV : MATERIELS</u>.....	<u>65</u>
 IV.1 Les chimiothèques	65
IV.1.1 Formatage	65
IV.1.2 Identification des molécules	66
IV.1.3 Gestion des molécules	67
 IV.2 La plateforme robotique	67
IV.2.1 L'automate TECAN GENESIS 2000	67
IV.2.2 Le lecteur de microplaque	68
IV.2.3 Autres périphériques.....	68
 IV.3 Les lignées cellulaires	70
 IV.4 Les anticorps	70
 <u>CHAPITRE V : METHODES</u>.....	<u>72</u>
 V.1 Biologie cellulaire	72
V.1.1 Culture cellulaire.....	72
V.1.2 Analyse du cycle cellulaire par FACs.....	72
V.1.3 Immunofluorescence.....	73

V.1.3.1 Marquage de la tubuline (TYR, GLU) et des noyaux	73
V.1.3.2 Marquage de l'actine	73
V.1.3.3 Marquage des mitochondries	74
V.1.4 Microscopie	74
V.1.5 Test de croissance cellulaire	74
V.1.6 Test permettant la détection des molécules stabilisant ou déstabilisant les microtubules en microplaques	75
V.1.7 Transfections	75
V.2 Biochimie	77
V.2.1 Extractions tissulaires et cellulaires	77
V.2.1.1 Production d'extraits de cervelles de veau	77
V.2.1.2 Production d'extraits de cellules HeLa	77
V.2.2 Détermination de la concentration en protéines	77
V.2.3 Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	78
V.2.4 Coloration du gel	79
V.2.5 Electro-transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose	79
V.2.6 Immuno-détection des protéines transférées	79
V.2.7 Purification de la tubuline	80
V.2.7.1 Tubuline 1X	80
V.2.7.2 Phospho-Tubuline (PC-tubuline)	80
V.2.8 Test d'assemblage de la tubuline	81
V.2.8.1 En absorbance	81
V.2.8.1.1 Etude de l'assemblage de la tubuline 1X	82
V.2.8.1.2 Etude de l'inhibition de l'assemblage de la PC-tubuline	82
V.2.8.2 En fluorescence	82
V.2.8.2.1 Etude de l'inhibition de l'assemblage de la tubuline 1X	82
V.2.8.2.2 Etude de l'initiation de l'assemblage de la PC-tubuline	83
V.2.9 Dépolymérisation des microtubules par MCAK	83
<u>RESULTATS.....</u>	<u>85</u>
<u>CHAPITRE VI : MISE EN PLACE DU CRIBLAGE</u>	<u>87</u>
VI.1 Principe et miniaturisation du test cellulaire permettant la détection de molécules actives sur la polymérisation des microtubules	87
VI.1.1 Principe	87
VI.1.2 Miniaturisation et automatisation	87
VI.1.3 Validation	93
VI.2 Caractéristiques des chimiothèques criblées	95
VI.2.1 Chimiothèque nationale	97
VI.2.2 Chimiothèque commerciale	97
VI.3 Aspects statistiques, normalisation	100
VI.3.1 Normalisation des signaux par le pourcentage d'activité	100
VI.3.2 Correction des erreurs systématiques	100

CHAPITRE VII : CRIBLAGE..... 104

VII.1 Criblage des chimiothèques académiques	104
VII.1.1 Criblage primaire.....	104
VII.1.2 Criblage secondaire	107
VII.1.3 Elimination des faux positifs.....	107
VII.1.4 Tests secondaires.....	110
VII.1.4.1 Effet sur le réseau d'actine	110
VII.1.4.2 Effet sur la localisation des mitochondries.....	111
VII.1.4.3 Détermination de l'EC50.....	112
VII.1.5 Sélection des molécules les plus spécifiques	115
VII.1.5.1 Molécules stabilisant les microtubules.....	115
VII.1.5.2 Molécules dépolymérisant les microtubules	116
VII.2 Criblage de la chimiothèque commerciale.....	117
VII.2.1 Criblage primaire.....	117
VII.2.2 Criblage secondaire	119

CHAPITRE VIII : ANALYSES APPROFONDIES DES MOLECULES SELECTIONNEES..... 120

VIII.1 Analyses communes aux 2 types d'activités (stabilisante et dépolymérisante)	120
VIII.1.1 Etude Structure/Activité.....	120
VIII.1.1.1 Série pyridocarbazole.....	120
VIII.1.1.2 Série azaindole	122
VIII.1.1.3 Série déazapurine	123
VIII.1.2 Etude du type d'interaction avec la tubuline (directe/indirecte).....	124
VIII.1.2.1 Série pyridocarbazole.....	124
VIII.1.2.2 Série azaindole	127
VIII.1.2.3 Série déazapurine	129
VIII.1.3 Etude de la cytotoxicité vis-à-vis de lignées cancéreuses.....	131
VIII.1.3.1 Série pyridocarbazole.....	132
VIII.1.3.2 Série azaindole	133
VIII.1.3.3 Série déazapurine	134
VIII.1.4 Etude du cycle cellulaire.....	134
VIII.1.4.1 Série pyridocarbazole.....	135
VIII.1.4.2 Série azaindole	136
VIII.1.4.3 Série déazapurine	137
VIII.1.5 Etude de la réversibilité de l'effet des molécules sur les microtubules	138
VIII.1.5.1 Série azaindole	138
VIII.1.5.2 Série déazapurine	139
VIII.2 Analyses complémentaires réalisées sur la série pyridocarbazole.....	139
VIII.2.1 Etude de la stabilité des microtubules.....	139
VIII.2.1.1 Résistance au froid	140
VIII.2.1.2 Résistance au nocodazole.....	141
VIII.2.2 Analyse des phénotypes mitotiques.....	142
VIII.2.3 Etude de l'effet des molécules sur les protéines associées aux microtubules.....	144

VIII.2.3.1 MCAK.....	144
VIII.2.3.2 Stathmine.....	146
VIII.2.4 Greffage de groupement chimique en vue d'une purification des cibles par colonne d'affinité	147
<u>DISCUSSION</u>	<u>149</u>
<u>CHAPITRE IX : LA STRATEGIE DE CRIBLAGE</u>	<u>152</u>
IX.1 Intérêt du test cellulaire	152
IX.2 Intérêt des chimiothèques utilisées	154
<u>CHAPITRE X : LES RESULTATS DU CRIBLAGE</u>	<u>157</u>
<u>CONCLUSION - PERSPECTIVES</u>	<u>165</u>
<u>ANNEXES</u>	<u>171</u>
Annexe 1 : Fiche de données Isis Base.....	173
Annexe 2 : Bilan	175
Annexe 3 : Publication.....	177
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	<u>179</u>

Liste des illustrations

Figure 1 : Cycle de tyrosination de la tubuline α (Westermann et al. 2003)-----	22
Figure 2 : Structure du dimère de tubuline (Nogales et al. 1998; Lowe et al. 2001) ---	25
Figure 3 : Illustration schématique d'un microtubule (Desai et al. 1997) -----	27
Figure 4 : Illustration schématique du "treadmilling" (Jordan et al. 2004)-----	29
Figure 5 : Illustration schématique de l'instabilité dynamique (Jordan et al. 2004) ---	30
Figure 6 : Organisation des microtubules dans les cellules en interphase (Howard et al. 2003)-----	32
Figure 7 : Structure obtenue par radio-cristallographie du complexe tubuline stathmine T2S (Gigant et al. 2000)-----	38
Figure 8 : <i>Taxus brevifolia</i> et structure du taxol® -----	40
Figure 9 : Reconstruction en 3D de l'interaction latérale entre protofilaments (Downing 2000) -----	41
Figure 10 : Cliché de microscopie électronique de <i>Sorangium cellulosum</i> (Mann 2002) et structure de l'épothilone A -----	42
Figure 11 : <i>Discodermia dissoluta</i> et structure du discodermolide -----	43
Figure 12 : Pervenche de Madagascar et structure de la vinblastine-----	44
Figure 13 : Site d'interaction de la vinblastine avec la tubuline (Gigant et al. 2005) --	45
Figure 14 : <i>Crocus d'automne</i> et structure de la colchicine -----	46
Figure 15 : <i>Combretum caffrum</i> et structure de la combretastatine -----	47
Figure 16 : Structure du nocodazole -----	48
Figure 17 : <i>Nostoc</i> et structure de la cryptophycine -----	48
Figure 18 : <i>Dolabella auricularia</i> et structure de la dolastatine-10 -----	49
Figure 19 : Comparaison entre les méthodes de génétique classique et de génétique chimique (Spring 2005) -----	53
Figure 20 : Nouvelle méthode d'extraction et de purification des substances naturelles (Lokey 2003) -----	54
Figure 21 : Comparaison de la synthèse orientée vers la diversité et de la synthèse ciblée (Stockwell 2004)-----	56
Figure 22 : Aperçu des méthodes de criblages <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> (Mayer 2003) -----	58
Figure 23 : Exemple de code attribué à une molécule de la chimiothèque nationale---	66
Figure 24: Worstation 2000 (TECAN) -----	68
Figure 25 : Principe du criblage phénotypique automatisé -----	88
Figure 26 : Intérêt de la lyse des cellules -----	90
Figure 27 : Performance de l'essai-----	93
Figure 28 : Propriétés physico-chimiques des molécules de la chimiothèque nationale -----	97
Figure 29 : Propriétés physico-chimiques des molécules de la chimiothèque Chembridge -----	98
Figure 30 : Sous-structure des molécules issues de la chimiothèque ChemBridge -----	99
Figure 31 : Comparaison des méthodes de normalisation -----	102
Figure 32 : Normalisation du signal brut « tubuline TYR »-----	103
Figure 33 : Représentation du pourcentage de tubuline TYR dans les cellules-----	105
Figure 34 : Représentation du pourcentage de tubuline GLU dans les cellules -----	106
Figure 35 : Structure des molécules fluorescentes et effet de des molécules sur des cellules HeLa -----	107
Figure 36 : Structure des 6 molécules sélectionnées -----	108
Figure 37 : Structure des 27 molécules sélectionnées-----	109

Figure 38 : Effet des molécules sur le réseau d'actine de cellules Rat2 -----	110
Figure 39 : Effet des molécules sur la localisation et la morphologie des mitochondries -----	112
Figure 40 : Courbes dose-effet -----	113
Figure 41 : Courbes dose-effet -----	114
Figure 42 : Représentation du pourcentage de tubuline TYR dans les cellules -----	117
Figure 43 : Représentation du pourcentage de tubuline GLU dans les cellules -----	118
Figure 44 : Famille des pyridocarbazoles : au centre la molécule « touche » issue du criblage. -----	121
Figure 45 : Structure du composé ICC128-L-036-H06 -----	121
Figure 46 : Structure de l'ellipticine -----	122
Figure 47 : Famille des azaindoles : au centre les molécules « touches » issues du criblage. -----	122
Figure 48 : Structure du composé ICC117-L-029-F11 -----	123
Figure 49 : Famille des deazapurines : au centre les molécules « touches » issue du criblage. -----	123
Figure 50 : Structure du composé ICC127-L-029-B04 -----	124
Figure 51 : Assemblage de la PCtubuline in vitro -----	125
Figure 52 : Assemblage de la tubuline 1X in vitro -----	126
Figure 53 : Etude de l'effet additionnel de ICC128-L-036-H06 sur l'assemblage de tubuline 1X in vitro -----	127
Figure 54 : Inhibition de l'assemblage de la tubuline 1X -----	128
Figure 55 : Inhibition de l'assemblage de la PC tubuline -----	129
Figure 56 : Inhibition de l'assemblage de la tubuline 1X -----	130
Figure 57 : Inhibition de l'assemblage de la PC tubuline -----	130
Figure 58 : Cytotoxicité du composé ICC128-L-036-H06 sur les cellules NCI H460 --	132
Figure 59 : Effet de la molécule ICC128-L-036-H06 sur le cycle cellulaire -----	135
Figure 60 : Effet de ICC117-L-029-F09 et ICC117-L-029-F11 sur le cycle cellulaire	136
Figure 61 : Effet de ICC 127-L-019-B04 et ICC 115-L-021-E02 sur le cycle cellulaire -----	137
Figure 62 : Effet du composé ICC 128-L-036-H06 sur les microtubules de cellules HeLa -----	139
Figure 63 : Effet de ICC 128-L-036-H06 sur la stabilité des microtubules au froid --	140
Figure 64 : Effet du nocodazole sur des cellules HeLa -----	141
Figure 65 : Effet du nocodazole sur des cellules HeLa traitées avec le composé ICC 128-L-036-H06 -----	142
Figure 66 : Analyse de l'effet de la molécule ICC 128-L-036-H06 sur le fuseau mitotique -----	143
Figure 67 : Effet de MCAK sur les microtubules de cellules MEF -----	144
Figure 68 : Cellule HeLa transfectée par MCAK-GFP -----	145
Figure 69 : Analyse de la tubuline GLU après transfection ou non avec des RNAi inactivant MCAK -----	146
Figure 70 : Structure de ICC 128-L-036-H06 et de son analogue biotinylé -----	147
Figure 71 : Structure de ICC127-M-202-H03 et de son analogue -----	148

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Lignées cellulaires utilisées</i>	<i>70</i>
<i>Tableau 2 : Anticorps primaires utilisés</i>	<i>70</i>
<i>Tableau 3 : Anticorps secondaires utilisés</i>	<i>71</i>
<i>Tableau 4</i>	<i>94</i>
<i>Tableau 5 : IC₅₀ des molécules ICC128-036-H06 et ICC127-M-202-H03 sur différentes lignées cancéreuses</i>	<i>132</i>
<i>Tableau 6 : IC₅₀ des molécules ICC117-L-029-F09 et ICC117-L-029-F11 sur différentes lignées cancéreuses</i>	<i>133</i>
<i>Tableau 7 : IC₅₀ des molécules ICC127-L-019-B04 et ICC115-L-021-E02 sur différentes lignées cancéreuses</i>	<i>134</i>

Introduction

Chapitre I : Le cytosquelette microtubulaire

De l'hétérodimère de tubuline aux microtubules

Le cytosquelette des cellules eucaryotes est composé de trois réseaux distincts de filaments protéiques : les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. Chacun de ces trois réseaux possède des propriétés et des fonctions différentes.

Les microtubules sont des filaments cylindriques creux résultant de l'assemblage non covalents d'hétérodimères de tubuline. Constituants majeurs du cytosquelette, ils régissent l'organisation intracellulaire de la cellule eucaryote. Au cours de l'évolution, l'apparition du système microtubulaire semble être le marqueur le plus précoce de la transition entre les règnes procaryote et eucaryote, et conditionnerait même l'apparition du noyau (Cavalier-Smith 1987).

Les microtubules sont essentiels à la vie de la cellule car ils prennent part intégrante dans les différentes fonctions du cytosquelette, telles que l'architecture cellulaire, la motilité des cellules, les transports intracellulaires et la division cellulaire. En effet, les microtubules jouent un rôle clé dans le maintien de la forme et de l'intégrité de la cellule. Ils peuvent également générer des battements ciliaires et flagellaires, en formant des assemblages complexes stables sur lesquels agissent des moteurs moléculaires (Dustin 1984). Les microtubules peuvent servir de rails directeurs pour contrôler le positionnement et le trafic d'organelles à l'intérieur des cellules. Enfin, les réseaux microtubulaires interphasiques peuvent se réorganiser pour former le fuseau mitotique, assurant ainsi le déplacement des chromosomes vers les pôles du fuseau mitotique. Ces polymères sont des structures très dynamiques, capables de s'assembler et de se désassembler rapidement pour répondre aux besoins de la cellule. Cette dynamique, coûteuse en énergie, est fortement modulée par des effecteurs protéiques spécialisés.

Nous présenterons d'une part les propriétés de la tubuline, brique élémentaire des microtubules, et d'autre part, les propriétés des microtubules.

I.1 La tubuline

I.1.1 L'hétérogénéité de la tubuline

Une des principales caractéristiques de la tubuline est son haut niveau d'hétérogénéité. L'origine de ce polymorphisme est à la fois génétique et post-traductionnelle.

I.1.1.1 Les différents membres de la famille tubuline

I.1.1.1.1 La tubuline α et β

La tubuline α et la tubuline β sont les membres les plus abondants de la famille des tubulines. Ces protéines globulaires, de poids moléculaire apparent d'environ 50kDa, forment l'hétérodimère constituant majeur des microtubules. Les gènes codant les tubulines α et β sont retrouvés chez tous les eucaryotes et sont soumis à une très grande force de conservation. Les différents gènes de tubuline ont dérivé par des phénomènes de duplication et de divergence à partir d'un gène ancestral commun. Ainsi, la séquence peptidique des deux sous-unités présente une identité d'environ 40% (Little *et al.* 1988).

Le nombre d'isotypes des tubulines α et β varie en fonction de l'espèce étudiée. Chez les vertébrés, 5 à 6 isotypes ont été mis en évidence (Ludueno 1998; Khodiyar *et al.* 2007). La divergence entre les différents isotypes est faible et localisée principalement au niveau de l'extrémité C-terminale. Ces isotypes ont des profils d'expression spécifiques. Par exemple, les classes β III sont spécifiques des neurones.

Le polymorphisme génique de la tubuline est impliqué dans les propriétés dynamiques des microtubules (Panda *et al.* 1994). Il a été montré que les différents isotypes de tubuline ont des propriétés d'assemblage variable et également des aptitudes différentes à interagir avec des protéines de stabilisation des microtubules (Lu *et al.* 1994; Tuszynski *et al.* 2006).

I.1.1.1.2 La tubuline γ

Une tubuline plus minoritaire, la tubuline γ , a été mise en évidence en 1989, chez le champignon *Aspergillus nidulans* lors d'un criblage destiné à rechercher des

suppresseurs de mutations de la tubuline β (Oakley *et al.* 1989). Cette protéine initialement trouvée sur le centrosome, de poids moléculaire 52kDa, intervient dans la dynamique du cytosquelette, au niveau de l'initiation de l'assemblage de la tubuline α/β en microtubules. Son rôle dans la nucléation a été démontré chez les mammifères *in vivo* par microinjection d'anticorps anti-tubuline γ dans différentes lignées cellulaires de mammifère (Joshi *et al.* 1992) et *in vitro* par déplétion de la tubuline γ (Martin *et al.* 1997). Chez les eucaryotes supérieurs, elle existe essentiellement sous forme de deux complexes appelés γ TuSC (γ -Tubulin Small Complexes) et γ TuRC (γ -Tubulin Ring Complexes). La tubuline γ a de nombreux autres rôles, dont l'élongation et l'organisation du fuseau mitotique (Job *et al.* 2003).

1.1.1.1.3 Autres tubulines

De nouveaux membres de la famille des tubulines ont été identifiés plus récemment. Ainsi, la tubuline δ a été découverte suite à des expériences de mutations chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (Dutcher *et al.* 1998). Elle est localisée au niveau des centrioles (Chang *et al.* 2000). La tubuline ϵ a été identifiée grâce à des recherches systématiques dans des banques de données de séquence, elle est située au niveau du matériel péricentriolaire. La tubuline ϵ est impliquée dans la duplication du centriole et dans l'organisation du matériel péricentriolaire (Chang *et al.* 2003).

1.1.1.2 Les modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles de la tubuline sont nombreuses. Elles ont pour principal effet de moduler les fonctions des tubulines en agissant par exemple sur les capacités des tubulines et donc des microtubules, à interagir avec leur protéines associées (MAPs). Ces modifications varient en fonction de la sous-unité, l'isotype et le tissu étudié. Les modifications post-traductionnelles peuvent également varier au cours du développement et du vieillissement au sein d'un même tissu. Ainsi, la tubuline peut être détyrosinée, polyglycylée, polyglutamylée, acétylée, phosphorylée ou encore palmitoylée.

1.1.1.2.1 Le cycle détyrosination/tyrosination

Le domaine carboxy-terminal de la tubuline est le lieu de la plupart des modifications post-traductionnelles notamment le cycle de détyrosination/tyrosination. Ce cycle consiste en l'addition réversible d'un résidu tyrosine à l'extrémité C-terminale de la sous-unité α de la tubuline.

La tubuline α est synthétisée sous forme tyrosinée (tubuline TYR) avec comme séquence carboxy-terminale : GLU-GLU-TYR (Cleveland *et al.* 1985). Dans la cellule, elle peut être détyrosinée par l'action d'une carboxypeptidase spécifique, la tubuline carboxy peptidase (TCP) non identifiée à ce jour (Lafanechere *et al.* 2000). La tubuline ainsi générée comporte un résidu glutamate à son extrémité carboxy-terminale et est appelée tubuline GLU. Cette tubuline est le substrat d'une enzyme, la tubuline tyrosine ligase (TTL) dont le gène a été cloné (Ersfeld *et al.* 1993) qui peut greffer à nouveau une tyrosine.

De plus, la tubuline détyrosinée (tubuline GLU) peut perdre le glutamate carboxy-terminal, conduisant à une tubuline ayant perdu ses deux derniers acides aminés, appelée tubuline- $\Delta 2$. Cette modification, ayant lieu au niveau du site d'action de la TTL, empêche la tubuline- $\Delta 2$ d'être à nouveau tyrosinée (Paturle-Lafanechere *et al.* 1991).

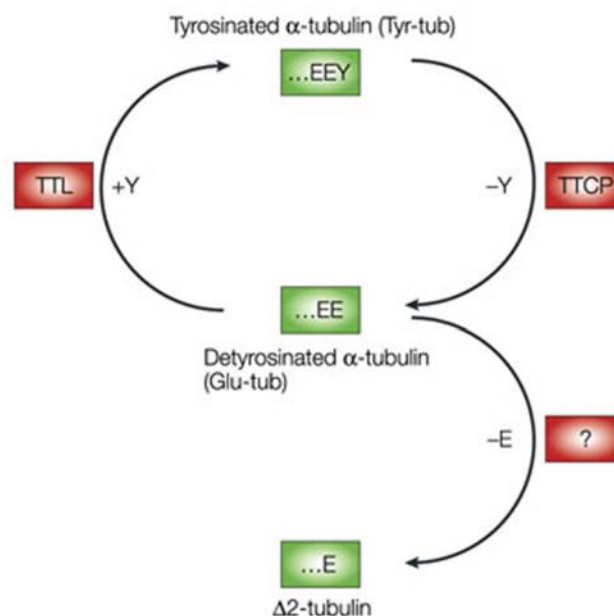


Figure 1 : Cycle de tyrosination de la tubuline α (Westermann *et al.* 2003)

La TCP ne paraît active que sur la tubuline incorporée dans les microtubules. Au contraire, la TTL n'agit que sur le dimère de tubuline libre. Ainsi, la tubuline qui se trouve dans des microtubules particulièrement peu dynamiques comme ceux des neurones sera principalement détyrosinée. Les microtubules stables, comme ceux que l'on trouve dans les neurones, sont ainsi majoritairement constitués de tubuline GLU et de tubuline- $\Delta 2$. Plus généralement, l'accumulation de tubuline- $\Delta 2$ est un marqueur de la dynamique ralentie des microtubules. L'accumulation de tubuline GLU et de tubuline- $\Delta 2$ est la conséquence d'une faible dynamique des microtubules, mais n'en est pas la cause. En effet, la détyrosination des microtubules induite par la microinjection d'anticorps inhibant la TTL n'entraîne pas la stabilisation des microtubules (Wehland *et al.* 1987).

1.1.1.2.2 Les polymodifications : la glycylation et la glutamylation

Le rôle des polymodifications n'est que partiellement connu. D'un point de vue évolutif, l'apparition de cette modification coïncide avec l'apparition des cils et des flagelles (Westermann *et al.* 2003)

La polyglycylation a été découverte sur la tubuline des axonèmes ciliaires de *Paramecia* et correspond à l'ajout successif de résidus glycine (1 à 34 résidus) au niveau du résidu GLU445 de la sous-unité α et du résidu GLU437 de la sous-unité β (Redeker *et al.* 1994) La mutation des glutamates de la tubuline β a révélé le rôle critique de cette modification dans l'assemblage des axonèmes (Thazhath *et al.* 2002).

La polyglutamylation, identifiée en 1990 (Edde *et al.* 1990) consiste en l'addition de 1 à 6-7 résidus glutamate sur un glutamate proche de l'extrémité C-terminale des tubulines α et β . Le niveau maximal de polyglutamylation pour la tubuline β est atteint au cours de la différenciation après la naissance (Audebert *et al.* 1994). La polyglutamylation régule de façon progressive l'interaction avec les protéines associées aux microtubules (MAPs), en modulant la conformation du domaine carboxy-terminal de la tubuline (Bonnet *et al.* 2001).

L'enzyme responsable de la polyglutamylation a récemment été identifiée, elle appartient à la même famille que la Tubuline Tyrosine Ligase (Janke *et al.* 2005; van Dijk *et al.* 2007).

1.1.1.2.3 L'acétylation

L'acétylation de la tubuline α a été décrite pour la première fois en 1983 en analysant les différents types de tubuline présents dans le flagelle de *Chlamydomonas*. Cette acétylation a lieu au niveau de la lysine 40 en N-terminal (LeDizet *et al.* 1987). Le groupement acétyl est greffé sur la tubuline α grâce à la tubuline acétyltransférase, enzyme non encore identifiée. Ce groupement peut être enlevé par une tubuline déacétylase (HDAC6 et SIRT2)(Hubbert *et al.* 2002; North *et al.* 2003).

Le rôle de cette modification n'est pas connu précisément. Ainsi, l'inhibition de l'acétylation n'entraîne pas d'effet détectable chez *Tetrahymena thermophila* (Gaertig *et al.* 1995). L'effet de l'acétylation sur la stabilité des microtubules a été étudié mais les résultats obtenus sont contradictoires (Matsuyama *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2003). Des expériences ont montré que l'acétylation de la tubuline était impliquée dans l'interaction de la kinésine 1 avec les microtubules *in vitro* (Reed *et al.* 2006). Très récemment, il a été montré que l'acétylation de la tubuline est étroitement corrélée à la stabilité du cil primaire. L'histone déacétylase 6 (HDAC6), responsable de la déacétylation de la tubuline, serait activée par une phosphorylation par la kinase Aurora, provoquant la désagrégation du cil primaire (Pugacheva *et al.* 2007).

1.1.1.2.4 Autres modifications

La phosphorylation de la tubuline β est l'une des premières modifications post-traductionnelle décrite. Elle a été mise en évidence lors de la purification de tubuline de cerveau (Eipper 1972). Par la suite, une augmentation de la phosphorylation de la tubuline β III a été observée au cours de la différenciation et la croissance neuritique de cellules de neuroblastomes de souris (Gard *et al.* 1985). De récentes études menées dans l'unité INSERM U366 (Direction : D. Job) ont démontré que la tubuline β pouvait être phosphorylée *in vitro* par le complexe CDK1-cycline B1 sur la sérine 172 appartenant au site consensus SPK conservé dans l'évolution (Fourest-Lieuvin *et al.* 2006). La tubuline β phosphorylée pourrait réguler la dynamique microtubulaire par exemple en bloquant les extrémités "plus" des microtubules.

La palmitoylation ou S-acylation de la tubuline correspond à l'addition d'un acide palmitique sur la cystéine 376 de la tubuline α (Caron 1997; Ozols *et al.* 1997). La mutation de cette cystéine chez *S. cerevisiae* entraîne des défauts de morphologie des

microtubules (microtubules astraux anormalement longs) et affecte la migration du fuseau mitotique (Caron *et al.* 2001). La palmitoylation jouerait donc un rôle dans l'interaction des microtubules avec le cortex cellulaire.

I.1.2 Structure de la tubuline

La structure du dimère de tubuline α/β a été déterminée par diffraction électronique avec une résolution de 3,7 Angström à partir de feuilletts bidimensionnels de tubuline formés en présence d'ions de zinc Zn^{2+} et stabilisés par du taxol® (Nogales *et al.* 1998; Lowe *et al.* 2001). Il a été ainsi montré que les sous-unités α et β ont une structure tertiaire identique composée de deux domaines globulaires disposés de chaque côté d'une hélice centrale. Les régions les plus conservées entre les deux sous-unités sont les structures secondaires qui permettent les contacts latéraux et longitudinaux au sein des microtubules.

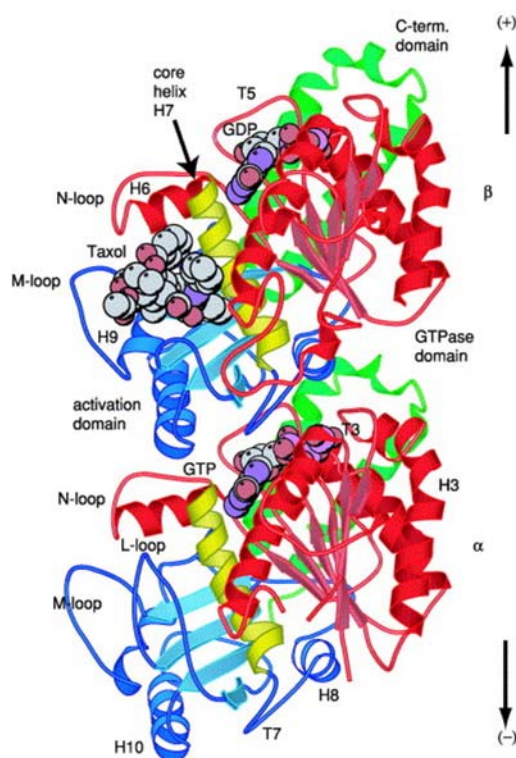


Figure 2 : Structure du dimère de tubuline (Nogales *et al.* 1998; Lowe *et al.* 2001)

L'hélice centrale qui relie les deux domaines globulaires de chaque sous-unité est colorée en jaune. Le domaine C-terminal situé sur la surface externe est coloré en vert. Le domaine GTPase est coloré en rose et le domaine d'activation en bleu.

La tubuline est composée de trois domaines fonctionnels : le domaine N-terminal constitué des 205 premiers acides aminés et contenant le site de liaison au GTP, le domaine central des acides aminés 206 à 381 contenant le site de fixation de certaines drogues et le domaine C-terminal correspondant au site d'interaction des protéines associées aux microtubules (MAPs).

Un site de liaison échangeable du GTP (site E) est exposé à la surface du dimère, au niveau de la sous-unité β . La sous-unité α possède également un site de liaison au GTP à l'interface avec la sous-unité β cependant il n'est ni hydrolysable, ni échangeable (site N).

I.1.3 Formation de l'hétérodimère de tubuline

Au cours de leur synthèse, les sous-unités sont prises en charges par des protéines chaperonnes spécifiques. Chacune des sous-unités est repliée dans sa structure native grâce à la chaperonne Hsp60 (Lewis *et al.* 1996). Cependant, avant de pouvoir former les microtubules, les sous-unités doivent s'associer pour former les hétérodimères α/β . Ce processus complexe nécessite l'intervention de plusieurs cofacteurs protéiques (Tian *et al.* 1997). En effet, une fois les conformations des sous-unités acquises, les protéines chaperonnes sont échangées contre un premier co-facteur, le co-facteur F_B pour la sous-unité α et F_A pour la sous-unité β . Ces deux co-facteurs peuvent alors s'échanger avec les co-facteurs F_D et F_E pour former des complexes F_E/α -tubuline et F_D/β -tubuline. La dimérisation finale de la tubuline a lieu après fixation d'un cinquième co-facteur F_E/α -tubuline F_D/β -tubuline/ F_C . Le dimère natif est ainsi libéré après hydrolyse du GTP.

La synthèse de la tubuline est soumise à plusieurs niveaux de contrôle : la régulation de la quantité de tubuline disponible dans la cellule et le contrôle de la stoechiométrie entre les deux sous-unités. Des expériences de microinjection de tubuline purifiée dans des cellules ont montré que la quantité de tubuline libre influe directement sur la quantité d'ARNm produit (Cleveland *et al.* 1983). Par ailleurs, l'expression des gènes des deux sous-unités α et β est coordonnée. En effet, lorsque le gène de la tubuline β est surexprimé, l'expression du gène de la tubuline α est augmentée (Gonzales-Garay *et al.* 1995). De cette manière, les cellules produisent autant de tubuline α que de tubuline β .

I.2 Les microtubules

I.2.1 Organisation structurale

Les microtubules sont des cylindres creux de 25nm de diamètre. Ils résultent de l'assemblage de protofilaments tous orientés selon la même direction, eux-mêmes formées par l'auto-assemblage d'hétérodimères de tubuline α et β .

In vivo, un microtubule est généralement constitué de 13 protofilaments alors que ce nombre peut varier de 9 à 16 *in vitro* (Chretien *et al.* 1991). Plusieurs modèles d'organisation des protofilaments ont été proposés. Dans le premier modèle, les interactions entre protofilaments se font entre tubulines de même isotype (α - α , β - β), sauf au niveau de la ligne de suture. Dans le deuxième modèle, les sous-unités de même type sont latéralement alternées d'un protofilament à l'autre (α - β - α - β ...). Le premier modèle semble être le plus répandu dans les cellules.

Les hétérodimères de tubuline α/β s'alignent le long d'hélices qui parcourent la surface du microtubule avec un pas de 12 nm (Metoz *et al.* 1997).

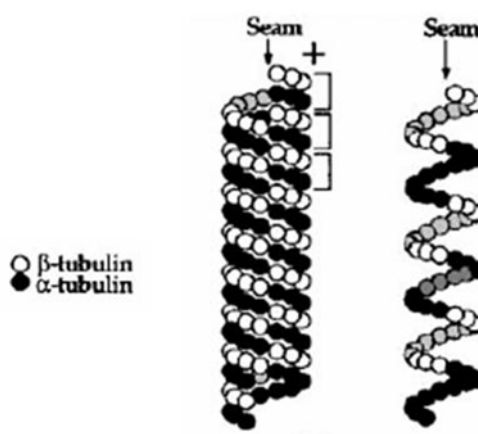


Figure 3 : Illustration schématique d'un microtubule (Desai *et al.* 1997)

Les monomères de tubuline sont représentés sous la forme de sphères foncées pour l' α -tubuline ou claires pour la β -tubuline. Le microtubule est constitué de 13 protofilaments et de 3 hélices adjacentes. L'hélice dessinée à droite ne représente pas un stade intermédiaire de l'assemblage des microtubules mais juste une aide visuelle.

La surface d'un microtubule correspond à un arrangement régulier et ordonné de sous-unités de tubuline. Ainsi, les microtubules exposent des sous-unités de tubuline β

d'un côté (extrémité "plus") et des sous-unités de tubuline α de l'autre (extrémité "moins"), ce sont donc des structures polarisées (Wade *et al.* 1997). Parallèlement à cette polarité structurale, on observe une polarité fonctionnelle des microtubules. Ainsi, les microtubules n'ont pas les mêmes propriétés dynamiques à leurs extrémités. L'extrémité "plus" polymérise beaucoup plus rapidement que l'extrémité "moins" (Nogales *et al.* 1999)

I.2.2 La dynamique des microtubules

I.2.2.1 Dynamique *in vitro*

Les microtubules polymérisés *in vitro* à partir de tubuline pure ont un comportement naturellement dynamique, se traduisant par le renouvellement des hétérodimères de tubuline α et β dans les microtubules.

La formation de microtubules à partir de dimères de tubuline libre ne peut se faire que dans des conditions de concentration en tubuline, de température et de concentration en GTP adéquates. Ainsi, une solution de tubuline, préalablement placée sur de la glace en présence de GTP comme source d'énergie (Weisenberg 1972) doit être incubée à 30°C afin de favoriser la polymérisation de la tubuline en microtubules. Ce phénomène peut être suivi en spectrophotométrie en mesurant la turbidité de la solution d'assemblage. La tubuline s'incorpore aux microtubules sous forme d'un complexe tubuline-GTP. Cette incorporation s'accompagne de l'hydrolyse du GTP, le GDP ainsi formé restant lié à la tubuline.

La polymérisation s'effectue en trois phases : une première phase de nucléation au cours de laquelle se formeraient des noyaux d'assemblage, puis une phase d'assemblage pendant laquelle les microtubules s'allongent et enfin une phase d'état stationnaire durant laquelle la masse de tubuline polymérisée reste constante. A l'état stationnaire, les microtubules sont dynamiques et échangent rapidement des sous-unités de tubuline avec le milieu. Les populations de tubuline polymérisée et non polymérisée sont alors en équilibre thermodynamique. Toute perturbation de cet équilibre amène à une redistribution de la tubuline entre les populations solubles et polymérisés. Ces perturbations peuvent être induites par la dilution de la suspension microtubulaire, la

suppression de GTP, des variations de températures, l'addition d'ions Ca^{2+} ou encore de drogues anti-microtubulaires (Dustin 1984).

Les microtubules peuvent présenter deux comportements dynamiques distincts non exclusifs (Farrell *et al.* 1987):

-le treadmilling ou phénomène de "tapis roulant" est caractérisé par l'incorporation de tubuline provenant de la population de sous-unités libres à l'extrémité "plus" des microtubules et la dépolymérisation au niveau de l'extrémité "moins" (Margolis *et al.* 1978). Ceci génère un flux de sous-unités de tubuline au sein du microtubule, de l'extrémité "plus" vers l'extrémité "moins".

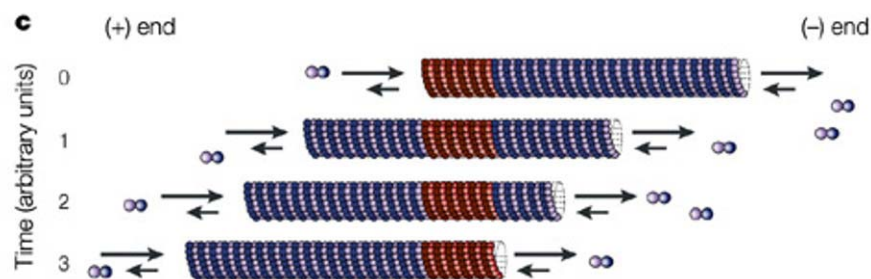


Figure 4 : Illustration schématique du "treadmilling" (Jordan *et al.* 2004)

Les hétérodimères de tubuline sont ajoutés à l'extrémité "plus" au temps 0, transitent le long du microtubule et ressortent au temps 3. La longueur du microtubule n'est pas modifiée.

-l'instabilité dynamique est caractérisée par des fluctuations spontanées de la longueur des microtubules à l'équilibre (Mitchison *et al.* 1984). Ainsi, des phases de dépolymérisation rapide peuvent succéder à des phases de polymérisation lente aux deux extrémités du microtubule. Le terme "catastrophe" désigne la transition entre polymérisation et dépolymérisation alors que le terme "sauvetage" désigne la transition inverse. Tout comme le treadmilling, l'instabilité dynamique entraîne donc un échange progressif entre sous-unités de tubuline incorporées dans les microtubules et sous-unités de tubuline libres.

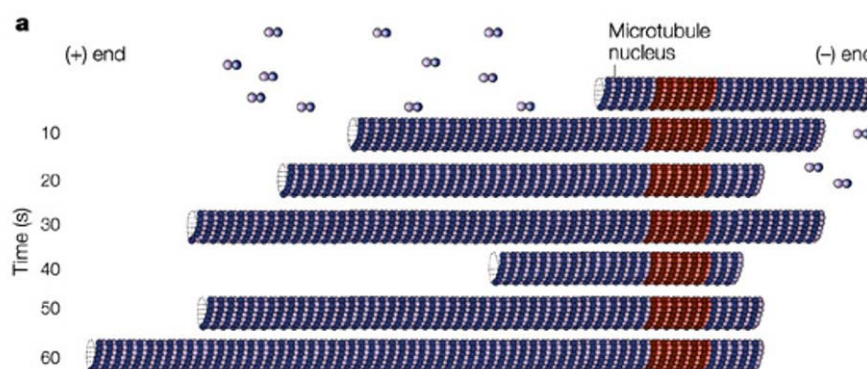


Figure 5 : Illustration schématique de l'instabilité dynamique (Jordan *et al.* 2004)

Les extrémités des microtubules grandissent ou rétrécissent de façon spontanée par addition ou perte de dimères de tubuline à leurs extrémités.

I.2.2.2 Dynamique *in vivo*

Les propriétés intrinsèques des microtubules *in vivo* sont considérablement différentes de celles des microtubules formés à partir de tubuline pure *in vitro*. Ces différences ont été mises en évidence par des expériences de stabilité des microtubules au froid en exposant des cellules ou des assemblages microtubulaires isolés à 0°C. Le degré de stabilité des microtubules intracellulaire est variable : certains résistent au froid, d'autres sont labiles au froid. Les microtubules interphasiques labiles au froid diffèrent profondément des microtubules assemblés *in vitro*. En effet, de tels microtubules résistent à la dilution, à la suppression du GTP et aux drogues dépolymérisantes. A température physiologique, ces microtubules ont un comportement identique à celui des microtubules stables au froid qui eux aussi résistent à la dilution et à l'action des drogues dépolymérisantes (Lieuvin *et al.* 1994). Dans les cellules, les réseaux interphasiques sont donc composés de microtubules intrinsèquement stables.

Toutefois, la stabilisation des assemblages microtubulaires peut être un phénomène réversible contrôlé par des effecteurs intracellulaires qui agissent en permanence sur ces polymères. Ainsi, les cellules activent en permanence des microtubules inertes pour générer une activité dynamique. L'état basal stabilisé des microtubules cytoplasmiques est dû à l'action de protéines associées aux microtubules (MAPs). De plus les microtubules échangent activement *in vivo* leur sous-unités de tubuline avec la population de tubuline libre (Saxton *et al.* 1984). L'existence de phénomènes de régulation de la stabilité génère ainsi des réseaux interphasiques avec un

comportement dynamique les rendant alors sensibles aux drogues dépolymérisantes. Ce qui explique que dans les cellules, les réseaux microtubulaires ont des comportements dynamiques similaires à ceux observés *in vitro* (Cassimeris *et al.* 1988)

Dans la cellule les microtubules sont le plus souvent nucléés à partir d'un centre organisateur. Dans le cas des flagelles et des cils, les microtubules sont nucléés à partir des corps basaux. Les extrémités "moins" des microtubules sont ancrées au niveau de ce centre organisateur alors que les extrémités "plus" irradient dans la cellule.

Après nucléation, le microtubule s'allonge pendant un certain temps avant de subir une catastrophe entraînant un raccourcissement rapide. Grâce à ce phénomène d'instabilité dynamique, les microtubules fluctuent continuellement jusqu'à ce que leur extrémité se lie à une structure capable de la stabiliser. Ce phénomène aboutit à la formation de structures organisées comme par exemple le fuseau mitotique.

Par ailleurs, le phénomène de treadmilling implique que tout objet couplé à une ou plusieurs sous-unité(s) de tubuline peut être transporté de manière centripète dans la cellule. Ce phénomène est d'ailleurs proposé comme modèle de la dynamique des microtubules du fuseau mitotique lorsque les chromosomes sont tirés vers les centrosomes.

I.2.3 Organisation du cytosquelette microtubulaire dans la cellule

I.2.3.1 Le centrosome

Les centrosomes sont les centres organisateurs des microtubules (MTOC) dans les cellules de mammifères. Ils sont constitués d'une paire de centrioles constitués de 9 triplets de microtubules et du matériel péricentriolaire au sein duquel se trouve le γ -TURC. La nucléation des microtubules se fait à proximité des centrioles. La tubuline γ associée dans des complexes (γ TURCs) permet de nucléer les microtubules à partir du matériel péricentriolaire (Job *et al.* 2003). Deux modèles hypothétiques de nucléation (Oakley 1995; Erickson 2000) ont été proposés afin d'expliquer l'initiation de l'assemblage des microtubules à partir du γ TuRC. Dans le modèle de la matrice (*template model*), l'organisation d'un protofilament se fait à partir d'un monomère de tubuline γ par le biais de contacts longitudinaux avec la tubuline α . Dans le modèle du protofilament, un court protofilament amorce est constitué par l'assemblage de plusieurs

monomères de tubuline γ et la nucléation des protofilaments adjacents s'effectue par le biais de contacts latéraux avec la tubuline α et/ou β . Pour le moment, il est impossible de trancher entre l'un ou l'autre de ces modèles.

I.2.3.2 Le réseau interphasique

Le réseau interphasique des cellules de mammifères est constitué de microtubules nucléés pour leur majorité sur le centrosome et irradiant dans tout l'espace intracellulaire.

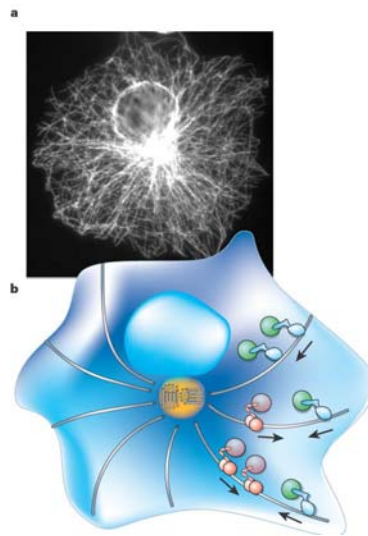


Figure 6 : Organisation des microtubules dans les cellules en interphase (Howard *et al.* 2003)

I.2.3.3 Le fuseau mitotique

Le fuseau mitotique d'une cellule de mammifère est composé de trois populations de microtubules distinctes : les microtubules astraux, les microtubules polaires et les microtubules kinétochoriens. Ils sont reliés aux centrosomes par leur extrémité "moins" (Telzer *et al.* 1981). L'extrémité "plus" des microtubules kinétochoriens capture les chromosomes via les kinétochores, structures protéiques associées aux centromères. Ces microtubules jouent un rôle majeur dans le positionnement des chromosomes en plaque métaphasique et de leur ségrégation lors de l'anaphase A. Les microtubules polaires et astraux semblent plus particulièrement impliqués dans l'éloignement des pôles, lors de l'anaphase B. Les microtubules astraux

participent au positionnement du fuseau dans la cellule, en fonction des déterminants corticaux.

La dynamique des microtubules des fuseaux mitotiques est beaucoup plus rapide que celle des réseaux interphasiques. Des expériences de microinjection de tubuline marquée à la fluorescéine ont montré que les fuseaux mitotiques échangeaient très rapidement des sous-unités de tubuline, avec un temps moyen de demi-renouvellement de 15 à 20 secondes (Saxton *et al.* 1984)

La nucléation des microtubules kinétochoriens se fait au niveau du centrosome mais également à partir des chromosomes. Ce phénomène a été observé dans des extraits méiotiques sans centrosome chez le Xénope (Karsenti *et al.* 2001), mais aussi dans des cellules somatiques (Maiato *et al.* 2004). La mise en place du fuseau est extrêmement contrôlée et implique des protéines associées aux microtubules (MAPs).

I.2.4 Les effecteurs de la dynamique des microtubules

En interphase, les microtubules sont régulés par de nombreuses protéines situées le long des microtubules. L'interaction de ces protéines avec les microtubules est étroitement contrôlée par des kinases et des phosphatases (Cassimeris *et al.* 2001). Seules les protéines stabilisantes comme les protéines associées aux microtubules (MAPs) ont été les premières décrites comme effecteurs de la dynamique des microtubules. Ce n'est que plus récemment qu'ont été découvertes des protéines avec une activité déstabilisante, comme les stathmines et les moteurs moléculaires.

I.2.4.1 Effecteurs favorisant la stabilisation des microtubules

I.2.4.1.1 Famille des MAP1

MAP1 a été initialement décrite comme une protéine de haut poids moléculaire (300 à 350kDa) associée aux préparations de microtubules recyclés et subdivisée en MAP1A, MAP1B codées par deux gènes différents. Ces protéines filamenteuses semblent connecter les microtubules entre eux dans les dendrites et les axones. Le domaine de liaison aux microtubules est situé dans la région amino-terminale basique riche en résidus lysine chez MAP1B et dans une région acide pour MAP1A. Outre sa localisation dans les neurones, MAP1A est distribuée de façon moins importante dans d'autres types cellulaires (Schoenfeld

et al. 1989) *In vitro*, MAP1A stabilise les microtubules en favorisant la nucléation et en stimulant l'élongation des microtubules (Pedrotti *et al.* 1996) mais son action est plus faible comparée à celle de MAP2 (Vaillant *et al.* 1998). MAP1B est capable de promouvoir l'assemblage des microtubules *in vitro* et de les stabiliser faiblement. Toutefois, MAP1B ne supprime pas complètement l'instabilité dynamique contrairement aux autres MAPs neuronales MAP2 et Tau (Vandecandelaere *et al.* 1996).

I.2.4.1.2 Famille MAP2/MAP4/Tau

MAP2, MAP4 et les protéines Tau font partie d'une même famille.

La famille MAP2 possède trois variants issus par épissage alternatifs d'un seul ARNm : MAP2a, MAP2b et MAP2c (Garner *et al.* 1988) MAP2a et MAP2b sont des protéines d'un poids moléculaire apparent de 280kDa, très allongées, flexibles et thermostables. Elles se situent spécifiquement dans les dendrites des cellules neuronales (Bernhardt *et al.* 1984). MAP2c possède un poids moléculaire apparent moins élevé (70kDa). C'est une isoforme caractéristique de l'embryon. MAP2 stimule l'assemblage des microtubules *in vitro* en favorisant la nucléation et en diminuant la concentration critique d'assemblage.

MAP4 est une protéine thermostable d'environ 210kDa. Elle est apparentée à Tau et MAP2 (Aizawa *et al.* 1989) mais est exprimée dans toutes les cellules non neuronales des vertébrés (Bulinski *et al.* 1980). Cette protéine joue un rôle dans l'assemblage des microtubules. Quand elle est ajoutée à de la tubuline purifiée, MAP4 stabilise les microtubules en augmentant de près de 30 fois la fréquence de sauvetage (Itoh *et al.* 1994). Une élévation du niveau de MAP4 dans les cellules, par surexpression ou par microinjection, génère des microtubules plus résistants à l'action de drogues comme le nocodazole (Olson *et al.* 1995; Yoshida *et al.* 1996; Nguyen *et al.* 1997), un ralentissement de la croissance cellulaire et une diminution des déplacements des organelles et des vésicules (Bulinski *et al.* 1997).

Les protéines Tau sont un ensemble de protéines de poids moléculaire variant entre 50 et 70kDa (Weingarten et al 1975, Cleveland et al 1977). Tout comme MAP2, les différentes isoformes de Tau résultent de l'épissage alternatif d'un gène unique (Himmler 1989). Ces isoformes sont différenciellement exprimées au cours du développement. Les protéines Tau sont essentiellement localisées dans les axones (Brion *et al.* 1988). Des études ont montré que Tau stimulait l'assemblage des microtubules. Les protéines Tau présentent des répétitions imparfaites d'un motif d'acide aminé impliqué dans la liaison aux microtubules. Une partie de ces motifs interagirait avec la tubuline β au même niveau que le site d'interaction avec des drogues stabilisantes telles que le taxol® et le discodermolide (Kar *et al.* 2003a; Kar *et al.* 2003b).

Ces 3 types de protéines ont une activité stabilisante sur les microtubules, en ralentissant leur cinétique de désassemblage en présence de drogues ou lors de dilutions (Dustin 1984). Cette activité reste cependant faible car l'addition de MAP2 ou de protéine Tau à des microtubules formés de tubuline pure n'induit pas de résistance complète à la dilution ou au froid. Ces microtubules formés de tubuline et de MAP2 ou de protéines Tau sont donc moins stables que les microtubules présents *in vivo*. Par ailleurs, ces MAPs sont les substrats de très nombreuses protéines kinases. Les phosphorylations de MAP2 et de Tau inhibent *in vitro* leur liaison aux microtubules ainsi que leur capacité à promouvoir l'assemblage des microtubules.

1.2.4.1.3 La protéine STOP

Une autre protéine appelée protéine STOP (Stable Tubule Only Polypeptides) confère aux microtubules un très haut degré de stabilité. En effet, les microtubules associés à cette protéine sont capables de résister à une dépolymérisation engendrée par le froid ou des ions Ca^{2+} . Dans les neurones, les protéines STOPs semblent avoir des fonctions plus spécifiques que la stabilisation des microtubules. L'inactivation du gène de la STOP chez la souris provoque des défauts synaptiques et des anomalies comportementales similaires à la schizophrénie (Bosc *et al.* 2003). Les protéines STOPs seraient nécessaires à la différenciation cellulaire et à l'établissement des neurites. Elles sont

également responsables du faible taux de renouvellement des microtubules caractéristique des cellules nerveuses (Guillaud *et al.* 1998).

Dans les fibroblastes en division, une isoforme de la protéine STOP est associée aux microtubules kinétochoriens (Denarier *et al.* 1998).

1.2.4.1.4 La doublecortine

La doublecortine est exprimée dans les neurones en cours de migration et de différenciation (Francis *et al.* 1999). Elle doit son nom au fait que sa mutation entraîne la formation d'un "double cortex" dans le cerveau. Le site de liaison de la doublecortine (domaine N-terminal) avec les microtubules est responsable de la stabilisation des microtubules (Horesh *et al.* 1999; Taylor *et al.* 2000). La doublecortine favorise la polymérisation mais aussi la formation de faisceaux anormaux de microtubules car le site de liaison à la tubuline consiste en une double répétition du domaine "DCX" qui peut assembler deux sous-unités de tubuline soit au sein d'un même microtubule soit avec un autre microtubule. Ces deux domaines ont des propriétés légèrement différentes : le domaine N-terminal n'interagit uniquement qu'avec les microtubules alors que le domaine C-terminal interagit à la fois avec les microtubules et les dimères libres de tubuline (Kim *et al.* 2003).

Une autre protéine, LIS1, aurait une fonction similaire dans le cerveau mais se lierait préférentiellement aux extrémités des microtubules plutôt que tout le long du polymère (Tanaka *et al.* 2004).

1.2.4.1.5 Autres protéines

D'autres protéines stabilisant les microtubules ont également été mises en évidence chez le Xénope. Ainsi, la protéine XMAP215 stimule fortement la vitesse d'élongation de l'extrémité "plus" (Vasquez *et al.* 1994). Cette propriété permet la formation de longs microtubules très dynamiques. Des homologues de la protéine XMAP215 ont été découverts chez un grand nombre d'espèces, notamment chez l'homme (TOGp). Un site de liaison aux microtubules a été identifié dans la partie N-terminale de TOGp. La partie C-terminale est capable d'interagir avec des dimères de tubuline et pourrait promouvoir l'élongation des microtubules (Spittle *et al.* 2000). Une autre protéine, XMAP310, stabilise les

microtubules en augmentant la fréquence de sauvetage et en ralentissant le raccourcissement des microtubules (Andersen *et al.* 1997).

I.2.4.2 Effecteurs favorisant la déstabilisation des microtubules

I.2.4.2.1 MCAK/XKCM1

Des moteurs moléculaires de la famille des kinésines, sont impliqués dans la régulation de la dynamique des microtubules. Ainsi, la sous-famille Kin-I ne se déplace pas le long des microtubules mais utilise l'énergie de l'ATP pour dépolymériser les extrémités des microtubules (Desai *et al.* 1999; Homma *et al.* 2003). Les moteurs XKCM1 identifiés chez le Xénope et son homologue MCAK chez l'homme font partie de cette sous-famille. XKCM1 est capable d'accroître la fréquence des catastrophes dans des extraits de Xénope, de façon ATP-dépendante. Des expériences ont montré que l'activité déstabilisante de XKCM1 était nécessaire pour la formation du fuseau mitotique dans des extraits d'oeufs de Xénope. La délétion de cette protéine aboutit à la formation de longs microtubules et à une interruption de l'assemblage du fuseau mitotique (Walczak *et al.* 1996).

I.2.4.2.2 La stathmine

La stathmine est une petite phosphoprotéine cytosolique de 18kDa environ découverte au début des années 1980. Cette protéine a été initialement identifiée comme un marqueur de cellules cancéreuses (Ozon *et al.* 1997). La stathmine interagit avec l'hétérodimère α/β de tubuline. Une molécule de stathmine, forme un complexe avec deux molécules de tubuline (Belmont *et al.* 1996b; Jourdain *et al.* 1997); cette interaction est affaiblie après phosphorylation de la stathmine. La structure cristalline déterminée par radiocristallographie aux rayons X révèle un arrangement tête-à-queue des deux molécules de tubuline, le domaine stathmine formant une longue hélice α reliant les deux tubulines.

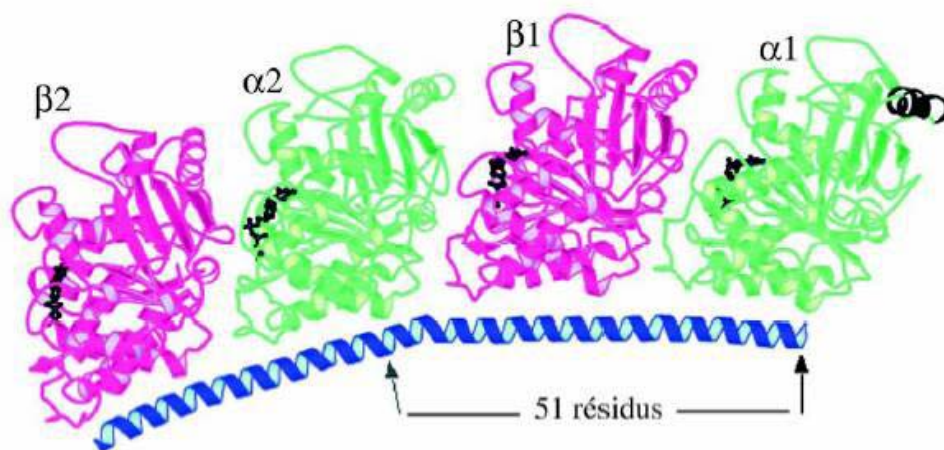


Figure 7 : Structure obtenue par radio-cristallographie du complexe tubuline stathmine T2S (Gigant *et al.* 2000)

L'interaction entre la stathmine et la tubuline aboutit à la séquestration de la tubuline diminuant ainsi la concentration totale de tubuline pour l'assemblage. En maintenant la tubuline dans une conformation courbe non compatible avec la structure droite de la tubuline dans le corps du microtubule, la stathmine diminue le réservoir de tubuline disponible pour la polymérisation. Par ailleurs, la stathmine peut stimuler fortement les catastrophes (Belmont *et al.* 1996a). Ces deux activités ont pu être dissociées suite à des variations de pH ou à l'utilisation de formes tronquées de la protéine (Howell *et al.* 1999).

La stathmine peut être phosphorylée sur quatre sérines par un ensemble complexe de protéines kinases et en réponse à différents stimuli. Les études du rôle de la phosphorylation de la stathmine ont été réalisées par phosphorylation *in vitro* ou par l'utilisation de mutants. Des expériences de pontage ont montré que la stathmine phosphorylée sur ces quatre sites n'interagit plus avec la tubuline (Larsson *et al.* 1997). La phosphorylation simultanée des sérines 16 et 63 inhibe presque totalement l'interaction avec la tubuline alors que la phosphorylation des sérines 25 et 38 n'altère que très peu cette interaction (Melander Gradin *et al.* 1997). L'état de phosphorylation de la stathmine peut ainsi moduler l'interaction stathmine/tubuline (Jourdain *et al.* 1997) et inhiber sa capacité à limiter la polymérisation.

I.2.4.3 Les protéines qui se lient à l'extrémité des microtubules

Les protéines liant spécifiquement l'extrémité des microtubules ont été identifiées plus récemment. Des protéines de la famille EB1 (End-Binding protein 1) sont impliquées dans de nombreux complexes macromoléculaires situés à l'extrémité "plus" des microtubules, comme les complexes permettant les contacts avec la membrane cellulaire (Bu *et al.* 2003). EB1 peut s'associer avec APC, un suppresseur de tumeur fréquemment muté dans les cancers du colon. EB1 serait responsable de la localisation de la protéine APC à l'extrémité des microtubules. C'est à ce niveau qu'APC favoriserait la polymérisation des microtubules. Dans les cellules mitotiques, EB1 et APC sont toutes deux localisées au niveau des kinétochores. Dans les centrosomes, ces protéines sont associées aux extrémités "plus" de microtubules très courts nouvellement synthétisés (Rehberg *et al.* 2002).

Par ailleurs, la liaison de protéines comme CLIP 70 à l'extrémité des microtubules peut provoquer leur stabilisation (Small *et al.* 2003).

I.2.5 Le contrôle pharmacologique des microtubules

La dynamique des microtubules continue d'être une cible privilégiée en chimiothérapie anticancéreuse. Elle peut être bloquée par de nombreux agents qui se lient sur des sites distincts de la tubuline. Actuellement, trois sites de liaison des poisons des microtubules ont été caractérisés au niveau de la tubuline : le domaine des alcaloïdes de la pervenche situé à l'interface entre les deux dimères, le site des taxoïdes situé sur la sous-unité β et celui de la colchicine situé à l'interface entre la sous unité α et la sous unité β .

I.2.5.1 Les molécules qui stabilisent les microtubules

I.2.5.1.1 Les taxanes

Le paclitaxel (taxol®) est un agent anticancéreux de la famille des taxanes diterpénoïdes (taxoïdes) extrait de l'écorce de l'if américain (*Taxus brevifolia*) (Wani *et al.* 1971). Cette molécule peut être également obtenue par héli-synthèse à partir d'un précurseur non cytotoxique, la 10-déacétyl baccatine III (Denis *et al.* 1988) ou après synthèse chimique complète. Le docetaxel (Taxotère®) est un analogue du paclitaxel obtenu par héli-synthèse à partir du même précurseur extrait des aiguilles de l'if européen (*Taxus baccata*) (Mangatal *et al.* 1989; Gueritte-Voegelein *et al.* 1991).

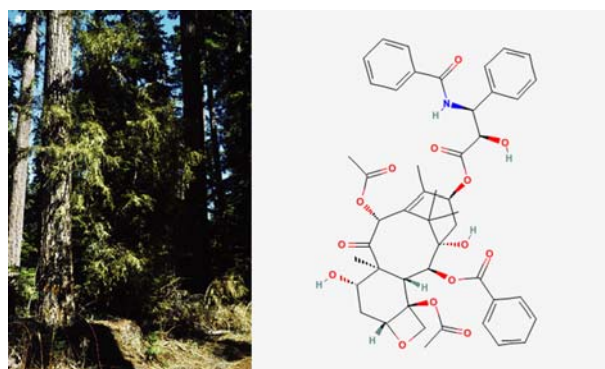


Figure 8 : *Taxus brevifolia* et structure du taxol®

Le paclitaxel interagit de façon spécifique et réversible avec les microtubules, avec une stoechiométrie d'une mole de paclitaxel pour une mole de tubuline. Cette interaction s'accompagne d'une stabilisation des microtubules qui deviennent alors résistants au froid ou à la présence d'ion Ca^{2+} qui favorisent leur dépolymérisation. Dans les cellules, cette stabilisation provoque une augmentation de la masse totale des microtubules à toutes les phases du cycle. On observe alors la formation de faisceaux anormaux de microtubules dans les cellules en interphase et la formation d'asters multiples avec un fuseau mitotique multipolaire dans les cellules en mitose.

Le paclitaxel est capable d'induire l'apoptose par deux mécanismes distincts :

-soit par un blocage de la cellule en prophase à la transition G2/M,

-soit lorsque les cellules sont parvenues à se diviser mais ont accompli une mitose anormale, par une activation de la kinase Raf-1 entraînant la phosphorylation de Bcl2.

L'action anti-tumorale du paclitaxel s'explique également par d'autres mécanismes d'action indépendants de sa liaison aux microtubules comme l'induction de l'expression des gènes du TNF α et d'autres cytokines ou la différenciation des macrophages antitumoraux.

Suite à des études de cristallographie électronique avec reconstruction en trois dimensions, le site de liaison du paclitaxel aux microtubules a été localisé entre les protofilaments adjacents (Nogales *et al.* 1995), à l'intérieur de la paroi des microtubules. Le contrôle de la dynamique des microtubules se ferait via une modulation de l'interaction latérale entre les protofilaments adjacents.

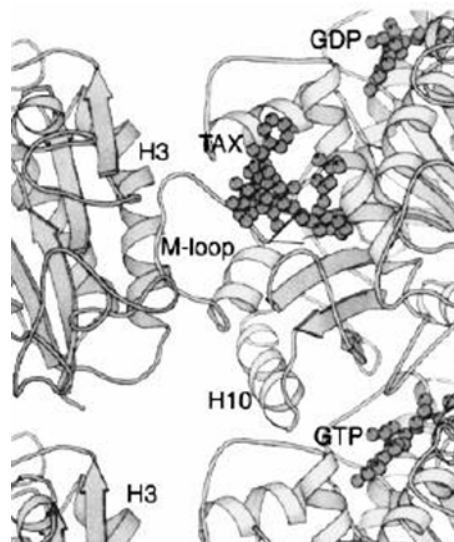


Figure 9 : Reconstruction en 3D de l'interaction latérale entre protofilaments (Downing 2000)

Représentation de l'intérieur d'un microtubule, avec l'extrémité "plus" localisée en haut de l'illustration. Le site d'interaction du taxol® est situé sur la tubuline β entre les 2 protofilaments.

Le paclitaxel et le docetaxel se lient au même site sur la tubuline. Cependant une affinité deux fois supérieure du docetaxel pour la tubuline a été observée. Le docetaxel s'avère également plus efficace que le paclitaxel au regard de ses effets cytotoxiques et sur la polymérisation de la tubuline (Diaz *et al.* 1993).

Malgré leur efficacité anti-tumorale, notamment pour les cancers du sein, des ovaires et des poumons, ces agents sont extrêmement toxiques car ils agissent également sur les microtubules des cellules non cancéreuses en prolifération (cellules hématopoïétiques, muqueuses...). Enfin, ils peuvent

affecter les neurones périphériques et provoquer des effets secondaires importants. Par ailleurs dans certains cas, les cellules tumorales deviennent insensibles aux taxanes car elles développent des mécanismes de résistance tels que l'expression du gène *mdr1* de résistance aux drogues, la modification de la structure et de l'expression de la tubuline.

1.2.5.1.2 Les épothilones

L'épothilone A et l'épothilone B sont des agents antimitotiques se caractérisant par un mécanisme d'action identique à celui du taxol®. L'activité de ces deux molécules vis à vis des microtubules a été découverte suite à la mise en place d'un modèle de criblage biochimique capable de repérer des produits augmentant la vitesse de polymérisation de la tubuline en microtubules, en 1995 (Bollag *et al.* 1995). Ces macrolides dérivés de la myxobactérie *Sorangium cellulosum* étaient déjà connus pour leurs activités antifongiques et cytotoxiques.

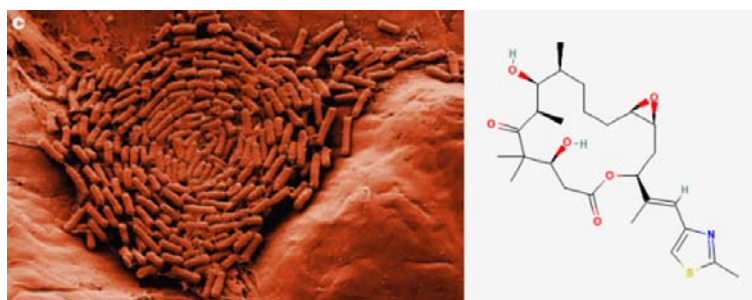


Figure 10 : Cliché de microscopie électronique de *Sorangium cellulosum* (Mann 2002) et structure de l'épothilone A

A la différence des taxanes, les épothilones peuvent traverser la barrière hémato-méningée, ce qui étend le spectre de leurs applications thérapeutiques. Les épothilones A et B augmentent d'une part la vitesse de polymérisation de la tubuline en microtubules et inhibent d'autre part la vitesse de la réaction inverse, c'est-à-dire la dépolymérisation des microtubules en tubuline. Les épothilones exercent ces propriétés en se fixant sur le même site que le taxol® (Bode *et al.* 2002) au sein des microtubules et cela avec une affinité 2 à 3 fois plus élevée que celle du taxol®. Cette similarité d'action biochimique se confirme sur les cellules: formation de faisceaux de microtubules, cytotoxicité consécutive à un blocage des cellules à la transition G2/M

Ces drogues inhibent la polymérisation des microtubules à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Gerth *et al.* 1996).

Les épothilones inhibent de façon compétitive la liaison du taxol® à la tubuline de cerveau de mammifère, suggérant que ces deux types de molécules aurait un site d'interaction commun avec la tubuline. Ceci peut s'expliquer par les analogies structurales révélées par la modélisation moléculaire entre la molécule d'épothilone et le cycle baccatine III du taxol®. Par ailleurs, on observe une très faible reconnaissance des épothilones par les lignées présentant le phénotype MDR1 et, enfin, une quasi-absence de résistance croisée sur des lignées présentant une résistance acquise au taxol® par modification de la tubuline β comme la lignée ovarienne humaine A 2780Tax résistante au taxol®.

1.2.5.1.3 Le discodermolide

Les composés marins ont permis d'isoler de nombreux produits, dont le discodermolide obtenu à partir d'une éponge des Caraïbes, *Discodermia dissoluta* en 1990.

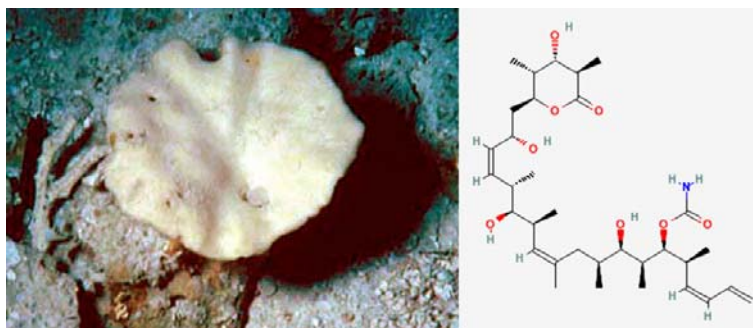


Figure 11 : *Discodermia dissoluta* et structure du discodermolide

Le discodermolide est un immunosuppresseur aussi actif que la cyclosporine A, qui est très efficace contre le rejet des greffes chez l'animal. Il a une action voisine du taxol® car il stabilise les microtubules et favorise leur assemblage. La structure relative du Discodermolide a pu être déterminée par analyses RMN 1D et 2D, et par cristallographie aux rayons X; la configuration absolue a été établie par la suite par l'équipe de Schreiber en réalisant la synthèse des deux énantiomères (+) et (-). Ces deux énantiomères sont tous les deux actifs sur la prolifération cellulaire mais à des stades différents du cycle: le produit naturel

(+) agit au stade G2/M tandis que le composé de synthèse (-) agit sur la phase S (Hung *et al.* 1994).

I.2.5.1.4 Autres molécules

Le succès du taxol® a encouragé la recherche d'autres molécules issues de produits naturels présentant la capacité de stabiliser les microtubules. Ceci a permis la découverte de l'eleutherobine, isolée pour la première fois en 1997 à partir d'un corail *Eleutherobia* (Long *et al.* 1998), du laulimalide, isolé en 1988 à partir d'une éponge du Pacifique *Cacospongia mycofijiensis* (Mooberry *et al.* 1999) et des sarcodictyines, extraites d'un corail méditerranéen *Sarcodictyon roseum* (D'Ambrosio *et al.* 1987)

I.2.5.2 Les molécules qui déstabilisent les microtubules

I.2.5.2.1 Les alcaloïdes de la pervenche

La vinblastine, alcaloïde extrait de la plante *Catharanthus aureus* (pervenche de Madagascar) appartient à la famille des alcaloïdes de la pervenche qui comprend aussi la vincristine. Grâce à ses activités antitumorales la vinblastine est aujourd'hui largement utilisée en chimiothérapie anticancéreuse (Rowinsky *et al.* 1991).

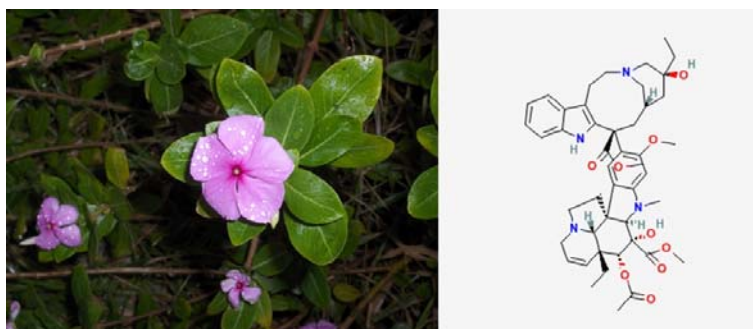


Figure 12 : Pervenche de Madagascar et structure de la vinblastine

La liaison de la vinblastine à la tubuline s'effectue, d'une façon rapide et réversible, par un mécanisme d'auto-association des dimères de tubuline. Elle induit alors la formation d'agrégats ordonnés et de polymères avec une structure différente de celle des microtubules (Himes 1991). La liaison de la vinblastine

s'effectue à l'interface entre deux dimères avec des affinités différentes selon sa position à l'intérieur du microtubules (Singer *et al.* 1989)(Wilson *et al.* 1982; Jordan *et al.* 1986).

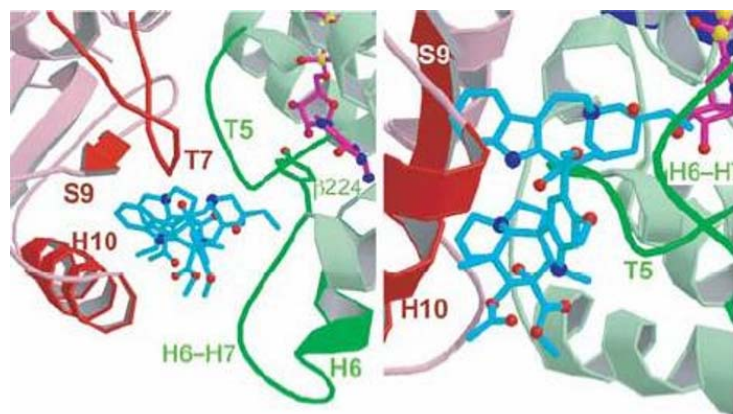


Figure 13 : Site d'interaction de la vinblastine avec la tubuline (Gigant *et al.* 2005)

Selon deux vues perpendiculaires

La liaison de la vinblastine au niveau des sites de faible affinité le long de la surface du microtubule est probablement responsable de la capacité de la vinblastine à induire *in vitro* la dépolymérisation des microtubules et à des concentrations supérieures à 10 μ M, la formation de paracristaux *in vivo* (Himes 1991). La liaison de la vinblastine, au niveau des sites de haute affinité localisés aux extrémités du microtubule, est responsable de la suppression des réactions impliquées dans la dynamique du microtubule à ces deux extrémités et observées pour de faibles concentrations en vinblastine. Contrairement à la colchicine, la vinblastine se lie directement aux extrémités du microtubule et n'est pas incorporée dans la trame du microtubule (Jordan *et al.* 1990). Le mécanisme moléculaire exact par lequel la vinblastine inhibe l'addition et la perte de dimères de tubuline au niveau de l'extrémité en croissance du microtubule reste encore mal connu.

Ces drogues sont utilisées dans le traitement de certains cancers comme le cancer des testicules, la maladie de Hodgkin ou la leucémie lymphocytaire aiguë.

I.2.5.2.2 La colchicine

La colchicine est un antimitotique puissant, extrait du crocus d'automne *Colchicum autumnale*. Elle a joué un rôle clé dans la compréhension des propriétés et des fonctions de la tubuline et des microtubules depuis qu'il a été découvert qu'elle se fixait aux sous-unités des microtubules dans des extraits cellulaires (Borisy *et al.* 1967; Wilson *et al.* 1967).

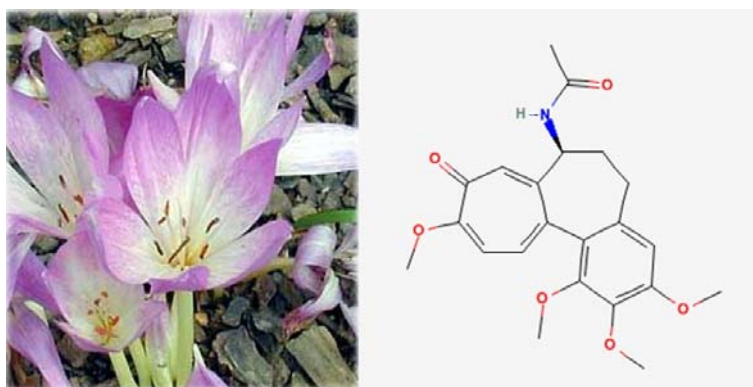


Figure 14 : Crocus d'automne et structure de la colchicine

L'affinité des microtubules avec la colchicine est très faible, la colchicine doit d'abord former un complexe avec la tubuline soluble pour pouvoir ensuite agir sur les microtubules (Margolis *et al.* 1977; Skoufias *et al.* 1992). Le site actif de la colchicine se situe dans une zone de la chaîne β , à l'interface des monomères α et β d'un dimère de tubuline.

La colchicine peut inhiber la polymérisation des microtubules à des concentrations très en dessous de la concentration totale en tubuline (Margolis *et al.* 1980). La colchicine agit aux extrémités des microtubules, en établissant une coiffe ou en stabilisant les extrémités (Wilson *et al.* 1986). Les microtubules dépolymériseraient alors par leur extrémité (-). La colchicine a été le premier ligand de la tubuline pour lequel un effet sur la vascularisation de tumeurs expérimentales a été observé. Mais les doses efficaces sont proches de la dose maximale tolérée (DMT) et induisent de fortes toxicités et une morbidité importante. La colchicine n'a pas pu être utilisée comme agent anticancéreux en raison de sa trop grande toxicité

I.2.5.2.3 La combretastatine

La combretastatine est la première molécule qui induit des effets analogues à la colchicine à des doses inférieures au dixième de la DMT avec une sélectivité pour les cellules endothéliales des vaisseaux associés à la tumeur. La combretastatine est un produit naturel isolé à partir d'un arbre sud africain *Combretum caffrum*.

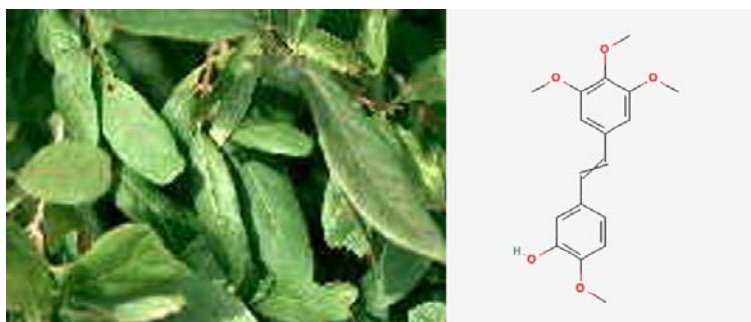


Figure 15 : *Combretum caffrum* et structure de la combretastatine

La combretastatine inhibe très fortement la liaison de la colchicine à la tubuline et la polymérisation de la tubuline en microtubules (Pettit *et al.* 1989). Contrairement à la colchicine, cette liaison est rapide et réversible. La combretastatine provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. Elle agit sur les cellules en phase de prolifération et non sur celles en phase quiescente. Par ailleurs, la combretastatine agit spécifiquement sur les vaisseaux sanguins irriguant les tumeurs solides dans les modèles murins. Elle provoquerait d'une part une diminution importante du débit sanguin au niveau de la tumeur et inhiberait la prolifération des cellules endothéliales vasculaires. L'interruption du flux d'oxygène, d'éléments nutritifs et de facteurs de croissance par les vaisseaux sanguins associés à la tumeur aboutit alors à la nécrose de cette dernière. En perturbant le cytosquelette microtubulaire, la combretastatine stoppe la division cellulaire des cellules endothéliales en phase proliférative et induit l'apoptose de ces dernières. Il n'est cependant pas exclu que d'autres processus, impliqués ou non dans la mitose, spécifiques ou prédominants dans les cellules endothéliales en phase proliférative soient la cible de la combretastatine.

I.2.5.2.4 Le nocodazole

Le nocodazole (initialement appelée oncodazole (Peterson *et al.* 2002)) est une molécule chimique appartenant à la famille des benzimidazoles. Elle a été identifiée en 1975 suite à la recherche d'agents vermifuges (De Brabander *et al.* 1975).

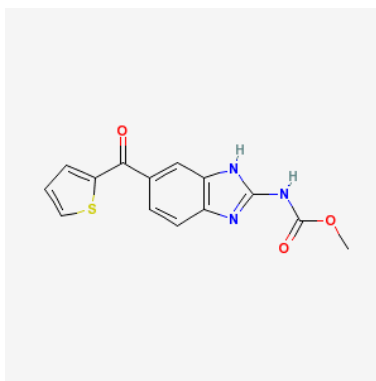


Figure 16 : Structure du nocodazole

C'est une molécule anti-mitotique qui fixe la tubuline libre et catalyse l'hydrolyse du GTP au site E tout en empêchant l'incorporation des dimères dans les microtubules, bloquant ainsi leur polymérisation. Cette molécule n'a pas été utilisée en thérapie anticancéreuse car les premières phases d'essais cliniques n'ont pas été concluantes, d'où la modification anecdotique de sa dénomination : on-codazole en no-codazole (Peterson *et al.* 2002).

I.2.5.2.5 Les cryptophycines

Les cryptophycines ont été initialement identifiées en 1990 à partir d'extraits d'une cyanobactérie appelée Nostoc (Eggen *et al.* 2002).



Figure 17 : Nostoc et structure de la cryptophycine

Ces macrolides sont capables d'interagir avec la tubuline, probablement sur un site superposé au site de liaison des alcaloïdes de la pervenche. Cependant, leur mécanisme d'action semble être différent. Ils inhibent la polymérisation des microtubules, en empêchant l'instabilité dynamique, probablement par la formation secondaire d'un complexe cryptophycine-tubuline à l'extrémité des microtubules. De cette façon, très peu de molécules de cryptophycine sont nécessaires pour avoir un effet important sur la dynamique des microtubules (Panda *et al.* 1998). Les cryptophycines sont très cytotoxiques même à des concentrations de l'ordre du picomolaire. De plus ces composés ne sont pas les substrats des pompes à efflux pgp.

1.2.5.2.6 La dolastatine

Des petits pseudopeptides tels que les dolastatines, ont été isolées à partir du «lièvre de mer» *Dolabella auricularia*. Ces agents antimitotiques semblent inhiber la formation des microtubules en interagissant avec la tubuline β et en induisant l'apoptose (Kalemkerian *et al.* 1999). Le site de liaison à la tubuline est vraisemblablement superposé à celui des alcaloïdes de la pervenche.

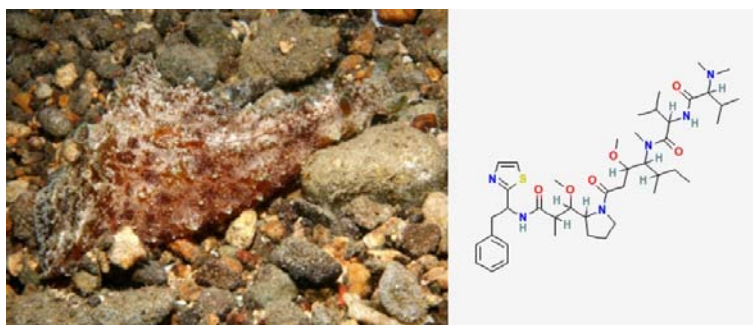


Figure 18 : *Dolabella auricularia* et structure de la dolastatine-10

La dolastatine-10 et la dolastatine-15 ont été synthétisés et présentent des propriétés anti-prolifératives très intéressantes, évaluées dans un grand nombre d'essais cliniques.

Chapitre II : Le criblage à haut débit

II.1 Le processus de criblage

Actuellement, les stratégies de développement de nouveaux médicaments bénéficient de l'essor des biotechnologies, de la mise au point d'équipements de plus en plus sophistiqués et de l'accès à de nouveaux moyens de traitements de données. Généralement, il faut tester quelques milliers de molécules pour aboutir à la mise sur le marché d'un médicament. Grâce à la chimie combinatoire, de nombreuses librairies de molécules sont aujourd'hui disponibles. Au-delà des applications médicales, la petite molécule est devenue un outil accessible pour la recherche fondamentale. C'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser de nouvelles stratégies de détection de molécules actives. Des progrès récents ont permis de révolutionner le criblage de nouvelles molécules par une augmentation de la cadence des tests de criblage. En effet, grâce à l'utilisation de robots, il est possible de réaliser les tests dans des microplaques 96 ou 384 puits sans réduire la fiabilité et la reproductibilité d'un test mais aussi la sensibilité. Seule la robotisation peut permettre une réelle standardisation de toutes les étapes d'un test allant de l'ensemencement des cellules jusqu'à l'analyse statistique des résultats. Les systèmes de détection reposent principalement sur la fluorescence et la luminescence, fournissant une excellente sensibilité et permettant des mesures rapides. Ces tests de criblage dits à haut-débit (HTS, pour High Throughput Screening en anglais) permettent donc de tester en parallèle un grand nombre de molécules sur diverses cibles biologiques (extraits, cellules, organismes).

La recherche pharmacologique, après avoir longtemps privilégié le criblage en aveugle, s'est orientée vers une approche étiologique, en essayant d'utiliser les connaissances des pathologies pour identifier des cibles susceptibles de donner matière au développement pharmacologique. Les thérapies contemporaines concernent environ 400 cibles mais grâce aux avancées récentes de la génétique, ce nombre pourrait passer à 2500 voire 5000 nouvelles cibles. Selon la cible d'intérêt, le criblage peut être réalisé sur une cible moléculaire ou dans un contexte cellulaire

II.1.1 Le criblage à l'échelle moléculaire

La plupart des cibles à cribler pour la recherche de nouvelles molécules actives ont été identifiées par des données biologiques. Il peut s'agir d'enzymes (kinases), de récepteurs (récepteurs couplés aux protéines G, GPCR), de canaux ioniques ou de facteurs de transcription ayant une activité intéressante en physiologie normale ou impliqués dans des pathologies. Le criblage consiste alors à rechercher des molécules capables de moduler *in vitro* l'activité de ces cibles isolées. Cette approche permet également de caractériser la performance des molécules vis à vis de leur cible grâce à la détermination de constantes biochimiques telles que la constante d'inhibition (K_i) ou l' IC_{50} à l'échelle moléculaire. Cependant, elle n'apporte aucune information sur ce qui peut se passer à l'échelle cellulaire. Par ailleurs, il existe de nombreuses cibles pour lesquelles seuls des criblages cellulaires peuvent être développés comme par exemple des essais où la réponse biologique implique un changement de localisation de la cible au niveau de la cellule (Htun *et al.* 1996). Ces essais nécessitent l'utilisation de cellules intactes. De façon générale, le criblage sur cibles isolées convient plus particulièrement aux cibles intracellulaires telles que les enzymes ou les récepteurs nucléaires alors que le criblage cellulaire est traditionnellement utilisé préférentiellement pour des cibles localisées au niveau de la membrane cellulaire.

II.1.2 Le criblage à l'échelle cellulaire

Le criblage cellulaire permet d'évaluer les effets de la molécule sur la structure et les fonctions cellulaires. Les cellules ont la propriété de développer des processus complexes en réponse à des stimuli variés. La plupart de ces processus peuvent être mis à profit pour développer des essais dans un format adapté au criblage à haut débit comme par exemple, la transcription de gènes, la prolifération, la cytotoxicité, la sécrétion, la translocation ou encore l'expression de protéines. Grâce aux progrès technologiques, il est également possible de transfecter les cellules avec des gènes rapporteurs afin de mieux détecter les modifications génétiques.

A l'heure actuelle, la plupart des cellules utilisées sont des cellules eucaryotes ou procaryotes indifférenciées ou peu différenciées. Ce choix est guidé par leur facilité d'obtention et d'entretien et du fait de leur prolifération importante et généralement continue. Cependant, l'utilisation de cellules différenciées est tout à fait envisageable dans un proche avenir. Il est déjà possible d'immobiliser un petit nombre de cellules dans des gels de collagène ou d'alginate et de les congeler tout en gardant leurs performances (Guyomard *et al.* 1996).

II.2 La génétique chimique

La compréhension des processus cellulaires et physiologiques est un objectif central de la recherche en biologie. Historiquement, la génétique s'est avérée être un outil puissant pour la compréhension de nombreux processus biologiques comme la division cellulaire chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Hartwell 1991), la mort programmée des cellules ou le développement d'organes chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Brenner 1974) ou encore le développement embryonnaire chez la mouche *Drosophila melanogaster* (Nusslein-Volhard *et al.* 1980). Ces exemples sont des approches classiques de génétique directe dont la procédure peut être résumée en trois étapes. Tout d'abord, le génome d'un organisme est muté de façon aléatoire (par rayons X, transposons...), puis le phénotype désiré est sélectionné parmi la large collection de mutants ainsi générée et finalement le gène responsable du phénotype est identifié. Alors que l'approche de génétique directe permet de caractériser le gène responsable de l'apparition d'un phénotype, la génétique inverse permet d'élucider la fonction d'une protéine d'intérêt en analysant le phénotype obtenu après mutation du gène codant pour cette protéine. Dans ce cas, la mutation peut affecter seulement l'activité de la protéine d'intérêt ou invalider totalement son expression (knockout). Ainsi, il est possible d'identifier la fonction d'une protéine en perturbant son activité.

Par analogie avec les approches de génétique, l'approche de génétique chimique se propose d'étudier les processus biologiques en utilisant de petites molécules chimiques pour moduler la fonction des protéines (figure 19). La génétique chimique directe implique l'utilisation de petites molécules afin d'obtenir

l'effet phénotypique désiré dans un système biologique. Une fois que la molécule d'intérêt est détectée, la protéine modulée par la molécule doit être également identifiée. La génétique chimique inverse implique la sélection de petites molécules capables de perturber l'activité de protéines d'intérêt. Les molécules identifiées sont ensuite utilisées pour tester les effets phénotypiques induits par la perturbation de la fonction de la protéine, dans les cellules ou dans l'organisme entier.

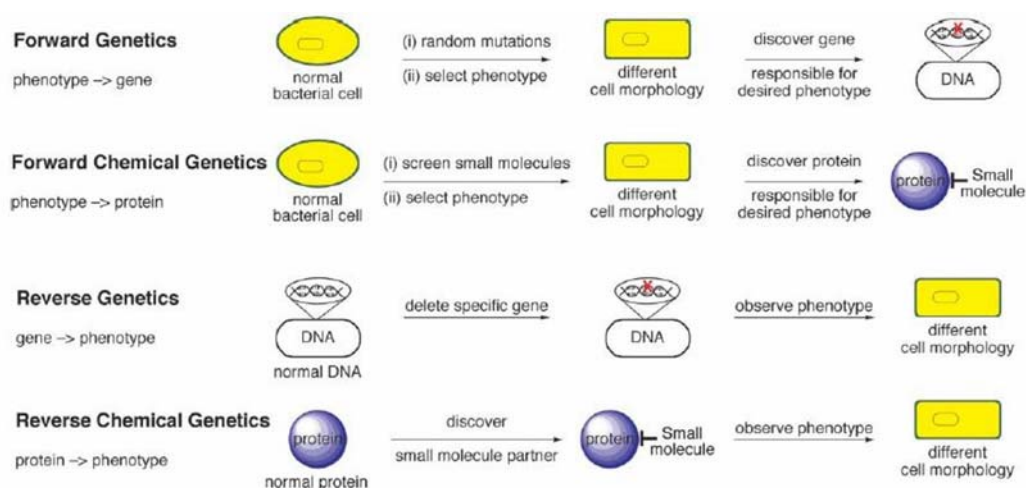


Figure 19 : Comparaison entre les méthodes de génétique classique et de génétique chimique (Spring 2005)

L'utilisation de petites molécules pour disséquer les processus biologiques n'est pas nouvelle. Il existe de nombreux exemples où la recherche d'effets phénotypiques induits par de petites molécules ont conduit à la découverte de processus biologiques importants. Des petites molécules comme la geldanamycine, inhibiteur de Hsp90 (Whitesell *et al.* 1994) ou bien la brefeldine A, molécule perturbant l'appareil de Golgi (Chardin *et al.* 1999) ont été initialement identifiées suite à leurs effets phénotypiques. On peut également citer le rôle de la colchicine dans la découverte de la tubuline (Shelanski *et al.* 1967). La génétique chimique reproduit les méthodes de la pharmacologie classique. De récentes avancées dans les méthodes de synthèses chimiques, la disponibilité de nombreuses chimiothèques commerciales, la robotique et le développement de tests biologiques automatisés (criblage à haut débit) ont permis de systématiser et d'accélérer ce type d'approche pharmacologique. Un exemple célèbre de cette approche est la découverte d'une petite molécule, le monastrol, au cours d'un criblage cellulaire permettant de sélectionner les molécules capables d'arrêter les cellules en mitose (Mayer *et al.*

1999). Le phénotype induit par le monastrol était très similaire à celui observé dans des cellules en culture après injection d'anticorps dirigés contre la kinésine Eg5. Des expériences ont ensuite démontré que le monastrol inhibait Eg5 *in vitro*.

II.2.1 Les chimiothèques

Différents types de chimiothèques sont maintenant disponibles pour les criblages. Les collections de substances naturelles ont été à l'origine de nombreuses découvertes. La méthode la plus classique pour identifier des produits naturels bio-actifs est d'extraire les échantillons avec des solvants et de tester l'activité biologique des extraits ainsi obtenus.

Ces cycles de purification des extraits et de criblage sont répétés jusqu'à l'isolement d'une molécule active. Bien que source de succès, cette approche présente certaines limites. Pour être sélectionnés dès le premier cycle de criblage, les extraits doivent contenir les molécules bio-actives de façon abondante. De plus, l'activité cytotoxique de certaines molécules peut masquer les effets phénotypiques d'autres molécules présentes dans le même extrait. Enfin, la bio-activité peut être le résultat d'une action synergique entre plusieurs molécules qui peut disparaître après fractionnement de l'extrait. L'existence de systèmes HPLC permet actuellement de préparer un grand nombre d'extraits d'organismes et d'utiliser des échantillons relativement purs lors du premier cycle de criblage (Eldridge *et al.* 2002).

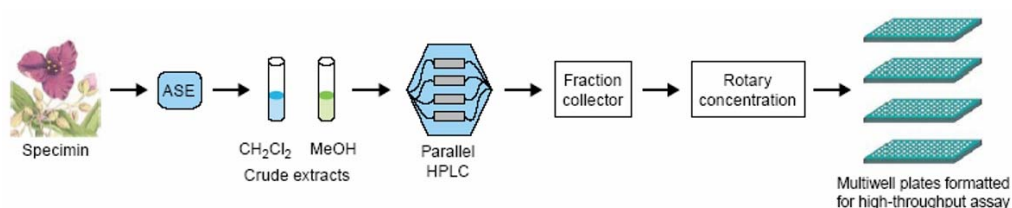


Figure 20 : Nouvelle méthode d'extraction et de purification des substances naturelles (Lokey 2003)

Des produits naturels dérivés de plantes, d'organismes marins ou de microorganismes sont extraits en utilisant un extracteur de solvant à haute pression (ASE) et purifiés en plusieurs fractions grâce à une HPLC munie d'un collecteur capable de distribuer les différentes fractions dans des microplaques.

La diversité et la complexité des substances naturelles et leur rôle historique dans la découverte de nombreux agents pharmacologiques ont encouragé la synthèse de molécules qui présenteraient des propriétés similaires. Des librairies de molécules présentant des propriétés similaires à celles des substances naturelles ont été

synthétisées spécifiquement pour les criblages phénotypiques. On parle alors de « synthèse orientée vers la diversité » (DOS) (Schreiber 2000) (figure 21). Le premier succès de cette stratégie est l'identification d'une molécule inhibant le transport de protéines dans les cellules de mammifères (Pelish *et al.* 2001).

Des collections de molécules de synthèse ou naturelles sont également mises à disposition soit par l'intermédiaire de fournisseurs commerciaux, soit par l'intermédiaire d'agences nationales telles que le National Cancer Institut (NCI). Les molécules présentes dans ces collections ne sont pas toujours triées, toutes les fonctions chimiques sont présentes, sans distinction quant à leur toxicité ou leur réactivité chimique. Elles sont en général d'une grande pureté et sont déjà formatées dans des plaques multipuits. Les deux principaux fournisseurs sont les sociétés ChemBridge et ChemDiv, proposant près de 750 000 molécules de structure connue.

La tendance actuelle est à la conception rationnelle de chimiothèques ciblées et originales afin d'augmenter la diversité moléculaire et la probabilité de trouver des touches pour une classe de cibles donnée (chimiothèque dynamique de Jean-Marie Lehn, création de ligands en reliant entre eux des modules chimiques simples, chimiothèque autour de pharmacophores). La construction autour de structures privilégiées permet d'orienter les capacités inhibitrices d'une chimiothèque. Récemment, la synthèse et l'utilisation d'une chimiothèque ciblée autour des acides acyltétroniques a permis d'identifier des inhibiteurs de phosphatases (Sodeoka *et al.* 2001).

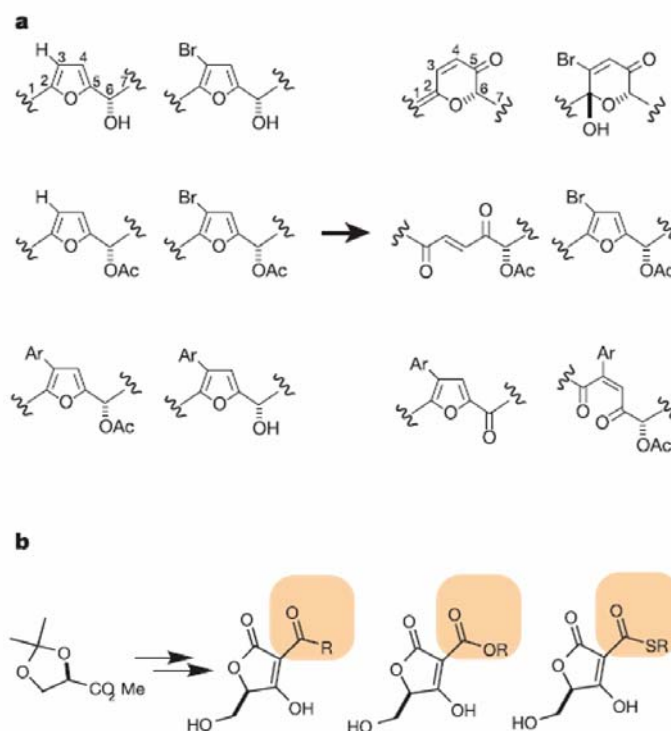


Figure 21 : Comparaison de la synthèse orientée vers la diversité et de la synthèse ciblée (Stockwell 2004)

- (a) L'objectif de la synthèse orientée vers la diversité est de générer des collections de molécules avec un maximum de diversité pour interagir avec différentes cibles. Dans cet exemple, une collection de molécules est créée à partir d'une même série de précurseurs. Les 6 molécules ainsi obtenues (à droite) ont des squelettes et des connectivités différentes (Burke *et al.* 2004).
- (b) L'objectif de la synthèse ciblée est de créer des analogues avec un noyau commun de façon à optimiser leur interaction avec un type de cible.

Le choix de la chimiothèque utilisée pour un criblage doit prendre en compte les avantages et inconvénients de chaque type de chimiothèque en regard du type de test, de la protéine ciblée ou du résultat recherché.

II.2.2 Les tests phénotypiques

Le criblage phénotypique consiste à cultiver des cellules, des extraits complexes, comme des extraits d'œufs de Xénope ou des petits organismes (*C. elegans*, Zebra Fish) dans des microplaques et de les traiter avec des molécules. Après une incubation pouvant varier de quelques heures à quelques jours, les changements physiologiques sont analysés dans chaque puits. Cette stratégie sélectionne des molécules capables de traverser les membranes biologiques (quand elle appliquée sur des cellules ou sur des organismes) et actives dans un contexte cellulaire. Elle implique que les molécules

d'intérêt présentent un certain degré de spécificité vis à vis de leur cible. Le criblage phénotypique présente l'avantage de pouvoir cibler des protéines qui n'ont pas encore été isolées et caractérisées. Les perturbations physiologiques dues à l'action de petites molécules peuvent générer des phénomènes assez variés tels que la mort cellulaire, la migration ou la prolifération cellulaire, l'expression de gènes, le déplacement de vésicules ou encore le développement axonal.

De nombreux tests de criblage phénotypiques ont été mis au point, incluant les essais mesurant la viabilité cellulaire ou la prolifération (Stockwell 2000a; Stockwell 2000b). Ces essais mesurent la présence de membranes cellulaires intactes, la concentration en ATP ou la présence d'estérases ou de réductases cellulaires.

Une molécule peut également être testée pour sa capacité à tuer les cellules en présence d'un élément défini telle qu'une autre molécule ou un gène d'intérêt (Dolma *et al.* 2003). Ces molécules ont alors une activité sélective en fonction du génotype, elles constituent de très bons candidats médicaments car elles présentent peu d'effets secondaires. Par ailleurs, certaines molécules peuvent être testées pour leur capacité à prévenir la létalité d'autres molécules ou protéines toxiques. Par exemple, Aiken et son équipe ont sélectionné par criblage des molécules qui empêchaient l'apoptose induite par la protéine mutée huntingtin dans des cellules PC12 (Aiken *et al.* 2004).

Le 'cytoblot' est une application intéressante dérivée de la méthode ELISA qui permet de quantifier rapidement le phénotype cellulaire grâce à l'utilisation d'un lecteur de microplaques (Stockwell *et al.* 1999). Après avoirensemencé des cellules dans des microplaques et les avoir traitées avec les molécules, ces cellules sont fixées puis marquées avec un anticorps. Par exemple, la nucléoline est phosphorylée uniquement en mitose et peut être utilisée comme un indicateur de l'index mitotique. Par ailleurs, l'incorporation du BrdU dans l'ADN peut être mesurée en utilisant un anticorps anti-BrdU pour quantifier la prolifération. Le signal induit par la perturbation peut être détecté en luminescence ou en fluorescence grâce à l'ajout d'un anticorps secondaire couplé à la peroxidase ou à un fluorophore. Cette méthode peut s'appliquer à n'importe quel essai phénotypique à condition que la perturbation induise des régulations de protéines ou des modifications post-traductionnelles pouvant être mises en évidence par un anticorps spécifique.

Le développement récent de microscopes automatisés a rendu possible l'acquisition d'images de cellules en microplaques et la détection de modifications phénotypiques. Ainsi, Yarrow et son équipe ont utilisé cette approche pour identifier des molécules

perturbant la migration cellulaire (Yarrow *et al.* 2004). Cette technologie a aussi été mise à profit pour rechercher des molécules empêchant l'exportation nucléaire d'un facteur de transcription (Kau *et al.* 2003). Le développement d'algorithmes d'analyse d'images permet alors de traiter automatiquement les acquisitions et d'extraire rapidement les données liées au phénotype d'intérêt. Par ailleurs, l'analyse d'images permet de classer les différents phénotypes induits par la molécule. Chaque image étant représentée par une série de pixels avec des valeurs distinctes, deux images peuvent être ainsi comparées mathématiquement (Stockwell 2004).

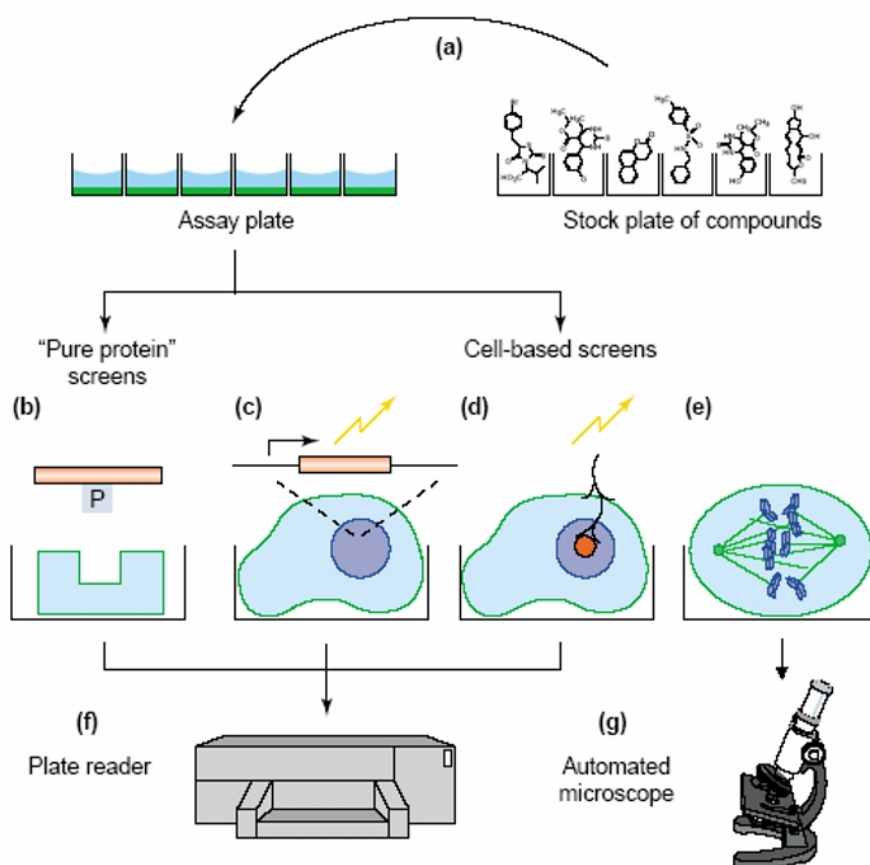


Figure 22 : Aperçu des méthodes de criblages *in vitro* et *in vivo* (Mayer 2003)

(a) Les molécules sont ajoutées dans chacun des puits d'une microplaque contenant soit des protéines en solution soit des lignées cellulaires. (b) Les molécules sont criblées *in vitro* sur protéines purifiées (c,d,e) Les molécules sont criblées *in vivo* dans des cellules. Les phénotypes induits peuvent être mesurés soit par l'approche du gène rapporteur (c), soit par l'approche du "cytoblot" (d) ; les signaux ainsi générés sont quantifiés avec un lecteur de microplaque (f). Les phénotypes induits peuvent également être visualisés grâce à des microscopes automatisés (e,g).

II.2.3 Identification des protéines cibles

Après avoir confirmé l'activité phénotypique des molécules, la dernière étape des approches de génétique chimique directe consiste à rechercher la ou les cible(s) de ces molécules. Il s'agit d'une étape clé et malheureusement, il n'existe pas de procédé universel et systématique pour identifier les protéines cibles ou le mécanisme d'action des molécules.

L'approche la plus classique est d'utiliser les molécules comme un 'hameçon' pour 'pêcher' les protéines cibles. Ainsi, on peut marquer la molécule d'intérêt avec des tags (radioactivité, fluorescence, biotine) et purifier la protéine cible en utilisant la présence de ces tags. Cependant, certaines molécules n'interagissent pas de façon covalente avec leur cible. Aussi, il est fréquent d'utiliser des cross-linker photoactivables qui permettent de lier la molécule et sa cible de façon covalente après avoir été exposés aux UV. Enfin, la cible peut être purifiée par chromatographie d'affinité en attachant la molécule sur des matrices solides via un bras espaceur. Des extraits cellulaires sont élués à travers la colonne sur laquelle la molécule est immobilisée. La cible doit alors être retenue de façon sélective, puis identifiée par spectrométrie de masse.

Un autre type d'approche consiste à utiliser la technique du phage display pour identifier la protéine-cible. Cette approche a permis la découverte d'une nouvelle cible cellulaire de la doxorubicine. (Jin *et al.* 2002).

Les cibles peuvent également être identifiées en sélectionnant des cibles hypothétiques et en les testant une par une dans des essais d'interaction. Mayer *et al.* ont développé cette approche pour identifier la cible du monastrol (Mayer *et al.* 1999). Il arrive que la molécule ou ses analogues soit déjà connue pour avoir des effets biologiques dans d'autres processus. Ces informations permettent alors de prédire les modes d'actions. Certaines bases de données comme PubChem ou ChEMBL peuvent être d'une grande aide pour cette approche. Il existe aussi des bases de données publiques comme Scifinder Scholar ou Beilstein Crossfire qui permettent de rechercher dans la littérature les structures chimiques et les activités pharmacologiques associées.

Enfin des approches génétiques, peuvent être mises à profit pour identifier les cibles. Ainsi, il est possible de générer des cellules porteuses de mutations ponctuelles résistant à l'action de la molécule chimique, grâce à des approches de mutagenèse aléatoire, puis d'identifier le gène et son produit d'expression qui confèrent cette

résistance. Toutefois des expériences biochimiques supplémentaires sont nécessaires pour prouver que le produit du gène identifié est bien la cible directe de la molécule plutôt qu'un effecteur indirect (Ward *et al.* 2002)

Par ailleurs, le triple hybride chimique est une technique puissante, développée récemment, permettant d'explorer l'ensemble du protéome pour isoler toutes les cibles d'un composé chimique (Becker *et al.* 2004). Cette technique, dérivée du système double hybride chez la levure, nécessite entre autre le couplage du composé actif à un composé comme le méthotrexate ou la dexaméthasone (Baker *et al.* 2003). Cette stratégie de triple hybride a l'avantage de permettre d'identifier la cible de la molécule même si elle est faiblement représentée, d'accéder directement au gène de la protéine et d'identifier d'autres cibles éventuelles de la molécule. En pratique, cette méthode nécessite que les molécules d'intérêt puissent traverser la paroi des levures et que l'affinité entre la cible et la molécule soit forte (Kley 2004).

Chapitre III : Objectifs du travail de thèse

Grâce à leurs propriétés dynamiques d'assemblage-désassemblage et à leur capacité d'interagir avec de nombreux facteurs cellulaires, les microtubules participent à de nombreuses fonctions cellulaires essentielles comme la motilité, le trafic intracellulaire et jouent un rôle crucial dans la mitose et la division cellulaire. Actuellement, la dynamique des microtubules est une cible privilégiée en thérapie anticancéreuse. Elle peut être bloquée par de nombreux agents qui se lient sur des sites distincts de la tubuline. En interagissant avec les microtubules, ces agents bloquent le cycle cellulaire et conduisent éventuellement à la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. De nombreux médicaments ciblant les microtubules sont en cours d'essais cliniques et un très grand nombre de molécules actives sur les microtubules sont en cours de développement. Cependant, malgré le succès thérapeutique des taxanes et des alcaloïdes de la pervenche, certaines cellules tumorales deviennent insensibles à ces drogues car elles développent des mécanismes de résistance tels que l'expression du gène *mdr1* de résistance aux drogues, la modification de la structure et de l'expression de la tubuline ou la modification de l'expression des MAPs qui rétablissent la dynamique des microtubules. Le développement de nouvelles drogues ciblant la tubuline et échappant aux phénomènes de résistance reste donc un enjeu important en cancérologie.

Par ailleurs, bien que des progrès considérables aient été réalisés pour identifier les différents composants impliqués dans la formation du fuseau mitotique, la connaissance des mécanismes moléculaires reste encore incomplète. La découverte de petites molécules perturbant la dynamique microtubulaire en ciblant directement la tubuline ou des protéines capables de réguler la dynamique des microtubules représente une étape importante dans la compréhension du processus de formation du fuseau mitotique et faciliterait la mise au point de nouvelles drogues antimitotiques plus spécifiques.

L'objectif de cette thèse a été d'identifier de nouveaux effecteurs des microtubules grâce aux approches de chimogénomique.

La première partie de ce travail a consisté au développement d'un test multiparamétrique automatisé permettant de détecter des modifications de l'état du réseau microtubulaire en se fondant sur les propriétés originales de substrat des enzymes

du cycle de tyrosination de la tubuline. Ce test cellulaire a été adapté au format microplaque 96 puits et à une utilisation robotique, pour identifier par criblage à haut débit de nouveaux agents perturbant la dynamique microtubulaire. Par la suite, plusieurs campagnes de criblage ont été réalisées avec les molécules de chimiothèques académiques et les molécules d'une chimiothèque commerciale.

Dans une deuxième partie, les molécules 'touches' les plus prometteuses issues de ce criblage ont été soumises à un ensemble de tests complémentaires (analyse de l'interaction *in vitro* avec la tubuline, analyse de l'effet des molécules sur le réseau d'actine, les mitochondries, le cycle cellulaire, la cytotoxicité...) et analysées par comparaison de motifs structuraux dans les différentes banques et dans la littérature afin de tenter d'identifier les cibles de ces molécules.

Matériels et Méthodes

Chapitre IV : Matériels

IV.1 Les chimiothèques

Le CMBA dispose de plusieurs chimiothèques ou collections de molécules de synthèse.

Il possède, d'une part, un ensemble de 14.720 molécules issues de la recherche académique française, provenant de 5 laboratoires différents du CNRS :

- l'UMR 176, Institut Curie, Orsay
- l'UMR 7081, Faculté de Pharmacie, Illkirch
- l'UMR 5181, Université Lyon1, Villeurbanne
- l'UMR 5250, département de Chimie Moléculaire, Université Joseph Fourier Grenoble 1, Grenoble
- l'UMR 6005, Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans

Ces différentes équipes font partie du groupement de service « Chimiothèque Nationale » (<http://chimiotheque-nationale.enscm.fr>)

D'autre part, en collaboration avec l'iBiTec-S/SCBM, le laboratoire possède plusieurs copies de la collection DIVERSet™ de la société ChemBridge (environ 17.000 molécules) et de la collection de Prestwick (1.120 composés) (<http://www.prestwickchemical.fr/index.php>).

Ces chimiothèques sont proposées sous forme de microplaques 96 puits. Chaque microplaque contient 80 molécules diluées dans du DMSO pur, solvant permettant leur solubilisation et leur conservation, et placées dans les 10 colonnes centrales de 8 puits. Les colonnes 01 et 12 sont laissées vides car on y déposera par la suite, les contrôles internes lors des criblages.

IV.1.1 Formatage

En général, les molécules sont fournies à une concentration élevée (de 25 à 50mM en moyenne). Le formatage consiste à faire différentes dilutions des molécules à partir

des plaques mères fournies, puis à générer plusieurs plaques filles de chaque dilution; chaque réplicat, à usage unique, contenant un petit volume de chaque composé dilué, sera utilisé lors d'un seul criblage. Il est souvent nécessaire de prédiluer les molécules dans des tampons aqueux avant de les inclure dans le test, afin de diminuer la concentration finale en DMSO, notamment pour les tests sur cellules. La stabilité des molécules ainsi diluées étant difficilement contrôlable, ces plaques filles ne sont utilisées qu'une seule fois. Les plaques mères et plaques filles sont identifiées grâce à l'apposition d'une étiquette code barre sur chaque microplaque et gérées dans une base de données.

IV.1.2 Identification des molécules

Un code alphanumérique bien particulier a été attribué à chaque molécule de la chimiothèque nationale. Par exemple, ce code peut regrouper des informations qui permettent d'identifier le laboratoire et l'équipe impliqués dans la synthèse de la molécule. Le numéro de la microplaque dans laquelle a été stockée la molécule ainsi que la position de la molécule au sein de cette microplaque figurent également dans ce code. Enfin le symbole L ou M nous informe si la molécule est brevetée ou non.

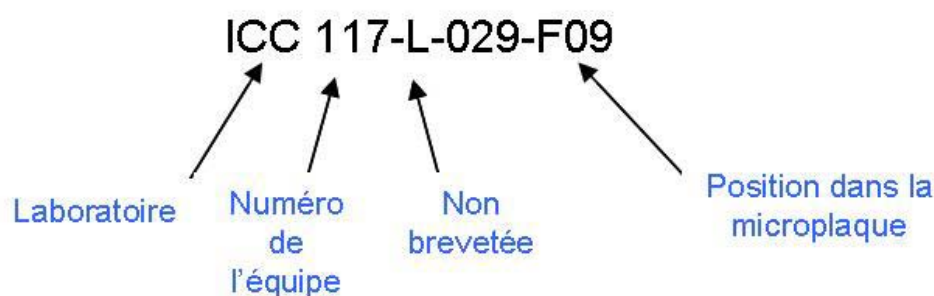


Figure 23 : Exemple de code attribué à une molécule de la chimiothèque nationale

Les molécules de la chimiothèque ChemBridge DIVERSet™ sont, quant à elles, identifiées par un code numérique classique.

IV.1.3 Gestion des molécules

Les informations relatives aux molécules, notamment le code attribué, la structure chimique 2D, les descripteurs structuraux disponibles (masse, concentration, log P...) sont entrées dans une base de données gérée informatiquement à l'aide du logiciel ISIS Base (ISISTM/Base, version 2.5 SP1, MDL Information Systems). Les fiches de données sont complétées avec les résultats de criblage réalisés. ([cf Annexe 1](#))

IV.2 La plateforme robotique

IV.2.1 L'automate TECAN GENESIS 2000

Le TECAN GENESIS est un automate constitué de 2 bras articulés capables de se déplacer selon trois axes. Le premier bras est un bras pipeteur (LiHA pour Liquid Handling Arm) muni de 8 embouts portes-pointes qui permet de pipeter, à l'aide de pointes jetables, simultanément dans les 8 puits d'une colonne d'une microplaque. Le deuxième bras est un bras manipulateur (RoMA pour Robotique Manipulating Arm) avec une capacité de mouvement en X, Y, Z et R (pour Rotation) qui permet de saisir les objets (microplaques et boîtes de pointes jetables) et de les déplacer sur la surface de travail. Cette surface de travail comporte des portoirs pour les microplaques ou les boîtes de pointes, un agitateur orbital de microplaques 2 positions et 2 étagères (ouverte/noire). Des capteurs optiques permettent l'ajustement des mouvements du robot.



Figure 24: Worstation 2000 (TECAN)

La station de criblage est placée dans une pièce type salle blanche, climatisée. Elle est installée sous un flux laminaire vertical d'air filtré et est pilotée par deux logiciels interconnectés:

- le logiciel GEMINI, logiciel de gestion de pipetage, qui permet de créer des protocoles de pipetage et de gérer les caractéristiques des liquides utilisés que ce soit en mode aspiration ou en mode distribution ;
- le logiciel FACTS qui s'organise en plusieurs modules. Les modules « Process Manager » et « Master Control Program » gèrent les déplacements d'objets et la mise en action des instruments périphériques. Le module « MCP Scheduler » est utilisé pour la planification des tâches.

IV.2.2 Le lecteur de microplaque

Le lecteur de microplaques FLUOstar OPTIMA(BMG Labtechnologies) est inclus dans la station robotique. Il permet de détecter des signaux en absorbance, en fluorescence ou en luminescence. Cette lecture peut être ponctuelle ou cyclique. Ainsi, il est possible de réaliser des cinétiques en mesurant les signaux à des intervalles de temps réguliers. Le protocole de la lecture (choix du mode de lecture, des longueurs d'onde...) est défini avec le logiciel Fluostar* Optima version 1.30-0. Un photomultiplicateur permet d'ajuster le gain.

IV.2.3 Autres périphériques

La station robotique dispose d'un système de stockage d'objets : le Carrousel (Tecan). Cet équipement est constitué de 9 tours pouvant contenir chacune 21 microplaques ou 5 boîtes de cônes 100µl ou 200µl, ou 4 boîtes de cônes 1000µl.

Par ailleurs, un incubateur de cellules, le Cytomat 400 (Heraeus), est adjacent à la surface de travail et permet de maintenir les microplaques contenant des cellules dans une atmosphère à 37°C et 5% de CO₂. Cet incubateur contient 2 tours d'une capacité de 21 microplaques chacune ; il est équipé d'un élévateur à crémaillère et d'une trappe permettant le dépôt automatique de chaque microplaque à l'extérieur sur une position de

transfert, ainsi que le repositionnement de la microplaque à l'intérieur de l'incubateur. La petite taille de la trappe et son ouverture et sa fermeture rapides minimisent les variations de température et de composition en gaz à l'intérieur de l'incubateur, de manière à maintenir les cellules dans des conditions optimales.

Enfin, la station est également équipée d'un laveur de microplaques : le Power Washer 384 (Tecan). Il comporte une tête 96 doubles-canaux permettant d'aspirer et de dispenser simultanément du liquide sur une microplaque entière. Une valve permet de dispenser ou d'aspirer jusqu'à 3 tampons différents. Les hauteurs d'aspiration et de distribution sont réglables, et les vitesses de distribution et de descente de la tête variables. Ce laveur est particulièrement adapté pour laver des microplaques contenant des cellules adhérentes, sans endommager le tapis cellulaire.

IV.3 Les lignées cellulaires

Le nom, la référence et l'origine des lignées sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Nom	Référence ATCC	Espèce	Morphologie	Origine	Pathologie
HeLa	CCL-2	humaine	Cellules épithéliales	Col de l'utérus	Adenocarcinome
NCI-H460	HTB-177	humaine	Cellules épithéliales	Poumon	Carcinome
786-O	CRL-1932	humaine	Cellules épithéliales	Rein	Adenocarcinome
MCF-7	HTB-22	humaine	Cellules épithéliales	Sein	Adenocarcinome
MES-SA	CRL-1976	humaine	Fibroblaste	Utérus	Sarcome utérin
MES-SA DX5	CRL-1977	humaine	Fibroblaste	Utérus	Sarcome utérin
Rat 2	CRL-1764	Rat	Fibroblaste	Embryon	/
MEF	/	murine	Fibroblaste	Embryon	/

Tableau 1 : Lignées cellulaires utilisées

IV.4 Les anticorps

Les anticorps primaires utilisés sont listés dans le tableau suivant:

Nom	Espèce d'origine	Type	Epitope	Dilution	
				Fluorescence	Western Blot
YL1/2	Rat	Monoclonal	Tubuline tyrosinée Epitope : EGEEF	1/4000	1/50 000
L4	Lapin	Polyclonal	Tubuline détyrosinée	1/4000	1/400 000
α 3A2	Souris	Monoclonal	Tubuline α Epitope : DMAALE		1/20 000
p-Op18 (Ser 16)	Lapin	Polyclonal	Serine16 phosphorylée de op18		1/200

Tableau 2 : Anticorps primaires utilisés

Les anticorps secondaires utilisés sont :

Nom	Espèce d'origine	Fournisseur	Dilution	
			Fluorescence	Western Blot
Anti-rat Cyanine 3	Chèvre	Rockland	1/500 à 1/1000	
Anti-lapin Alexa Fluor® 488	Chèvre	Molecular Probes	1/500 à 1/1000	
Anti-rat HRPo	Singe	Jackson Immunoresearch		1/5000
Anti-lapin HRPo	Chèvre	Biosource		1/5000

Tableau 3 : Anticorps secondaires utilisés

Chapitre V : Méthodes

V.1 Biologie cellulaire

V.1.1 Culture cellulaire

Toutes les lignées sont cultivées dans 15ml de milieu de culture dans des flacons T75 dans une étuve humidifiée à 37°C et à 5% de CO₂. Pour le maintien de la culture, les cellules sont divisées lorsqu'elles atteignent la confluence en les dissociant avec une solution de trypsine 0.5% -EDTA (Gibco, Invitrogen) et réensemencées à des dilutions variant de 1/5 à 1/20. Afin d'éviter toute dérive et variations des propriétés cellulaires, ces lignées sont utilisées pendant 20 passages au maximum exceptée la lignée MEF (cellules primaires) qu'il est déconseillé d'utiliser au-delà de 6 passages car ces cellules arrêtent de se diviser après un certain nombre de passages.

-Les lignées HeLa, NCI H460 et 786-O sont cultivées dans du RPMI-1640 avec GlutaMAX™ I (Gibco, Invitrogen) contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF, Hyclone, Thermo Fisher Scientific) et 1% de pénicilline / streptomycine(Gibco, Invitrogen).

-Les lignées RAT 2 et les MEF sont cultivées dans du DMEM avec GlutaMAX™ I contenant 10% de SVF et 1% de pénicilline / streptomycine.

-Les lignées MCF-7 sont cultivées dans du EMEM (ATCC) avec 10% de SVF, 1% de pénicilline / streptomycine et 0,1mg/ml d'insuline (Sigma Aldrich).

-Les lignées MES-SA et MES-SA DX5 sont cultivées dans du McCoy's 5A (ATCC) avec 10% de SVF et 1% de pénicilline / streptomycine pendant les premiers passages puis dans du RPMI-1640 contenant 10% de SVF et 1% de pénicilline / streptomycine.

V.1.2 Analyse du cycle cellulaire par FACs

Les cellules (3.10^6 au minimum) sont dissociées avec de la trypsine-EDTA puis lavées avec du PBS-EDTA 2mM. Après centrifugation, le culot est repris lentement avec de 1,5ml d'éthanol 70% froid (-20°C), puis mélangé en vortexant à petite vitesse. Le tout est placé à température ambiante pendant au moins 30 minutes. Les cellules sont lavées 2 fois avec du

PBS-EDTA 2mM. Après centrifugation, les cellules sont reprises dans 500 µl de PBS-EDTA contenant 10µl de RNase A à 0,5mg/ml et 5 µl d'iodure de propidium à 1mg/ml, puis incubées 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Le marquage à l'iodure de propidium du noyau des cellules est quantifié sur le FACS Calibur. (Becton Dickinson).

V.1.3 Immunofluorescence

V.1.3.1 Marquage de la tubuline (TYR, GLU) et des noyaux

Environ 10.000 cellules sontensemencées sur des lamelles de verre déposées dans des puits de plaques 24 puits et incubées à 37°C 5% CO₂ pendant 72 heures, ceci afin que les cellules puissent suffisamment adhérer au support. Après élimination du milieu, les cellules sont perméabilisées avec du tampon OPT (PIPES 80 mM, EGTA1 mM, MgCl₂1 mM, Triton X-100 0.5%, glycérol 10% pH 6.7) préalablement chauffé à 37°C pendant 3 minutes à 37°C puis fixées dans du méthanol préalablement maintenu à -20°C pendant 10 minutes à -20°C. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS/Tween 20 0,1% et incubées pendant 15 minutes minimum à température ambiante avec les anticorps primaires adéquats (cf [Les anticorps](#) tableau 2) dilués dans une solution de PBS/BSA 0,3%/NaN₃ 0,02%. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS/Tween 20 0,1%. Elles sont incubées pendant 15 minutes à température ambiante avec une solution d'anticorps secondaires et de Hoechst à 1µg/ml final, dilués dans du PBS/BSA 0,3%/NaN₃ 0,02%. Finalement, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS/Tween 20 0,1% puis déshydratées avec de l'éthanol pur et fixées sur des lames à l'aide d'une solution de montage Fluorsave™ (Calbiochem, Merck).

V.1.3.2 Marquage de l'actine

Les cellules sontensemencées sur des lamelles de verre et incubées comme pour le marquage de la tubuline. Après élimination du milieu, les cellules sont lavées avec du PBS tiède puis fixées par ajout d'une solution de PBS/formaldéhyde 3,7% pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules sont lavées avec du PBS puis perméabilisées avec une solution de PBS/Triton X100 0,2% pendant 15 minutes à température ambiante. Après un autre lavage avec du PBS, les cellules sont incubées avec une solution de PBS/BSA 1% pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées avec 1 unité (0,165µM final) de phalloïdine marquée à l'Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Invitrogen) pendant

20 minutes à température ambiante. Les cellules sont lavées une dernière fois avec du PBS puis déshydratées avec de l'éthanol pur. Enfin, les cellules sont fixées sur des lames à l'aide d'une solution de montage Fluorsave™.

V.1.3.3 Marquage des mitochondries

Comme pour le marquage tubuline, les cellules sont ensemencées sur des lamelles de verre et incubées à 37°C 5% CO₂. Trois jours après l'ensemencement, du MitoTracker® Red CMXRos (Molecular Probes, Invitrogen) est ajouté dans le milieu de culture de façon à avoir une concentration finale de 250nM. Les cellules sont ensuite incubées 30 minutes à 37°C 5%CO₂. Ce marqueur diffuse de façon passive à travers la membrane plasmique et s'accumule dans les mitochondries actives. Après élimination du milieu, les cellules sont lavées avec du milieu tiède puis fixées par ajout d'une solution de PBS/formaldéhyde 3,7% pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules sont rincées avec du PBS puis peuvent être perméabilisées avec une solution de PBS/triton X100 0,2% pendant 15 minutes à température ambiante pour réaliser, si nécessaire, d'autres marquages en immunofluorescence.

V.1.4 Microscopie

Les lames d'immunofluorescence sont lues à l'aide de microscopes droits Zeiss (Axioskop) équipé d'une caméra CCD (CollSnap ES, Ropper Scientific). Les microscopes sont équipés d'objectifs x20 sec, x40 et x100 à immersion dans l'huile (Neofluar, Zeiss). Tout l'équipement est commandé par le logiciel Metavue™ (Universal Imaging, Molecular Devices).

V.1.5 Test de croissance cellulaire

Les tests de croissance cellulaire sont réalisés en microplaques 96 puits transparentes (Greiner) après avoir ensemencé 100µl d'une solution cellulaire de 2.10⁵ cellules/ml à 5.10⁵cellules/ml (en fonction des lignées cellulaires). Après 24 heures d'incubation à 37°C, 5%CO₂, le milieu de culture est enlevé et remplacé par des solutions de molécules à différentes concentrations. Les cellules sont incubées avec ces molécules pendant 48 heures supplémentaires à 37°C, 5% CO₂. Après élimination du milieu, les cellules sont lavées avec

du RPMI blanc (Gibco, Invitrogen) puis incubées avec du 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide ou MTT (0,5mg/ml final) pendant 4H à 37°C 5% CO₂. Le MTT (Sigma Aldrich) permet d'estimer la viabilité des cellules par la mesure de l'activité d'une enzyme mitochondriale. En effet, dans les cellules vivantes, les déshydrogénases mitochondriales sont capables de cliver le cycle tétrazolium, entraînant ainsi la formation de cristaux de formazan insolubles en milieu aqueux. Ces cristaux sont solubilisés grâce à l'ajout d'une solution de solubilisation (Isopropanol, Triton X100 10%, HCl 0,1N). Après agitation, l'absorbance est mesurée à 570nm à l'aide du lecteur de microplaque FLUOstar OPTIMA.

V.1.6 Test permettant la détection des molécules stabilisant ou déstabilisant les microtubules en microplaques

Des cellules HeLa sontensemencées dans des microplaques 96 puits noires à fond noir (Greiner 655086), en distribuant 90µl par puits d'une solution cellulaire à 40.000 cellules/ml, et incubées à 37°C 5% CO₂. 24 heures après, les cellules sont incubées avec les molécules d'intérêt pendant 2 heures à 37°C 5% CO₂. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec du tampon OPT tiède pendant 6 minutes à 37°C puis fixées dans du méthanol pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS/Tween 20 0,1% et incubées avec les anticorps primaires YL1/2 et L4 (cf [Les anticorps](#) tableau 2) diluées au 1/4000 dans une solution de PBS/BSA 0,3%/NaN₃ 0,02% toute la nuit à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS/Tween 20 0,1% puis incubées pendant 1 heure à température ambiante avec une solution de Hoechst à 1µg/ml final et d'anticorps secondaires anti-rat Cyanine 3 et anti-lapin Alexa Fluor® 488 respectivement dilués au 1/500 et 1/1000 dans du PBS/BSA 0,3%/NaN₃ 0,02%. Après 3 lavages au PBS/Tween 20 0,1%, du PBS/Glycérol 50% est distribué dans chaque puit. Les différentes intensités de fluorescence sont mesurées grâce au lecteur FLUOstar OPTIMA.

V.1.7 Transfections

Les cellules sontensemencées préalablement sur lamelles de verre dans des plaques 24 puits (Becton Dickinson) de façon à atteindre, lors de la transfection, une confluence de 70 à 80%. Le jour de la transfection, les RNAi (0,5nM) ou les plasmides (2µg) sont dilués dans

50µl d'Opti-MEM (Gibco, Invitrogen). De même, 4µl de Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) sont dilués dans 50µl d'Opti-MEM. Après 5 minutes de pause, les deux solutions sont mélangées doucement puis incubées pendant 20 minutes à température ambiante. Les 100 µl de mélange sont ensuite ajoutés au milieu de culture dans chaque puits. Les cellules sont incubées 24 ou 48 heures avant de tester l'expression transgénique.

V.2 Biochimie

V.2.1 Extractions tissulaires et cellulaires

V.2.1.1 Production d'extraits de cervelles de veau

La tubuline est purifiée à partir de cervelles de veau, tissu particulièrement riche en microtubules. Des cervelles de veaux sont récupérées aux abattoirs et traitées moins d'une heure après le sacrifice de l'animal, grâce à la proximité des abattoirs et du laboratoire. Le cervelet et les méninges sont éliminés en chambre froide. Les cervelles sont pesées et homogénéisées 3 fois 20 secondes dans un broyeur de type « Waring Blender » avec 0,75 mL de MEM pH6,75 (MES 100mM, EGTA 1mM, MgCl₂ 1mM) par gramme de cervelle.

V.2.1.2 Production d'extraits de cellules HeLa

1.10⁶ cellules HeLa sontensemencées la veille dans des boîtes de pétri de 60mm (Becton Dickinson) et incubées à 37°C 5% CO₂. Le lendemain, les cellules sont lavées avec du PBS tiède puis dissociées avec une solution de trypsine 0.5% -EDTA. Les cellules sont récupérées par centrifugation et reprises dans 600 µl de tampon de lyse RIPA (Santa Cruz Biotechnology, Inc) enrichi en inhibiteurs de protéases et de phosphatases puis incubées 30 minutes dans la glace. Afin d'éliminer l'ADN, les cellules sont traitées 3 fois 15 secondes aux ultrasons puis incubées une seconde fois 30 minutes dans la glace. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 10 min à 4°C à 18.000g. Le surnageant est récupéré : il correspond à l'extrait protéique total.

V.2.2 Détermination de la concentration en protéines

La concentration protéique des extraits est déterminée à l'aide du kit Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). C'est un test colorimétrique basé sur la méthode du Biuret. Cette méthode a été développée par Gornall et coll. (Gornall *et al.* 1949) qui ont appliqué la réaction du biuret pour obtenir une méthode quantitative de dosage des protéines.

En milieu alcalin, les liaisons peptidiques des protéines réagissent avec les ions Cu^{2+} pour former un complexe coloré en rose, qui, ajouté à la teinte bleue du réactif donne finalement une coloration pourpre (bleu-violet). L'absorbance, proportionnelle à la concentration en protéines dans l'échantillon, est mesurée à 570nm. Une série de dilutions contenant un volume identique mais des quantités croissantes et connues d'Albumine de Sérum Bovin (BSA) permet d'établir une courbe-étalon. La concentration des échantillons est alors déterminée en comparant les valeurs obtenues avec celles de la courbe étalon.

V.2.3 Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de Sodium DodécylSulfate (SDS), selon la méthode de Laemmli (Laemmli 1970). La polyacrylamide est un gel finement réticulé, que l'on fabrique extemporanément en mélangeant de l'acrylamide qui polymérise en donnant des chaînes linéaires, et du bis-acrylamide qui forme des ponts entre les chaînes; on obtient ainsi un réseau, dont les mailles sont de taille variable en fonction des proportions d'acrylamide et de bis-acrylamide utilisées; le gel obtenu se comporte donc comme un tamis moléculaire (les protéines migrent d'autant moins vite qu'elles sont plus grosses). En présence de SDS, détergent anionique qui défait la structure spatiale et se fixe sur les protéines, toutes les molécules sont chargées de la même façon, et la séparation est alors uniquement fonction de la masse molaire. Le poids moléculaire apparent des protéines étudiées peut être alors déterminé par référence avec des protéines de poids moléculaire connu (Sigma Aldrich Marker Wide Range). Avant d'être déposés sur gel, les échantillons sont dilués dans un tampon dénaturant 4X (Tris-HCl pH6,8 220 mM / SDS 8% / Glycérol 40% / β - mercaptoéthanol 16% / bleu de bromophénol 0,16%) et portés à ébullition pendant 5 min. Le β -mercaptoéthanol, agent réducteur qui rompt les ponts disulfures, contribue à dénaturer les protéines. La température élevée favorise également la désagrégation et la dénaturation des protéines. Les protéines sont concentrées sur un gel de concentration (5% acrylamide) et séparées sur un gel de séparation (7,5 à 12% acrylamide). La migration est réalisée à 150 V dans un tampon Tris 50 mM pH 8,6 / glycine 384 mM / SDS 0,1%. Le gel peut être alors coloré et séché pour révéler les protéines ou soumis à un électro-transfert pour une analyse des protéines par immuno-détection.

V.2.4 Coloration du gel

Les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie.. Le gel est incubé 1 heure dans du colorant Coomassie stain solution (Bio-Rad). L'excès de colorant est éliminé par lavage deux fois 20 minutes dans du décolorant Coomassie G250 destain solution (Bio-Rad). Le gel peut alors être séché pour être conservé.

V.2.5 Electro-transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Les échantillons de protéines séparées par SDS-PAGE sont transférés sur une membrane de nitrocellulose. Le transfert est effectué pendant 1 heure à 100 V dans un tampon Tris 25 mM pH 8,3 / glycine 192 mM / méthanol 20% dans une cuve Mini Transblot (Bio-Rad). Il faut maintenir un courant suffisamment fort pour favoriser l'extraction des protéines du gel, particulièrement des grosses protéines. Cependant, pour éviter que les protéines se détachent de la matrice et diffusent dans le tampon (cas des petites protéines), un solvant est ajouté dans le tampon. Ainsi, le méthanol va stabiliser l'interaction de la nitrocellulose et des protéines. Pour vérifier la qualité du transfert, la membrane de nitrocellulose est incubée quelques minutes dans une solution de rouge Ponceau (Sigma Aldrich) qui va colorer de façon réversible les protéines. Cette coloration disparaît après lavage dans de l'eau distillée.

V.2.6 Immuno-détection des protéines transférées

Tout d'abord, la membrane est incubée pendant 30 minutes à température ambiante dans un tampon TBS (Tris base 20mM, NaCl 136mM pH7,6) contenant 0,1% de Tween 20 (Sigma Aldrich) et 5% de lait en poudre pour saturer les sites non spécifiques. Après 3 lavages de 15 minutes dans du TBS Tween 20 0,1%, la membrane est incubée toute la nuit sous agitation à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du TBS contenant 0,1% de Tween 20 et 5% de BSA. Le lendemain, la membrane est rincée 3 fois dans du TBS Tween 20 0,1% et incubée pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire, dirigé contre les immunoglobulines de l'espèce ayant servi à préparer l'anticorps primaire, couplé à la peroxydase. Elle est ensuite lavée trois fois pendant 5 min toujours dans du TBS Tween 20 0,1%. La détection de la protéine d'intérêt se

fait par chimio-luminescence grâce au kit ECL™ (Amersham Biosciences), La solution de révélation préparée extemporanément en mélangeant du luminol et un agent oxydant (1:1) est déposée sur la membrane pendant 1 minute. Les membranes sont alors exposées contre un film autoradiographique (Kodak) le temps nécessaire pour voir apparaître le signal d'intérêt à l'issue du développement de film.

V.2.7 Purification de la tubuline

V.2.7.1 Tubuline 1X

Les extraits de cervelles de veau préparés extemporanément (cf [Extractions tissulaires et cellulaires](#) §V.2.1.1) sont centrifugés 35 minutes à 100.000g à 4 °C. Le surnageant contenant les protéines microtubulaires solubles est récupéré et ajusté à 25% de glycérol et 2,5mM d'ATP final L'ensemble est incubé pendant 40 minutes dans un bain-marie à 30°C afin de favoriser l'assemblage de la tubuline. La solution est ensuite centrifugée à 100.000g à 30°C pendant 1h30 sur un coussin de MEM/Glycérol 60%, préalablement placé au fond des tubes à centrifuger et préchauffé à 30°C. Le surnageant est éliminé et les culots de microtubules sont repris dans du MEM et dépolymérisés pendant 30 minutes sur la glace. La solution est alors stockée à -80°C. Cette tubuline qui a subi un cycle d'assemblage/désassemblage est appelée tubuline 1X. La tubuline 1X est constituée de tubuline et de protéines qui co-purifient avec les microtubules.

V.2.7.2 Phospho-Tubuline (PC-tubuline)

La tubuline est soumise à une seconde étape de purification par chromatographie échangeuse d'ions sur Phosphocellulose P11 (Whatman). Cette étape permet d'obtenir de la tubuline pure, sans les protéines associées de la tubuline 1X, appelée PC-tubuline.

Préalablement, la résine de phosphocellulose est activée par un premier traitement avec de la soude froide à 0,5N pendant 5 minutes. Après rinçage avec de l'eau bi-distillée, elle est ensuite traitée avec de l'acide chlorhydrique froid à 0,5N pendant 5 minutes. Après un dernier rinçage à l'eau bi-distillée, elle est remise en suspension dans du MEM et le pH est ajusté à 6,65 par ajout de soude.

La purification de la tubuline est réalisée en chambre froide. La phosphocellulose est coulée dans un Büchner à raison de 1ml de résine pour 2,5mg de tubuline 1X. Elle est équilibrée avec 3 volumes de MEM minimum. La surface sur laquelle la tubuline 1X est déposée doit être plane et homogène. La tubuline 1X est déposée doucement, le long de la paroi du Büchner. Après 15 minutes pendant lesquelles on laisse pénétrer par gravité la tubuline 1X dans la phosphocellulose, la tubuline est éluée avec du MEM, par aspiration douce, et collectée par fraction de 20ml. La concentration protéique de chaque fraction est évaluée grâce à la mesure de l'absorbance à 280 nm. Les fractions où la concentration protéique est importante sont regroupées en une seule et même fraction dont le volume et la concentration sont mesurés. Pour éviter la dénaturation de la tubuline, du GTP est ajouté de façon à avoir une concentration finale de 1mM.

La tubuline est ensuite concentrée à l'aide de centripres 30 de 15 mL (Amicon). Les centripres sont centrifugés 2 à 3 fois 30 minutes à 650g à 4°C. Les culots sont réunis dans une éprouvette, le volume est mesuré ainsi que la concentration en protéines (concentration minimum : 5mg/ml). La PC-tubuline ne peut pas être congelée dans du MEM, car elle se dénaturerait. C'est pourquoi elle doit être transférée dans du tampon PEM (PIPES 100mM, EGTA 1mM, MgCl₂ 1mM, pH6,65).

Ce changement de tampon se fait par filtration sur Biogel P6 équilibré dans du PEM. La PC-tubuline est déposée sur la résine et centrifugée 5 minutes à 650g à 4°C. Du GTP et du MgCl₂ sont ajoutés de façon à avoir une concentration finale en GTP de 1mM et en MgCl₂ de 10mM. La solution est aliquotée en fractions de quelques centaines de microlitres. La PC-tubuline est alors congelée dans de l'azote liquide et stockée à -80°C.

V.2.8 Test d'assemblage de la tubuline

V.2.8.1 En absorbance

La méthode la plus classique pour étudier l'assemblage de la tubuline en microtubules est de mesurer l'absorbance à 355nm de la protéine polymérisée. Les aliquotes de tubuline 1X ou de PC-tubuline sont décongelées dans la glace, juste avant utilisation. Le test d'assemblage est préparé dans une microplaque transparente ½ puits (Greiner 675180) posée sur la glace.

V.2.8.1.1 Etude de l'assemblage de la tubuline 1X

Après avoir dilué les molécules à tester dans du tampon MEM, la tubuline est ajoutée dans chaque puits de manière à atteindre une concentration finale de 3mg de tubuline/mL. Le GTP est distribué dans l'ensemble des puits, à l'aide d'une multipipette (BioHit), la concentration finale en GTP dans le milieu est de 1mM. L'assemblage de la tubuline est déclenché en incubant la microplaque à 37°C. La cinétique d'assemblage est mesurée en absorbance à 355nm toutes les 30 secondes pendant 30 minutes à l'aide du lecteur FLUOstar OPTIMA thermostaté à 37°C.

V.2.8.1.2 Etude de l'inhibition de l'assemblage de la PC-tubuline

Après avoir dilué les molécules à tester dans du tampon PEM, la PC-tubuline est ajoutée dans chaque puits de manière à atteindre une concentration finale de tubuline de 4mg/ml. La microplaque est incubée 10 minutes dans la glace. Le GTP (1mM final) est distribué dans l'ensemble des puits. L'assemblage de la tubuline est déclenché en incubant la microplaque à 37°C. La cinétique d'assemblage est mesurée en absorbance à 355nm toutes les 6 secondes pendant 25 minutes à l'aide du lecteur FLUOstar OPTIMA thermostaté à 37°C.

V.2.8.2 En fluorescence

V.2.8.2.1 Etude de l'inhibition de l'assemblage de la tubuline 1X

Le test a été adapté en s'inspirant du protocole proposé par Barron et al (Barron *et al.* 2003). Ce test utilise une molécule fluorescente, le 4',6-Diamidino-2-phenylindole ou DAPI, qui s'associe de façon non covalente préférentiellement avec la tubuline polymérisée. Le test est effectué dans une microplaque noire ½ puits (Greiner 675090) posée sur la glace. Les molécules à tester sont diluées dans du tampon MEM contenant du DAPI 10µM final (Sigma Aldrich). La tubuline 1X est alors rajoutée dans chaque puits de façon à avoir une concentration finale de 3mg /ml. La microplaque est incubée 10 minutes dans la glace afin de favoriser l'association des molécules avec la tubuline. Du GTP (1mM final) est distribué dans l'ensemble des puits et la microplaque est incubée à 37°C permettant ainsi l'assemblage de la tubuline. La fluorescence générée par l'association DAPI/tubuline polymérisée est mesurée en fonction du temps toutes les 7 ou 9 secondes pendant au moins 30 minutes à l'aide du lecteur FLUOstar OPTIMA thermostaté à 37°C. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission

sont respectivement 355 et 460nm. La présence de molécules inhibitrices de l'assemblage de la tubuline se caractérise par une fluorescence faible tout au long du temps.

V.2.8.2.2 Etude de l'initiation de l'assemblage de la PC-tubuline

Les molécules à tester sont diluées dans du tampon PEM contenant du DAPI (10µM final) du MgCl₂ (5mM final) et du GTP (1mM final). La PC-tubuline est rajoutée au dernier moment dans chaque puits de façon à avoir une concentration finale de 1mg /ml. La microplaque est incubée à 37°C et la fluorescence est mesurée en fonction du temps toutes les 9 secondes pendant 30 minutes à l'aide du lecteur de microplaque. La présence de molécules favorisant l'initiation de l'assemblage se caractérise par une augmentation de la fluorescence au court du temps.

V.2.9 Dépolymérisation des microtubules par MCAK

Cette expérience a été mise au point par Leticia Peris (Institut des Neurosciences, Equipe Physiopathologie du Cytosquelette, Grenoble). Des cellules MEF sontensemencées préalablement à une densité de 5.000 cellules sur lamelles de verre dans des plaques 24 puits. Trois jours après, les cellules sont perméabilisées avec du tampon OPT pendant 2 minutes à 30-35°C. Elles sont ensuite incubées pendant 5 minutes dans du tampon PEM (Pipes 80mM, EGTA 1mM, MgCl₂ 1mM, pH 6.7) additionné de taxol® 2µM (Sigma Aldrich). 50 à 100nM de la protéine motrice active MCAK sont dilués dans du PEM contenant du taxol® 2µM, du DTT 1mM, du KCl 75mM et du Mg-ATP 25mM. Chaque lamelle est incubée avec cette solution pendant 10 minutes à 24 ± 1°C dans un environnement humide. Les cellules sont lavées dans du tampon PEM additionné de taxol® 2µM. Les cellules sont ensuite fixées avec du méthanol à -20°C pendant 10 minutes pour réaliser un immuno-marquage des microtubules en fluorescence afin de quantifier l'activité dépolymérisante de MCAK.

Résultats

Chapitre VI : Mise en place du criblage

VI.1 Principe et miniaturisation du test cellulaire permettant la détection de molécules actives sur la polymérisation des microtubules

VI.1.1 Principe

Ce test repose sur les propriétés des deux enzymes impliquées dans le cycle de détyrosination/tyrosination de la tubuline. Le clivage de la tyrosine C-terminale de la tubuline α par la tubuline carboxypeptidase (TCP) et la ré-addition de cet acide aminé à la chaîne principale par la tubuline tyrosine ligase (TTL) induit la génération de deux populations de tubuline : la tubuline tyrosinée (tubuline TYR) et la tubuline détyrosinée qui comporte un acide glutamique à l'extrémité C-terminale (tubuline GLU). La TTL n'ajoute la tyrosine que sur des molécules de tubuline libres, non incorporées dans les microtubules et elle agit apparemment plus rapidement que la TCP. Par conséquent, lors de la division cellulaire, les réseaux microtubulaires dynamiques sont massivement constitués de tubuline TYR. La tubuline GLU n'est présente que dans une petite sous population de microtubules dépourvus d'activité dynamique et s'accumule lorsque les microtubules sont stabilisés par des protéines effectrices ou des drogues.

VI.1.2 Miniaturisation et automatisation

Jusqu'à présent, l'effet de composés exogènes sur les microtubules pouvait être observé sur lamelle en immunofluorescence après analyse visuelle. Afin de cribler l'ensemble des molécules de la chimiothèque, il a été nécessaire de convertir ce test cellulaire au format microplaque 96 puits. Cette miniaturisation consiste non seulement à réduire autant que possible les formats de l'essai (dimensions du matériel, volumes des réactifs...) mais aussi à l'adapter à toutes les contraintes d'une plate-forme robotisée, notamment à une lecture automatisée. La simplicité, la fiabilité, la robustesse, la reproductibilité au sein d'une même plaque et d'une plaque à l'autre et la rapidité sont les principales qualités requises pour que le test soit considéré comme adéquat pour le criblage automatisé.

Le criblage consiste à tester l'ensemble des molécules d'une chimiothèque pour sélectionner les molécules actives. Dans un premier temps, les cellules sont incubées avec les molécules de

la chimiothèque. Ces cellules sont ensuite lysées avec un tampon qui préserve le réseau microtubulaire mais élimine la tubuline libre. Après fixation au méthanol, les microtubules sont marqués avec des anticorps spécifiques de la tubuline TYR ou de la tubuline GLU puis avec des anticorps secondaires fluorescents dans deux longueurs d'ondes différentes. L'ADN est également marqué avec du Hoechst. Les effets des différents composés sur le cytosquelette microtubulaire sont quantifiés en utilisant un lecteur de fluorescence (figure 25). Les agents dépolymérisants comme la colchicine peuvent être identifiés par une chute du signal de fluorescence issu du marquage de la tubuline TYR alors que les agents qui stabilisent les microtubules, comme le paclitaxel, peuvent être détectés par une augmentation du signal issu du marquage de la tubuline GLU. Le marquage Hoechst est un contrôle indirect sur l'état du tapis cellulaire à la fin de l'essai et peut être un indicateur de l'effet global des agents.

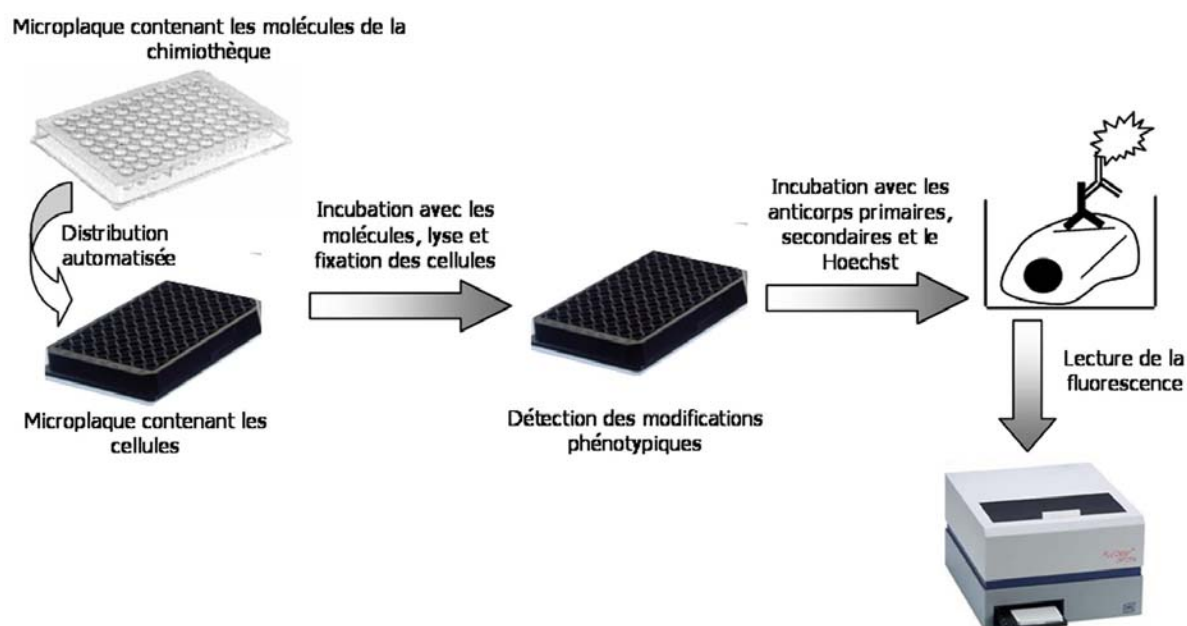


Figure 25 : Principe du criblage phénotypique automatisé

Les molécules chimiques formatées en microplaque sont distribuées à l'aide d'automate de pipetage dans les microplaques contenant des cellules HeLa. Après 2 heures d'incubation, les cellules sont lysées puis fixées avec du méthanol. Les cellules sont ensuite incubées avec des anticorps primaires spécifiques de la tubuline GLU ou de la tubuline TYR puis avec des anticorps secondaires et le Hoechst. La fluorescence est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque.

Comme l'activité d'une molécule n'est testée que dans un seul puits et à une seule concentration, les conditions expérimentales doivent être optimisées de façon à minimiser le nombre de faux négatifs et de faux positifs. Pour la mise au point de l'essai, nous avons utilisé des molécules contrôles dont l'activité vis-à-vis du cytosquelette est connue. Ainsi des

contrôles bio-actifs, la colchicine et le taxol® et un contrôle bio-inactif le DMSO ont systématiquement été utilisés pour les étapes de mise au point.

o *Fixation et perméabilisation des cellules*

Les conditions de fixation et de perméabilisation des cellules avaient été optimisées précédemment au laboratoire. Afin de pouvoir réaliser cet essai sur la plate-forme robotique, la fixation et la perméabilisation des cellules sont réalisées au sein d'une seule et même étape en incubant les cellules dans du méthanol à température ambiante. Ce mode de fixation préserve le réseau microtubulaire et donne des résultats aussi bons, voire meilleurs, qu'avec une fixation au formaldéhyde.

o *Introduction d'une étape de lyse*

L'anticorps anti-tubuline TYR utilisé permet à la fois de marquer la tubuline libre et la tubuline incorporée dans les microtubules. Pour pouvoir différencier, à l'aide d'un lecteur, les cellules dont le réseau microtubulaire est dépolymérisé des cellules dont le réseau est intact, une étape de lyse a été ajoutée de façon à ce que la tubuline libre puisse être éliminée de la cellule. La lyse est réalisée avec un tampon (tampon OPT) qui préserve les structures microtubulaires. Ainsi, l'effet dépolymérisant de certains agents peut être détecté en mesurant la fluorescence liée au marquage de la tubuline TYR avec un lecteur de microplaque (figure 26).

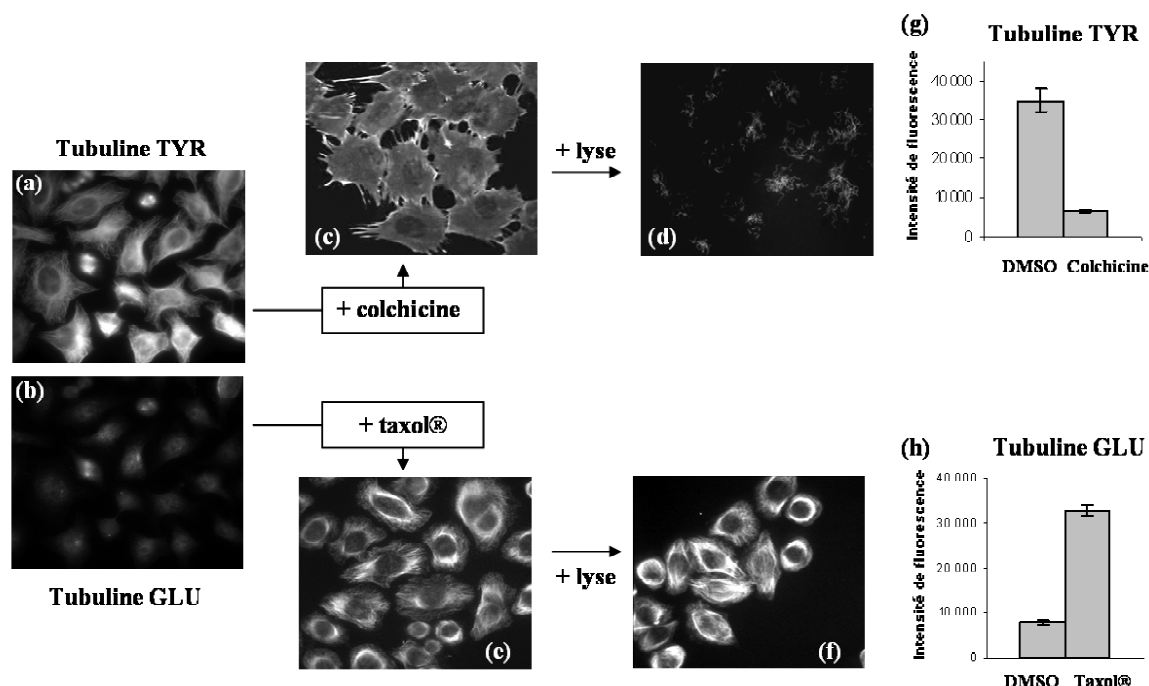


Figure 26 : Intérêt de la lyse des cellules

(a,b) Visualisation en immunofluorescence de la tubuline TYR (a) et de la tubuline GLU (b) dans des cellules HeLa traitées au DMSO ; (c,d) Visualisation en immunofluorescence de la tubuline TYR dans des cellules traitées à la colchicine avant la lyse (c) et après la lyse (d) ; (e,f) Visualisation en immunofluorescence de la tubuline GLU dans des cellules traitées au taxol® avant la lyse (e) et après la lyse (f) , (g) comparaison de l'intensité de fluorescence mesurée par le lecteur après détection de la tubuline TYR, dans les cellules traitées au DMSO et dans les cellules traitées à la colchicine après la lyse ; (h) comparaison de l'intensité de fluorescence mesurée par le lecteur après détection de la tubuline GLU, dans les cellules traitées au DMSO et dans les cellules traitées au taxol® après la lyse

o Détermination de la densité cellulaire

Pour vérifier l'influence de la densité cellulaire sur les performances de l'essai, plusieurs concentrations de cellules HeLa ont été ensemencées dans les microplaques. Pour chaque concentration cellulaire, les signaux correspondant aux marquages de la tubuline TYR, de la tubuline GLU et des noyaux ont été mesurés. Plus la densité d'ensemencement est élevée, plus les signaux sont élevés. Toutefois, ces signaux atteignent un plateau à partir de 3.10^5 cellules/ml. A partir de cette concentration, les signaux obtenus pour les cellules traitées à la colchicine ou au taxol® sont très distincts des signaux obtenus pour les cellules traitées au DMSO. La concentration cellulaire pour le criblage a donc été fixée à 4.10^5 cellules/ml.

o Détermination de la concentration maximale en DMSO

Bien que le DMSO soit réputé inerte sur la plupart des cibles biologiques, il peut interférer avec certaines cibles. De plus, il est toxique pour les cellules. Par conséquent, il faut rechercher quelle est la concentration maximale en DMSO toléré par l'essai (Moore *et al.*

2001; Johnston 2002) et adapter en conséquence la dilution des molécules de la chimiothèque. L'effet du DMSO a été testé sur les cellules et sur la qualité du test. Une diminution significative du marquage de la tubuline TYR et du marquage des noyaux est observée à partir d'une concentration de 1%. Pour le criblage, les molécules seront donc diluées et testées à une concentration de DMSO de 0,5%.

o Simplification de l'essai

Lors de la mise au point de l'essai, il est important de déterminer si le test peut être simplifié. Cette simplification peut permettre d'augmenter la cadence du test (nombre de plaques passées par jour). De plus, si les étapes concernées sont des étapes d'aspiration ou de distribution qui peuvent endommager le tapis cellulaire, la qualité du test peut être améliorée par cette simplification. Jusqu'à présent, l'incubation des cellules avec les anticorps secondaires était suivie de 3 lavages puis d'une étape de coloration de l'ADN avec le Hoechst. Les 2 étapes d'incubation ont été regroupées afin de réduire la longueur de l'essai et le nombre de lavages. Nous avons vérifié que cette modification n'affecte pas de façon significative les résultats du test.

o Automatisation de l'essai

L'automatisation de l'essai a été réalisée en étroite collaboration avec Caroline Barette, ingénieur CEA responsable de la plateforme robotique de criblage. Les temps d'incubation des différents marqueurs ont du être adaptés pour pouvoir traiter le maximum de microplaques par jour. Normalement, la durée d'incubation des anticorps et du Hoechst est de 30 minutes mais celle-ci ne permet au robot que de traiter 4 plaques par procédure robotique. Les durées d'incubation ont donc été augmentées à 2 heures pour l'incubation des anticorps primaires et 1 heure pour l'incubation des anticorps secondaires. De cette façon, il est possible de traiter 7 plaques par procédure robotique. Pour des raisons d'organisation, le lavage après l'incubation des anticorps primaires se fait sur la nuit et l'incubation avec les anticorps secondaires et le Hoechst n'est réalisée que le lendemain. Bien que ces modifications allongent la durée de l'essai, elles permettent d'augmenter le nombre de microplaques criblées par jour et donc de réduire la durée du criblage.

o *Performance de l'essai*

La qualité d'un essai peut être jugée en calculant une valeur statistique, le facteur Z' (Weber *et al.* 1976; Zhang *et al.* 1999). Cette valeur est définie selon la formule suivante :

$$Z' = 1 - \frac{3\sigma_{(+)} + 3\sigma_{(-)}}{|\mu_{(+)} - \mu_{(-)}|}$$

Cette formule prend en compte les écart-types (σ) et les moyennes (μ) des composés bioactifs (+) et des composés bio-inactifs (-). Lorsque les moyennes sont éloignées et que les écarts types sont faibles, la valeur Z' tend vers 1, le test est alors discriminant et de bonne qualité. Un test est considéré comme fiable et discriminant si le Z' est supérieur à 0,5. En dessous de cette valeur, le test pourra être utilisé pour le criblage mais devra être réalisé en duplicate.

Le Z' a été déterminé pour chaque type de marquage à partir de 32 valeurs de contrôles bioactifs (taxol® ou colchicine) et de 32 valeurs de contrôles bioinactifs (DMSO). Pour le marquage permettant de mesurer la variation de la tubuline GLU, le Z' obtenu est de 0,79 et pour celui permettant de mesurer la variation de la tubuline TYR, le Z' obtenu est de 0,66.

Un autre paramètre est également utilisé pour analyser la performance du test. Ce paramètre est le rapport de la moyenne des signaux les plus forts sur la moyenne des signaux les plus faibles. Il donne une idée de la séparation entre les signaux bioactifs et les signaux bioinactifs. Plus ce paramètre est élevé, plus l'essai est robuste. Pour le marquage de la tubuline TYR, le rapport de la moyenne des signaux issus des cellules traitées au DMSO sur la moyenne des signaux issus des cellules traitées à la colchicine est de 5,4. Pour le marquage de la tubuline GLU, le rapport de la moyenne des signaux issus des cellules traitées au taxol® sur la moyenne des signaux issus des cellules traitées au DMSO est de 4,1 (figure 27).

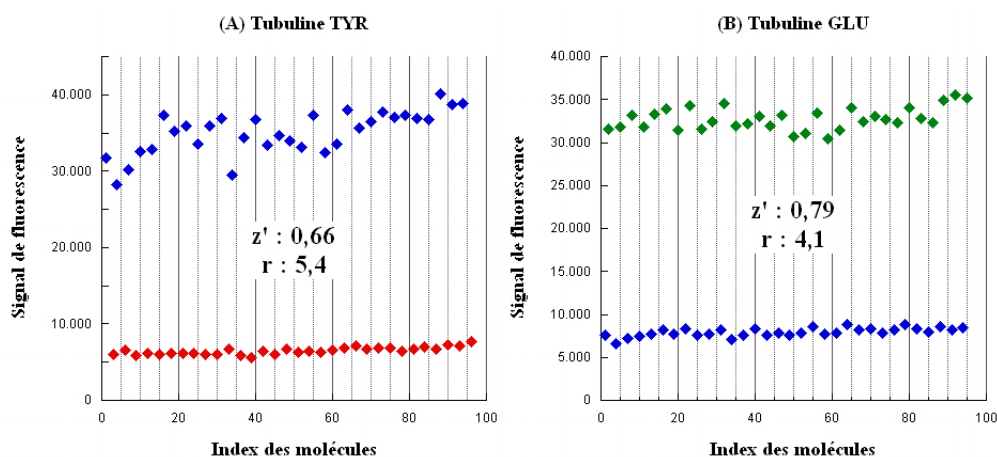


Figure 27 : Performance de l'essai

- (A) Niveau de tubuline TYR dans les cellules traitées au DMSO (◆) ou à la colchicine (◆). Le rapport de la moyenne des signaux les plus forts sur la moyenne des signaux les plus faibles est de 5,4 et le Z' de l'essai est de 0,66.
- (B) Niveau de tubuline GLU dans des cellules traitées au DMSO (◆) ou au taxol® (◆). Le rapport de la moyenne des signaux les plus forts sur la moyenne des signaux les plus faibles est de 4,1 et le Z' de l'essai est de 0,79.

Pour tester la variabilité de l'essai d'un jour à l'autre, des expériences ont été réalisées sur des jours différents. Pour chaque essai, le z' et le rapport de la moyenne des signaux les plus forts sur la moyenne des signaux les plus faibles sont calculés puis comparés. Ces valeurs sont assez stables, pour les trois types de marquages. L'ensemble de ces résultats indique que le test est fiable d'un point de vue statistique, discriminant et robuste.

VI.1.3 Validation

L'essai a été évalué en testant une quarantaine de molécules agissant sur le cytosquelette microtubulaire ou présentant des effets biologiques ciblant d'autres effecteurs ou différentes voies de signalisation. Les valeurs brutes obtenues ont été converties en pourcentage de signal GLU ou de signal TYR en prenant comme valeurs maximales de référence, les valeurs brutes GLU du taxol® ou les valeurs brutes TYR du DMSO.

Molécules	Tubuline TYR (%)	Tubuline GLU (%)	Noyaux (%)
3-Aminobenzamide	105	1	101
Actinomycin D	109	2	89
Apigenin	111	4	101
BAPTA-AM	103	0	98
Benomyl	73	0	99
Brefeldin A	98	0	98
Camptothecin	81	0	98
Colchicine	0	0	97
Combretastatin A4	0	0	95
Costunolide	80	0	97
Cycloheximide	101	0	96
Cytochalasin D	79	0	89
Daidzein	97	0	100
Daunorubicin	100	5	55
DMSO	100	0	100
Docetaxel	125	96	100
Epothilone B	130	110	100
Etoposide	101	1	100
Griseofulvin	90	0	101
HA14-1	103	0	99
Homoharringtonine	106	0	96
Latrunculin A	98	0	91
Linomide	97	0	98
Methotrexate	106	2	99
Monastrol	123	3	101
Mycophenolic acid	117	1	101
Nocodazole	0	0	100
Noscapine	84	0	99
Paclitaxel	130	91	100
Parthenolide	77	0	97
Phalloidin	100	1	100
Pifithrin-alpha	110	0	100
Podophyllotoxin	0	0	94
Pregnenolone	112	1	101
Silibinin	107	1	101
Streptozocin	99	0	100
Vinblastine	82	0	96
Vincristine	90	0	96

Tableau 4

Le taxol® (ou paclitaxel) et la colchicine, réintroduits parmi les autres composés, sont à nouveau détectés. Les molécules connues pour exercer une dépolymérisation des microtubules comme la Combretastatine A4 ou le nocodazole sont effectivement détectées par notre test : on observe une disparition totale du signal TYR, ce qui indique que le réseau est complètement dépolymérisé. Ces résultats indiquent que le test mis au point est valide pour la détection de composés présentant des modes d'actions similaires à la colchicine et au

paclitaxel. Le bénomyl et la griséofulvine sont des agents fongicides antimitotiques, connus pour avoir un effet sur la tubuline *in vitro*. Toutefois les effets de ces agents sont difficilement détectables sur les cellules en interphase (Weber *et al.* 1976; Gupta *et al.* 2004). Il est donc normal que ces agents ne soient pas sélectionnés par notre test. Les molécules ayant des effets sur le cytosquelette d'actine, le cycle cellulaire, la synthèse protéique, l'ADN ou les topoisomérases ne font pas varier de façon significative les pourcentages de tubuline GLU et de tubuline TYR. Ce résultat confirme la spécificité de notre test vis-à-vis de l'état d'assemblage du réseau microtubulaire.

La daunorubicine provoque une diminution du signal Hoechst, mais n'a pas d'action sur les microtubules. Cette molécule, utilisée en chimiothérapie cancéreuse (Monneret 2001) est un intercalant de l'ADN double-brin (Di Marco *et al.* 1981). Par conséquent, il entre en compétition directe avec le Hoechst, ce qui explique cette chute de signal.

Les limites de cet essai ont toutefois été mises en évidence lors de cette expérience. En effet, nos conditions expérimentales n'ont pas permis de détecter l'action dépolymérisante de la vinblastine ou la vincristine. Ceci s'explique par le fait que ces drogues sont capables de former des paracristsaux de protofilaments de tubuline, après une étape de dépolymérisation du réseau microtubulaire, de manière dépendante de la dose de substance et du temps d'incubation. Ces paracristsaux sont stables (Paturle-Lafanechere *et al.* 1994) et ne sont donc pas éliminés par l'étape de lyse. Nous avons vérifié que dans nos conditions expérimentales, il y avait bien formation de paracristsaux. Ceux-ci sont abondamment marqués avec l'anticorps dirigé contre la tubuline TYR. Par conséquent, une analyse de l'intensité de fluorescence à l'aide du lecteur dont nous disposons ne permet de faire la différence entre des cellules normales et des cellules pourvues de paracristsaux.

VI.2 Caractéristiques des chimiothèques criblées

Lorsqu'on désire trouver une nouvelle tête de série, il est indispensable de cribler un grand nombre de molécules différentes et de veiller à ce que les structures de celles-ci soient les plus diversifiées possibles. En effet, il est maintenant admis que, d'une manière générale, les molécules ayant des structures voisines ont une activité biologique proche. Ainsi, il existe une corrélation forte entre la structure d'une molécule et les propriétés observées. En se basant sur

ce principe, plusieurs chimiothèques d'origine diverse ont été criblées. Ceci dans le but d'isoler plusieurs familles d'intérêts.

La plupart des chimiothèques sont filtrées par un certain nombre de descripteurs pour ne retenir que des candidats médicaments potentiels ou "drug-like". Ces filtres permettent le plus souvent d'éliminer des molécules chimiquement réactives, toxiques, métabolisables ou présentant des propriétés physicochimiques inadéquates.

La « règle des 5 » de Lipinski est devenu un standard pour caractériser l'aspect "drug-like" d'une molécule. Cette règle permet de prédire si une molécule chimique a des chances de conserver son activité après administration orale chez l'homme. Elle a été formulée par Christopher A. Lipinski qui s'est basé sur le fait que la plupart des médicaments étaient généralement de petites molécules lipophiles (Lipinski *et al.* 2001) Ainsi, un médicament reste actif après administration orale, s'il remplit au moins trois de ces conditions :

- un nombre de donneurs d'hydrogène inférieur à 5 ;
- un nombre d'accepteurs d'hydrogène inférieur à 10 ;
- une masse moléculaire inférieure à 500 g.mol⁻¹ ;
- un coefficient de partition logP inférieur à 5.

Le logP correspond au logarithme du coefficient de partage octanol/eau. Il évalue l'hydrophobicité de la molécule et rend compte de la tendance d'une molécule à s'accumuler dans les membranes biologiques des organismes vivants. S'il est élevé, le risque de bioaccumulation est important. Lorsqu'il est estimé à partir de la formule chimique de la molécule, on parle de clogP.

D'autres filtres ont été proposés par Ghose (Ghose *et al.* 1999) afin de mieux évaluer l'aspect "drug like" des molécules. Ces molécules doivent alors remplir les règles suivantes :

- un coefficient de partition logP compris entre -0,4 et 5,6 ;
- une réfractivité moléculaire comprise entre 40 et 130 ;
- une masse moléculaire comprise entre 160 et 480 g.mol⁻¹ ;
- un nombre d'atomes compris entre 20 et 70.

VI.2.1 Chimiothèque nationale

La chimiothèque nationale est une fédération de chimiothèques de laboratoires, comprenant environ 30.000 molécules et plus de 8.000 extraits de plantes. Les produits choisis et mis en plaque (à une concentration d'environ 10 mM dans du DMSO) sont libres de droit et leurs méthodes de synthèse sont connues. Les thèmes de recherche des laboratoires publics impliqués étant très variés, la principale caractéristique de cette fédération est de proposer une chimiothèque d'une très grande diversité moléculaire. Le LEDSS propose par exemple des intermédiaires de synthèse, des bio-molécules, des analogues structuraux, des composés hétérocycliques (dérivés de l'indole, du pyrrole, de l'acridine...), des composés multi-dentés (O, N, S), des macrocycles polyhydroxylés, ou des radicaux organiques stables...

Le CMBA ne dispose que d'une partie de cette chimiothèque ([cf chapitre IV Matériels](#)). Sur les 11.920 molécules, 10.628 molécules respectent la règle de Lipinski (soit environ 89% de la chimiothèque) et 9.523 molécules sont sélectionnées par le filtre de Ghose (soit environ 80%).

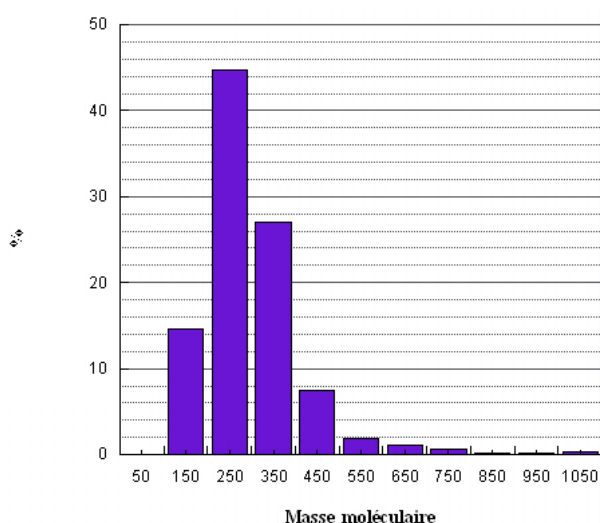


Figure 28 : Propriétés physico-chimiques des molécules de la chimiothèque nationale

VI.2.2 Chimiothèque commerciale

La chimiothèque ChemBridge® regroupe actuellement 450.000 molécules. Ces molécules sont issues de la chimie combinatoire et sont sélectionnées en fonction de leur diversité et de leur capacité à devenir des candidats-médicaments. La chimiothèque DIVERSet™ du

laboratoire, est une sous-collection de la chimiothèque ChemBridge d'environ 16.000 petites molécules "drug-like". Elle est conçue pour être une bibliothèque universelle de criblage de la plus grande partie des pharmacophores, par l'intermédiaire d'un nombre minimum de composés. Cette sélection est faite à l'aide de descripteurs 3D basés sur les propriétés pharmacophores des molécules. DIVERSet™ est particulièrement utile pour le criblage principal contre une vaste palette de cibles biologiques, y compris celles pour lesquelles on ne dispose d'aucune information structurale.

La majorité des molécules de la chimiothèque ChemBridge respecte les règles de Lipinski. Le nombre moyen de donneurs d'hydrogène tend vers 1, le nombre moyen d'accepteurs d'hydrogène est compris entre 3 et 4, la moyenne des masses moléculaires est d'environ 340 g.mol⁻¹ et la moyenne du clogP est de 4. Elles sont donc, *a priori*, particulièrement adaptées au criblage cellulaire.

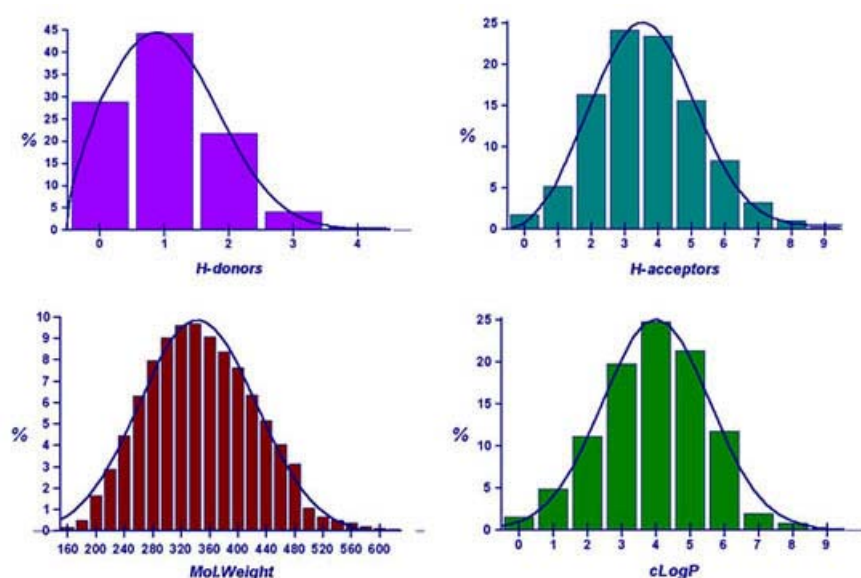


Figure 29 : Propriétés physico-chimiques des molécules de la chimiothèque Chembridge

Les molécules de la chimiothèque sont le plus souvent des hétérocycles dont les principales sous-structures chimiques sont répertoriées ci-dessous :











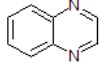




 1H-Indoles	 Pyrazoles	 1H-Benzimidazoles	 Pyridines	 Quinolines
 Piperidines	 Morpholines	 Piperazines	 1,3-Benzoxazoles	 Pyrazines
 Quinoxalines	 Pyrimidines			
7-member heterocycles:				
				

Figure 30 : Sous-structure des molécules issues de la chimiothèque ChemBridge

Sur les 16.479 molécules de la chimiothèque DIVERSet™ du laboratoire, 15.604 molécules respectent la règle de Lipinski (soit environ 95% de la chimiothèque) et 15.733 molécules sont sélectionnées par le filtre de Ghose (soit environ 95%).

VI.3 Aspects statistiques, normalisation

L'analyse des données brutes issues d'un criblage permet d'identifier les molécules bio-actives qui feront l'objet d'études plus approfondies. Cette sélection est réalisée en appliquant un seuil sur les signaux mesurés.

Les signaux de bio-activité sont caractérisés par une certaine variabilité et une incertitude dues aux erreurs de mesures. L'origine des ces erreurs peut être d'ordre biologique, chimique ou technologique. Elles engendrent soit des faux-positifs (molécules identifiées à tort comme bio-actives) soit des faux-négatifs (molécules identifiées comme bio-inactives alors qu'elles ont bien une activité).

VI.3.1 Normalisation des signaux par le pourcentage d'activité

La sélection des molécules bio-actives peut-être effectuée par seuillage sur un signal brut. Cependant l'observation des valeurs obtenues avec les molécules contrôles indique que celui-ci n'est pas toujours comparable d'une plaque à l'autre, en particulier sur la totalité d'une campagne de criblage. C'est pourquoi une approche de normalisation basée sur les contrôles de bio-activité et de bio-inactivité a été développée pour résoudre ce problème. Cette approche consiste à ramener le signal de bio-activité brut à une valeur comprise entre 0 et 100. Le plus souvent, le pourcentage du signal mesuré représente sa distance relative à la moyenne d'un ensemble de contrôle de bio-activité. Cependant, cette méthode de normalisation n'est pas la plus appropriée pour traiter nos valeurs de criblage (cf figure 31). Nous avons donc développé une autre méthode qui est décrite dans le paragraphe suivant.

VI.3.2 Correction des erreurs systématiques

La valeur du signal mesuré est souvent différente de la vraie valeur du signal qui est émis. La différence entre ces deux valeurs est appelée « erreur de mesure ». Elle peut être classée selon deux catégories en fonction de son origine. Si l'erreur survient de façon hasardeuse, on parle alors d'erreur statistique ou *erreur aléatoire*. Si l'erreur est constante et qu'elle introduit systématiquement le même décalage, on parle plutôt de biais ou *erreur systématique*.

Au cours des différentes campagnes de criblage, des phénomènes de gradients de signaux ont été observés. Ces phénomènes sont liés au fonctionnement du laveur de microplaque, ils

entraînent des erreurs systématiques. En effet, plusieurs expériences ont démontré que l'aspiration au niveau des 96 puits ne se faisait pas de façon homogène. Le signal de fluorescence résultant est légèrement plus fort à droite de la microplaque qu'à gauche. Malgré le réglage des différents paramètres d'aspiration et de distribution, ce phénomène, inhérent à la conception de l'appareil, n'a pas pu être corrigé. Aussi, les signaux mesurés ont été soumis à un post-traitement mathématique.

La correction des signaux consiste à prendre en compte les 5 valeurs des contrôles bio-inactifs pour déterminer la pente et l'ordonnée à l'origine de la droite de régression. Ainsi, il est possible de définir à l'aide de ces informations, les valeurs "réelles" qu'auraient les contrôles bio-inactifs en fonction de leur position dans la microplaque. Les valeurs "réelles" des contrôles bio-actifs sont calculées de la même façon mais en prenant en compte les 5 valeurs des contrôles bio-actifs. Le pourcentage du signal mesuré dans un puits d'indice i est alors calculé par rapport aux valeurs qu'auraient les contrôles bio-actif et bio-inactif dans ce même puits. On parle alors de méthode de normalisation par double régression.

Le test étant multi-paramétrique, les pourcentages de bio-activité ont été calculés de deux façons :

-normalisation du signal pour l'activité « génération de tubuline GLU »

Soit x^i , la valeur brute "tubuline GLU" d'une molécule dans un puits d'indice i et $C_{(+)}^i$ et $C_{(-)}^i$, les valeurs "tubuline GLU" estimées (par la méthode de double régression décrite ci-dessus) du contrôle bio-actif et du contrôle bio-inactif dans ce même puits, le signal normalisé est déterminé à l'aide de l'équation ci-dessous:

$$P(x^i) = \frac{x^i - C_{(-)}^i}{C_{(+)}^i - C_{(-)}^i}$$

-normalisation du signal pour l'activité « génération de tubuline TYR »

Soit x^i , la valeur brute "tubuline TYR" d'une molécule dans un puits d'indice i et $C_{(+)}^i$ et $C_{(-)}^i$, les valeurs "tubuline TYR" estimées du contrôle bio-actif et du contrôle bio-inactif dans ce même puits, le signal normalisé est calculé à partir de l'équation suivante:

$$P(x^i) = \frac{x^i - C_{(+)}^i}{C_{(-)}^i - C_{(+)}^i}$$

Cette méthode de normalisation semble être la plus adaptée pour traiter la dérive due au fonctionnement du laveur.

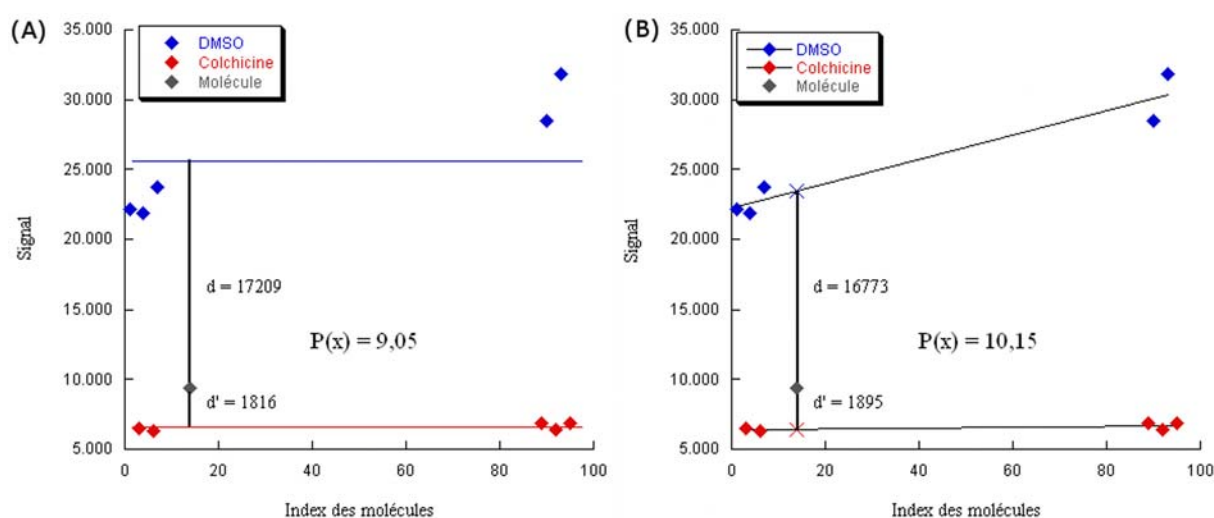


Figure 31 : Comparaison des méthodes de normalisation

(A) Normalisation du signal « tubuline TYR » par la méthode des moyennes. Le pourcentage de signal d'une molécule $P(x)$ est calculé par rapport à sa distance relative à la moyenne des contrôles DMSO (—) et à la moyenne des contrôles colchicine (—). (B) Normalisation du signal « tubuline TYR » par la méthode de double régression. Le pourcentage de signal d'une molécule $P(x)$ est calculé par rapport à sa distance relative au contrôle DMSO (X) et au contrôle colchicine (X).

On peut noter que dans ce cas, la normalisation est réalisée à l'échelle d'une plaque, c'est-à-dire que les contrôles considérés sont ceux qui ont été mesurés au sein d'une même plaque.

La variabilité des valeurs des molécules en fonction de leur position dans la microplaque et en fonction des jours de criblage a ainsi pu être corrigée en appliquant la normalisation par la méthode de double régression. On obtient alors des nuages de points plus homogènes.

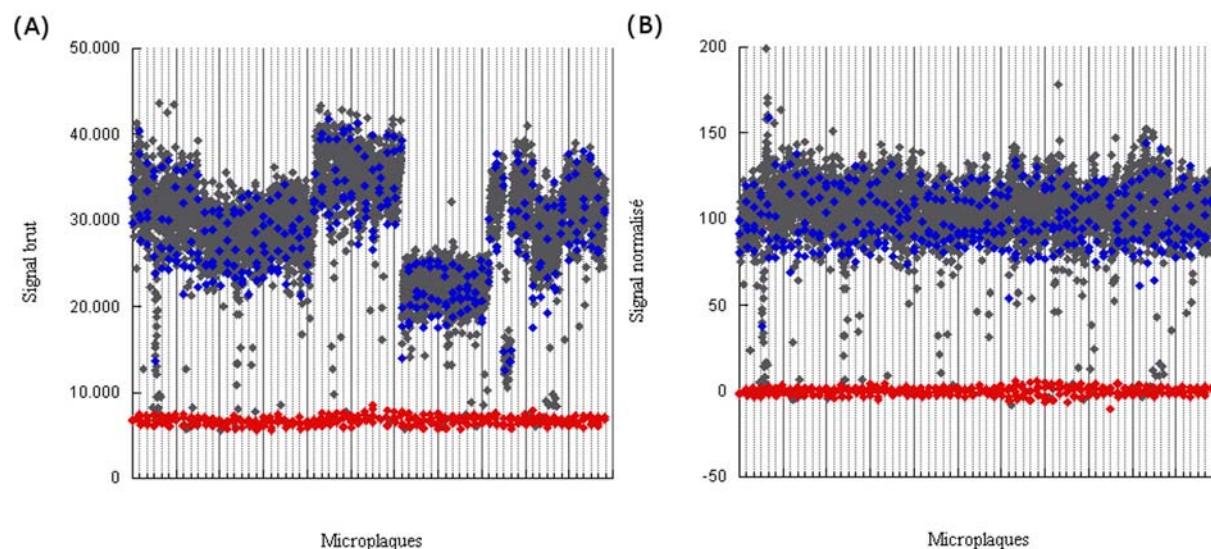


Figure 32 : Normalisation du signal brut « tubuline TYR »

(A) signaux de tubuline TYR bruts mesurés sur 65 plaques au cours du criblage de la Chimiothèque Nationale

(B) les signaux ont été normalisés avec une fenêtre égale à une microplaque. Les variations observées en (A) sont régularisées.

Chapitre VII : Criblage

VII.1 Criblage des chimiothèques académiques

VII.1.1 Criblage primaire

Les 11.920 molécules issues des chimiothèques académiques dont dispose le CMBA, ont été criblées à l'aide du test cellulaire à une concentration moyenne de 25µM. Le choix de cette concentration est basé sur la concentration maximale de solvant tolérée par le test cellulaire. La dilution des molécules a été adaptée de façon à ce que la concentration finale en DMSO soit de 0.5%. En effet, des expériences ont montré qu'à cette dose, le DMSO n'avait pas d'effet toxique sur les cellules. Le choix de la concentration est aussi étroitement lié à la spécificité relative des molécules vis-à-vis de la cible. Ainsi, plus la concentration en molécules est élevée, plus les chances d'obtenir des touches sont importantes mais moins la spécificité sera grande. Cette concentration de 25µM, modérément élevée et respectant la concentration en DMSO de 0,5 %, est donc un bon compromis.

Les nuages de points des valeurs normalisées obtenues pour les molécules testées lors de ce criblage primaire, ainsi que celles des contrôles bio-actifs et bio-inactifs, sont représentés ci-dessous.

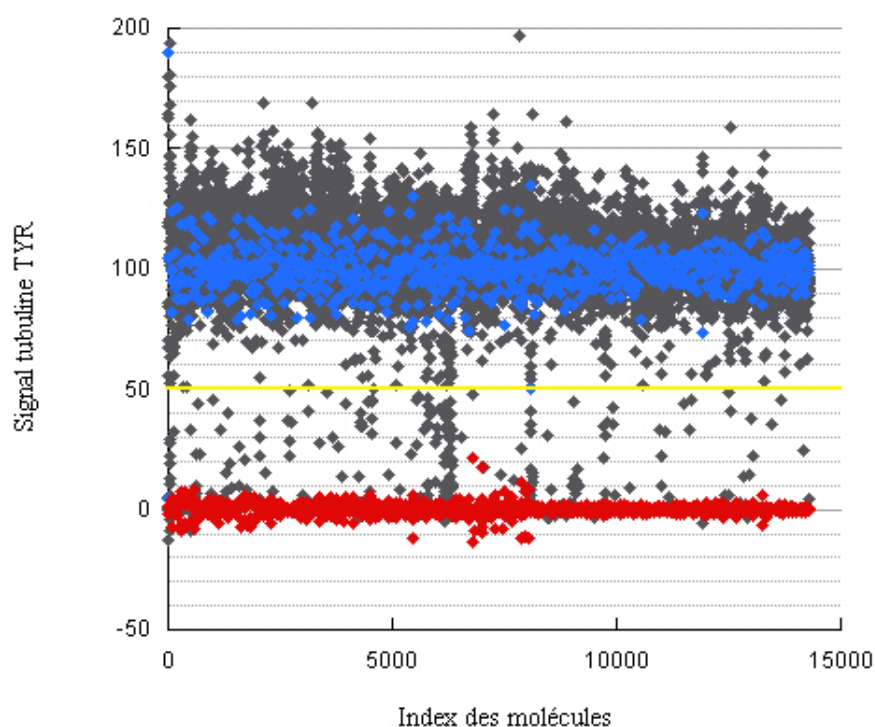


Figure 33 : Représentation du pourcentage de tubuline TYR dans les cellules

Les points rouges (♦) représentent les contrôles bio-actifs (colchicine) et les points bleus (♦), les contrôles bio-inactifs (DMSO). Les points gris (♦) représentent les valeurs obtenues pour les molécules, et la barre (—) indique le seuil fixé.

Pour le marquage de la tubuline TYR (figure 33) la présence d'un agent dépolymérisant, se traduit par une diminution voire une absence de tubuline TYR dans la cellule. Toutes les molécules présentant un niveau de signal inférieur au seuil fixé ont été retenues pour être de nouveau testées.

Toutefois, nous avons croisé les valeurs obtenues en tubuline TYR et les valeurs obtenues en Hoechst car si la diminution de tubuline TYR est associée à une baisse de fluorescence Hoechst, cela signifie que les cellules se sont décollées. Nous avons considéré que les molécules avaient un effet potentiellement dépolymérisant sur les microtubules lorsque le pourcentage du contenu en tubuline TYR dans la cellule est inférieur ou égal à 50% et que le pourcentage de signal Hoechst est supérieur ou égal à 90%. Nous avons donc sélectionné 175 molécules pour réaliser le criblage secondaire ce qui représente 1,5% de l'ensemble des molécules de la chimiothèque.

Pour le marquage de la tubuline GLU (figure 34) la présence d'un agent stabilisant, se traduit par la présence de tubuline GLU dans la cellule.

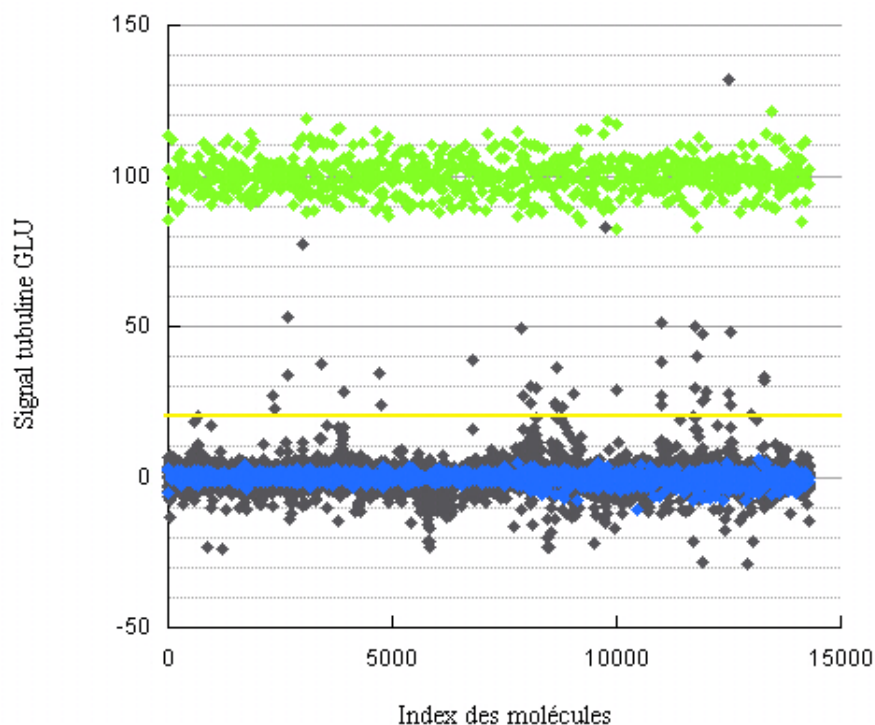


Figure 34 : Représentation du pourcentage de tubuline GLU dans les cellules

Les points verts (◆) représentent les contrôles bio-actifs (taxol®), les points bleus (◆), les contrôles bio-inactifs (DMSO) et les points gris (◆), les valeurs obtenues pour les molécules. La barre (—) indique le seuil fixé (20%).

Etant donnée la faible proportion de molécules entraînant une augmentation du pourcentage en tubuline GLU, nous avons élargi notre fenêtre de sélection et nous avons décidé de retenir les molécules pour lesquelles le signal était augmenté de 20% (cf barre de seuillage) pour le criblage secondaire. Nous avons donc sélectionné 46 molécules (soit 0.4% des molécules de la chimiothèque).

Enfin, l'analyse comparée des différents signaux obtenus pour chaque marquage permet également de détecter la présence de certains agents intercalants de l'ADN (petit sillon). En effet, de tels agents ne provoquent pas de modifications au niveau de la tubuline TYR et de la tubuline GLU mais engendrent une chute du signal Hoechst. Nous n'avons pas exploité directement ces dernières molécules, mais ces informations ont été transmises aux collaborateurs chimistes.

VII.1.2 Criblage secondaire

Afin de confirmer l'activité des molécules sélectionnées au cours du criblage primaire, celles-ci sont criblées une seconde fois avec le même test cellulaire. Ce deuxième criblage a permis d'affirmer l'activité de 72 molécules sur les 221 retenues au criblage primaire, soit un taux de confirmation d'environ 33%. Parmi ces molécules, 56 sont capables de diminuer le signal TYR sans décoller les cellules et 16 sont capables d'augmenter le signal GLU. Ce taux de confirmation, même s'il paraît faible, est tout à fait comparable (et même meilleur) à ceux classiquement obtenus pour les tests cellulaires en criblage à haut débit.

VII.1.3 Elimination des faux positifs

Lorsqu'on identifie des molécules bio-actives par seuillage, le fait d'abaisser la valeur du seuil de bio-activité tend à augmenter le nombre de faux-positifs.

Une analyse du réseau microtubulaire en immunofluorescence a permis de visualiser l'effet réel des molécules sur les microtubules et d'éliminer ces faux-positifs. Pour cela, toutes les molécules sélectionnées au cours du criblage secondaire, ont été fournies à nouveau par les chimistes avec lesquels nous collaborons, sous forme de poudre. Après mise en solution, ces molécules ont été incubées avec des cellules HeLaensemencées sur lamelles de verre, dans les mêmes conditions que pour le criblage.

Parmi les 16 molécules retenues pour leur effet potentiellement stabilisant, 5 molécules de la chimiothèque de l'UMR 7081 appartiennent à une famille de composés qui fluorescent aux mêmes longueurs d'onde que l'anticorps Alexa Fluor® 488. Ce marquage vert qui persiste même après lavage des cellules, n'est donc pas spécifique aux microtubules.

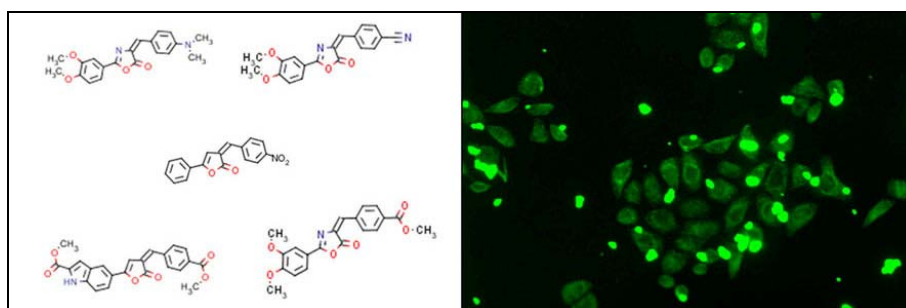


Figure 35 : Structure des molécules fluorescentes et effet de des molécules sur des cellules HeLa

Par ailleurs, l'analyse en immunofluorescence n'a pas permis de confirmer l'activité de 5 autres molécules pourtant actives lors des deux précédents criblages.

Ce manque de reproductibilité peut être dû au fait que les lots de molécules testées sur lamelles ne soient pas les mêmes que ceux utilisés pour le criblage. La stabilité des molécules au cours du temps dépend fortement du mode de conservation de celles-ci. Aussi, le degré de dégradation des molécules n'est pas le même dans tous les lots selon qu'elles sont conservées en poudre ou en solution dans le DMSO. Les molécules en solution dans le DMSO peuvent aussi voir leur stabilité varier en fonction du degré d'hygrométrie du DMSO.

A l'issue de cette première étape d'analyses des « touches », seules 6 molécules génèrent réellement de la tubuline GLU dans les cellules de façon reproductible. Les structures et les identifiants de ces molécules sont représentées ci-dessous :

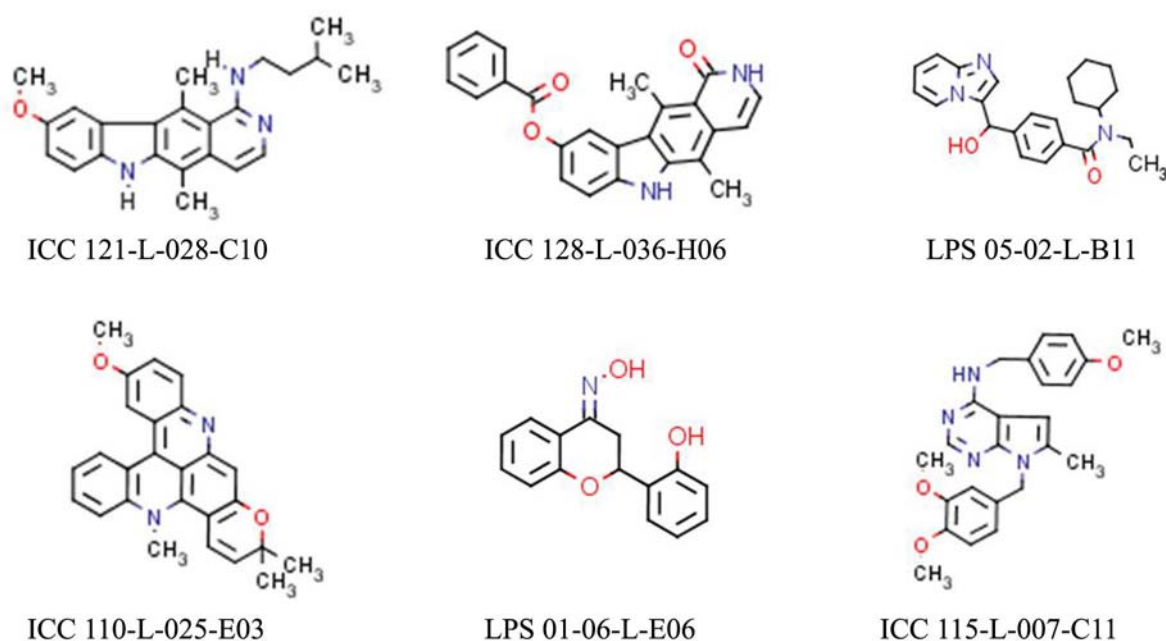


Figure 36 : Structure des 6 molécules sélectionnées

Si on compare les structures des molécules, on observe qu'elles appartiennent toutes à des familles structurales distinctes, à l'exception des composés ICC121-L-028-C10 et ICC128-L-036-H06 qui présentent tous les deux un motif carbazole.

Concernant les molécules sélectionnées pour leur effet potentiellement dépolymérisant, seules les molécules les plus originales d'un point de vue structural, ont été testées en immunofluorescence sur lamelles. Ainsi, nous n'avons pas retenu les analogues structuraux

de la combretastatine. De plus, les molécules comportant des groupements avec une importante réactivité chimique, capables de réagir avec un grand nombre de protéines, ont été écartées. Ces critères de sélection nous ont conduits à ne retenir que la moitié (28 composés) des touches retenues à la suite du criblage secondaire. L'analyse microscopique en immunofluorescence des effets des ces molécules sur le réseau microtubulaire a permis de confirmer l'activité de 27 molécules. La proportion de faux-positifs est donc plutôt faible. Ceci confirme la pertinence des critères de sélection choisis, que ce soit lors de l'analyse du criblage secondaire (élimination des composés qui provoquent un détachement des cellules) ou lors de l'analyse de la structure des composés. La plupart des molécules sélectionnées sont regroupées dans 4 grandes familles structurales. La famille I regroupe des azaindoles et la famille IV des deazapurines.

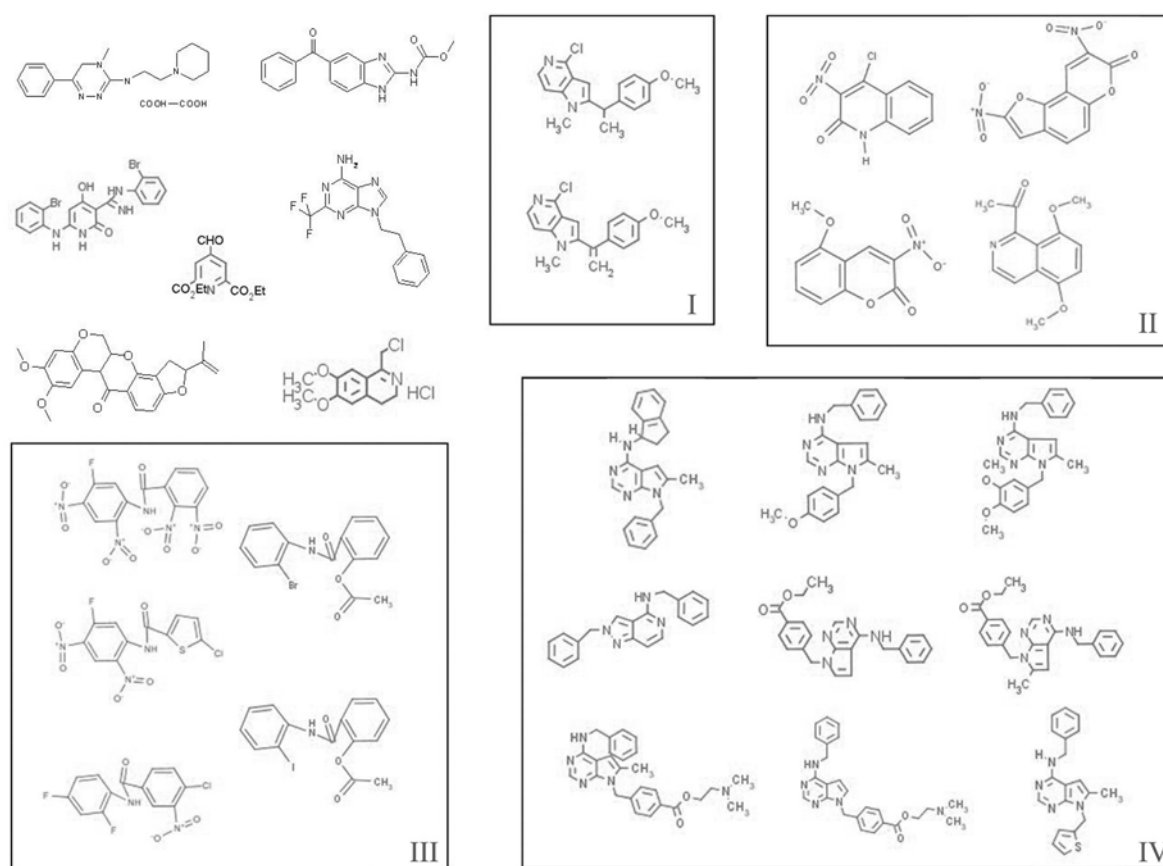


Figure 37 : Structure des 27 molécules sélectionnées

VII.1.4 Tests secondaires

VII.1.4.1 Effet sur le réseau d'actine

L'actine, tout comme la tubuline, forme des réseaux. Ces réseaux soutiennent mécaniquement la membrane plasmique, déterminant ainsi sa forme et sa plasticité, et permettent à la cellule de migrer, d'endocyter des particules et de se diviser. Il est connu que le réseau d'actine et le réseau microtubulaire, même s'il existe des substances spécifiques de chacun des réseaux, sont étroitement interrégulés. De ce fait, certaines molécules agissant sur les microtubules peuvent aussi avoir un effet sur le réseau d'actine (Enomoto 1996). Nous avons testé l'effet des molécules retenues pour leur effet potentiellement stabilisant sur le réseau d'actine. Contrairement aux cellules épithéliales, les fibroblastes présentent un réseau d'actine filamentaire important, ce qui facilite l'analyse. C'est pourquoi, pour cette analyse, nous avons incubé des fibroblastes de rat avec les molécules à 25µM pendant 2 heures puis nous avons marqué l'actine F à l'aide d'une phallotoxine couplée à un fluorophore (Alexa Fluor[®] 488).

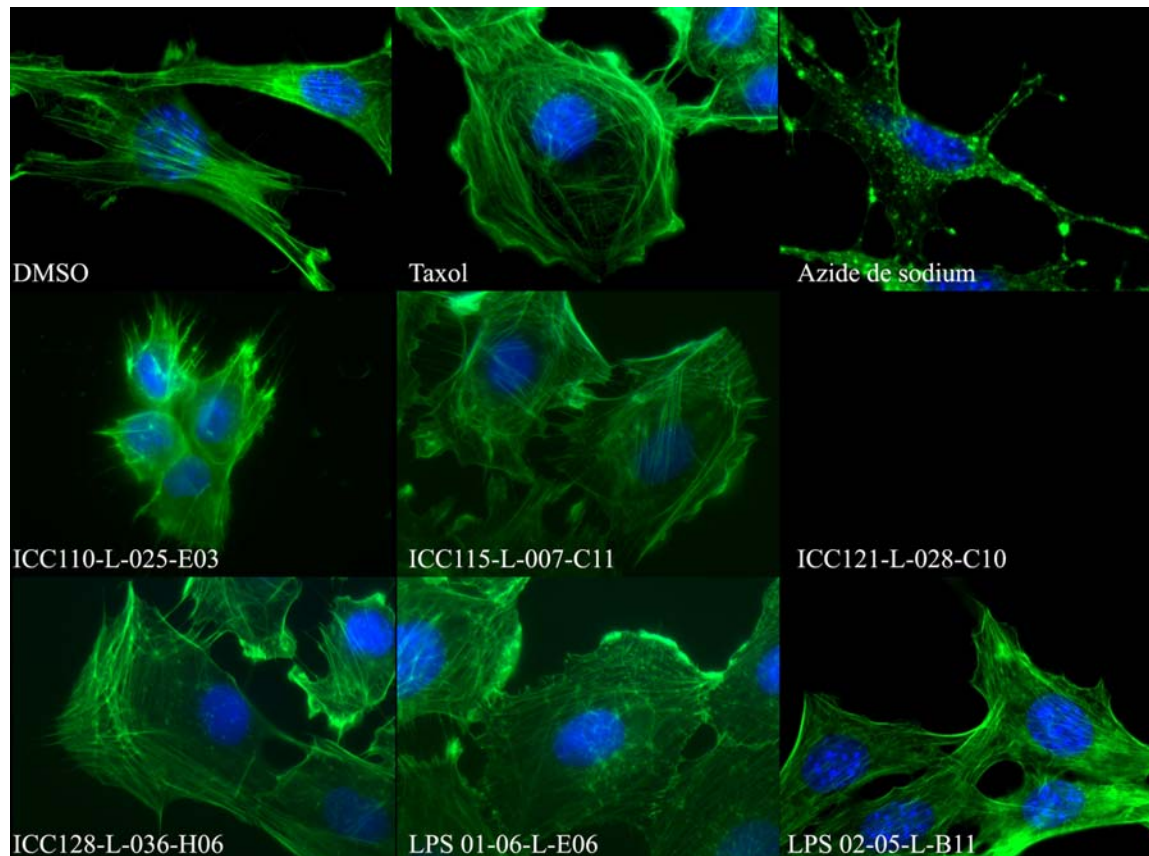


Figure 38 : Effet des molécules sur le réseau d'actine de cellules Rat2

La molécule ICC110-L-025-E03- provoque un réseau d'actine anormal (figure 38) Nous n'avons pas pu observer l'effet de la molécule ICC121-L-028-C10- sur l'actine car celle-ci est très toxique vis à vis des fibroblastes de rat. Le réseau d'actine des cellules traitées avec les autres molécules semble normal. Toutefois, nous avons remarqué que ces molécules ne génèrent pas de tubuline GLU supplémentaire dans les cellules Rat2 contrairement aux cellules HeLa. Il faut donc prendre ces résultats avec précaution.

VII.1.4.2 Effet sur la localisation des mitochondries

Plusieurs substances actives sur les microtubules ont aussi un effet sur l'organisation spatiale des mitochondries. Une des bases moléculaires de ce phénomène est le rôle central joué par les microtubules dans le positionnement de ces organelles (Heggeness *et al.* 1978). De nombreux agents anticancéreux classiques agissent sur les mitochondries comme les épipodophyllotoxines (VP-16), les taxanes et les analogues nucléosidiques. Un traitement des cellules avec du taxol® provoque la phosphorylation de Bcl-2. Bcl-2 est une protéine à activité anti-apoptotique qui régule la perméabilité de la mitochondrie. La phosphorylation de Bcl-2 entraîne des régulations complexes membranaires et cytoplasmiques aboutissant à la perméabilisation de la mitochondrie. Des molécules solubles sont ainsi libérées vers le noyau ou le cytoplasme provoquant la mort de la cellule.

Par ailleurs, il est connu que l'azide de sodium est capable de provoquer une stabilisation des microtubules, générant ainsi de la tubuline GLU (De Brabander *et al.* 1982; Gundersen *et al.* 1987). L'azide de sodium est un inhibiteur de la respiration mitochondriale. L'explication de ce phénomène serait que, en bloquant le transfert d'électron lors de l'oxydation phosphorylante, cette substance provoque une déplétion en ATP. Celle-ci va bloquer une étape non identifiée de la dépolymérisation des microtubules et provoquer l'augmentation de tubuline GLU dans la cellule.

Notre objectif est d'écarter des molécules présentant un mode d'action similaire à l'azide de sodium, qui représenteraient pour nous des faux-positifs. Un marquage des mitochondries permet d'identifier aisément de telles molécules.

Pour analyser l'effet des molécules sélectionnées sur ces organites, nous avons utilisé le marqueur MitoTracker® qui a la propriété de diffuser de façon passive à travers la membrane mitochondriale et de s'accumuler dans les mitochondries actives. A l'aide de ce marqueur

fluorescent, il est possible de déterminer la position des mitochondries dans la cellule et de savoir si elles sont fonctionnelles.

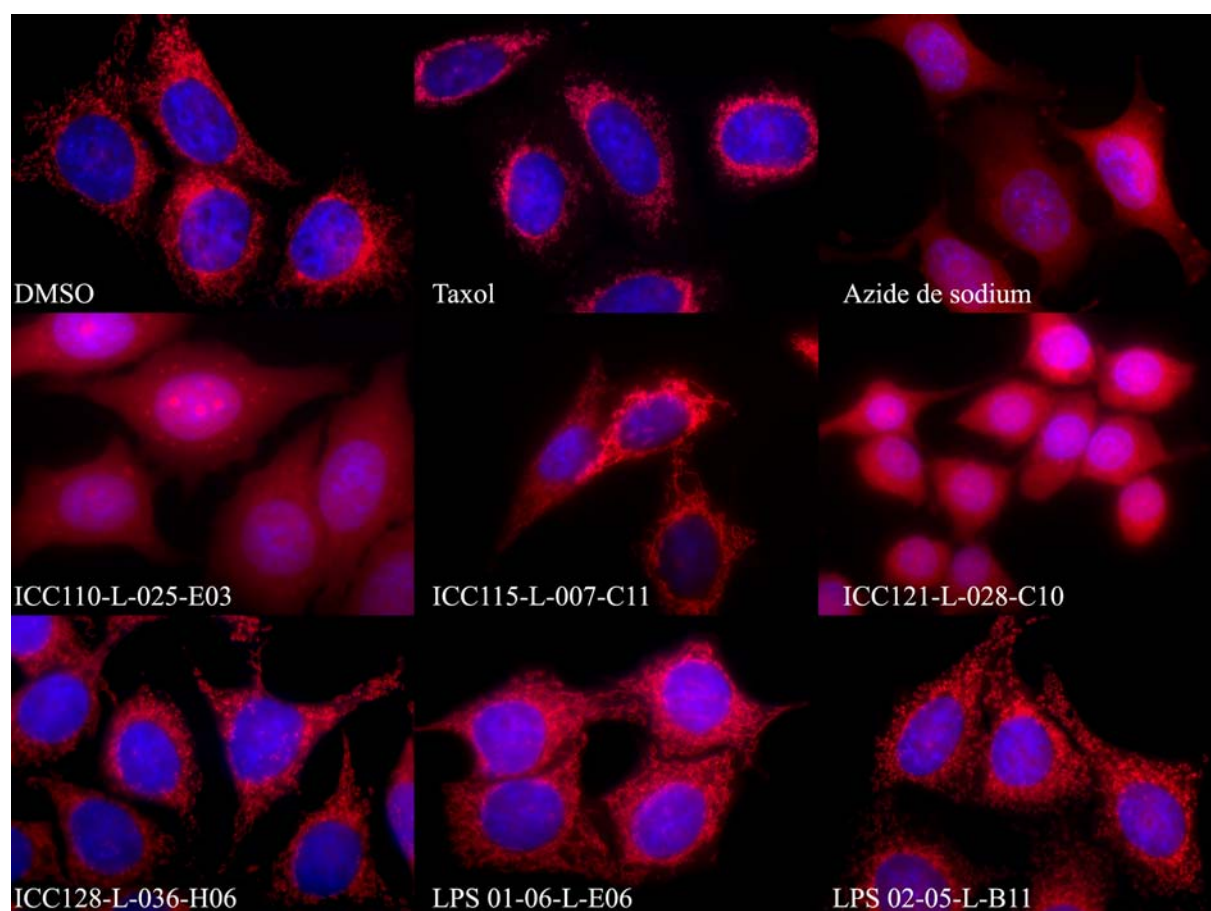


Figure 39 : Effet des molécules sur la localisation et la morphologie des mitochondries

Après 2 heures de traitement à 25 μ M, les molécules ICC110-L-025-E03- et ICC121-L-028-C10- ont induit un phénotype type « azide de sodium » (figure 39).

Il est intéressant de remarquer que le taxol® provoque une délocalisation des mitochondries dans l'espace périnucléaire et que ce phénomène n'est pas observé avec les différentes molécules testées.

VII.1.4.3 Détermination de l'EC50

Dans le but d'évaluer la bio-activité des molécules *in vivo* et de comparer leurs activités, nous avons cherché à déterminer l'EC50 de ces molécules (concentration effective à 50% de l'effet total). Nous avons ainsi réalisé des courbes dose-effet qui permettent de mesurer la variation du signal tubuline TYR ou tubuline GLU dans les cellules en fonction de la

concentration des molécules. Il est ensuite possible de définir, à l'aide de ces courbes, la concentration de molécule bio-active qui produit une activité correspondant à 50% de l'effet total recherché.

Nous avons réalisé des courbes dose effet mesurant la variation de la quantité de tubuline Glu pour les 6 molécules. Pour cela, des cellules HeLa ont été incubées 2 heures avec différentes concentrations de molécules, puis traitées selon le protocole d'immunofluorescence en microplaques. L'intensité de fluorescence a ensuite été mesurée à l'aide du lecteur de microplaques.

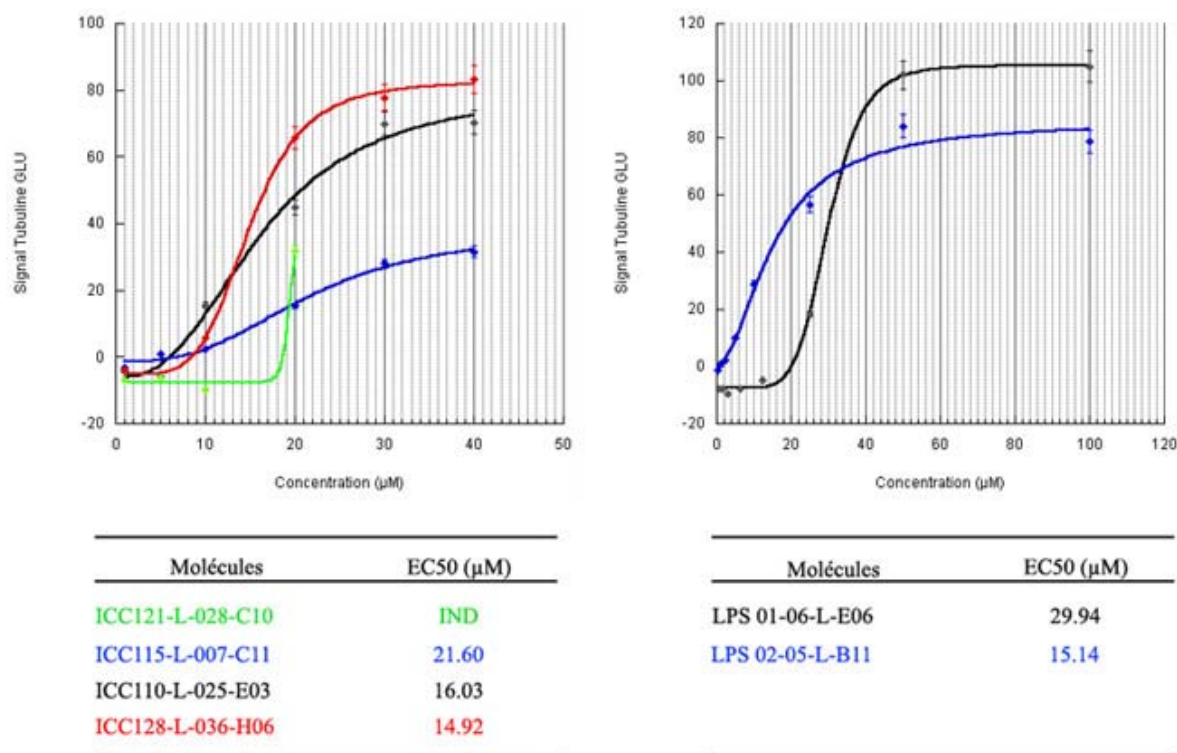


Figure 40 Coubes dose-effet

Le pourcentage du signal mesuré représente sa distance relative au contrôle de bio-activité (taxol®) et au contrôle de bio-inactivité (DMSO). L'EC50 a été déterminée à l'aide du logiciel KaleidaGraph® 3.60.

Les molécules ICC128-L-036-H06, ICC110-L-025-E03, LPS 01-06-L-E06 et LPS 02-05-L-B11 sont capables, aux concentrations les plus élevées, de provoquer une élévation du signal GLU proche de celle du taxol®. Toutefois, dans nos conditions expérimentales, l'EC50 du taxol® est d'environ 0,1µM, soit 100 fois plus faible. La molécule ICC115-L-007-C11 ne provoque qu'une augmentation faible du signal GLU (environ 30% du signal maximum

obtenu pour le taxol®), même pour des concentrations élevées. Au-delà de 20 μM , l'activité de la molécule ICC121-L-028-C10- est telle que les cellules se décollent. Par conséquent nous n'avons pas pu déterminer son EC50.

L'EC50 des molécules sélectionnées pour leur effet dépolymérisant n'a été déterminée que pour les drogues pour lesquelles une dépolymérisation totale des microtubules a été observée en immunofluorescence sur lamelles, après 2 heures d'incubation à une concentration de 25 μM (soit 13 molécules). Ces expériences ont été réalisées par Marjorie Mollaret en stage de master professionnel.

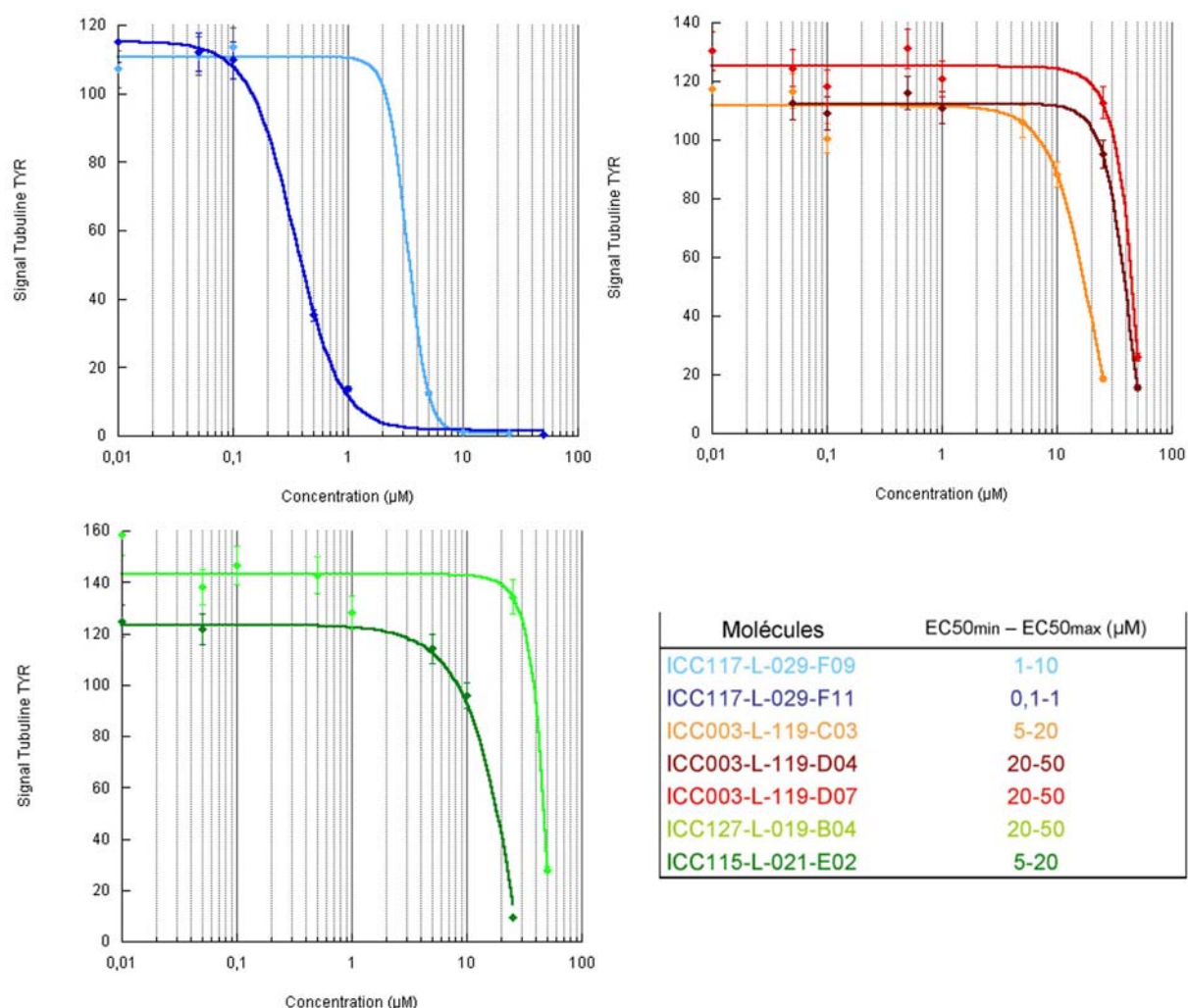


Figure 41 : Courbes dose-effet

Le pourcentage du signal mesuré représente sa distance relative au contrôle de bio-activité (colchicine) et au contrôle de bio-inactivité (DMSO). L'EC50 a été évaluée graphiquement.

La fenêtre de concentrations pour lesquelles la courbe s'infléchit est étroite. Une détermination précise de l'EC50 impliquerait donc d'augmenter le nombre de mesures à l'intérieur de cette fenêtre. Pour une première estimation, nous avons choisi de présenter ces résultats sous forme d'une « fourchette » EC50_{min}-EC50_{max}. Seules les valeurs d'EC50_{min}-EC50_{max} de 7 molécules sur 13 sont présentées ; en effet, nous avons rencontré des difficultés de reproductibilité des tests pour une partie des molécules. Ainsi pour l'instant, aucun résultat concluant n'a pu être obtenu pour les autres molécules, toutes les valeurs présentant une trop grande variabilité entre elles.

La molécule ICC117-L-029-F11 présente une activité remarquable, elle possède une EC50 et un profil d'effet dose-dépendant fortement similaire à celui de la colchicine.

VII.1.5 Sélection des molécules les plus spécifiques

VII.1.5.1 Molécules stabilisant les microtubules

La molécule LPS-02-05-L-B11 n'a pas été retenue pour la suite de nos études. En effet, les quantités de molécules nécessaires pour nos études nous ont amenés à demander cette molécule auprès des chimistes à plusieurs reprises. Nous avons donc eu en notre possession 3 lots de molécules. Il s'est avéré que le 3^{ème} lot de molécule n'engendrait plus la formation de tubuline GLU dans les cellules. Malgré de nombreux échanges avec les chimistes pour essayer de trouver la cause de ce changement d'activité, nous n'avons pas réussi à résoudre ce problème.

Nous n'avons pas retenu la molécule ICC121-L-028-C10- car, bien que très intéressante, l'importante activité cytotoxique de la molécule limite l'étude approfondie de son mode d'action.

Concernant la molécule ICC110-L-025-E03, les différentes expériences peuvent laisser penser que cette molécule a un effet plus général sur la cellule (perturbation importante du réseau d'actine et des mitochondries) et que la génération de tubuline GLU dans la cellule résulte de cet effet plus général comparable à celui observé avec l'azide de sodium.

Enfin, la molécule LPS-01-06-L-E06 ne possède que très peu d'analogues structuraux dans la chimiothèque empêchant, de ce fait, des études structure-activité approfondies.

Aux vues de ces résultats, nous avons préféré concentrer nos efforts sur la détermination du mécanisme d'action de la molécule ICC128-L-036-H06.

VII.1.5.2 Molécules dépolymérisant les microtubules

Après concertations avec les différentes équipes de chimistes concernées, nous avons décidé de n'étudier que des molécules originales:

- soit du point de vue de leur structure (pour brevet ou publication) ;
- soit du point de vue de leur mode d'action (indirect sur tubuline). La molécule représente alors un outil de recherche pour identifier de nouvelles cibles et de nouveaux agents régulateurs.

4 molécules ont été retenues non seulement parce qu'elles répondent à ces critères mais aussi parce qu'elles ont des propriétés chimiques et biologiques intéressantes.

Ainsi, les purines substituées (ou 7-déazapurines) ICC115-L-021-E02 et ICC127-L-029-B04 présentent un réel intérêt du fait de la présence de nombreux analogues dans la chimiothèque dont elles sont issues (UMR 176 CNRS/IC).

Les deux autres molécules ICC117-L-029-F11 et ICC117-L-029-F09 appartiennent à la famille des azaindoles. Un brevet décrit l'utilisation des dérivés 2-acyl-indoles comme agents anti-tumoraux. Ces molécules possèdent une action antiméiotique et entraînent une inhibition directe et/ou indirecte de la polymérisation de la tubuline pour le traitement de maladies tumorales dans des cellules de mammifères. ICC117-L-029-F11 et ICC117-L-029-F09 ne figurent pas dans les revendications de ce brevet, aussi nous avons jugé qu'il est utile de poursuivre l'analyse du mode d'action de ces molécules.

VII.2 Criblage de la chimiothèque commerciale

VII.2.1 Criblage primaire

Les 16.479 molécules issues de la chimiothèque ChemBridge DiverSet™, ont été criblées à une concentration moyenne de 50µM. Nous avons pu réaliser le criblage à une concentration plus élevée que celle utilisée pour le criblage précédent, tout en respectant les contraintes dues au DMSO, car les molécules de cette chimiothèque sont deux fois plus concentrées. Cette concentration devrait permettre, théoriquement de majorer le nombre de touches. Toutefois, nous sommes bien conscients que cette forte concentration en molécule peut entraîner des réponses moins spécifiques par rapport à la cible d'intérêt.

Tout comme pour le criblage des molécules des chimiothèques académiques, nous avons considéré que les molécules avaient un effet potentiellement dépolymérisant sur les microtubules lorsque le pourcentage du contenu en tubuline TYR dans la cellule est inférieur ou égal à 50% et que le pourcentage de signal Hoechst est supérieur ou égal à 90%.

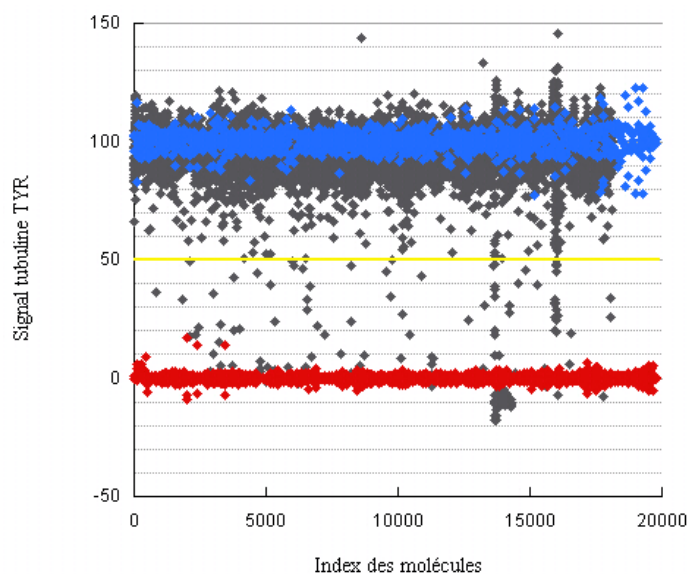


Figure 42 : Représentation du pourcentage de tubuline TYR dans les cellules

Les points rouges (♦) représentent les contrôles bio-actifs (colchicine) et les points bleus (♦), les contrôles bio-inactifs (DMSO). Les points gris (♦) représentent les valeurs obtenues pour les molécules, et la barre (—) indique le seuil fixé.

Nous avons donc sélectionné 66 molécules pour réaliser le criblage secondaire ce qui représente 0,4% de la chimiothèque.

Concernant le criblage d'agents stabilisant les microtubules, la proportion de molécules générant un pourcentage de tubuline GLU supérieur à 20% est plus importante que pour le criblage des chimiothèques académiques. Aussi, pour tenter d'être plus sélectifs, nous avons décidé de ne retenir que les molécules générant un pourcentage de tubuline GLU supérieur ou égal à 30%.

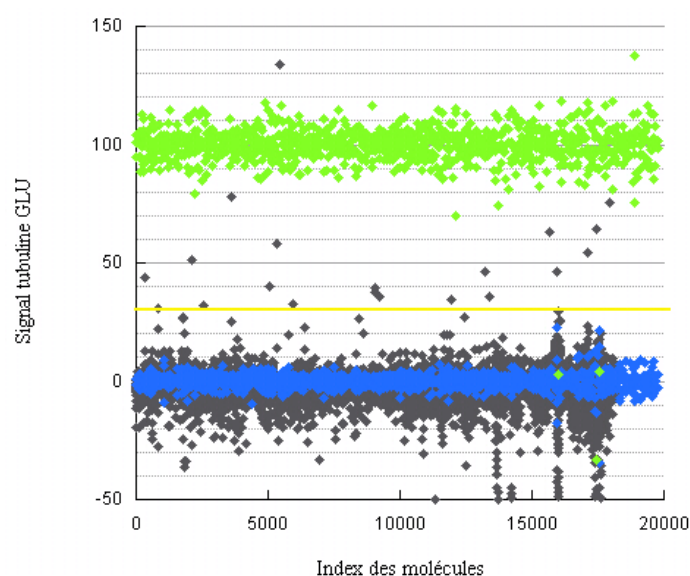


Figure 43 : Représentation du pourcentage de tubuline GLU dans les cellules

Les points verts (◆) représentent les contrôles bio-actifs (taxol®), les points bleus (◆), les contrôles bio-inactifs (DMSO) et les points gris (◆), les valeurs obtenues pour les molécules. La barre (—) indique le seuil fixé (30%).

20 molécules ont alors été sélectionnées, cela correspond à 0.2% des molécules de la chimiothèque.

VII.2.2 Criblage secondaire

Suite à des problèmes de planning et d'occupation de la plate-forme, le criblage secondaire n'a pas pu se faire dans la continuité du criblage primaire.

Pour gagner du temps, les 20 molécules sélectionnées pour leur activité « stabilisatrice » ont été recommandées sous forme de poudre à la société ChemBridge. L'effet de ces molécules sur le réseau microtubulaire a été analysé manuellement par immunofluorescence sur lamelles et en microplaques dans les mêmes conditions que le criblage primaire. 9 molécules ont vu leur activité reconfirmée.

Par la suite, le criblage secondaire a pu être réalisé sur la plate-forme robotique mais il s'est avéré que sur les 9 hits confirmés auparavant, seule 1 molécule a généré un pourcentage de tubuline GLU supérieur à 30%.

Suite à ces discordances dans les résultats et compte tenu des délais inhérents à un stage de doctorat, l'analyse des hits de ce criblage a été différée. Des variations dans les méthodes de stockage et de traitement des microplaques utilisées pour le criblage primaire et le criblage secondaire pourraient être à l'origine des discordances observées. Des expériences méthodologiques complémentaires, visant à comprendre l'origine de ces discordances ont été réalisées au CMBA et sont en cours d'analyse.

Chapitre VIII : Analyses approfondies des molécules sélectionnées

VIII.1 Analyses communes aux 2 types d'activités (stabilisante et dépolymérisante)

VIII.1.1 Etude Structure/Activité

Les études structure/activité (SAR) ont pour but de déterminer les éléments structuraux nécessaire à l'activité d'une molécule. Pour cela, nous avons recherché, en collaboration avec les chimistes, les analogues structuraux des hits sélectionnés parmi les molécules chimiques déjà criblées et parmi les molécules chimiques disponibles commercialement.

VIII.1.1.1 Série pyridocarbazole

Concernant la molécule ICC 128-L-036-H06, nous avons sélectionné 7 analogues structuraux au sein de la chimiothèque nationale, considérés comme bio-inactifs lors du criblage primaire, car leur activité se situait en dessous du seuil de 20% fixé. Pour conduire ces études des relations structure/activité, les chimistes nous ont fourni un nouveau lot de molécules, sous forme de poudre. Nous avons ainsi évalué leurs effets à 25µM une seconde fois à l'aide du test en microplaque. La majeure partie des analogues structuraux testés ne montre pas d'activité détectable sur la génération de tubuline GLU. Seule une molécule considérée jusqu'alors comme inactive, provoque, à notre grande surprise, une production de tubuline GLU aussi forte voire plus, que la molécule d'origine ICC 128-L-036-H06.

Ce résultat nous a amené par la suite à n'utiliser que des molécules récemment fournies sous forme de poudre pour effectuer l'intégralité des études structure/activité.

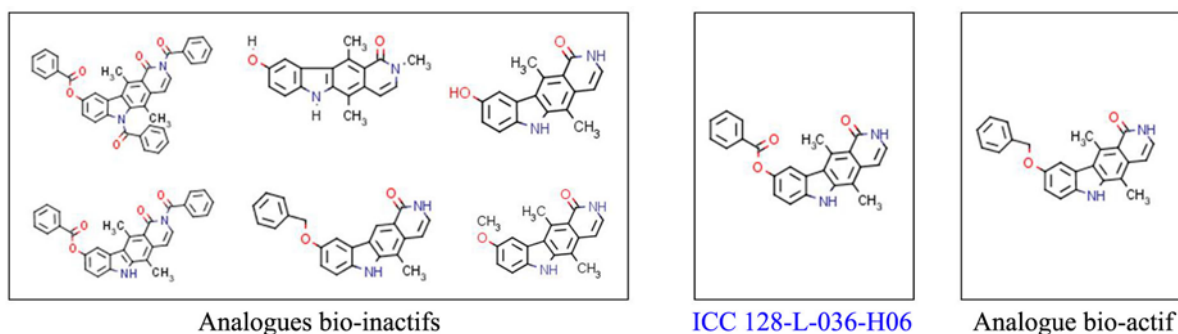


Figure 44 : Famille des pyridocarbazoles : au centre la molécule « touche » issue du criblage.
Les analogues structuraux n'ayant pas montré d'activité figurent dans l'encadré de gauche. A droite, l'analogue structural actif (nommé ICC127-M-202-H03)

L'analyse comparée de ces résultats, a permis de déterminer le rôle essentiel de plusieurs fonctions chimiques pour la génération de tubuline GLU.

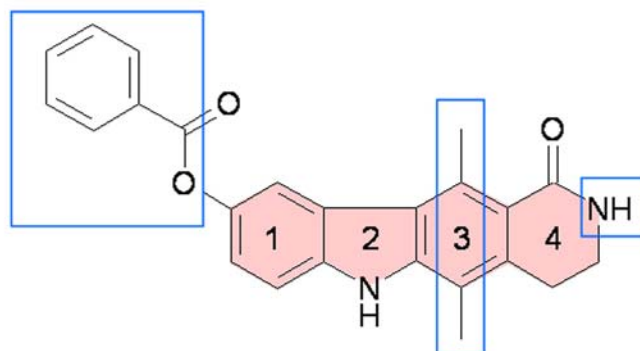


Figure 45 : Structure du composé ICC128-L-036-H06

La partie en rose représente l'élément de base essentiel. Les groupements encadrés en bleu sont indispensables à l'activité de la molécule sur les microtubules.

Le groupement benzyl éther sur le premier cycle, les 2 groupements méthyl sur le troisième cycle et l'amine secondaire sur le quatrième cycle sont indispensables à l'activité de la molécule. Par ailleurs, la perte de la fonction cétone sur le groupement benzyl éther n'entraîne pas de changement d'activité.

La recherche d'analogues structuraux dans les chimiothèques commerciales et la littérature nous ont conduit à l'identification de l'ellipticine, puissant cytotoxique inhibant l'activité de la topoisomérase II (Liu *et al.* 1989) et possédant des propriétés antitumorales dans certains cancers (Mathe *et al.* 1970). Nous avons testé l'activité de l'ellipticine sur le

réseau microtubulaire. Celle-ci ne semble ni avoir d'effet sur la tubuline GLU, ni sur la tubuline TYR. Ce résultat tend à conforter les données issues de notre étude structure/activité.

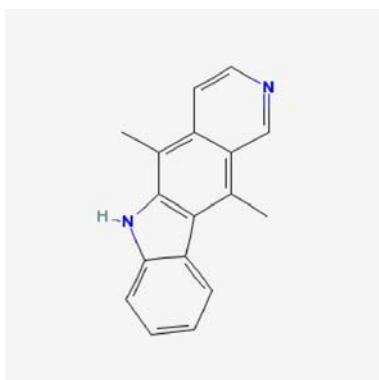


Figure 46 : Structure de l'ellipticine

VIII.1.1.2 Série azaindole

Avant de procéder à l'étude structure/activité de la série azaindole, il a été décidé de sélectionner les analogues structuraux les plus pertinents des molécules ICC 117-L-029-F11 et ICC 117-L-029-F09. 8 molécules ont ainsi été choisies, à nouveau fournies sous forme de poudre et ont été testées manuellement à 50µM à l'aide du protocole d'immunofluorescence des microtubules en microplaque.

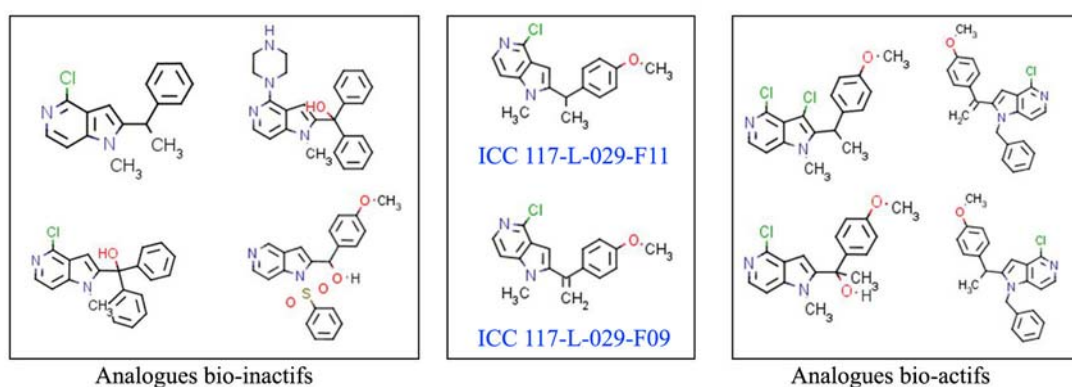


Figure 47 : Famille des azaindoles : au centre les molécules « touches » issues du criblage.
Les analogues structuraux n'ayant pas montré d'activité figurent dans l'encadré de gauche. A droite, les analogues structuraux actifs

Ces analyses ont permis l'identification de 2 fonctions chimiques indispensables à l'activité dépolymérisante des molécules : il s'agit du chlore situé sur le groupement pyrrolo-pyridine et du groupement méthoxy situé sur le benzène.

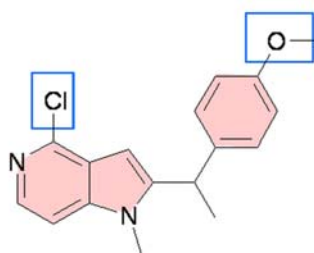


Figure 48 : Structure du composé ICC117-L-029-F11

La partie en rose représente l'élément de base essentiel. Les groupements encadrés en bleu sont indispensables à l'activité de la molécule sur les microtubules.

VIII.1.1.3 Série déazapurine

Tout comme pour la série azaindole, les chimistes nous ont fait parvenir les analogues structuraux qu'ils jugeaient les plus adéquats pour nos études. 36 molécules ont ainsi été analysées à 50µM à l'aide du test d'immunofluorescence des microtubules en microplaque.

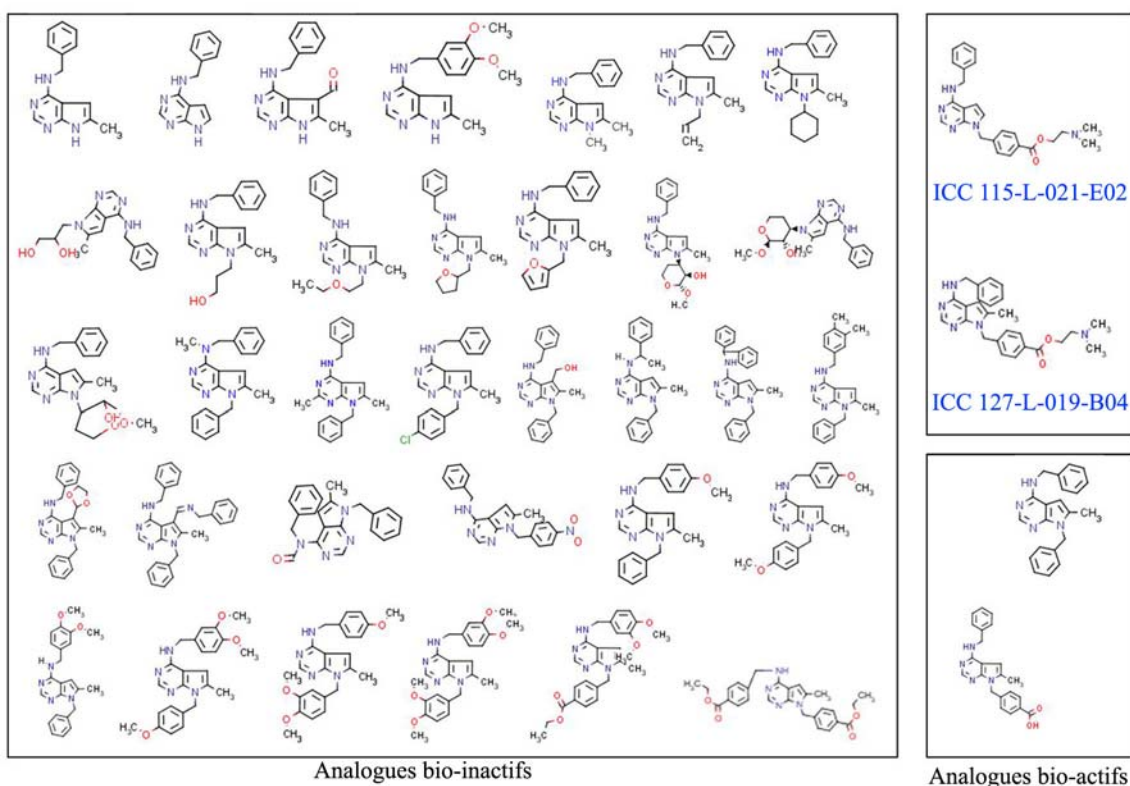


Figure 49 : Famille des deazapurines : au centre les molécules « touches » issue du criblage.
Les analogues structuraux n'ayant pas montré d'activité figurent dans l'encadré de gauche. A droite, les analogues structuraux actifs

Il ressort de l'étude comparée de l'activité de ces différents analogues structuraux que le noyau purine, le groupement benzylamine et le benzène sont nécessaires à l'activité dépolymérisante. Nous avons également remarqué que la substitution du groupement benzylamine entraînait une perte d'activité.

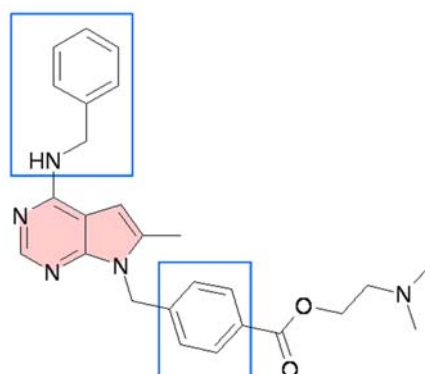


Figure 50 : Structure du composé ICC127-L-029-B04

La partie en rose représente l'élément de base essentiel. Les groupements encadrés en bleu sont indispensables à l'activité de la molécule sur les microtubules

VIII.1.2 Etude du type d'interaction avec la tubuline (directe/indirecte)

Pour savoir si les molécules exercent leur effet par une action directe sur la tubuline ou par l'intermédiaire d'un effecteur, nous avons analysé l'effet des molécules sur l'assemblage *in vitro* de la tubuline en microtubules

VIII.1.2.1 Série pyridocarbazole

L'analyse structurale des composés actifs ne montre pas de motifs communs avec les composés connus pour interagir directement avec la tubuline, notamment le taxol®, les épothilones et le discodermolide.

Le taxol® est capable d'induire l'assemblage des microtubules à partir d'une faible concentration en tubuline car il a la propriété d'abaisser la concentration critique d'assemblage c'est à dire la concentration minimale en tubuline nécessaire pour induire un assemblage. Pour savoir si le composé ICC128-L-036-H06 présente un mode d'action semblable, nous avons testé s'il était capable de promouvoir l'assemblage des microtubules *in vitro*. Pour cela nous avons adapté une méthode décrite par Barron (Barron *et al.* 2003) basée

sur la fluorescence, plus sensible et moins consommatrice, pour détecter l'assemblage des microtubules.

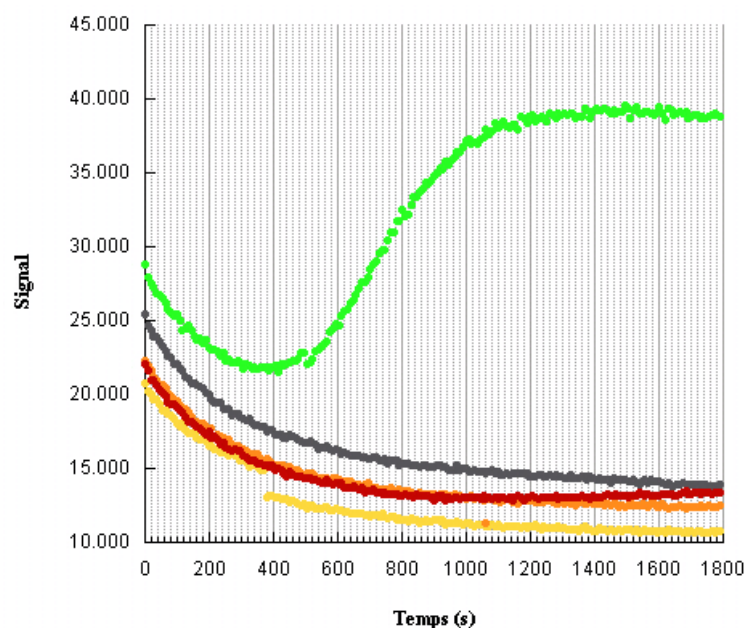


Figure 51 : Assemblage de la PCtubuline *in vitro*

De la tubuline purifiée (1mg/ml) est incubée dans du tampon PEM en présence de GTP (1mM), de $MgCl_2$ (5mM), de DAPI (10µM) à 37°C. L'effet du composé ICC128-L-036-H06 à différentes concentrations (● 25µM, ● 50µM et ● 100µM) est comparé à celui du taxol® (●) à 5µM et du DMSO (●) à 0,5%.

Dès 5µM, le taxol® arrive à induire l'assemblage de la tubuline dans ces conditions (figure 51). A l'inverse même à de fortes concentrations, le composé ICC128-L-036-H06 engendre un profil d'assemblage similaire à celui induit par le DMSO, qui est notre contrôle négatif. Cette expérience nous indique que le mécanisme d'action du composé ICC128-L-036-H06 diffère de celui du taxol®. Toutefois, elle ne permet de conclure quant à l'interaction du composé ICC128-L-036-H06 avec la tubuline.

Nous avons étudié, dans un deuxième temps, si la présence du composé ICC128-L-036-H06 avait un impact sur la vitesse d'assemblage de la tubuline 1X. Pour cela, nous avons recherché les conditions d'assemblage optimales. Dans ce but, nous avons déterminé la concentration critique d'assemblage dans nos conditions expérimentales. Afin de favoriser cet assemblage, nous avons choisi une concentration en tubuline légèrement supérieure à la concentration critique soit 3mg/ml final.

Les expériences d'assemblage ont été réalisées en mesurant la variation de l'absorbance au cours du temps.

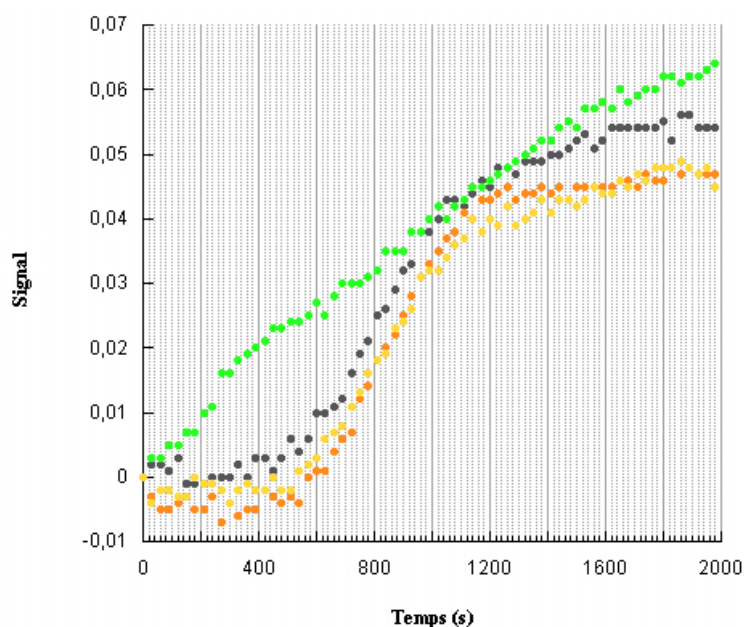


Figure 52 : Assemblage de la tubuline 1X in vitro

De la tubuline 1X (3mg/ml) est incubée dans du tampon MEM en présence de GTP (1mM) et de $MgCl_2$ (5mM) à 37°C. L'effet de ICC128-L-036-H06 à différentes concentrations (● 25µM et ● 50µM) est comparé à celui du taxol® (●) à 5µM et du DMSO (●) à 0,5%.

Si l'on se base sur la courbe d'assemblage de la tubuline 1X en présence de DMSO, le taxol® induit bien un assemblage plus rapide, ce qui n'est pas le cas de du composé ICC 128-L-036-H06 (figure 52).

Nous avons enfin analysé si le composé ICC128-L-036-H06 pouvait avoir un effet additionnel à celui du taxol®. Pour cela, nous avons réalisé une série d'assemblages de tubuline 1X dans différentes conditions.

Dans l'expérience illustrée ci-dessous (figure 53), nous avons incubé la tubuline 1X soit avec une solution équimolaire du composé ICC 128-L-036-H06 et de taxol® (50µM final), soit avec une solution de taxol® seul (50µM), soit avec une solution de DMSO (0,5%).

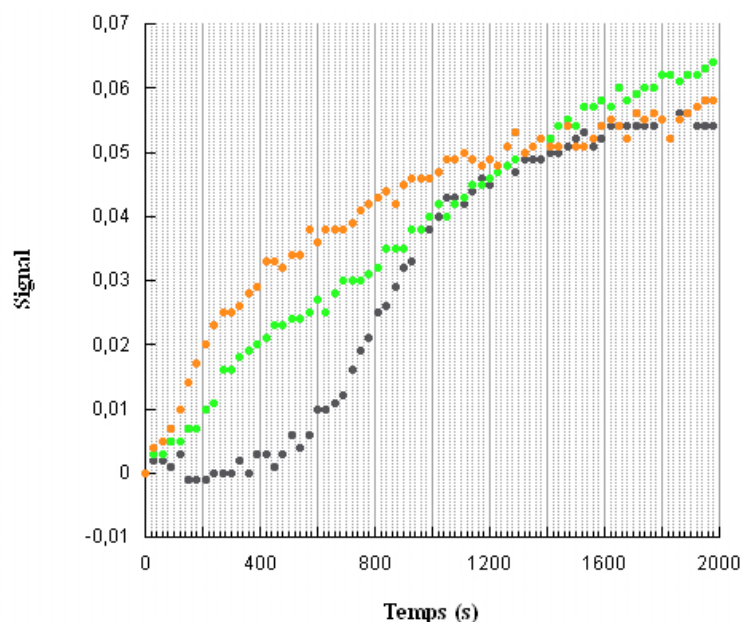


Figure 53 : Etude de l'effet additionnel de ICC128-L-036-H06 sur l'assemblage de tubuline 1X *in vitro*
 De la tubuline 1X (3mg/ml) est incubée dans du tampon MEM en présence de GTP (1mM) et de $MgCl_2$ (5mM) à 37°C. L'effet du composé ICC128-L-036-H06 (50 μ M) additionné à du taxol® (50 μ M) (●) est comparé à celui du taxol® seul (●) (50 μ M) et du DMSO (●) (0,5%).

En présence d'ICC128-L-036-H06 et de taxol®, la courbe d'assemblage s'infléchit plus rapidement qu'en présence de taxol® seul.

Nous avons également conduit des expériences avec des concentrations très faibles en taxol® de façon à ce qu'il n'ait pas d'effet sur la vitesse d'assemblage de la tubuline 1X. Nous avons regardé si l'ajout du composé ICC 128-L-036-H06 à ces faibles concentrations de taxol® engendrait un assemblage plus rapide.

Les premiers résultats obtenus ne permettent pas d'établir une conclusion définitive sur l'interaction directe ou pas de ICC 128-L-036-H06 avec la tubuline. Que se soit en absorbance ou en fluorescence, les profils d'assemblage obtenus avec cette molécule ne sont pas reproductibles d'un jour sur l'autre.

VIII.1.2.2 Série azaindole

Afin de déterminer le mécanisme d'action des deux molécules ICC117-L-029-F11 et ICC117-L-029-F09, Marjorie Mollaret a effectué des expériences d'inhibition de

l'assemblage de la tubuline *in vitro*. Ces expériences permettent de spécifier si la tubuline est bien la cible directe de ces molécules ou si la dépolymérisation observée résulte d'une interaction avec un effecteur.

Nous avons analysé l'effet de ces molécules à différentes concentrations sur la tubuline 1X et sur la tubuline purifiée, dépourvue de ces protéines associées (PC tubuline). Quel que soit le mode de lecture utilisé (absorbance ou fluorescence), l'assemblage de la tubuline se traduit par une augmentation du signal en fonction du temps. La présence d'un agent dépolymérisant comme la colchicine se caractérise par des courbes plates.

L'étude de l'inhibition de l'assemblage de la tubuline 1X a été réalisée en fluorescence selon le protocole proposé par Barron. Pour chaque composé, ces expériences ont été réalisées pour 3 concentrations (25, 50 et 100 μ M) de composé, pour une concentration en tubuline 1 X constante (5 mg/ml).

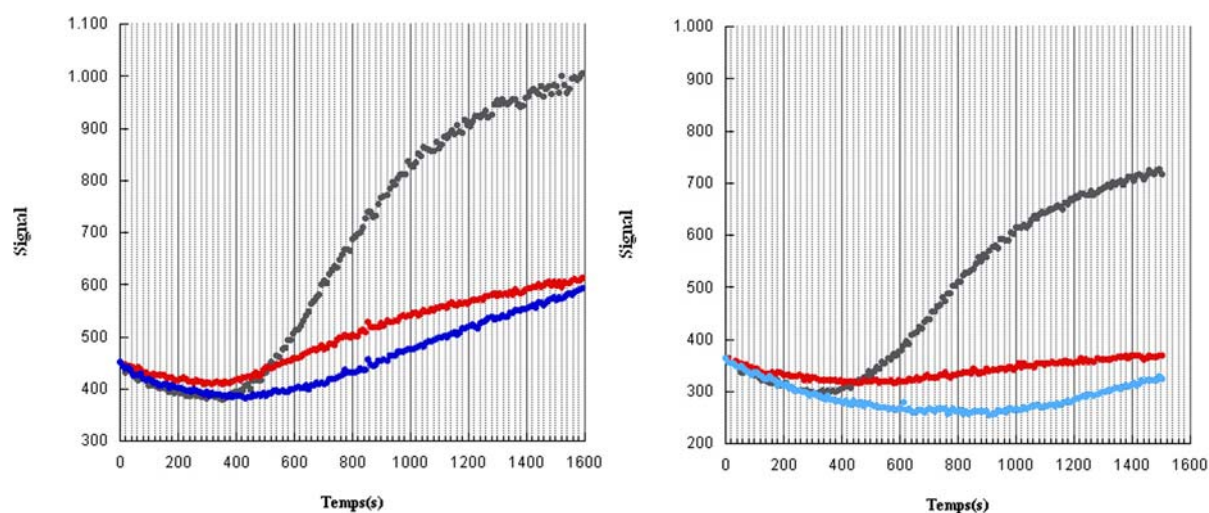


Figure 54 : Inhibition de l'assemblage de la tubuline 1X

De la tubuline 1X (5mg/ml) est incubée dans du tampon MEM en présence de GTP (1mM) et du DAPI (10 μ M) à 37°C. Les effets des composés ICC117-L-029-F11 (●) et ICC117-L-029-F09 (●) à 50 μ M sont comparés à ceux de la colchicine (●) à 2 μ M et du DMSO (●) à 0,5%.

D'après nos analyses, les deux molécules sont capables d'inhiber dès 25 μ M l'assemblage de la tubuline 1X (résultats non montrés). Cette inhibition est totale dès 50 μ M. Ces expériences tendent à prouver que ces molécules interagissent avec la tubuline.

Cependant, il est intéressant de savoir si ces molécules interagissent réellement avec la tubuline elle-même ou avec ses protéines associées (MAPs). Nous avons donc procédé aux

mêmes types d'expériences mais sur de la PC tubuline en mesurant les variations d'absorbance.

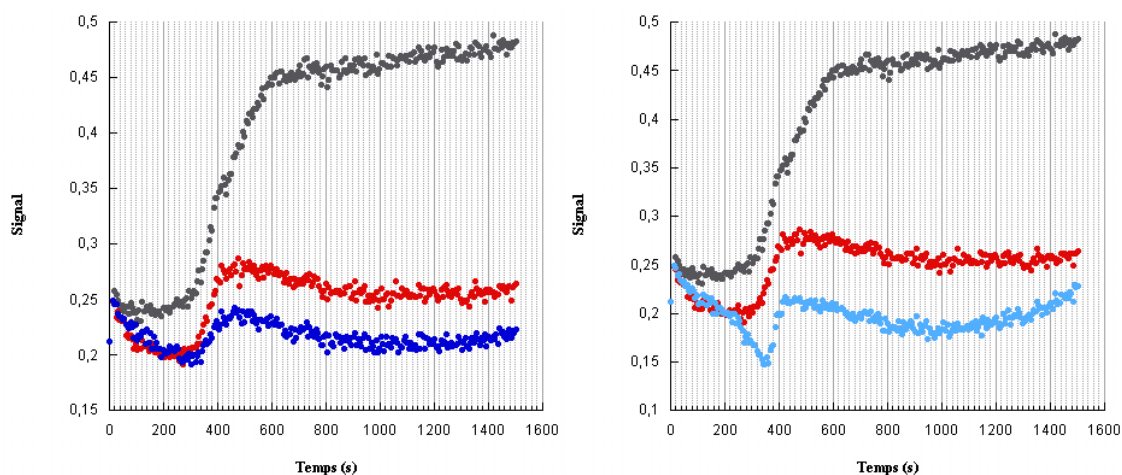


Figure 55 : Inhibition de l'assemblage de la PC tubuline

De la PC tubuline (4mg/ml) est incubée dans du tampon PEM en présence de GTP (1mM) à 37°C. Les effets des composés ICC117-L-029-F11 (●) et ICC117-L-029-F09 (●) à 50μM sont comparés à ceux de la colchicine (●) à 2μM et du DMSO (●) à 0,5%.

L'interaction directe de ces molécules avec la tubuline est confirmée. Ces molécules ont donc un mécanisme d'action comparable à celui d'agents dépolymérisants comme la colchicine.

VIII.1.2.3 Série déazapurine

L'activité des molécules ICC115-L-021-E02 et ICC127-L-029-B04 a également été testée à l'aide du test d'inhibition de l'assemblage de la tubuline en fluorescence. Pour cela, de la tubuline 1X (5 mg/ml) a été incubée avec différentes concentrations de molécules (25, 50 ou 100μM).

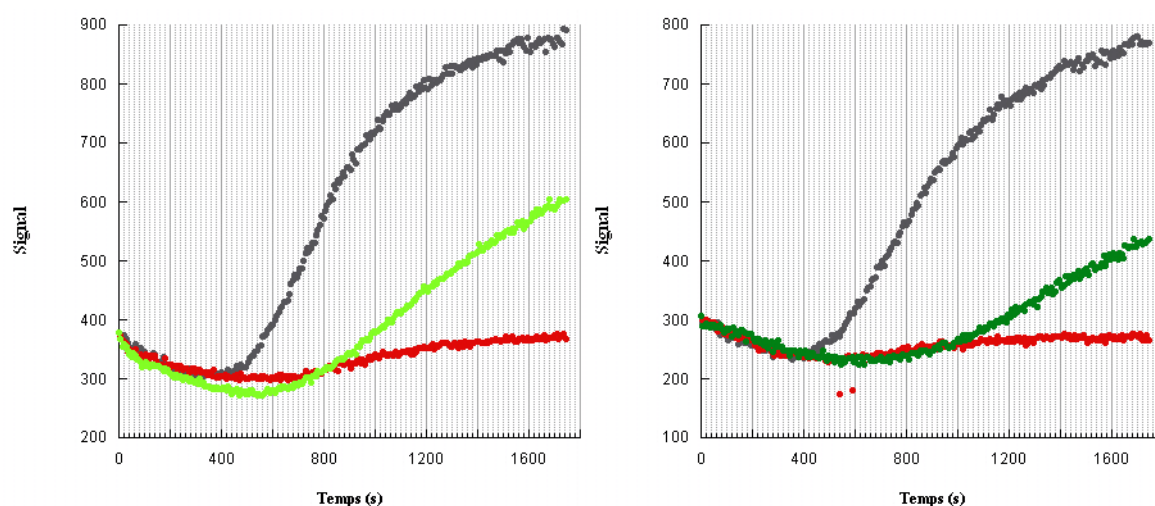


Figure 56 : Inhibition de l'assemblage de la tubuline 1X

De la tubuline 1X (5mg/ml) est incubée dans du tampon MEM en présence de GTP (1mM) et du DAPI (10 μ M) à 37°C. Les effets des composés ICC127-L-029-B04 (●) et ICC115-L-021-E02 (●) à 100 μ M sont comparés à ceux de la colchicine (●) à 2 μ M et du DMSO (●) à 0,5%.

Même à des concentrations élevées (100 μ M), ICC127-L-029-B04 n'inhibe que partiellement la polymérisation de la tubuline. La molécule ICC115-L-021-E02 inhibe presque totalement la polymérisation de la tubuline mais des problèmes de solubilité de la molécule dans le milieu ne nous permettent pas de tester cette molécule à des concentrations supérieures à 100 μ M. Par la suite, seule l'activité de cette molécule a été testée sur l'assemblage de la tubuline purifiée (PC tubuline) *in vitro*

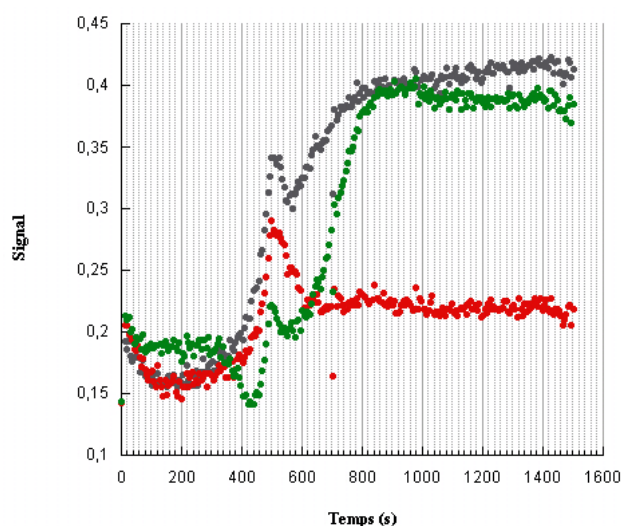


Figure 57: Inhibition de l'assemblage de la PC tubuline

De la PC tubuline (4mg/ml) est incubée dans du tampon PEM en présence de GTP (1mM) à 37°C. Les effets de la molécule ICC115-L-021-E02 (●) à 50 μ M sont comparés à ceux de la colchicine (●) à 2 μ M et du DMSO (●) à 0,5%.

ICC115-L-021-E02 n'empêche pas la polymérisation de la PC tubuline. Ces résultats préliminaires méritent d'être approfondis. En effet soit ce composé interagit avec la tubuline avec une affinité faible, soit il agit de façon indirecte sur la tubuline, vraisemblablement par l'intermédiaire d'une protéine associée aux microtubules, présente dans les préparations de tubuline 1X.

VIII.1.3 Etude de la cytotoxicité vis-à-vis de lignées cancéreuses

Afin d'évaluer l'effet de ces composés sur la croissance de lignées cancéreuses, la viabilité d'un certain nombre de lignées cellulaires transformées, comme les cellules HeLa (adénocarcinome utérin), les 786-O (adénocarcinome de rein), les NCI H460 (carcinome du poumon), les MCF-7 (adénocarcinome du sein) les MES-SA (sarcome utérin) et les MES-SA DX5 (sarcome utérin), en présence des composés actifs a été comparée à leur viabilité en présence de DMSO.

Les MES-SA DX5 sont des lignées cancéreuses multi drogues-résistantes exprimant un niveau élevé de glycoprotéine P. Cette protéine, a été identifiée comme l'une des causes majeures de chimiorésistance des cancers. Elle est codée par un gène appelé *MDR1* (pour multidrug resistance). Sa fonction normale est d'évacuer hors des cellules les substances étrangères et les toxines de notre environnement. Les cellules tumorales comme les MES-SA DX5 sont capables d'utiliser à leur profit ce rôle de détoxification. En produisant beaucoup de glycoprotéine P, elles se débarrassent des médicaments. Les médicaments concernés sont les anthracyclines, les épipodophyllotoxines, les vinca-alcaloïdes, le taxol®, quelques intercalants comme la mitoxantrone et la dactinomycine, certains dérivés de la camptothécine.

La viabilité des cellules a été évaluée à l'aide du test MTT après 48 heures d'exposition avec différentes concentrations de molécules (de 100µM à 0,001µM). Nous avons ainsi obtenu des courbes dose-effet qui ont permis de déterminer la concentration nécessaire pour inhiber 50% de la croissance cellulaire (IC₅₀). Un exemple de courbe de cytotoxicité est illustré ci-dessous (figure 58).

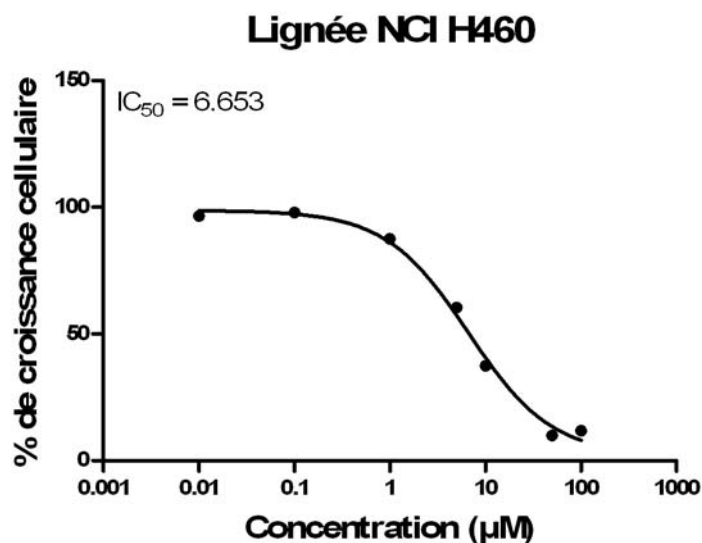


Figure 58 : Cytotoxicité du composé ICC128-L-036-H06 sur les cellules NCI H460

Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de ICC128-L-036-H06 pendant 48H et la viabilité cellulaire a été mesurée à l'aide du test MTT.

VIII.1.3.1 Série pyridocarbazole

Nous avons analysé l'effet des deux analogues bio-actifs (ICC128-L-036-H06 et ICC127-M-202-H03) de la famille des pyridocarbazoles. Les valeurs des IC₅₀ obtenues sont présentées dans le tableau ci-dessous :

	ICC128-L-036-H06	ICC127-M-202-H03
HeLa	1,21 μM	3,05 μM
786-O	55,09 μM	3,34 μM
NCI H460	6,65 μM	1,52 μM
MCF-7	62,20 μM	ND
MES-SA	26,04 μM	33,90 μM
MES-SA DX5	27,41 μM	13,92 μM

Tableau 5 : IC₅₀ des molécules ICC128-036-H06 et ICC127-M-202-H03 sur différentes lignées cancéreuses

La cytotoxicité des molécules est très variable en fonction des lignées cellulaires. La lignée MCF-7 semble être la lignée la plus résistante. Pour cette lignée, l'IC₅₀ de la molécule ICC127-M-202-H03 n'a pas pu être déterminée car la gamme de concentration en molécule était trop basse. En revanche, la lignée multi drogues-résistantes MES-SA DX5 est sensible

aux deux molécules, ce qui est plutôt encourageant. Enfin, la molécule ICC127-M-202-H03 est plus cytotoxique que la molécule ICC128-036-H06 vis à vis des lignées 786-O, NCI H460 et MES-SA DX5.

VIII.1.3.2 Série azaindole

Les valeurs des IC_{50} obtenues pour les deux molécules « têtes de série » sont présentées sur le tableau ci-dessous :

	ICC 117-L-029-F09	ICC 117-L-029-F11
HeLa	0,65 μ M	0,48 μ M
786-O	1,25 μ M	0,39 μ M
NCI H460	1,00 μ M	0,27 μ M
MCF-7	12,67 μ M	1,24 μ M
MES-SA	0,32 μ M	0,87 μ M
MES-SA DX5	0,24 μ M	0,45 μ M

Tableau 6 : IC_{50} des molécules ICC117-L-029-F09 et ICC117-L-029-F11 sur différentes lignées cancéreuses.

Lorsqu'on expose les cellules résistantes MES-SA DX5 aux molécules de la série azaindole, on observe une inhibition dose-dépendante de la prolifération cellulaire avec une IC_{50} de 0,24 μ M pour le composé ICC117-L-029-F09 et une IC_{50} de 0,45 μ M pour le composé ICC117-L-029-F11.

Ces deux molécules ont des effets similaires sur les autres types de lignées cancéreuses avec des IC_{50} de l'ordre du μ M à l'exception de la molécule ICC117-L-029-F09 qui présente une IC_{50} de l'ordre de la dizaine de μ M sur la lignée MCF-7.

VIII.1.3.3 Série déazapurine

Les valeurs des IC₅₀ obtenues pour les deux molécules « têtes de série » sont présentées sur le tableau ci-dessous :

	ICC 127-L-019-B04	ICC 115-L-021-E02
HeLa	3,54 μ M	1,76 μ M
786-O	4,69 μ M	20,35 μ M
NCI H460	5,05 μ M	3,85 μ M
MCF-7	30,90 μ M	ND
MES-SA	5,02 μ M	75,14 μ M
MES-SA DX5	8,10 μ M	résistante

Tableau 7 : IC₅₀ des molécules ICC127-L-019-B04 et ICC115-L-021-E02 sur différentes lignées cancéreuses.

Comme pour la série des pyridocarbazoles, les résultats varient en fonction des lignées cellulaires. La molécule ICC127-L-019-B04 semble plus cytotoxique que la molécule ICC115-L-021-E02 sur la plupart des lignées, avec une IC₅₀ de l'ordre du μ M, excepté pour la lignée MCF-7 pour laquelle on mesure une IC₅₀ plus élevée (30,9 μ M).

La croissance des MES-SA DX5 n'est pas affectée par la présence de ICC115-L-021-E02 quelle que soit la concentration utilisée. Il est probable que, tout comme la colchicine, cette molécule soit rejetée de la cellule via l'activité excessive de la glycoprotéine P.

VIII.1.4 Etude du cycle cellulaire

La dynamique des microtubules joue un rôle très important dans la division cellulaire. Un changement de cette dynamique peut avoir des conséquences sur la progression du cycle cellulaire. Nous avons donc analysé l'effet sur le cycle cellulaire de cellules HeLa après addition de ces différentes molécules à l'aide de la cytométrie en flux. Cette technique est rapide et simple à mettre en œuvre pour suivre la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle.

VIII.1.4.1 Série pyridocarbazole

Des cellules HeLa, non synchronisées, ont été incubées avec du DMSO (contrôle négatif) ou du taxol® (contrôle positif) ou ICC128-036-H06 (25µM) pendant 16 heures, puis marquées avec de l'iodure de propidium. La répartition des cellules dans les différentes phases du cycle G0/G1, S et G2/M est illustrée dans la figure 59. Cette étude n'a pas pu être conduite sur le composé ICC127-M-202-H03, car nous n'avons à notre disposition qu'une quantité limitée de ce composé.

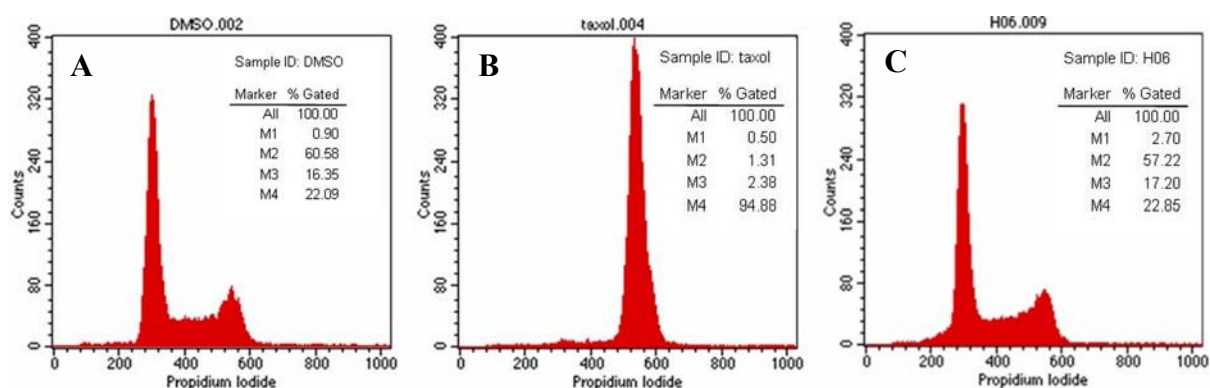


Figure 59 : Effet de la molécule ICC128-036-H06 sur le cycle cellulaire

Des cellules HeLa ont été traitées avec du DMSO (**A**), du taxol® (**B**) ou le composé ICC128-036-H06 (**C**) pendant 16 heures. Le cycle cellulaire est analysé par cytométrie en flux, les valeurs indiquées correspondent aux pourcentages de cellules en phase sub G1 (**M1**), en phase G0/G1 (**M2**) en phase S (**M3**) et en phase G2/M (**M4**)

Après 16 heures d'incubation, le taxol® induit un arrêt très marqué du cycle cellulaire en phase G2/M ; environ 94% des cellules se situent dans cette phase au lieu de 22% dans les conditions contrôles. Le profil obtenu avec ICC128-036-H06 ne montre pas d'arrêt spécifique dans l'une ou l'autre des phases. Toutefois, ce résultat négatif ne permet pas d'exclure totalement une absence d'effet de cette substance sur le cycle cellulaire. Une analyse cinétique plus approfondie, réalisée différents temps après application de la molécule sur des cellules synchronisées pourrait permettre de mettre en évidence des effets plus subtils.

VIII.1.4.2 Série azaindole

De la même façon que pour la série précédente, des cellules HeLa ont été incubées avec du DMSO (contrôle négatif), de la colchicine (contrôle positif) ou les composés ICC117-L-029-F09 ou ICC117-L-029-F11 à 25 μ M pendant 16 heures.

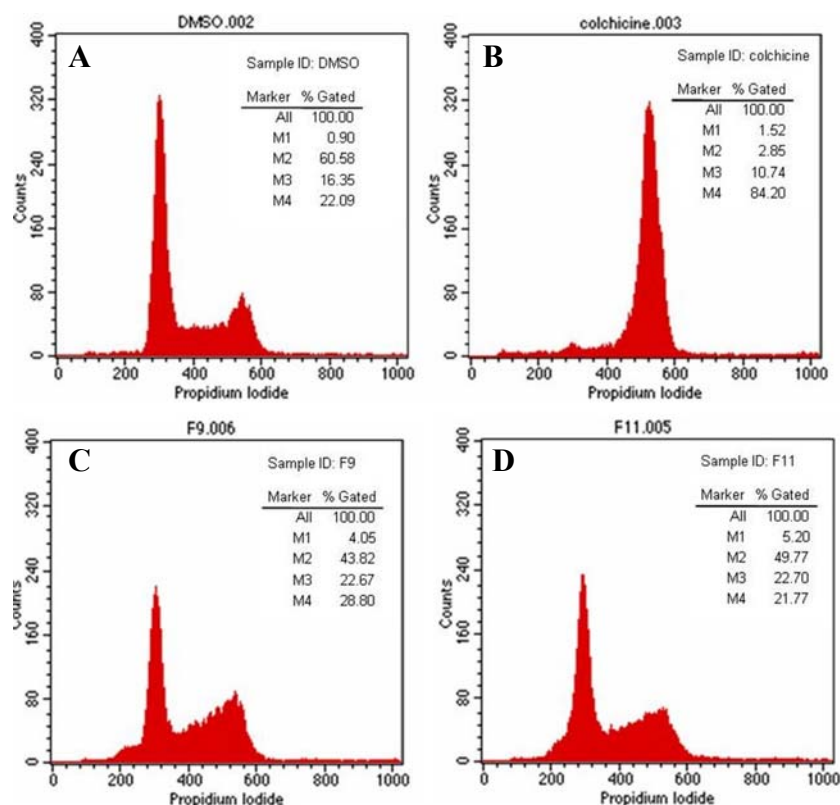


Figure 60 : Effet de ICC117-L-029-F09 et ICC117-L-029-F11 sur le cycle cellulaire

Des cellules HeLa ont été traitées avec du DMSO (**A**), de la colchicine (**B**), les composés ICC117-L-029-F09 (**C**) et ICC117-L-029-F11 (**D**) pendant 16 heures. Le cycle cellulaire est analysé par cytométrie en flux, les valeurs indiquées correspondent aux pourcentages de cellules en phase sub G1 (**M1**), en phase G0/G1 (**M2**) en phase S (**M3**) et en phase G2/M (**M4**)

Lorsque les cellules sont traitées avec les deux molécules ICC117-L-029-F09 et ICC117-L-029-F11, les pourcentages de cellules dans les différentes phases du cycle varient légèrement si on les compare à ceux induits par le DMSO. Ainsi, on observe moins de cellules en phase G0/G1 (~45% au lieu de 60%) et plus de cellules en phase S (22% au lieu de 16%). Une très légère augmentation en phase “sub-G1” est également mise en évidence. L’accumulation des cellules en phase “sub-G1” confirme le caractère cytotoxique de ces molécules. Afin de

confirmer ces observations, il serait judicieux d'augmenter la durée d'exposition des cellules aux molécules.

VIII.1.4.3 Série déazapurine

Nous avons également comparé l'effet des molécules ICC127-L-019-B04 et ICC115-L-021-E02 sur le cycle cellulaire à celui du DMSO et de la colchicine.

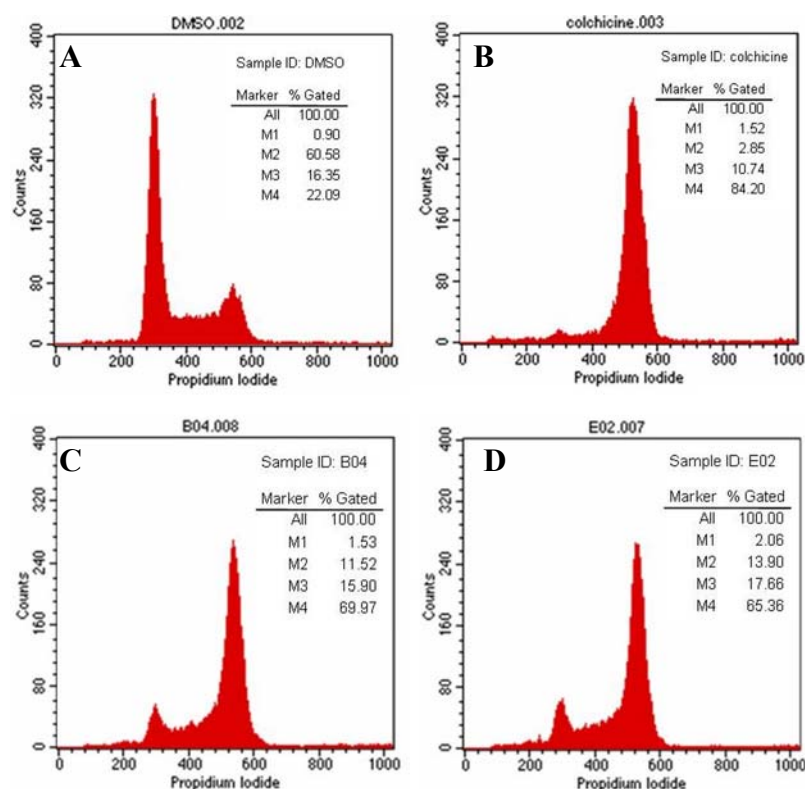


Figure 61 : Effet de ICC 127-L-019-B04 et ICC 115-L-021-E02 sur le cycle cellulaire

Des cellules HeLa ont été traitées avec du DMSO (**A**), de la colchicine (**B**) les composés ICC 127-L-019-B04 (**C**) ou ICC 115-L-021-E02 (**D**) pendant 16 heures. Le cycle cellulaire est analysé par cytométrie en flux, les valeurs indiquées correspondent aux pourcentages de cellules en phase “sub G1” (**M1**), en phase G0/G1 (**M2**) en phase S (**M3**) et en phase G2/M (**M4**).

Lorsque les cellules sont traitées avec du DMSO, la proportion de cellules en phase G0/G1 (~60%) et est plus importante qu'en phase G2/M (~20%). Après 16 heures d'exposition aux molécules ICC127-L-019-B04 et ICC115-L-021-E02, les proportions sont inversées, la majorité des cellules se trouvent en phase G2/M (~65%) et seuls 12% des cellules se situent en phase G0/G1. Les profils obtenus sont fortement similaires au profil obtenu en présence de colchicine. Ces molécules semblent donc induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M.

VIII.1.5 Etude de la réversibilité de l'effet des molécules sur les microtubules

Pour la recherche d'agents anti-cancéreux, il est important de connaître l'index thérapeutique des molécules sélectionnées. Idéalement, elles doivent être suffisamment efficaces pour éliminer les cellules malignes, mais pas trop toxiques pour ne pas engendrer trop d'effets secondaires. Afin de sélectionner des molécules les plus prometteuses, nous avons analysé non seulement la cytotoxicité des composés, mais aussi leur réversibilité potentielle.

De plus, cette étude de réversibilité est utile car, outre leur intérêt en thérapie anticancéreuse, les petites molécules peuvent être des outils puissants pour la recherche. Elles sont en particulier bien adaptées à l'étude de processus dynamiques, se produisant sur une échelle de temps de l'ordre de la seconde ou de la minute. Si leur action est réversible, elles peuvent être ajoutées ou soustraites du milieu afin de perturber la fonction de la protéine d'intérêt de façon contrôlée dans le temps. Couplée à des méthodes telles que la vidéomicroscopie sur cellules vivantes, cette approche peut se révéler riche d'informations.

L'étude de la réversibilité de l'effet des molécules a consisté à comparer l'état du réseau microtubulaire de cellules HeLa incubées 2 heures avec les molécules à tester, à celui de cellules HeLa incubées aussi longtemps avec les molécules, mais ensuite lavées et ré-incubées une nuit dans du milieu, afin d'éliminer les molécules.

VIII.1.5.1 Série azaindole

Dans cette expérience deux agents connus pour dépolymériser les microtubules ont été utilisés comme contrôles : la colchicine et le nocodazole. L'action de la colchicine n'est pas (ou très lentement) réversible car après une nuit de lavage, le réseau est toujours totalement dépolymérisé. Au contraire, l'action du nocodazole est réversible. Les microtubules retrouvent l'aspect caractéristique d'un réseau normal après un lavage d'une nuit.

Les composés ICC117-L-029-F09 et ICC117-L-029-F11 montre une réversibilité de leur effet similaire à ce qui est observé pour le nocodazole; le réseau microtubulaire dépolymérisé retrouve un aspect normal après une nuit de lavage.

VIII.1.5.2 Série déazapurine

La réversibilité des composés de cette série a été analysée de façon identique à la série précédente, en utilisant la colchicine et le nocodazole à titre de contrôles. Au contraire de la famille précédente, la dépolymérisation des microtubules induites par les composés ICC127-L-019-B04 et ICC115-L-021-E02, est toujours observable malgré les 16 heures de lavage. Leur action n'est donc pas (ou peu) réversible.

VIII.2 Analyses complémentaires réalisées sur la série pyridocarbazole

VIII.2.1 Etude de la stabilité des microtubules

Comme décrit ci-dessus, nous n'avons pas pu obtenir de résultats concluants quant à l'activité stabilisatrice des ces composés sur les microtubules formés *in vitro*. Pourtant, ces molécules sont capables de générer des microtubules détyrosinés, d'aspect recourbés, caractéristiques des microtubules peu dynamiques (figure 62). Afin de vérifier si les substances sélectionnées stabilisent bien les microtubules cellulaires et dans le but de tenter de comprendre leurs mécanismes d'action, nous avons analysé la résistance du réseau microtubulaire de cellules traitées au froid ou au nocodazole.

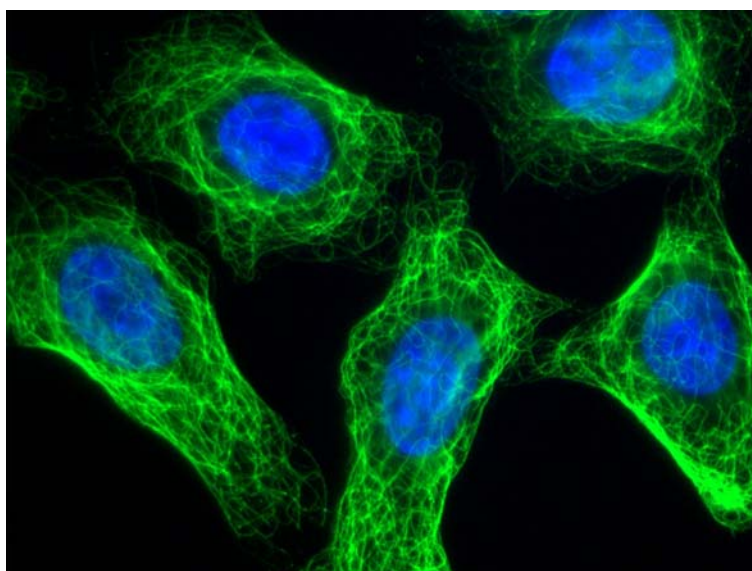


Figure 62 : Effet du composé ICC 128-L-036-H06 sur les microtubules de cellules HeLa

Des cellules HeLa sont incubées avec le composé ICC 128-L-036-H06. Les microtubules détyrosinés sont marqués avec un anticorps anti-tubuline détyrosinée (L4) et les chromosomes (ADN) sont marqués au Hoechst.

VIII.2.1.1 Résistance au froid

Le terme "stabilité" des microtubules recouvre plusieurs de leurs propriétés objectivables expérimentalement. Il est à noter que ces propriétés ne sont pas mutuellement exclusives. Ainsi, on peut trouver dans les cellules, des microtubules très stabilisés, comme par exemple dans les neurones ou les fibroblastes. La protéine responsable de cette grande stabilité a été identifiée au laboratoire: c'est la protéine STOP (Bosc *et al.* 1999). Expérimentalement, des microtubules présentant un tel degré de stabilité, sont capables de résister à la dépolymérisation par le froid. Une substance comme le taxol®, est aussi capable d'induire une telle stabilité des microtubules. Ainsi, les microtubules traités au taxol® sont résistants au froid.

Nous avons adapté un test de résistance des microtubules au froid au format des microplaques. Pour cela, nous avons modifié le test mis au point pour le criblage en introduisant une étape d'incubation de 30 minutes sur de la glace après l'étape de 2 heures d'incubation des cellules avec les molécules. Une résistance des microtubules au froid se caractérise par la présence non seulement de tubuline GLU, mais aussi de tubuline TYR dans toutes les cellules. Plus le signal tubuline TYR est élevé, plus les microtubules sont résistants. Le graphique ci-dessous (figure 63) représente le pourcentage de microtubules stabilisés en fonction de la concentration en composé ICC128-L-036-H06. Ce pourcentage a été calculé par rapport au signal tubuline TYR obtenu dans des cellules traitées au taxol®.

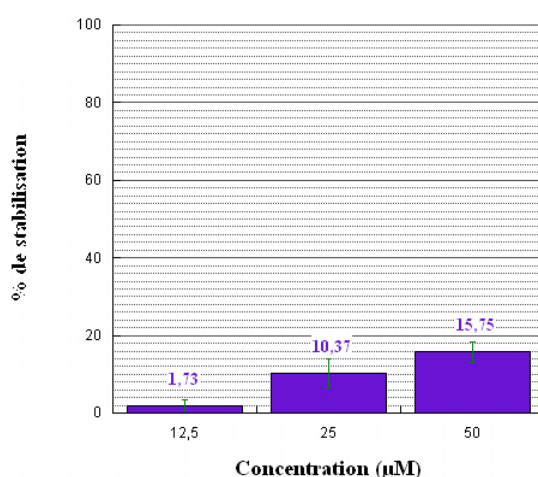


Figure 63 : Effet de ICC 128-L-036-H06 sur la stabilité des microtubules au froid

Les cellules HeLa sont incubées avec du taxol® ou avec le composé ICC 128-L-036-H06 pendant 2 heures puis exposées 30 minutes à 4°C. La quantité de tubuline TYR dans les cellules traitées avec ICC 128-L-036-H06 est mesurée puis rapportée en pourcentage par rapport à la quantité de tubuline TYR mesurée dans les puits contenant les cellules traitées au taxol® (100%).

Cette expérience montre la faible capacité, contrairement au taxol®, du composé ICC128-L-036-H06 à protéger les microtubules d'une dépolymérisation induite par le froid. Ces résultats suggèrent fortement que ce composé présente un mode d'action différent de celui du taxol®.

VIII.2.1.2 Résistance au nocodazole

Par ailleurs, il existe aussi des microtubules avec une dynamique ralentie, présentant de ce fait, une longévité accrue. De tels microtubules sont les substrats d'enzymes de modification telles que la TCP et sont souvent enrichis en tubuline GLU. Cette population de microtubules peut être mise en évidence grâce à sa résistance relative au nocodazole. En effet, à la différence de la colchicine, le nocodazole agit en inactivant les dimères libres de tubuline, conduisant à une augmentation de la concentration critique d'assemblage. On peut, en quelque sorte, comparer son effet à une dilution de la population de tubuline libre capable de s'assembler conduisant à une élévation de la concentration critique d'assemblage (Saoudi *et al.* 1998). Le nocodazole provoque alors une dépolymérisation (figure 64) des microtubules par leur extrémité non ancrée sur le centrosome. Si les microtubules ont une dynamique ralentie, cette dépolymérisation se fera lentement.

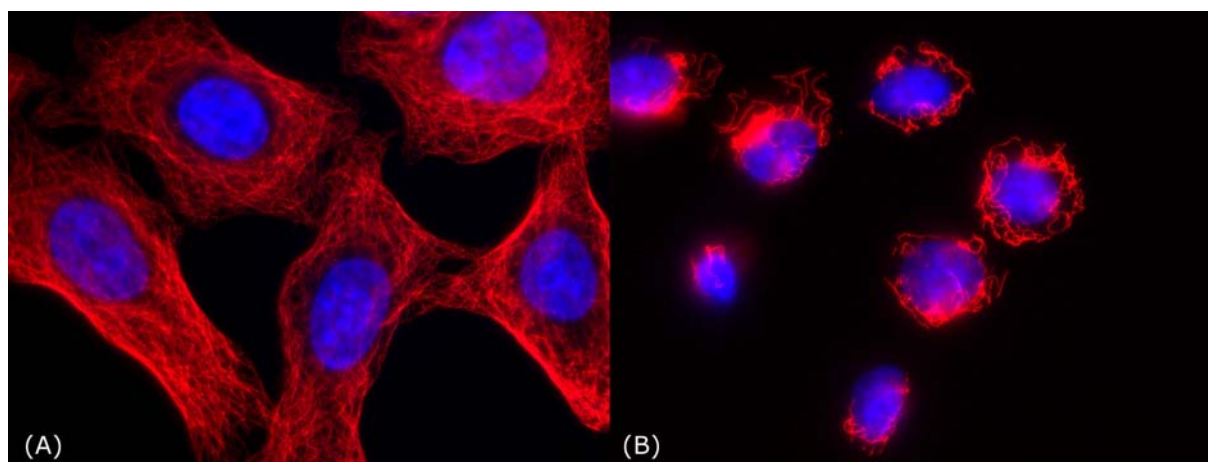


Figure 64 : Effet du nocodazole sur des cellules HeLa

Des cellules HeLa sont incubées (B) ou non (A) avec du nocodazole pendant 30min. Le réseau microtubulaire est marqué avec un anticorps anti-tubuline et les chromosomes (ADN) sont marqués au Hoechst.

Un test de résistance des microtubules au nocodazole en microplaques a été adapté à partir du test de criblage, de façon similaire à celui réalisé pour la mesure de la stabilité au froid. Pour

cela, nous avons introduit une étape d'incubation de 30 minutes avec le nocodazole après l'incubation de 2 heures des cellules avec les molécules. Là encore une résistance des microtubules à une dépolymérisation induite par le nocodazole se traduit par la présence non seulement de tubuline GLU dans un grand nombre de cellules, mais aussi de tubuline TYR dans toutes les cellules. C'est le cas, par exemple, de microtubules traités au taxol® ou à l'azide de sodium.

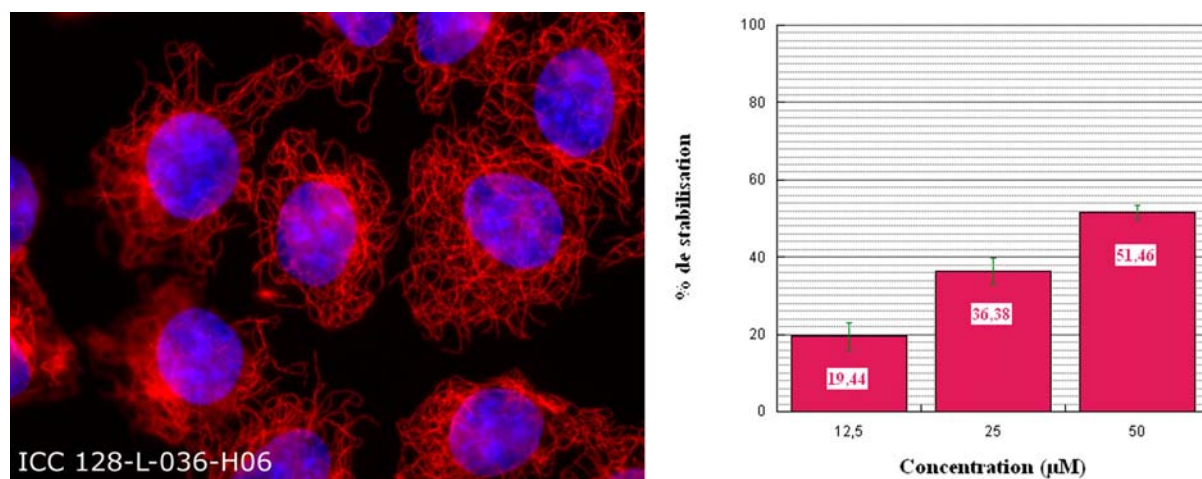


Figure 65 : Effet du nocodazole sur des cellules HeLa traitées avec le composé ICC 128-L-036-H06

Les cellules HeLa sont incubées avec la molécule ICC 128-L-036-H06 pendant 2 heures puis exposées 30 minutes à du nocodazole. La quantité de tubuline TYR dans les cellules traitées avec le composé ICC 128-L-036-H06 est mesurée puis rapportée en pourcentage de la quantité de tubuline TYR mesurée dans les puits contenant les cellules traitées au taxol®.

Les analyses ont révélé que ICC128-L-036-H06 est capable d'induire une certaine résistance des microtubules au nocodazole de façon dose-dépendante. La molécule provoque donc un ralentissement de la dynamique microtubulaire.

VIII.2.2 Analyse des phénotypes mitotiques

De nombreux agents ciblant la tubuline entraînent une modification de la dynamique microtubulaire et empêchent la formation d'un fuseau mitotique fonctionnel. Cette perturbation du fuseau mitotique bloque le déroulement normal de la mitose et aboutit à une inhibition de la prolifération cellulaire

D'après les résultats préliminaires en FACs, ICC128-L-036-H06 ne provoque pas d'arrêt du cycle cellulaire. Cependant, nous avons cherché à savoir si la molécule était capable de perturber le fuseau mitotique. Pour cela, nous avons examiné la morphologie des fuseaux

mitotiques de cellules HeLa après un traitement de 2 heures avec la molécule. Le fuseau est visualisé en microscopie à fluorescence à l'aide d'un anticorps anti-tubuline.

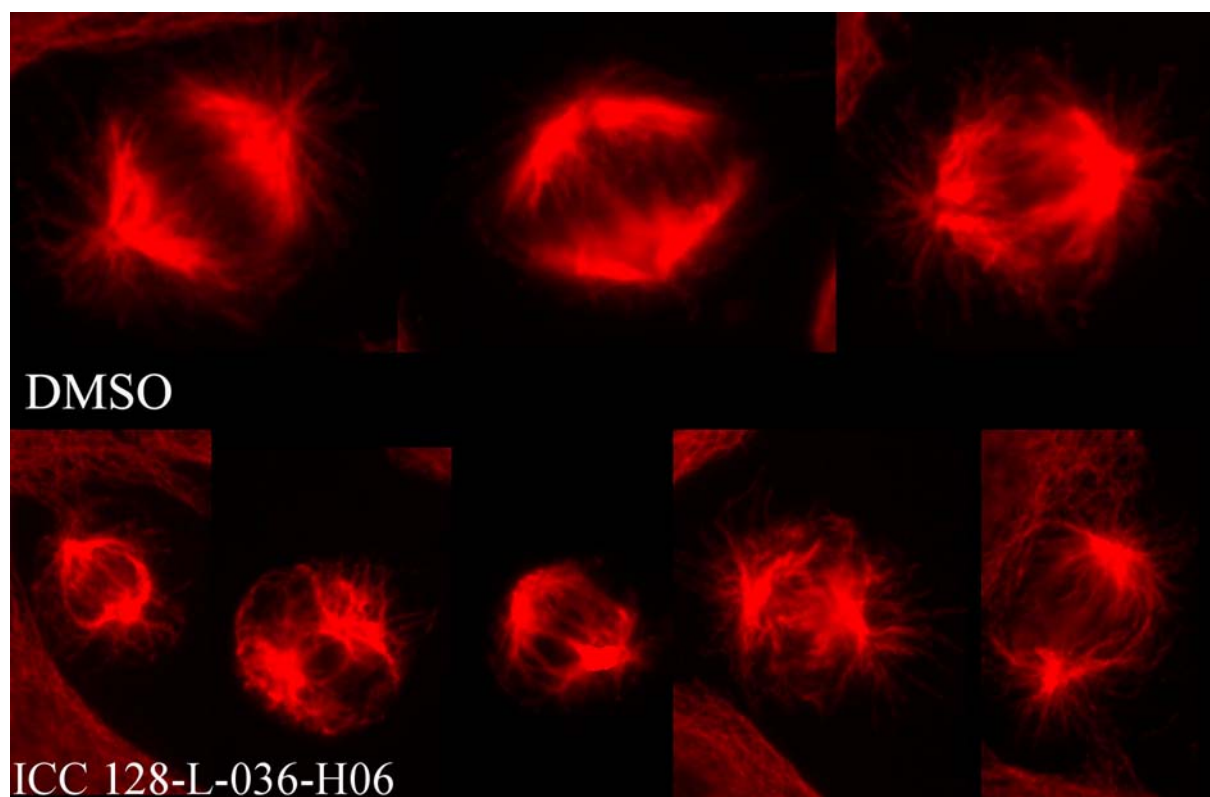


Figure 66 : Analyse de l'effet de la molécule ICC 128-L-036-H06 sur le fuseau mitotique
Des cellules HeLa sont traitées ou non avec la molécule ICC 128-L-036-H06 pendant 2 heures. Le fuseau mitotique (tubuline) est marqué avec un anticorps anti-tubuline.

Après 2 heures d'incubation, la molécule a la particularité de provoquer des mitoses anormales avec des microtubules astraux très longs.

Des mitoses anormales sont également visibles dans des cellules traitées au taxol® (résultats non montrés). Toutefois, la morphologie des ces mitoses avec des fuseaux tripolaires ou quadripolaires est complètement différente de celle observée avec notre molécule.

Compte-tenu des résultats obtenus au FACs et des effets décrits pour des temps plus longs d'incubation avec ce composé, il est fort probable que ces fuseaux anormaux résultent d'un effet de la molécule sur les cellules qui avaient déjà amorcé leur division lors de l'application du composé. Cette étude mériterait d'être complétée par une étude, plus approfondie, éventuellement en vidéomicroscopie, sur cellules synchronisées.

VIII.2.3 Etude de l'effet des molécules sur les protéines associées aux microtubules

Les expériences que nous avons menées jusqu'à présent, n'ont pas montré de façon évidente une interaction directe entre ICC128-L-036-H06 et la tubuline. Il n'est donc pas exclu que cette molécule puisse perturber la dynamique microtubulaire de façon indirecte en agissant sur des protéines effectrices, comme les protéines associées aux microtubules. Nous avons donc entamé l'étude des effets de ce composé sur différentes cibles candidates

VIII.2.3.1 MCAK

MCAK augmente le taux de catastrophe et induit la dépolymérisation des microtubules. La suppression de MCAK dans les cellules de Xénope entraîne la formation de longs microtubules et une perturbation du fuseau mitotique (Walczak *et al.* 1996). Ce phénotype permet de supposer que le composé ICC 128-L-036-H06 puisse être un inhibiteur de MCAK.

Nous avons tout d'abord testé la capacité de la molécule à inhiber ce moteur à l'aide d'un test *in vitro* mis au point par Leticia Peris. Le test consiste à incuber des cellules MEF avec la protéine motrice MCAK pendant 10 minutes afin que la protéine puisse dépolymériser les microtubules (figure 67). Le réseau microtubulaire est ensuite visualisé par immunomarquage.

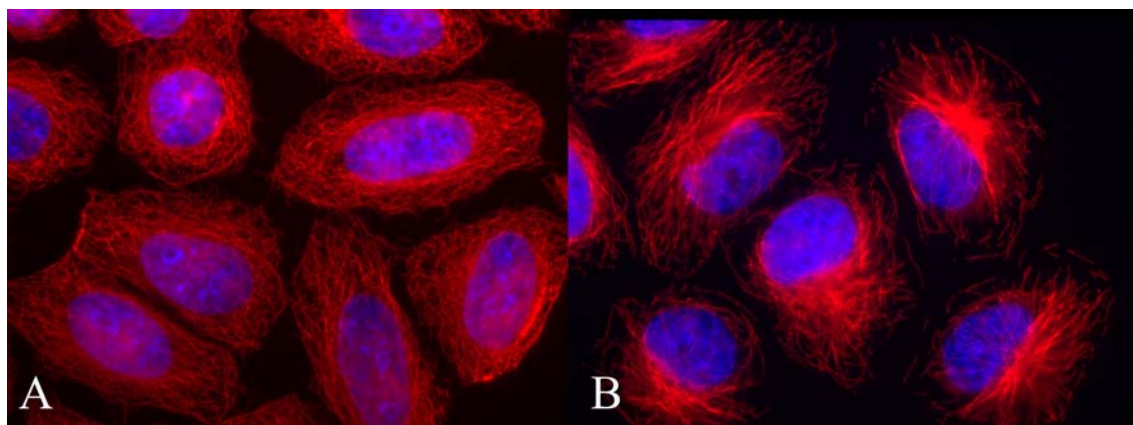


Figure 67 : Effet de MCAK sur les microtubules de cellules MEF

Des cellules HeLa sont incubées (B) ou non (A) avec la protéine MCAK pendant 10min. Le réseau microtubulaire est ensuite marqué avec un anticorps anti-tubuline et les chromosomes (ADN) sont marqués au Hoechst.

La co-incubation du composé ICC 128-L-036-H06 avec MCAK sur des cellules MEF n'a pas permis d'inhiber de manière détectable, à l'aide de ce test, l'action de ce moteur dépolymérisant.

Afin de confirmer ces résultats *in vivo*, des expériences de transfection ont été réalisées avec la protéine recombinante MCAK couplée à la GFP. Ainsi, nous avons surexprimé MCAK dans des cellules HeLa de façon à induire une dépolymérisation du réseau microtubulaire (figure 68) et nous avons testé si le composé ICC 128-L-036-H06 pouvait inhiber cette dépolymérisation.

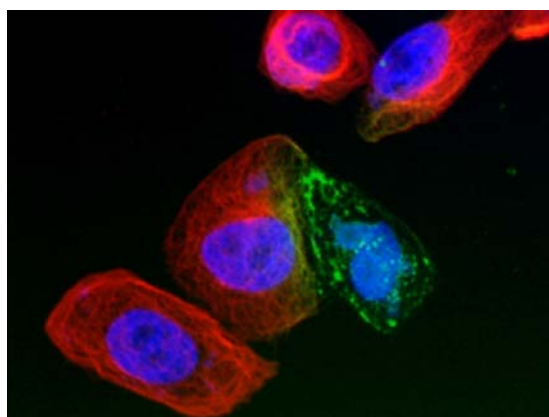


Figure 68 : Cellule HeLa transfectée par MCAK-GFP

Des cellules HeLa ont été transfectées avec 2µg de MCAK-GFP puis incubées pendant 48 heures. Les microtubules ont été marqués avec un anticorps anti-tubuline TYR et le noyaux coloré avec du Hoechst.

Les résultats obtenus sont en corrélation avec ceux obtenus *in vitro*, la molécule n'inhibe pas MCAK de manière détectable.

Dans une dernière expérience, nous avons testé si l'inhibition de MCAK pouvait être à l'origine de l'augmentation de tubuline GLU dans les cellules. Pour cela, nous avons mimé l'inhibition de MCAK par une interférence de l'ARN en transfectant les cellules avec 3 types de RNAi (KIF2C-HSS 117019, KIF2C-HSS 117020 et KIF2C-HSS 117021) puis, nous avons recherché la présence de tubuline GLU dans les cellules traitées à l'aide d'un anticorps.

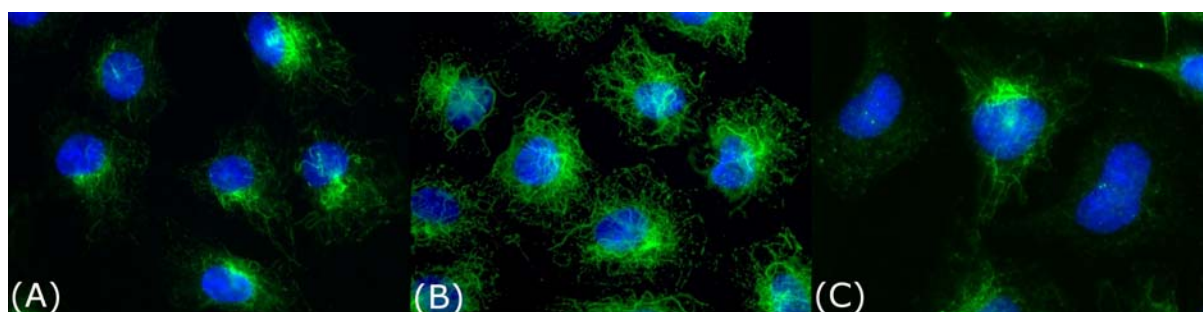


Figure 69 : Analyse de la tubuline GLU après transfection ou non avec des RNAi inactivant MCAK
(A,B) : cellules incubées avec du DMSO (A) ou le composé ICC 128-L-036-H06 (B) pendant 2 heures

(C) : cellules HeLa transfectées avec KIF2C- HSS 117021

Les microtubules ont été marqués avec un anticorps anti-tubuline GLU et le noyaux coloré avec du Hoechst.

Quel que soit l'ARNi utilisé, les cellules transfectées ne montrent pas plus d'élévation de tubuline GLU que les cellules traitées au DMSO. Enfin, l'effet du composé sur l'activité ATPase du moteur MCAK, *in vitro*, a été testé par l'équipe de F. Kozielski. Les résultats ont été négatifs.

L'ensemble de ces données tend à montrer que MCAK n'est pas la cible de la molécule ICC128-L-036-H06.

VIII.2.3.2 Stathmine

En s'associant aux dimères de tubuline, la stathmine va séquestrer la tubuline et provoquer la dépolymérisation des microtubules (Curmi *et al.* 1997; Jourdain *et al.* 1997). De plus, cette protéine joue un rôle spécifique comme promoteur des catastrophes. Chez le Xénope, l'inactivation de la stathmine par un anticorps spécifique, entraîne l'augmentation de la masse globale des microtubules et une diminution des catastrophes (Belmont *et al.* 1996a; Belmont *et al.* 1996b; Tournebize *et al.* 1997)

L'activité de la stathmine est régulée par des phosphorylations en réponse à de nombreux signaux. Ces phosphorylations empêchent la protéine de dépolymériser les microtubules. Elles touchent principalement 4 résidus sérine (Ser16, Ser25, Ser38 et Ser63) (Cassimeris 2002).

Suite à ces observations, nous avons cherché à savoir, si dans les cellules traitées avec ICC128-L-036-H06, la proportion de stathmine phosphorylée était plus importante que dans

des cellules non traitées. Pour cela, nous avons réalisé des immunomarquages d'extraits cellulaires traités ou non avec ICC128-L-036-H06 à l'aide d'un anticorps anti-phosphostathmine (Ser16).

Les premiers résultats n'ont pas donné de réponse nette et demandent à être confirmés.

VIII.2.4 Greffage de groupement chimique en vue d'une purification des cibles par colonne d'affinité

Etant donnée la difficulté pour trouver le mécanisme d'action de ICC128-L-036-H06, nous avons mené une dernière approche qui consiste à purifier la cible à partir d'extraits cellulaires ou de tissus, au moyen de la molécule immobilisée sur un support d'affinité ou bien marqué (radioactivement ou à l'aide de biotine). Cette approche est assez longue car elle implique la synthèse d'analogues actifs. Le CMBA ne disposant pas du savoir-faire et du matériel nécessaire pour produire ces analogues, ce travail ne peut se faire qu'en collaboration étroite avec les chimistes de l'institut Curie.

Dans une première étape, il est important d'identifier les sites de la molécule qui peuvent être a priori modifiés sans que l'activité du composé soit perdue. L'analyse des différents analogues structuraux que nous avons conduite indique que l'azote situé au niveau du noyau indole pourrait être un bon candidat.

Dans un premier temps, Chi Hung N'Guyen a entamé la synthèse d'analogues de ICC128-L-036-H06 afin d'obtenir une molécule marquée à la biotine (figure 70)

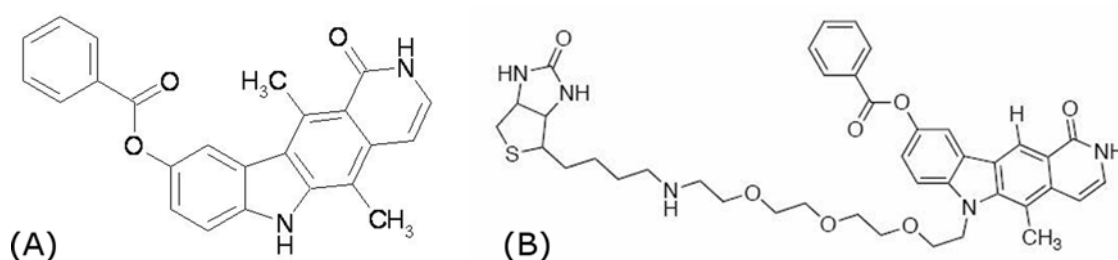


Figure 70 : Structure de ICC 128-L-036-H06 et de son analogue biotinylé
Structure de ICC 128-L-036-H06 (A) et de l'analogue biotinylé (B)

Cette synthèse, très difficile, a été arrêtée car la molécule obtenue était très peu soluble même dans le DMSO. Il a ensuite été décidé de greffer le bras espaceur terminé par une amine

secondaire à la place de la biotine sur le composé ICC127-M-202-H03, plus soluble et plus puissant.

Compte-tenu du fait qu'il n'y a en stock, qu'une petite quantité du composé et que sa synthèse totale nécessite plus de 10 étapes, il a été décidé de mettre au point la synthèse du composé conjugué sur l'analogue inactif mono-méthyle de la molécule ICC127-M-202-H03. Ce composé conjugué sera de plus d'une grande utilité à titre de contrôle, pour éliminer les protéines non spécifiquement responsables de l'activité stabilisatrice. Dans un deuxième temps, le protocole de conjugaison mis au point et optimisé sur le composé inactif sera appliqué au composé di-méthylé en stock. (figure 71)

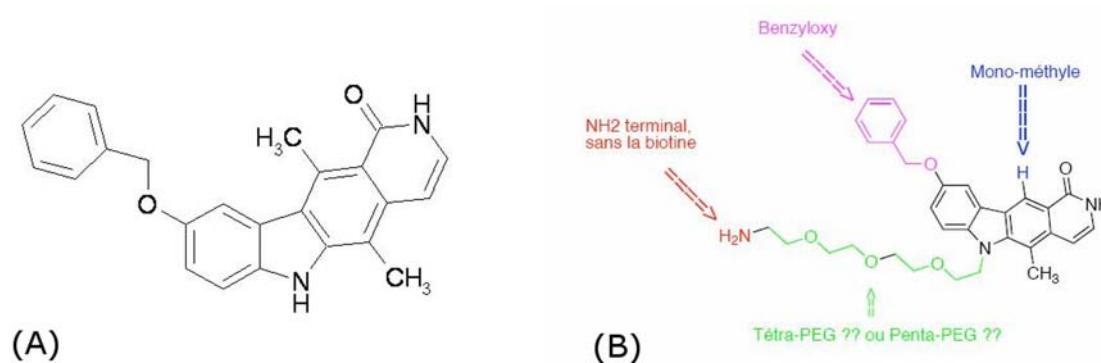


Figure 71 : Structure de ICC127-M-202-H03 et de son analogue
Structure de ICC 127-M-202-H03 (A) et de son analogue (B)

La synthèse étant toujours en cours, nous n'avons pas pu mener notre approche jusqu'au bout.

Discussion

A l'heure actuelle, la recherche d'agents ciblant le cytosquelette microtubulaire reste une priorité. D'une part, de tels agents constituent des outils intéressants pour essayer de comprendre le rôle des microtubules dans les cellules ainsi que les subtilités de la structure de la tubuline. D'autre part, au-delà de son implication dans le cancer, le cytosquelette microtubulaire et ses protéines associées ont été impliqués dans la pathogenèse d'une grande variété de maladies comme les maladies neurodégénératives, les infections virales ou les maladies parasitaires. Le cytosquelette microtubulaire et ses différents effecteurs représentent ainsi une cible validée pour des thérapies médicamenteuses comme en témoigne le succès clinique des taxanes et des alcaloïdes de la pervenche dans le traitement des cancers.

Depuis quelques années, de nombreux essais biologiques ont été mis au point pour identifier de nouvelles molécules ciblant les microtubules et de nouvelles techniques ont été développées afin de mieux comprendre leur mécanisme d'action au niveau moléculaire. Les premiers essais ont consisté à analyser l'effet cytotoxique de molécules sur des lignées cellulaires cancéreuses. Ainsi, des criblages d'agents anticancéreux ont été réalisés à l'aide de tests de mesure de viabilité cellulaire (MTT et sulforhodamine B) (Skehan *et al.* 1990). D'autres essais de criblage ont été réalisés directement sur la tubuline *in vitro* afin de sélectionner des molécules capables d'inhiber l'assemblage de la tubuline. Enfin, des expériences de "cytoblot" *in vivo* ont également été développées pour identifier des molécules capables de perturber le cycle cellulaire. La progression des cellules en mitose était suivie de manière indirecte grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal (TG-3) reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée de la nucléoline durant la mitose (Haggarty *et al.* 2000).

Dans ce contexte, nous avons choisi de développer un test de criblage cellulaire original, permettant de sélectionner des molécules agissant sur la dynamique des microtubules.

Chapitre IX : La stratégie de criblage

IX.1 Intérêt du test cellulaire

Plusieurs raisons nous ont amenés à mettre au point un test automatisé de criblage sur cellules plutôt que sur de la tubuline purifiée. Tout d'abord, dans le cadre d'un criblage à haut débit, la purification de tubuline à grande échelle reste un défi technique long et coûteux. Des préparations de tubulines commerciales sont disponibles mais restent encore trop instables et sont trop chères pour une utilisation en milieu académique. L'essai cellulaire est donc une alternative plus rapide et moins chère étant donnée que la cellule fournit elle-même la cible.

Par ailleurs, certaines cibles mettent en jeu des interactions complexes et ne peuvent être reconstituées dans des essais biochimiques. Il a été montré que la tubuline était régulée par de nombreux facteurs moléculaires (MAPs) ou transcriptionnels. Par conséquent, il est plus intéressant de cibler la tubuline dans un contexte physiologique approprié dans lequel tous les éléments nécessaires sont régulés. Ainsi, l'essai cellulaire phénotypique que nous avons développé présente l'avantage d'identifier non seulement des molécules pouvant perturber directement la tubuline ou les microtubules mais aussi des effecteurs connus ou inconnus de la dynamique microtubulaire. Les propriétés de ces molécules pourront ensuite être mises à profit pour disséquer les processus perturbés.

Un autre avantage de cette approche est que la spécificité de l'activité de la molécule vis à vis de sa cible principale n'est pas toujours strictement requise. Si la molécule induit un phénotype intéressant dans un système donné, cela peut se révéler utile tant que ses effets secondaires restent minimales (Specht *et al.* 2002). C'est par exemple le cas du taxol® qui non seulement interagit avec les microtubules, mais est aussi responsable d'autres perturbations biologiques dans la cellule comme l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B, la phosphorylation de Bcl-2 ou encore l'activation de la libération de cytokines (Altmann 2001).

Lors de criblage sur cellules, de nombreuses cibles potentielles sont sondées. Un avantage de ce type de criblage est que, en fin de compte, c'est la cellule elle-même qui guide le criblage vers les cibles les plus accessibles (Peterson *et al.* 2002). Enfin, le criblage cellulaire permet de sélectionner des molécules pour d'autres propriétés d'intérêt comme leur solubilité dans les milieux de culture ou leur capacité à traverser les membranes cellulaires. Bien que

ces informations ne puissent pas être considérées comme des indicateurs définitifs des propriétés d'absorption d'une molécule dans un organisme, elles permettent d'éliminer des séries de molécules chimiques inappropriées lors de la recherche de molécules 'tête de série' en vue d'une future application en recherche clinique.

Les approches de criblage sur cellules nécessitent tout de même que l'on prenne certaines précautions. Ainsi, lorsqu'une molécule est sélectionnée à la suite d'un criblage sur cellule, il ne faut pas perdre de vue que ce n'est pas nécessairement cette molécule qui est responsable de l'effet observé, mais que ce peut-être un métabolite secondaire, généré par dégradation du composé dans les milieux extra ou intra-cellulaires. De plus, on ne connaît pas la concentration intracellulaire réelle, responsable de l'effet observé. Celle-ci peut résulter non seulement d'un équilibre entre les pompes d'influx et d'efflux, mais aussi du degré d'affinité du composé avec sa (ses) cible(s). Cette méconnaissance de la concentration intracellulaire des composés peut poser des problèmes dans la comparaison des courbes dose-effets et par conséquent dans l'interprétation des relations structure-activité.

Par ailleurs, dans ce type d'essai, la cytotoxicité d'une molécule peut masquer son activité sur la cible d'intérêt, produisant ainsi des faux négatifs ou des faux positifs dans le cas de la recherche d'inhibiteurs. Ce degré de cytotoxicité peut dépendre de la concentration en molécule et de la durée de l'exposition des cellules à la molécule. Il peut aussi dépendre de la concentration en solvant de la molécule. Par exemple, la plupart des chimiothèques sont diluées dans du DMSO or il a été montré que concentré à 1% ou plus, le DMSO interfère avec la plupart des essais cellulaires. Cette concentration peut d'ailleurs être abaissée pour certaines lignées cellulaires. C'est pourquoi nous avons choisi de nous placer à une concentration en DMSO de 0,5%. Il a aussi été observé que de longues périodes d'incubation (24 heures-48 heures) pouvaient entraîner des variations de prolifération cellulaire au sein d'une même microplaque et générer des dérives de signal. Dans notre essai, la durée d'incubation choisie (2 heures) est suffisamment longue pour déclencher une réponse phénotypique et permet de ne pas être confronté à ces problèmes de variations de signal.

Enfin, si l'on exclue les criblages cellulaires réalisés en imagerie en microscopie, encore peu fréquents, les informations fournies par les essais cellulaires restent assez limitées. Le test que nous avons mis au point permet de mesurer plusieurs paramètres lors d'une même campagne de criblage. Même si l'analyse comparée des ces différents paramètres est plus riche d'informations que leur analyse séparée, les résultats obtenus nécessitent d'être complétés par

de nombreux tests secondaires pour déterminer précisément les processus affectés. L'identification de la cible reste donc un défi important.

IX.2 Intérêt des chimiothèques utilisées

De nombreuses molécules bio-actives ont été identifiées à partir de mélanges complexes biologiques dérivés de plantes, d'organismes marins, de champignons ou encore de bactéries. Le principal risque de cette approche est que l'activité observée soit le résultat d'effets synergiques entre plusieurs molécules. Une autre alternative consiste à utiliser de larges collections de molécules chimiques de structures diverses et définies. Jusqu'à présent, cette approche était réservée aux compagnies pharmaceutiques. Cependant, les progrès de la chimie, la parallélisation et la miniaturisation des méthodes de synthèse ont permis la production rapide d'un très grand nombre de molécules aux structures diverses, par les laboratoires académiques. Par ailleurs, de nombreux fournisseurs ont proposé des collections de petites molécules adaptées pour une utilisation en milieu académique.

Pour le criblage d'agents régulant la dynamique microtubulaire, nous avons utilisé deux types de chimiothèques, une chimiothèque issue de laboratoires de chimie académiques et une chimiothèque commerciale (ChemBridge DIVERSet™). La chimiothèque académique du CMBA regroupe plusieurs sous-chimiothèques différentes. Chaque sous-chimiothèque est principalement constituée de structures moléculaires focalisées autour de structures particulières. La chimiothèque Chembridge propose des petites molécules 'pré-sélectionnées' présentant une grande diversité structurale et susceptibles, si l'on se fie à certains de leurs descripteurs moléculaires, de traverser les membranes cellulaires. Cette chimiothèque est issue de méthodes de synthèse orientée vers la diversité.

Chaque type de chimiothèque présente des avantages et des inconvénients. Ainsi, les molécules synthétisées à partir d'une sous-structure commune sont souvent plus aptes à être actives que des molécules synthétisées de façon aléatoire, cependant elles ont l'inconvénient de ne cibler que les protéines d'une classe connue. Il a été montré que des molécules avec des structures similaires ou des mécanismes d'actions similaires génèrent des profils phénotypiques similaires (Xiao *et al.* 2003). D'un autre côté, Dixon et Villar ont montré qu'une série de molécules structuralement différentes pouvait interagir avec une même

protéine avec des affinités de l'ordre du nanomolaire, alors que des analogues très proches de ces molécules ne montrent que peu d'affinité pour cette même protéine (Dixon *et al.* 1998). Cette série de molécules présentait une diversité chimique significative mais une diversité minimale au niveau de son activité biologique.

Finalement, ces deux types de chimiothèques peuvent s'avérer complémentaires. En effet, les chimiothèques orientées vers la diversité peuvent conduire à la découverte de molécules interagissant avec une nouvelle classe de protéines. Ces mêmes molécules peuvent alors servir de base pour la création d'une collection de molécules focalisées permettant l'étude approfondie des relations structure-activité de molécules ciblant cette nouvelle classe de protéines.

D'un point de vue expérimental, les analyses statistiques réalisées sur les criblages primaires des deux chimiothèques montrent que la chimiothèque académique a fourni plus de 'touches' que la chimiothèque commerciale. Toutefois, dans le cas de la chimiothèque académique, la plupart des molécules sélectionnées ont une sous-structure similaire et appartiennent à des familles structurales, ce qui peut expliquer le fait qu'on ait plus de touches pour cette chimiothèque.

Même si le nombre de touches n'est pas très élevé au sein de la chimiothèque commerciale, elle présente tout de même l'avantage de proposer des molécules pouvant être synthétisées rapidement, ce qui facilite le réapprovisionnement. De plus, les compagnies qui commercialisent ces chimiothèques sont capables de fournir de nombreux analogues pour la réalisation des études structure-activité. Les molécules de la chimiothèque académique, quant à elles, peuvent être le résultat d'une synthèse plus complexe nécessitant de nombreuses étapes et peuvent ralentir grandement les études de structure-activité et les processus d'identification de la cible.

Lors de ce criblage, nous avons été confrontés au problème de reconfirmation de l'activité des molécules sélectionnées. Une des raisons de ce problème peut être liée à des phénomènes d'instabilité et/ou de dégradations des composés induits par des variations dans les méthodes de stockage et de traitement des microplaques utilisées pour le criblage primaire et le criblage secondaire. Par ailleurs, dans la mesure où nos essais sont réalisés sur cellules vivantes, même en s'assurant des meilleures conditions de reproductibilité, on ne peut pas exclure que la variabilité biologique soit aussi en partie responsable des problèmes de confirmation

rencontrés. Lors de la mise au point du test, nous avons utilisé le facteur Z' comme critère de reproductibilité et de robustesse du test, nous autorisant à réaliser le criblage en « simplicate ». Même si ce facteur est couramment utilisé par la communauté des équipes impliquées dans le criblage, des études statistiques récentes montrent que des résultats beaucoup plus fiables sont obtenus en dupliquant les essais (Malo *et al.* 2006). Même si ce type d'approche augmente le coût et le temps de réalisation des criblages, les difficultés de confirmation rencontrées lors des criblages réalisés au cours de ma thèse ont conduit l'équipe du CMBA à tester l'intérêt de réaliser les criblages en double.

Chapitre X : Les résultats du criblage

Les différentes campagnes de criblage ont permis de sélectionner des molécules capables de dépolymériser les microtubules et des molécules capables d'induire la détyrosination des microtubules. Ces molécules peuvent, en théorie, se répartir en plusieurs catégories en fonction de leur mode d'action:

- les molécules au mode d'action direct, qui agissent directement sur la tubuline ou les microtubules comme le taxol®, la colchicine ou le nocodazole. Le mode d'action de ces molécules peut être validé par des tests d'assemblage de tubuline *in vitro*.

- les molécules au mode d'action indirect, capables de perturber la dynamique microtubulaire en agissant sur des effecteurs endogènes. Cette catégorie est particulièrement intéressante pour la recherche en biologie et en thérapeutique. Par exemple, certains agents pourraient cibler les enzymes du cycle de tyrosination. Ainsi, l'apparition de tubuline détyrosinée dans la cellule peut être le résultat de l'inhibition de la TTL ou de l'activation de la TCP. Il n'existe à l'heure actuelle aucun inhibiteur connu de ces enzymes et de telles molécules présentent un intérêt réel pour la recherche. D'autres agents pourraient interagir avec des protéines associées au microtubules comme les MAPs. Ces derniers pourraient représenter une nouvelle classe d'agents thérapeutiques et présenter une grande utilité pour l'étude de la fonction des protéines qu'ils ciblent.

- les molécules provoquant des effets plus généraux (métabolisme, toxicité, décollement des cellules). Une partie de ces molécules peut être repérée dès le criblage primaire. En effet, les molécules provoquant un décollement des cellules peuvent être rapidement détectées grâce au marquage des noyaux.

A l'issue des deux criblages et de tests secondaires, nous avons choisi d'étudier de façon plus approfondie le mécanisme d'action de molécules issues de 3 familles structurales distinctes (cf [Annexe 2 : Bilan](#)).

Le premier composé, ICC128-L-036-H06, est un pyridocarbazole dérivé de l'ellipticine, composé aromatique s'intercalant entre les paires de bases de l'ADN et présentant une activité antitumorale. Il a été montré que l'activité cytotoxique de l'ellipticine est liée à la présence d'un groupement OH en position 9 du noyau pyridocarbazole et à son interaction avec l'ADN topo-isomérase II. Cependant, aucune interaction entre la tubuline et l'ellipticine

n'a été décrite jusqu'à présent. De plus, lorsque nous avons constaté cette analogie structurale entre l'ellipticine et le composé ICC128-L-036-H06, nous avons recherché un effet éventuel de l'ellipticine sur le cytosquelette microtubulaire. Nous n'avons observé aucun effet détectable de l'ellipticine sur l'état de tyrosination des microtubules, dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour caractériser le composé ICC128-L-036-H06. Inversement les composés actifs (ICC128-L-036-H06 et ICC127-M-202-H03) que nous avons sélectionnés, capables de générer de la tubuline GLU, ne montrent pas ou très peu de propriétés intercalantes sur l'ADN (communication personnelle de Marie-Paule Teulade-Fichou, UMR 176, Institut Curie, Orsay). Malgré leur similarité structurale et leurs propriétés cytotoxiques sur les cellules cancéreuses, le mode d'action de ces deux molécules est donc vraisemblablement très différent de celui de l'ellipticine.

L'analyse quantitative que nous avons réalisée en microplaques, à l'aide du lecteur en fluorescence montre qu'après deux heures d'application, le composé ICC128-L-036-H06 provoque une élévation de la quantité de tubuline détyrosinée dans la cellule avec une concentration efficace EC_{50} d'environ 15 μ M. Si l'on ne peut pas exclure totalement que cette augmentation de tubuline détyrosinée résulte d'une activation de la tubuline carboxypeptidase ou d'une inhibition de la tubuline tyrosine ligase, plusieurs arguments sont en faveur du fait qu'elle résulte d'un ralentissement de la dynamique des microtubules. Tout d'abord, l'observation des cellules traitées en microscopie montre :

- d'une part que les microtubules détyrosinés, même s'ils sont abondants, sont une sous-population des microtubules cellulaires, ce qui ne serait pas le cas s'ils résultaient d'une inhibition de la TTL (Webster *et al.* 1990; Fonrose *et al.* 2007).
- d'autre part que ces derniers ont une allure « tordue », caractéristique de microtubules stabilisés (Gundersen *et al.* 1984).

De plus, nous avons montré que les microtubules des cellules traitées par ce composé présentent, de manière dose-dépendante, une dynamique ralentie. Ces expériences nécessitent bien-sûr d'être confirmées par des analyses plus approfondies, notamment en vidéomicroscopie, que nous sommes en train de réaliser sur cellules HeLa transfectées avec de la tubuline-GFP, en collaboration avec Yasmina Saoudi (INSERM U 836, équipe dirigée par Annie Andrieux).

Du point de vue phénotypique, ces composés présentent une certaine spécificité vis-à-vis du cytosquelette. En effet, après deux heures d'application, on observe aussi un nombre important de fuseaux mitotiques anormaux. Compte-tenu de la cinétique d'apparition de ces

fuseaux anormaux, il semblerait que ces défauts résultent d'une action du composé sur les mitoses déjà initiées au moment de l'application du composé.

L'analyse au FACs du contenu en ADN, réalisée sur des cellules non synchronisées, après 2 ou 16 heures de traitement, n'a pas permis de mettre en évidence un arrêt éventuel du cycle cellulaire. De même, des expériences exploratoires réalisées en collaboration avec Manuel Théry (laboratoire Biopuces, iRTSV, CEA Grenoble) sur cellules HeLa fixées sur micropatrons (Théry *et al.* 2005; Théry *et al.* 2006; Théry *et al.* 2007), et suivies en vidéomicroscopie, n'ont pas permis de mettre en évidence un défaut de polarité du fuseau mitotique. Toutefois, ces dernières expériences ont été réalisées sur cellules synchronisées, ce qui a permis de mettre en évidence un retard important (environ 10 heures de décalage par rapport aux contrôles) de l'entrée en mitose. Clairement, des expériences complémentaires sont nécessaires pour analyser de manière approfondie l'effet de ces composés sur le déroulement de la mitose.

L'absence de blocage évident du cycle cellulaire indique cependant que ces composés ont un mode d'action original, différent de celui des taxanes ou des épothilones. Cette conclusion est renforcée par le fait que les études sur l'assemblage de la tubuline *in vitro* que nous avons conduites n'ont pas permis de mettre en évidence une éventuelle interaction avec la tubuline, à la différence des taxanes et des épothilones. Nous avons conduit différentes expériences pour tenter de comprendre le mode d'action de ces composés. Nous avons notamment testé si ces molécules pouvaient inhiber directement des protéines connues pour provoquer une dépolymérisation des microtubules, comme le moteur MCAK ou la stathmine. Les résultats négatifs obtenus nous ont permis d'écarter ces cibles éventuelles.

Nous avons alors émis l'hypothèse que la molécule pouvait agir de façon plus générale en régulant certaines kinases ou phosphatases. Afin d'explorer l'hypothèse que les effets phénotypiques de nos composés résultent d'une interaction avec des kinases, nous avons conduit des expériences préliminaires par l'intermédiaire de la société Kinexus, en analysant l'effet de la molécule, après 2 heures d'application sur cellules HeLa, sur la phosphorylation d'un ensemble de protéines kinases. La principale activation observée concerne les MAP kinases Erk ½. La voie des MAP kinase est souvent impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire. Un enrichissement en Erk a d'ailleurs été mis en évidence sur la fraction de tubuline constituant les fuseaux mitotique et le midbody chez des NIH3T3 en division (Willard *et al.* 2001; Mabjeesh 2003). Cependant, il est prématuré de conclure que l'activation de Erk induise directement le ralentissement de la dynamique des microtubules. Les voies de signalisation étant très complexes et faisant intervenir de nombreux régulateurs, l'étude de la

relation entre l'activation de Erk et la stabilisation de la dynamique des microtubules s'avère très difficile à réaliser.

Un autre effet caractéristique des composés mis en évidence par les analyses en vidéomicroscopie est la faible capacité des cellules HeLa traitées par la molécule à se déplacer. Ce manque de motilité laisse penser que la molécule pourrait également agir sur le cytosquelette d'actine. Les expériences de marquage de l'actine dans des fibroblastes de rat n'ayant pas été concluantes, elles ont été réalisées sur des cellules HeLa. Ces dernières expériences mettent clairement en évidence des modifications du cytosquelette d'actine, soulignant par ailleurs l'importance du modèle d'étude. Tout récemment, nous avons testé si ces composés étaient actifs directement sur la polymérisation *in vitro* d'actine purifiée (fournie par Laurent Blanchoin, laboratoire LPCV, iRTSV, CEA Grenoble). Ces expériences ont permis d'exclure un effet direct des composés sur la polymérisation de l'actine.

Il reste maintenant à déterminer si la molécule agit de façon indépendante sur les microtubules et sur l'actine. En effet, les microtubules et l'actine sont des composants majeurs du cytosquelette et les résultats de nombreuses publications sont en faveur d'une interaction entre ces deux réseaux. Ainsi, Walss-Bass et son équipe ont montré que l'isotype IV de la tubuline était vraisemblablement impliquée dans l'interaction entre les microtubules et l'actine (Walss-Bass *et al.* 2001). Par ailleurs, les microtubules peuvent contrôler directement l'organisation des filaments d'actine en modulant localement l'activité de petites GTPases de la famille Rho. Certains agents dépolymérisant les microtubules induisent l'activation de Rho via le facteur d'échange de guanine GEF-H1, générant ainsi la formation de fibre de stress (Krendel *et al.* 2002). Le composé ICC128-L-036-H06 agissant de façon indirecte sur les microtubules et sur l'actine, on peut alors penser que cette molécule pourrait réguler la voie Rho ou des protéines capables d'interagir à la fois avec les microtubules et l'actine. C'est le cas de Arg, une protéine de la famille des tyrosines kinases, qui régule la motilité ainsi que la morphologie cellulaire et qui possède des sites de liaison aux microtubules et à l'actine, permettant ainsi la liaison entre ces deux structures (Watts *et al.* 2000). Mip-90, décrite comme une protéine interagissant avec les microtubules pourrait également être la cible du composé ICC128-L-036-H06. En effet, cette protéine est capable d'interagir avec les filaments d'actine et semblerait jouer un rôle dans la régulation de l'interaction entre le réseau microtubulaire et le réseau d'actine dans des cellules non neuronales (Ramus *et al.* 2006). De plus, Mip-90 aurait des fonctions similaires à celles de la protéine Tau, en interagissant avec les microtubules et la calmoduline. Mip-90 s'incorpore

dans les microtubules *in vitro* et jouent un rôle dans la régulation de l'assemblage des microtubules, modulant ainsi la dynamique du cytosquelette.

Malgré de nombreuses expériences, le mécanisme d'action de cette molécule reste encore inconnu. Par conséquent, l'identification de sa cible reste notre principale priorité.

Depuis peu, nous assistons également à un regain d'intérêt pour le développement d'agents se liant sur le site colchicine de la tubuline. En effet, ils existent des agents tels que les combretastatines qui après interaction avec la tubuline, vont inhiber la progression du cycle cellulaire et entraîner l'apoptose de la cellule (Hamel *et al.* 1983) ou le 2-methoxyestradiol, qui inhibe également la croissance des tumeurs (Mabjeesh 2003). Ces deux types de molécules sont déjà en cours d'essais cliniques. C'est dans ce contexte que nous avons également décidé de consacrer une partie de nos efforts aux molécules sélectionnées par le criblage présentant un effet dépolymérisant sur les microtubules. Toutefois, nous nous sommes limités à l'étude de deux familles de molécules.

La première famille regroupe les dérivés azaindoles ICC117-L-029-F09 et ICC117-L-029-F11. Cette famille possède de nombreux composés décrits pour avoir des activités biologiques intéressantes comme par exemple des inhibiteurs de thrombine (brevet EP0997465), des agents anti-viraux visant notamment le virus HIV (brevet United States Patent 6476034) ou encore comme nous l'avons cité précédemment, des inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline (brevet EP1276720B1). Les revendications de ce dernier brevet n'incluant pas les composés ICC117-L-029-F09 et ICC117-L-029-F11 et les propriétés antitumorales de ces molécules n'étant que très peu décrites jusqu'à présent, nous avons approfondi notre analyse afin de déterminer le mécanisme d'action de ces molécules sur la tubuline.

Contrairement aux agents interagissant avec les microtubules déjà existants, les composés ICC117-L-029-F09 et ICC117-L-029-F11 ont des structures chimiques relativement simples, adaptées à une utilisation pharmacologique. Ces deux molécules présentent des activités anti-prolifératives efficaces sur de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses avec une IC₅₀ proche du micromolaire. En particulier, les composés ICC117-L-029-F09 et ICC117-L-029-F11 inhibent la prolifération des lignées multi-drogues résistantes MESSA DX5 exprimant un niveau élevé de glycoprotéine P avec une efficacité similaire à celle des autres lignées cancéreuses, suggérant ainsi que ces molécules ne sont pas les substrats des glycoprotéines P. Il serait intéressant de tester l'activité de ces molécules sur d'autres types de cellules

résistantes aux traitements actuels. Ces résistances peuvent être induites soit par des altérations de la distribution des isoformes de tubuline β (Ranganathan *et al.* 1996) ou par des mutations de la tubuline, conduisant à une altération de la stabilité basale des microtubules, soit par des mutations affectant le site de liaison du taxol® (Hari *et al.* 2006).

Des perturbations importantes du cytosquelette microtubulaire, notamment une dépolymérisation des microtubules en interphase, ont été observées dans des cellules HeLa traitées par l'une ou l'autre de ces molécules et pourraient expliquer l'effet inhibiteur de ces molécules sur la prolifération cellulaire. Des expériences d'assemblage *in vitro* à partir de tubuline 1X ou de tubuline purifiée ont montré que les composés ICC117-L-029-F09 et ICC117-L-029-F11 étaient capables d'inhiber l'assemblage par interaction directe avec la tubuline. L'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux de cellules traitées avec ICC117-L-029-F09 et ICC117-L-029-F11 a révélé une légère accumulation des cellules en phase S plutôt qu'en phase M. Même s'ils demandent à être confirmés, ces résultats ne sont pas très surprenants car certains agents inhibant l'assemblage des microtubules ont déjà été décrits pour être à l'origine d'un arrêt du cycle cellulaire en phase S (Landen *et al.* 2004). Enfin, tout comme le nocodazole, les composés ICC117-L-029-F09 et ICC117-L-029-F11 présentent une activité réversible. Cette propriété est intéressante pour un usage potentiel en thérapie anti-cancéreuse.

La deuxième famille est constituée de purines substituées (7-déazapurines), ICC115-L-021-E02 et ICC127-L-029-B04. Certains dérivés de cette famille ont été présentés comme des inhibiteurs de purine nucléoside phosphorylases (PNP), de purine phosphoribosyltransferases (PPRT), de 5'-methylthioadenosine phosphorylases (MTAP), 5'-methylthioadenosine nucléosidases (MTAN) et/ou de nucléoside hydrolases (NH). Ces molécules auraient des applications pharmacologiques assez larges comme le traitement des cancers, des infections bactériennes, des infections à protozoaires ... (brevet WO2004018496). Les composés ICC115-L-021-E02 et ICC127-L-029-B04 favorisent la dépolymérisation des microtubules *in vivo* de façon dose-dépendante. Cependant, lorsque les expériences d'inhibition de l'assemblage de la tubuline sont réalisées *in vitro*, l'effet est beaucoup moins important. De plus, nous avons montré que le composé le plus actif, ICC115-L-021-E02, n'était pas capable d'inhiber l'assemblage de la tubuline purifiée. Cette molécule n'interagit donc pas directement avec la tubuline mais vraisemblablement, avec ses protéines associées. A l'heure actuelle, seule la tryprostatin A (TPS-A), un composé naturel, serait capable

d'inhiber l'assemblage des microtubules en interférant avec les interactions entre certaines MAPs (MAP2 ou Tau) et l'extrémité C-terminale de la tubuline (Usui 2007).

Un des effets caractéristique de la plupart des agents ciblant les microtubules est d'induire un arrêt du cycle cellulaire en mitose. D'après les analyses en cytométrie en flux, les composés ICC115-L-021-E02 et ICC127-L-029-B04 provoquent eux aussi, un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M associé à une augmentation de la population sub-G1 suggérant que la mort des cellules résulte de l'arrêt mitotique.

Les composés ICC115-L-021-E02 et ICC127-L-029-B04 sont capables d'inhiber la prolifération de nombreuses lignées cellulaires mais avec une efficacité moindre que les azaindoles. Ainsi, le composé ICC115-L-021-E02, qui est pourtant plus actif sur la dynamique des microtubules que le composé ICC127-L-029-B04, n'a pas d'effet cytotoxique sur la lignée MCF-7 et la lignée MES-SA DX5 quelle que soit la concentration utilisée. Cette dernière constatation est certainement due à un défaut d'accumulation du composé ICC115-L-021-E02 dans la cellule. Concernant la lignée MES-SA DX5, il est vraisemblable que la molécule soit un substrat privilégié de la glycoprotéine P.

L'utilisation thérapeutique de ces molécules semble limitée, cependant elles proposent un mécanisme d'action original très intéressant et pourraient servir d'outils en recherche fondamentale.

Conclusion - Perspectives

La compréhension des mécanismes de la régulation de la dynamique des microtubules s'avère être un enjeu important pour l'élaboration de thérapeutiques efficaces. Une approche classique, mais qui a pris un essor important récemment grâce au criblage à haut débit, consiste à utiliser des petites molécules comme outils moléculaires pour élucider les mécanismes mis en jeu dans de nombreux processus cellulaires.

Suite à la mise au point d'un test phénotypique multiparamétrique adapté à une utilisation robotique et au criblage de plusieurs collections de composés chimiques, nous avons identifié des molécules, appartenant à trois familles structurales distinctes, ciblant la dynamique du cytosquelette microtubulaire.

Nous avons ainsi montré que certains dérivés pyridocarbazoles étaient capables de ralentir la dynamique microtubulaire et de générer des phénotypes mitotiques aberrants avec un mécanisme d'action différent de celui d'agents stabilisant la dynamique des microtubules comme le taxol®. Une interaction directe avec la tubuline n'ayant pas pu être démontrée de façon expérimentale, plusieurs mécanismes d'action ont été envisagés comme la régulation des protéines associées aux microtubules ou la régulation plus générale de voies de signalisation. Les nombreuses expériences réalisées n'ont pas encore permis d'identifier précisément la cible de ces molécules. Cependant, ces molécules présentent un grand intérêt non seulement en tant que nouvel outil pour disséquer le processus de la dynamique microtubulaire mais également en tant que candidat-médicament grâce à leurs propriétés cytotoxiques vis à vis de lignées cancéreuses. De plus, apparentées structurellement à l'ellipticine, elles peuvent comme cette dernière, être efficaces dans le traitement de plusieurs cancers, sans présenter trop d'effets toxiques secondaires (Stiborova *et al.* 2008)

Une autre catégorie de composés apparentés aux déazapurines, favorisent au contraire la dépolymérisation des microtubules et un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. Tout comme la série précédente, l'effet de ces molécules sur la dynamique des microtubules, n'est pas le résultat d'une interaction directe avec la tubuline. Ces molécules possèdent un mécanisme d'action original, encore très peu décrit dans la littérature, qui mérite d'être étudié de façon plus approfondie.

Ces deux cas illustrent donc parfaitement l'un des principaux défis des approches de génétique chimique directe à savoir l'identification de la cible des molécules. De nombreuses approches biochimiques ou génétiques peuvent être appliquées pour identifier les cibles moléculaires. Nous avons choisi d'utiliser une méthode classique mais qui a déjà fait ses preuves (Bach *et al.* 2005; Guiffant *et al.* 2007), la purification par chromatographie d'affinité. Un analogue du dérivé pyridocarbazole est en cours de modification afin de

permettre l'immobilisation de la molécule sur un support solide par l'intermédiaire d'un bras espaceur. Une fois que la molécule immobilisée aura été incubée avec des extraits cellulaires et que toutes les protéines non liées auront été éliminées par une série de lavages, les protéines fixées spécifiquement sur la molécule seront éluées à l'aide de tampons adaptés. Ces protéines pourront alors être identifiées par immunodétection ou par spectrométrie de masse. Ce type d'approche peut s'avérer plus difficile si l'activité de la molécule est altérée par la modification chimique, si les forces d'interaction entre la protéine et la molécule sont faibles ou encore si la cible est faiblement représentée dans les extraits cellulaires. Ce dernier problème peut être résolu en utilisant des extraits partiellement purifiés. Il est également possible de minimiser les interactions non spécifiques en utilisant un analogue structural bio-inactif. Malgré sa complexité, nous avons choisi de privilégier cette approche car c'est la seule méthode où la protéine cible garde sa structure tridimensionnelle et ses modifications post-traductionnelles.

Le criblage a également permis de sélectionner d'autres composés, dérivés d'azaindoles, capables d'inhiber la polymérisation des microtubules mais en interagissant directement avec la tubuline. Ces molécules fortement cytotoxiques mais d'activité réversible pourraient constituer de nouveaux agents anticancéreux intéressants car elles échappent à certains mécanismes de résistance. Afin de préciser le site de liaison de ces molécules avec la tubuline, il serait nécessaire de conduire des expériences de compétition avec la colchicine et la vinblastine.

Ces résultats sont très encourageants mais certains points importants nécessitent une analyse un peu plus poussée, comme par exemple l'étude de l'origine de la cytotoxicité des molécules. En effet, concernant le dérivé pyridocarbazole, nous n'avons pas encore déterminé si la cytotoxicité induite par les molécules était le résultat direct du ralentissement de la dynamique des microtubules ou bien celui de son effet sur l'actine, ou une combinaison des deux, voire d'autres effets non encore identifiés. L'effet observé sur l'actine est intéressant, car, en inhibant la motilité cellulaire, ce composé pourrait restreindre la formation de nouvelles tumeurs en ralentissant l'invasion cellulaire et les métastases lors de la progression du cancer (Pienta *et al.* 1991; Frame *et al.* 2002).

Par ailleurs, de nombreuses drogues antitumorales sont non seulement capables d'inhiber la prolifération cellulaire mais aussi d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses. Ce processus a l'avantage de former des corps apoptotiques éliminés par le système immunitaire sans provoquer de réponse inflammatoire (Fink *et al.* 2005). De nombreux régulateurs sont impliqués dans le processus d'apoptose comme les protéines de la famille Bcl-2 (Cory *et al.*

2003) ou le suppresseur de tumeur p53 (Yu *et al.* 2005). L'activation des protéases caspases joue également un rôle important dans le processus d'apoptose. Par conséquent, nous pourrions analyser l'effet des molécules sélectionnées sur ces différents facteurs pour déterminer les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la mort des cellules.

Enfin, nous envisageons de poursuivre nos études par l'intermédiaire de xénogreffes implantées sur des modèles animaux, en vue d'une éventuelle utilisation thérapeutique de ces composés. En effet, même s'ils sont issus de la synthèse chimique, la structure de base de ces composés est semblable à celle de substances naturelles. Or, dans le domaine des médicaments anticancéreux, une étude a établi que 62% des anticancéreux commercialisés entre 1981 et 2003 étaient d'origine naturelle. Les chances que ces composés constituent des médicaments sont donc éventuellement majorées. De plus, les composés que nous avons sélectionnés présentent une bonne biodisponibilité puisqu'ils sont aptes à pénétrer dans les cellules.

Nous espérons ainsi identifier à court terme de nouvelles cibles moléculaires impliquées dans la dynamique des microtubules afin de proposer à plus long terme, des molécules interagissant avec cette dynamique, qui présentent des mécanismes d'actions biologiques nouveaux, leur permettant d'être plus actifs dans les cancers résistants et éventuellement, de générer moins d'effets secondaires indésirables.

Annexes

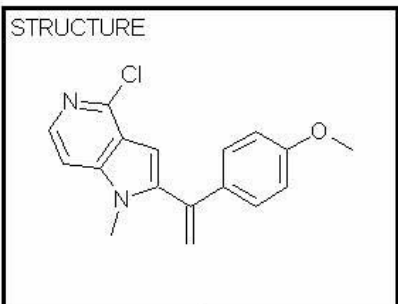
Annexe 1 : Fiche de données Isis Base

ISIS/Base - [TubIV_v4.db/saisiechimie]

File Edit Options Object Database Search List Window Help

Forms Query Browse Update <Root> 78 of 276
Search Domain: All

STRUCTURE



formule $C_{17}H_{15}ClN_2O$ PM 298.77

compound identifier
ICC117-L-029-F09-

Chimiotheque Curie Puits F09

CB plaque mere G0002229 CB plaque fille G0002442

CB plaque HP G0003790 Puits HP H11

Criblage primaire 25µM 2h

Cy3 brut 6443	A488 brut 4872	Hoechst brut 53252
Tubuline-Tyr (%) -0.9816	Tubuline-Glu (%) -8.8912	Signal Hoechst (%) 92.2445

Criblage secondaire 25µM 2h

Cy3 brut 2aire 7806	A488 brut 2aire 22248	Hoechst brut 2aire 61103
Tubuline-Tyr 2aire (%) -2.0148	Tubuline-Glu 2aire (%) -18.4219	Signal Hoechst 2aire (%) 100.5083

Criblage secondaire 25µM 4h

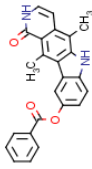
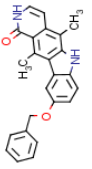
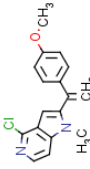
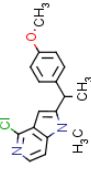
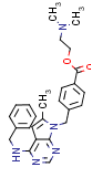
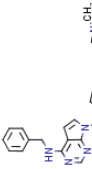
Cy3 brut 25micro 4h 7442	A488 brut 25µM 4h 21034	Hoechst brut 25µM 4h 57995
Tubuline-Tyr 25µM 4h (%) -2.6077	Tubuline-Glu 25µM 4h (%) -27.2661	Signal Hoechst 25µM 4h (%) 91.1344

Criblage secondaire 2.5µM 4h

Cy3 brut 2.5µM 4h	A488 brut 2.5µM 4h	Hoechst brut 2.5µM 4h
Tubuline-Tyr 2.5µM 4h (%)	Tubuline-Glu 2.5µM 4h (%)	Signal Hoechst 2.5µM 4h (%)

Exemple d'une fiche de données d'une molécule faisant partie de la chimiothèque

Annexe 2 : Bilan

Familles	Molécules	Structure	Effets <i>in vivo</i>						Effets <i>in vitro</i>				
			Sur le cytosquelette microtubulaire		Sur le cycle cellulaire	Toxicité sur lignées cancéreuses (IC ₅₀ en µM)					Sur la tubuline 1X	Sur la PC-tubuline	
			Type d'effet	EC50 (µM)		HeLa	786-O	NCI H460	MCF-7	MES-SA			MES-SA DX5
Pyrido carbazoles	ICC128-L-036-H06.		Stabilisation des microtubules	14,92	Pas d'effet mais phénotype mitotique aberrant	1,21	55,09	6,65	62,20	26,04	27,41	Pas d'effet	Pas d'effet
	ICC127-M-202-H03		Stabilisation des microtubules	Non testée	Non testée	3,05	3,34	1,52	ND	33,90	13,92	Pas d'effet	Pas d'effet
Azaindoles	ICC117-L-029-F09		Dépolymérisation des microtubules	1-10	Légère accumulation en phase S	0,65	1,25	1,00	12,67	0,32	0,24	Dépolymérisation	Dépolymérisation
	ICC117-L-029-F11		Dépolymérisation des microtubules	0,1-1	Légère accumulation en phase S	0,48	0,39	0,27	1,24	0,87	0,45	Dépolymérisation	Dépolymérisation
Deazapurines	ICC127-L-019-B04		Dépolymérisation des microtubule	20-50	Accumulation en phase G2/M	3,54	4,69	5,05	30,90	5,02	8,10	Dépolymérisation partielle	Non testée
	ICC115-L-021-E02		Dépolymérisation des microtubule	5-20	Accumulation en phase G2/M	1,76	20,35	3,85	ND	75,14	Résistante	Dépolymérisation	Pas d'effet

Récapitulatif des résultats obtenus suite aux analyses complémentaires effectuées *in vivo* et *in vitro*.
Ces analyses ont été réalisées avec les molécules sélectionnées à l'issue du criblage et de tests secondaires

Annexe 3 : Publication

Miniaturization and Validation of a Sensitive Multiparametric Cell-Based Assay for the Concomitant Detection of Microtubule-Destabilizing and Microtubule-Stabilizing Agents

Emilie Vassal, Caroline Barette, Xavier Fonrose, Raphaël Dupont, Emmanuelle Sans-Soleihac et Laurence Lafanechère

Journal of Biomolecular Screening 11(4); 2006: 377-389

Miniaturization and Validation of a Sensitive Multiparametric Cell-Based Assay for the Concomitant Detection of Microtubule-Destabilizing and Microtubule-Stabilizing Agents

EMILIE VASSAL,¹ CAROLINE BARETTE,² XAVIER FONROSE,^{1,3} RAPHAËL DUPONT,⁴
EMMANUELLE SANS-SOLEILHAC,² and LAURENCE LAFANECHÈRE⁵

The authors describe a cell-based assay for anti-microtubule compounds suitable for automation. This assay allows the identification, in a single screening campaign, of both microtubule-destabilizing and microtubule-stabilizing agents. Its rationale is based on the substrate properties of the tubulin-modifying enzymes involved in the tubulin tyrosination cycle. This cycle involves the removal of the C-terminal tyrosine of the tubulin α -subunit by an ill-defined tubulin carboxypeptidase and its readdition by tubulin tyrosine ligase. Because of the substrate properties of these enzymes, dynamic microtubules, sensitive to depolymerizing drugs, are composed of tyrosinated tubulin, whereas nondynamic, stabilized microtubules are composed of detyrosinated tubulin. Thus depolymerization or stabilization of the microtubule network can easily be detected with double-immunofluorescence staining using antibodies specific to tyrosinated and detyrosinated tubulin. The authors have scaled this assay to the 96-well plate format and adapted its process for an automated handling, including a readout using a microplate reader. They describe the different steps of this adaptation. This assay was validated using known compounds. This new cell-based assay represents an alternative to both global cytotoxicity assays and in vitro tubulin assembly assays commonly used for the detection of microtubule poisons. (*Journal of Biomolecular Screening* 2006:377-389)

Key words: microtubules, tubulin post-translational modifications, cell-based assay, anticancer drugs, high-content screening

INTRODUCTION

MICROTUBULES ARE KEY COMPONENTS of the cytoskeleton of eukaryotic cells. They are long, filamentous, tube-shaped protein polymers. They are crucial for the development and maintenance of cell shape, intracellular organelle, and other components of transport, cell signaling, and mitosis. Their central role in mitosis and cell division makes microtubules an important target for anticancer drugs.¹⁻¹² In addition to cancer, the microtubular cytoskeleton has been implicated in the etiology of a wide variety

of diseases including neurodegenerative and mental diseases,¹³⁻¹⁵ viral infections,¹⁶⁻¹⁸ and parasitic diseases.¹⁹⁻²⁴ Therefore, pharmaceuticals that target microtubules may have wide clinical applications. Moreover, compounds targeting the microtubular cytoskeleton have proven to be valuable tools for basic research in cell biology.²⁵

Microtubules are cylindrical aggregates of α -tubulin and β -tubulin heterodimers. They are highly dynamic polymers, and their polymerization dynamics are tightly regulated both in space and time. Microtubules' various biological functions are determined and regulated in large part by their polymerization dynamics.²⁶ Cancer drugs such as paclitaxel or *Vinca* alkaloids were previously thought to work through opposite mechanisms. They are now known to act by modifying microtubule dynamics and not through increasing or decreasing the overall microtubule mass.¹

We have developed and robotized a new cell-based assay, which allows the identification, in a single screening campaign, of both microtubule-destabilizing and microtubule-stabilizing agents. The rationale of this assay is based on the substrate properties of the tubulin-modifying enzymes involved in the tubulin tyrosination cycle.

¹Université Joseph Fourier, INSERM U366-CS/DRDC/CEA Grenoble, France.

²CEA, INSERM U366-CS/DRDC/CEA Grenoble, France.

³Université Joseph Fourier, INSERM U366-CS/DRDC/CEA, and Département de Biologie Intégrée, Grenoble, France.

⁴Université Joseph Fourier, Biopuces/DRDC/CEA, Grenoble, France.

⁵INSERM, U366-CS/DRDC/CEA, Grenoble, France.

Received Nov 10, 2005, and in revised form Dec 20, 2005. Accepted for publication Dec 29, 2005.

Journal of Biomolecular Screening 11(4); 2006
DOI: 10.1177/1087057106286210

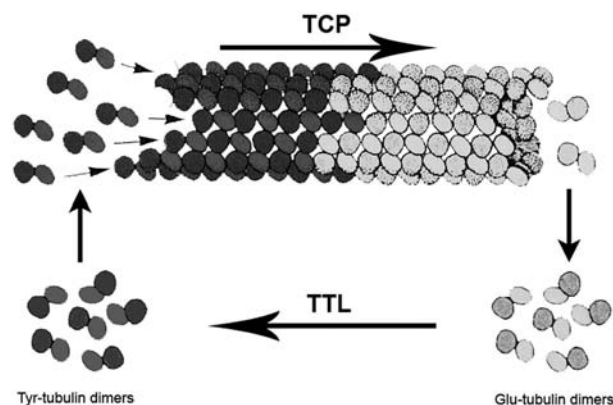


FIG. 1. The tubulin detyrosination-tyrosination cycle. The carboxy-terminal tyrosine of α -tubulin is removed by tubulin carboxypeptidase (TCP) and readded by tubulin tyrosine ligase (TTL). TTL acts only on free tubulin dimers, whereas TCP is likely to have a higher specificity for microtubules.

The tubulin tyrosination cycle

The tubulin tyrosination cycle was discovered some 30 years ago.^{27,28} It involves the cyclic removal of the carboxy-terminal tyrosine residue of the α -tubulin chain by an uncharacterized tubulin carboxypeptidase (TCP) and the readdition of a tyrosine residue at the same location by tubulin tyrosine ligase (TTL), in an ATP-dependent reaction²⁹⁻³¹ (**Fig. 1**). In most α -tubulins, the carboxy-terminal tyrosine is encoded for by messenger RNA. Thus, the primary modification is the tyrosine removal by TCP. The resulting detyrosinated tubulin exposes a carboxy-terminal glutamic acid and is therefore referred to as Glu-tubulin. Tubulin tyrosination is known to occur in a great variety of species ranging from humans³² to invertebrates such as trypanosomes.³³ However, although yeast cells encode a C-terminal tyrosine (*Schizosaccharomyces pombe*) or a phenylalanine (*Saccharomyces cerevisiae*), the tyrosination cycle itself does not exist in these species.^{34,35}

TTL, the enzyme that catalyses the tubulin tyrosination reaction, adds tyrosine to soluble, detyrosinated tubulin and does not react efficiently with tubulin once it is assembled into microtubules.^{29,31,36-38} Less is known about TCP mainly because it has not yet been purified to homogeneity. Indirect evidence indicates that TCP is likely to prefer polymerized substrate and that its binding to microtubules may be required for its function.^{37,39-41} TCP acts slowly on microtubules, whereas TTL recharges Glu-tubulin quickly upon release from microtubules³⁷ (**Fig. 1**).

As a consequence of the substrate specificity of TTL and of the kinetics differences of TTL and TCP, tyrosinated tubulin (Tyr-tubulin) is the main component of dynamic microtubules, being the dominant tubulin variant in cycling cells in vitro, whereas Glu-tubulin is a marker of long-lived stable microtubules.^{29,37,42-45} Depending on the cell type, these detyrosinated microtubules are ei-

ther not detectable or represent a small subpopulation of the cellular microtubules³¹ (**Fig. 2B**).

Microtubule-depolymerizing agents, which act primarily on dynamic microtubules, proceed principally on the tyrosinated microtubule, whereas microtubule-stabilizing agents such as paclitaxel lead to an enhanced detyrosination of tubulin in microtubules.^{37,40,46} This enhanced detyrosination, which arises in an almost null background, is easily detectable.

Principle of the assay

We took advantage of this differential repartition of Tyr- and Glu-tubulin in dynamic and stable microtubules, respectively, to design a multiparametric assay allowing the detection of the different types of microtubule poisons. In a 1st step, cells were exposed to drugs. Then, cells were permeabilized in a buffer that preserves intact microtubules but allows the extraction of free tubulin.⁴⁷ After fixation, the remaining microtubules were double stained with antibodies specific of Tyr- and Glu-tubulin, followed by fluorescent secondary antibodies. We also added a final DNA staining of the nuclei, using Hoechst reagent. This dye, weakly fluorescent itself in solution, binds specifically to the A-T base pairs in double-strand DNA, resulting in an increase in fluorescence and a shift in the maximum emission from 500 to 460 nm.⁴⁸ We found that Hoechst staining is also a good control of the state of the cell monolayer at the end of the assay and could be an indicator of global effects of the drugs screened on the cell monolayer.

The effects of the different drugs on the microtubular cytoskeleton were finally quantified using a fluorescence microplate reader. Depolymerizing drugs such as colchicine could be identified by a decrease of the fluorescence signal in the Tyr-tubulin channel, whereas drugs that stabilize microtubules, such as paclitaxel, could be detected by an increase of the fluorescence signal on the Glu-tubulin channel.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Reagents

Bovine serum albumin, EGTA, DMSO, Glycerol (Fluka), Hoechst 33258 (Hoechst), magnesium chloride solution, Pipes, potassium chloride, potassium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, Triton X-100, and Tween 20 were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). RPMI 1640 medium with Glutamax I, trypsin-EDTA solution, and penicillin-streptomycin solution were from Gibco, Invitrogen (Carlsbad, CA). Sodium chloride was from Carlo Erba Reagents (Rodano, MI, Italy). Fetal bovine serum was from Perbio (Brebieres, France).

Antibodies

The monoclonal Tyr-tubulin antibody (clone YL1/2) was a generous gift from Dr. J. V. Kilmartin (MRC, Cambridge, UK). It

can also be purchased from Abcam (www.abcam.com). The polyclonal Glu-tubulin antibody (L4) was produced in our laboratory and is also available commercially from Abcys (Paris, France). The cyanine 3 (Cy3)-conjugated goat antirat antibody was from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA), and the AlexaFluor 488 (A488)-conjugated goat antirabbit antibody was from Molecular Probes (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

Model compounds

Paclitaxel and colchicine were used as bioactive controls and were purchased from Sigma Aldrich. Etoposide was obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Other tested compounds were either purchased from Tocris Cookson (Ellisville, MO) or from Sigma Aldrich. Compounds were dissolved in DMSO so that the final concentration of DMSO on cells did not exceed 0.5% (see the "Results" section).

Cells

HeLa cells were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). They were grown in RPMI 1640 medium with Glutamax supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 37° C.

Instrumentation

The screening facility is composed of a TECAN GENESIS 200 workstation as a core component and is completed with a TECAN 9-stacker Carousel BC, a TECAN Te-Shake 2-position plate shaker, a TECAN 6-position Dark Incubator, a KENDRO 42-position Cytomat 2C cell incubator, a TECAN Power Washer 384 with a 96-well wash head, and a BMG FLUOstar Optima plate reader (BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany). The platform is controlled using the TECAN Gemini 4.00 and FACTS 4.81 software.

Fluorescence was measured with the FLUOstar Optima plate reader. For Cy3, A488, and Hoechst measurements, we used, respectively, 544-ex, 495-10, and 355-ex filters as excitation filters and 580-12, 520-12, and 460-em filters as emission filters.

Methods

Immunofluorescence procedure for microscopy analysis

Cells grown for 2 days on glass coverslips were incubated 3 min at 37° C with or without OPT buffer (Pipes 80 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 1 mM, triton X-100 0.5%, and glycerol 10%, pH 6.8) and fixed as described in the "Results" section; they were then processed for immunofluorescence as described in Paturle-Lafanechère and others.⁴⁶ Fluorescence images were taken using a microscope (Axioskop 50; Zeiss, Oberkochen, Germany) and 100×/1.3 Plan Neofluar objective, a CoolSnap ES charge-coupled device camera (Roper Scientific, Trenton, NJ), and Metaview

(Universal Imaging Corp., Sunnyvale, CA) software and were processed using Adobe Photoshop.

Protocol for 96-well format assay

Microplate preparation

HeLa cells were cultured as monolayers. The cells were seeded at 36,000 cells per well of 96-well polystyrene tissue culture plates (reference #655 086; Greiner Bio One, Kremsmuenster, Austria) in 90 µl of medium, using an 8-channel pipettor (Biohit, Helsinki, Finland), and were allowed to grow 24 h.

Drugs addition

The day following microplate preparation, each well was robotically supplemented with 10 µl of RPMI containing test compounds so that the final concentration of test compounds was 25 µM. For bioactive controls, the final concentration was 5 µM for paclitaxel and 2 µM for colchicine. The final concentration of DMSO was 0.5%. After drugs dispense, cells were incubated 2 h at 37° C, 5% CO₂, in the workstation incubator.

Cell permeabilization, cell fixation

After medium aspiration, cells were permeabilized 10 min with 100 µl of warm OPT buffer and fixed 6 min with 100 µl of methanol.

Microtubule and nuclear staining: basic protocol

After 2 washes with 150 µl of PBS Tween 0.1% (KCl 2.7 mM; KH₂PO₄ 1.5 mM; NaCl 136 mM; Na₂HPO₄ 8 mM; Tween 0.1%; pH 7.4), cells were incubated 2 h at 37° C with a mixture (50 µl per well) of tubulin antibodies: YL1/2 (Tyr-tubulin antibody) and L4 (Glu-tubulin antibody) at a 1:4000 dilution. Cells were rinsed 2 times and then incubated overnight with 200 µl of PBS Tween 0.1%. The next day, cells were incubated 1 h at 37° C with a mixture (50 µl per well) of Cy3 antibody and A488 antibody diluted, respectively, at 1:500 and 1:1000. Then, cells were rinsed 3 times and incubated 1 h with Hoechst (1 µg/ml). After 3 rinses with 200 µl of PBS Tween 0.1%, a 50% glycerol-PBS solution (50 µl) was added into each well. Fluorescence was measured using the FLUOstar Optima microplate reader.

Microtubule and nuclear staining: optimized protocol

After 2 washes with 150 µl of PBS Tween 0.1%, cells were incubated 2 h at 37° C with a mixture (50 µl per well) of tubulin antibodies: YL1/2 and L4 at a 1:4000 dilution. Cells were rinsed 2 times and then incubated overnight with 200 µl of PBS Tween 0.1%. The next day, cells were incubated 1 h at 37° C with a mixture (50 µl per well) of Cy3 antibody and A488 antibody diluted, respectively, at 1:500 and 1:1000 and Hoechst (1 µg/ml). After 3 rinses with 200 µl of PBS Tween 0.1%, a 50% glycerol-PBS solution (50 µl) was added into each well. Fluorescence was measured using the FLUOstar Optima microplate reader.

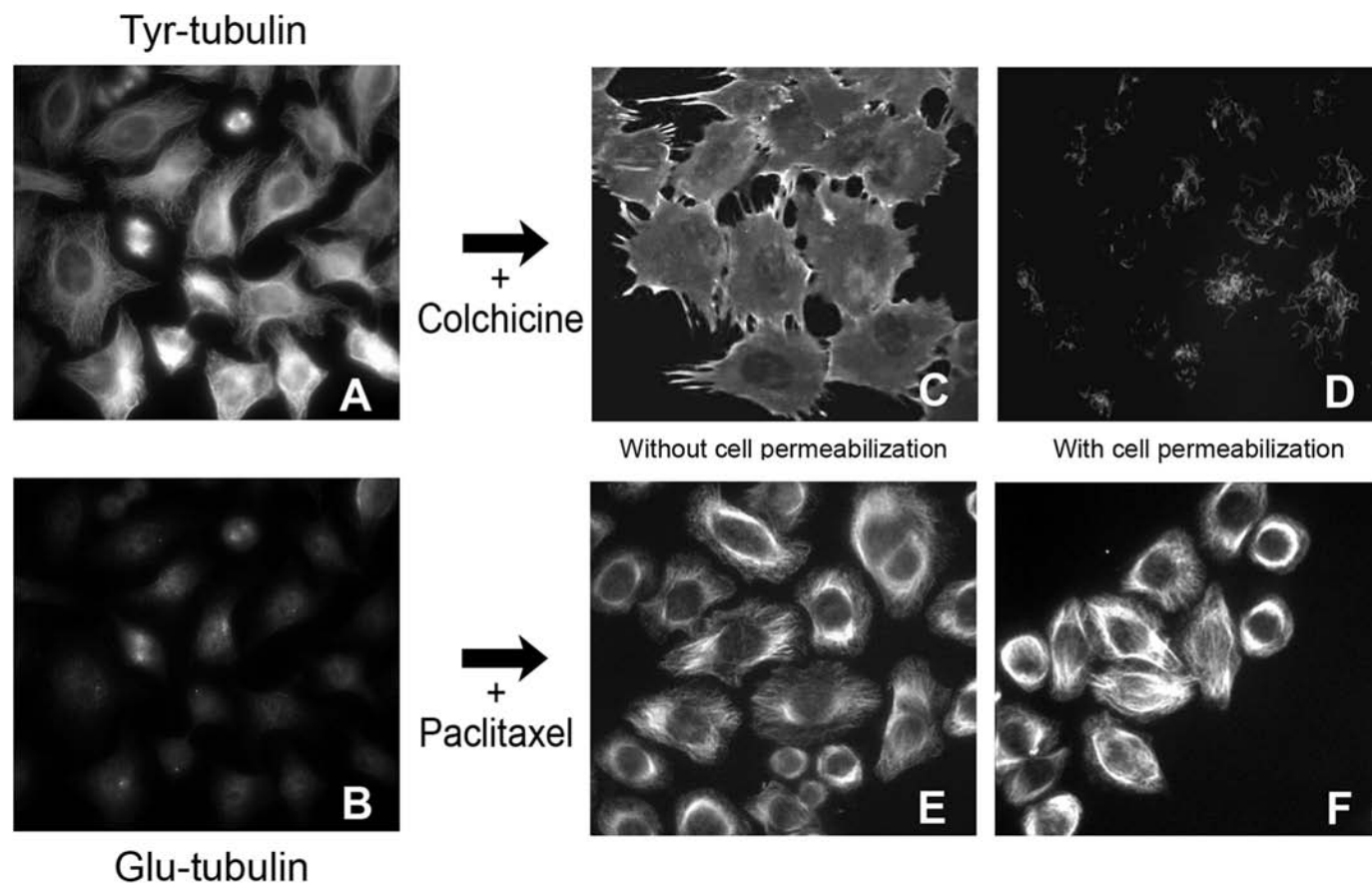


FIG. 2. Effect of the cell permeabilization on the Tyr- and Glu-tubulin immunostaining. HeLa cells grown on coverslips were treated (C, D, E, F) or not (A, B) with 2 μ M colchicine (C, D) or 5 μ M paclitaxel (E, F) for 2 h and then processed for immunofluorescence as indicated in the “Materials and Methods” section. Before fixation, cells were either treated (D, F) or not (C, E) with a warm permeabilization buffer for 3 min. (A, C, D) Tyr-tubulin immunostaining. (B, E, F) Glu-tubulin immunostaining. (A, B) Cells were double stained. The permeabilization buffer eliminates free tubulin dimers but preserves intact microtubules.

Results analysis

Results treatment

Raw data were exported from the microplate reader's software to an Excel file and normalized according to the following procedure. Mean values of DMSO, colchicine, and paclitaxel were calculated for each individual microplate, using intraplate control data points. DMSO and colchicine mean values from Cy3 staining were considered as control (100%) and low (0%) cell Tyr-tubulin content, respectively; DMSO and paclitaxel mean values from A488 staining were considered as low (0%) and high (100%) cell Glu-tubulin content, respectively; DMSO mean values from Hoechst staining were considered as control (100%) cell DNA content. According to that, Cy3, A488, and Hoechst raw data from each tested molecule were converted into percentages of Tyr-tubulin, Glu-tubulin, and DNA signals, respectively.

Assay performance

To evaluate the quality of the assay, the Z' factor was calculated using the following equation according to Zhang and others⁴⁹:

$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma_{c+} + 3\sigma_{c-})}{|\mu_{c+} - \mu_{c-}|},$$

where c+ are the bioactive controls, c– the bioinactive controls, μ the mean, and σ the standard deviation.

RESULTS

Assay miniaturization

Immunofluorescence of the different tubulin isoforms has been widely used in the field of cytoskeleton research, using cells grown

on glass coverslips and evaluated by visual analysis under the microscope. However, the miniaturizing of such a procedure in a robust assay, performed in the 96-well plate format and amenable to high-throughput screens using automates and a plate reader, is not trivial. The use of automates instead of humans implies several modifications. The assay also needs to be simplified to accelerate output. Moreover, because of biological variations, cell-based assays are sometimes irreproducible, and detailed method optimizations are unavoidable for their adaptation to high-throughput screening (HTS). To choose the best conditions for the assay, we thus tested different parameters.

Cell permeabilization

The different antibodies that we used stain for both microtubules and free tubulin. Thus, a plate reader will not detect any intensity difference between intact and depolymerized microtubule network (compare **Fig. 2A** and **Fig. 2C**). The addition of a permeabilization step before fixation can solve this problem. The permeabilization buffer we use preserves intact microtubules (compare **Fig. 2E** and **Fig. 2F**) but allows the extraction of free tubulin (compare **Fig. 2C** and **Fig. 2D**). Using this procedure, the effect of depolymerizing agents could be clearly detected by a plate reader (see the final results in **Fig. 6**).

Cell fixation conditions

When immunostaining, the microtubule cytoskeleton cells are commonly fixed for 6 to 10 min with anhydrous methanol at -20°C . However, such cold conditions are not suitable for HTS automate. We thus compared the effect of different fixation conditions (formaldehyde 3.7% or methanol at room temperature) with -20°C methanol fixation on the microtubule network, as observed by immunofluorescence. As shown in **Figure 3**, methanol fixation, whatever the temperature, preserves the microtubule network (**Fig. 3A, B**). We found that methanol fixation gave better results than formaldehyde fixation (**Fig. 3C**) did and thus decided to use methanol at room temperature to fix the cells.

Cell seeding density

We tested the effect of cell seeding density on the dynamic range of the assay. Cells were seeded at different concentrations 1 day before the assay. The next day, the assay was run using colchicine and paclitaxel as bioactive controls and DMSO as bioinactive control (**Fig. 4**).

Figure 4A shows that the Hoechst signal intensity is a function of the number of cells present in the well, up to 4×10^5 cells/ml. For the different tubulin staining conditions, a plateau is reached for cell concentrations ranging from 3×10^5 to 5×10^5 cells/ml (**Fig. 4B, C**). In this concentration range, there is a clear difference between the signals obtained for untreated cells compared with those treated with drugs (either colchicine or paclitaxel). We thus chose to seed cells at a concentration of 4×10^5 cells/ml. This concentration corresponds to a true seeding number of 3.6×10^5 cells/well (see the "Materials and Methods" section).

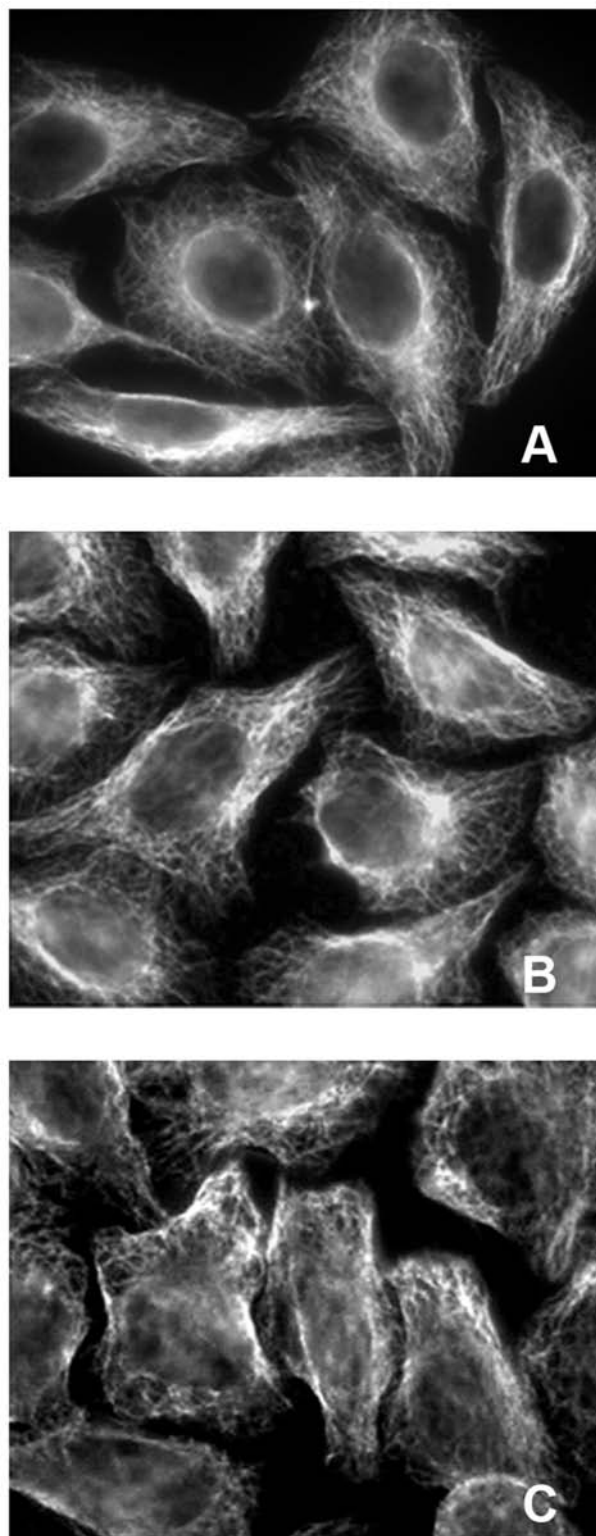


FIG. 3. Comparison of the effect of several fixation techniques on the integrity of the microtubular network. HeLa cells grown on coverslips were fixed either at -20°C with methanol (**A**) or at room temperature with methanol (**B**) or with formaldehyde 3.7% (**C**). They were then processed for Tyr-tubulin immunofluorescence as described in the "Materials and Methods" section.

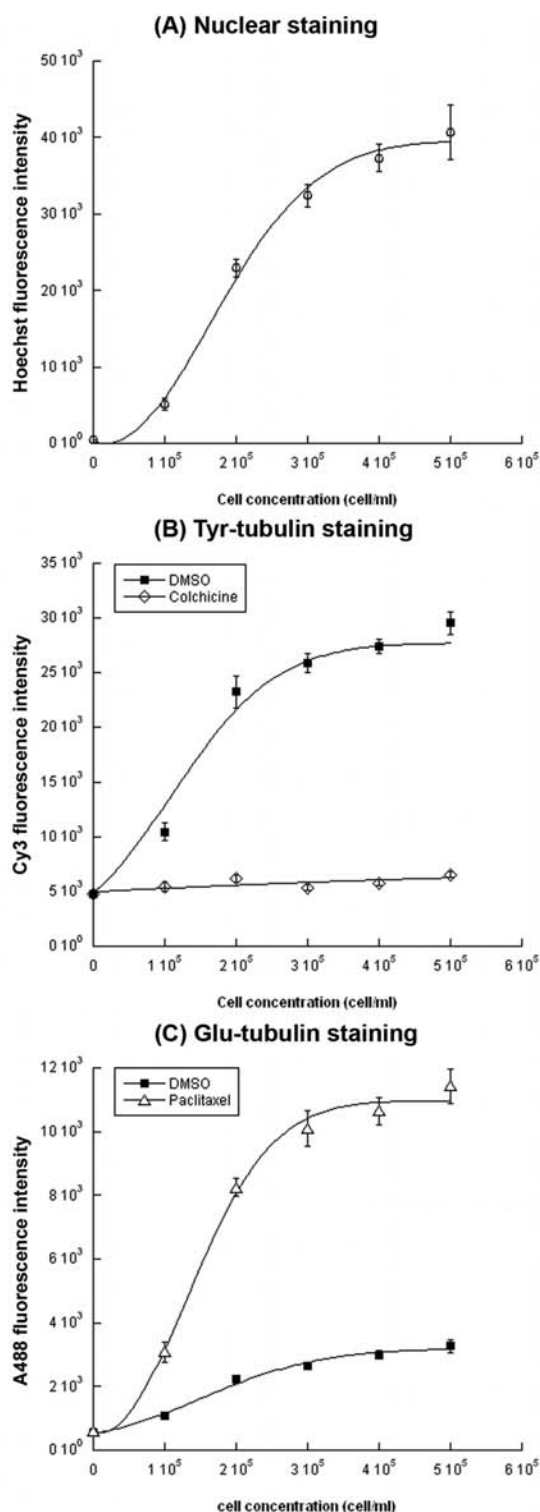


FIG. 4. Effects of cell density on the dynamic range of the assay. HeLa cells were seeded on microplates at different concentrations, as indicated. After 24 h, they were treated for 2 h with DMSO alone (bioinactive control) or with colchicine 2 μ M or paclitaxel 5 μ M (bioactive controls). They were then processed for immunofluorescence as described in the “Materials and Methods” section. (A) Nuclear staining, (B) Tyr-tubulin staining, and (C) Glu-tubulin staining. Data are mean values \pm SD of 10 replicates.

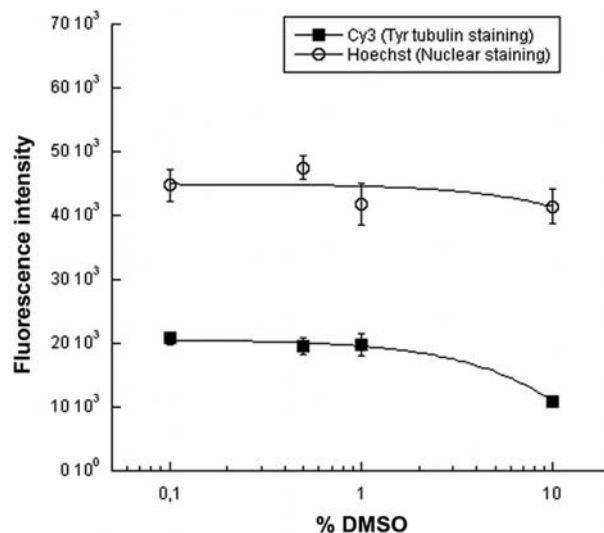


FIG. 5. DMSO assay tolerance. HeLa cells were seeded on microplates. After 24 h, they were treated for 2 h with different concentrations of DMSO as indicated. They were then processed for immunofluorescence as described in the “Materials and Methods” section. Data are mean values \pm SD of 16 replicates.

Assay optimization

The throughput of an assay can be increased by diminishing the number of steps it contains. We knew that the sequence 1) addition of secondary antibodies, 2) 3 washes, 3) addition of the Hoechst reagent, 4) 3 washes, 5) addition of PBS glycerol, and 6) reading in the plate reader was efficient. To gain 2 steps, we tested if it was possible to add the Hoechst reagent together with the secondary antibodies. Moreover, as the permeabilized cell monolayer is very fragile, such a modification by reducing the number of washing steps (see below) might also improve the quality of the assay. We found that the addition of Hoechst reagent together with the secondary antibodies does not noticeably affect the signal-to-background (S/B) ratio, neither for Tyr-tubulin staining nor for Glu-tubulin staining (not shown). Moreover, this modification of the procedure had no detectable effect on the signal Hoechst itself. We thus adopted this optimized procedure.

DMSO tolerance

DMSO is the most commonly used solvent for chemical libraries. Yet DMSO itself is known to exhibit cytotoxic properties that might induce some false-positive or false-negative results.⁵⁰ It is also important to determine the DMSO tolerance of the assay to determine the maximal concentration of the compounds that can be screened. **Figure 5** shows the consequence of applying different concentrations of DMSO for 2 h on the tyrosinated microtubule content of the cells and on the Hoechst staining of the nuclei. These 2 markers indicate that at 1% or greater, DMSO has some interfering deleterious effects. At concentrations lower than 1%, no de-

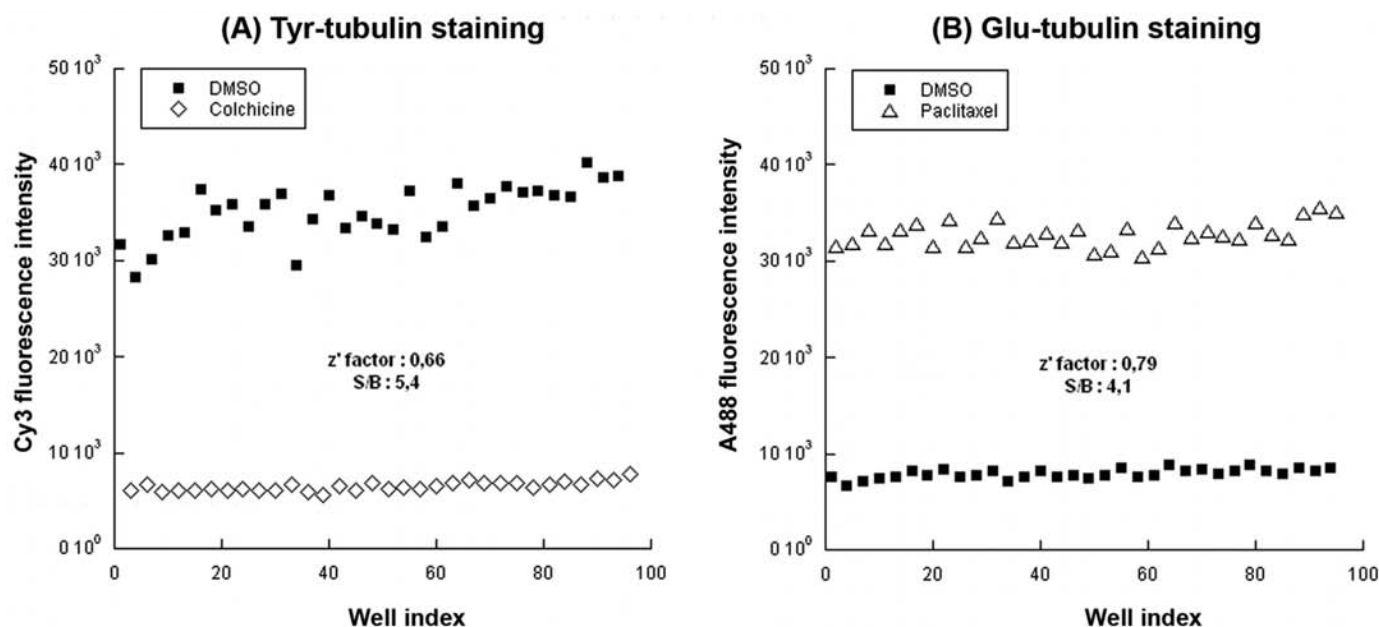


FIG. 6. Evaluation of the intra-assay repeatability. HeLa cells were seeded on a microplate. After 24 h, they were treated for 2 h with DMSO alone (bioinactive control) or with colchicine 2 μ M or paclitaxel 5 μ M (bioactive controls). They were then processed for immunofluorescence, as described in the “Materials and Methods” section. (A) Tyr-tubulin staining. (B) Glu-tubulin staining. Data are mean values \pm SD of 32 replicates. Each point represents the fluorescence intensity obtained for each well of a 96-well microplate. The correspondence between well index number and the well position on the plate is as follows: 1 = A1, 2 = B1, 9 = A2, . . . , 96 = H12.

tectable effect on cells was measurable in our experimental conditions.

Assay performance

To evaluate the assay reproducibility and quality, together with its suitability for automation, we ran a series of experiments on the workstation (see description in “Materials and Methods” section). We used known microtubule-destabilizing and -stabilizing agents colchicine²⁵ (2 μ M) and paclitaxel⁵¹ (5 μ M) as controls of bioactivity and DMSO as a control of bioinactivity. The quality of the 96-well plate assay was assessed by calculating S/B ratios and Z' factors according to Zhang and others.⁴⁹ For microtubule depolymerizing agents assay (colchicine as control), a DMSO/colchicine ratio of 5.4 and a Z' value of 0.66 were obtained (Fig. 6A). For microtubule-stabilizing agents assay (paclitaxel as control), a paclitaxel/DMSO ratio of 4.1 and a Z' value of 0.79 were obtained (Fig. 6B). These Z' values indicate that this assay is excellent for HTS, for both types of signals.

The run-to-run reproducibility of the assay was assessed by comparing the Z' factors obtained from separate assays performed at different days. Figure 7 shows the different Z' values obtained for these different assays. The mean Z' value was largely above 0.5 for both markers (Fig. 7A, B). For microtubule depolymerizing assay (Fig. 7A), 3 experiments out of 9 were qualified by a Z' value slightly under 0.5 (0.44–0.48). However, for cell-based assays, Z' factors greater than 0.4 are deemed acceptable.⁵²

We observed a small drift of the signal, with a slight positive slope from the left to the right of the microplate (Fig. 8A). However, the resulting greater dispersion of the points has no major consequence on the Z' factor. This slope was more accentuated for the Cy3 channel (Tyr-tubulin channel) than for the A488 channel (Glu-tubulin channel) and could explain the lesser reproducibility of this part of the assay. We tested separately the different steps of the procedure and found that the slope resulted from a lack of homogeneity of the washing steps, due to an inhomogeneous aspiration by the microplate washer. This is demonstrated by the fact that the slope is reverted when the microplate is manually rotated, only for the washing steps, so that the H12 well is transposed to the opposite corner (A1 well; Fig. 8B). This result underlies the importance of the quality of microplate washers for such cell-based assays.

Assay sensitivity

Screening campaigns using cell-based assays are usually run using a rather elevated concentration of the tested compounds (10 to 50 μ M). However, to evaluate the sensitivity of the assay we developed, we tested the effect of different concentrations of colchicine and paclitaxel on the fluorescence intensity measured by the microplate reader. As shown in Figure 9A, a depolymerizing effect of colchicine could be detected for a concentration of 0.1 μ M. The paclitaxel effect is very strong, and we could detect an effect at 0.01 μ M (Fig. 9B).

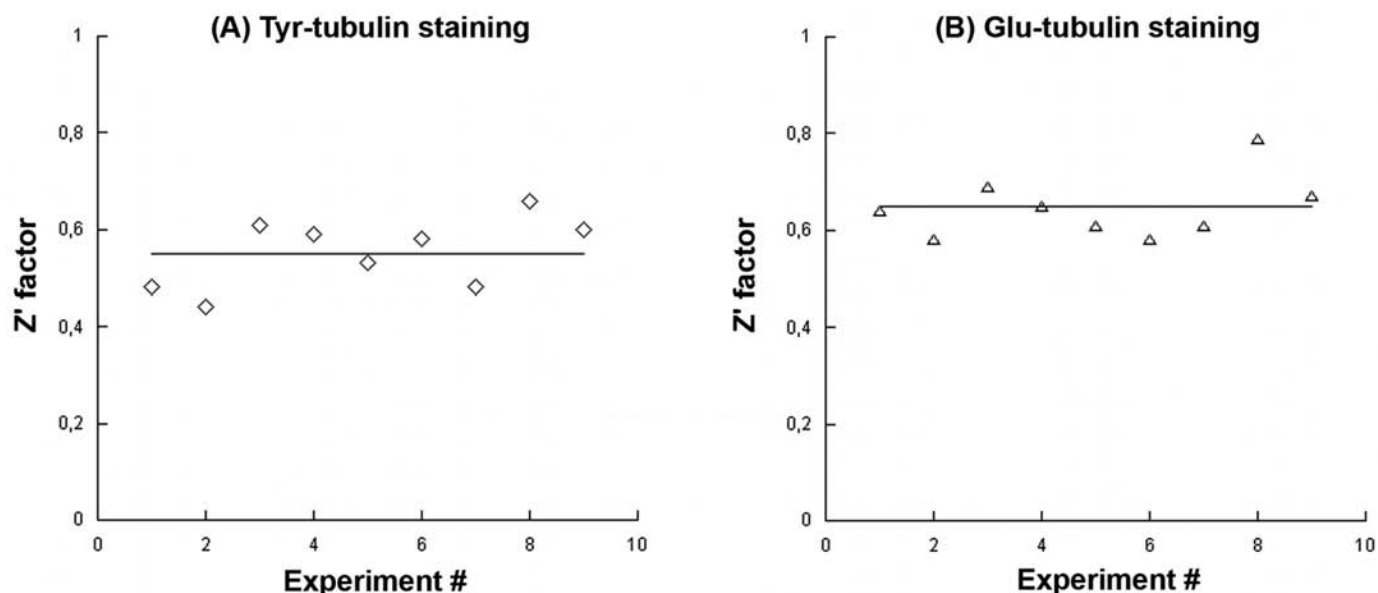


FIG. 7. Analysis of the inter-assay variation of the Z' factor. HeLa cells were seeded on microplates. After 24 h, they were treated for 2 h with DMSO alone (bioinactive control) or with colchicine 2 μ M or paclitaxel 5 μ M (bioactive controls). They were then processed for immunofluorescence as described in the "Materials and Methods" section. (A) Tyr-tubulin staining. (B) Glu-tubulin staining. Each Z' value is calculated using 32 replicates. Each Z' value corresponds to an assay run on a different day. For Tyr-tubulin staining, the Z' values range from 0.44 to 0.66, and for Glu-tubulin staining, the Z' values range from 0.58 to 0.79.

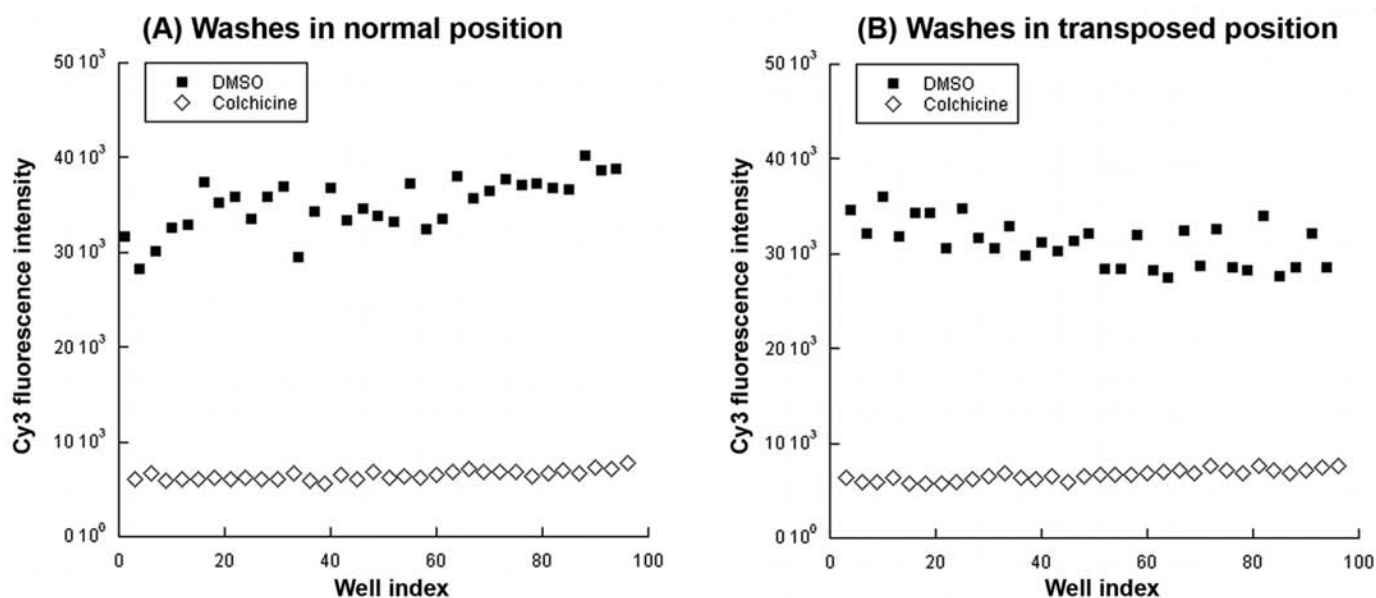


FIG. 8. Effect of the robotic microplate washer on the assay repeatability. HeLa cells were seeded on microplates. After 24 h, they were treated for 2 h with DMSO alone (bioinactive control) or with colchicine 2 μ M or paclitaxel 5 μ M (bioactive controls). They were then processed for immunofluorescence as described in the "Materials and Methods" section. The microplate was disposed either in the normal position (A) or rotated by 180° (B) on the robotic microplate washer. Each point represents the Tyr-tubulin fluorescence signal intensity obtained for each well of a 96-well microplate. The correspondence between well index number and the well position on the plate is as follows: 1 = A1, 2 = B1, 9 = A2, . . . , 96 = H12.

Validation of the assay with model compounds

The 96-well plate assay was evaluated by testing a set of known microtubule poisons. This includes about 10 drugs that have been

described to show a microtubule depolymerizing effect and 3 microtubule-stabilizing agents (paclitaxel, docetaxel, and epothilone B). All of these compounds were randomly distributed into a microplate. The other wells of the microplate were filled

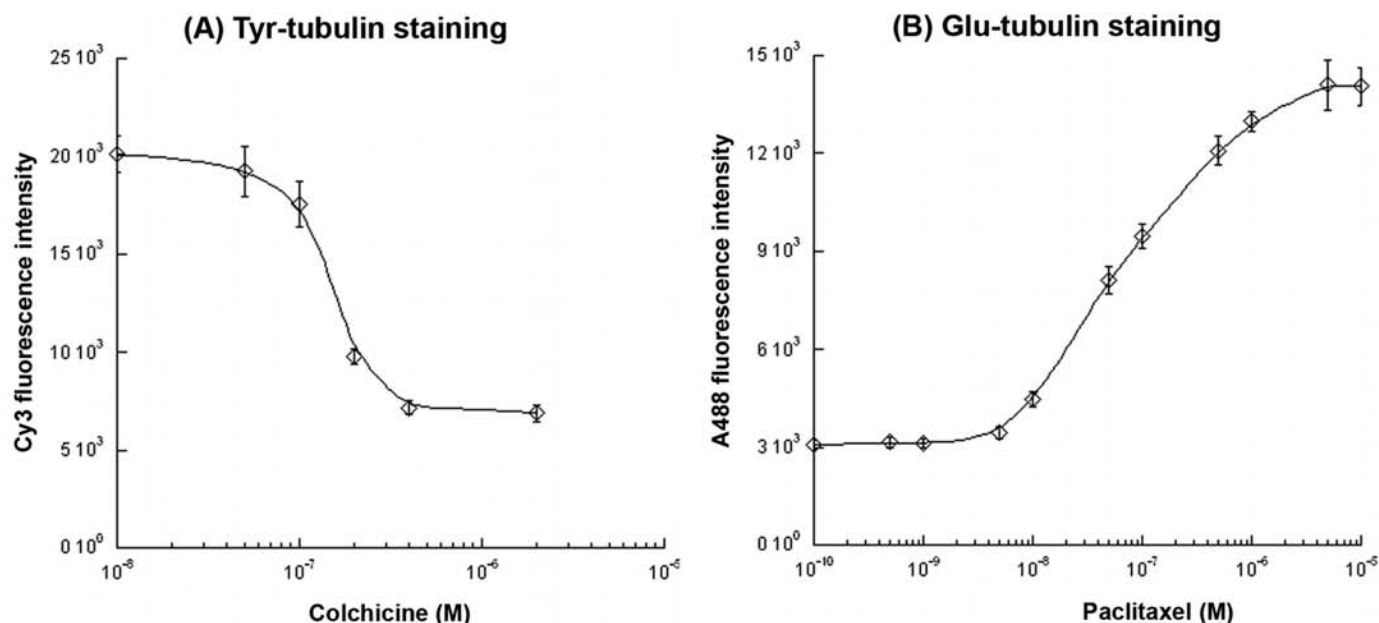


FIG. 9. Evaluation of the assay sensitivity. HeLa cells were seeded on microplates. After 24 h, they were treated for 2 h with DMSO alone (bioinactive control) or with different concentrations of colchicine or paclitaxel as indicated. They were then processed for immunofluorescence as described in the "Materials and Methods" section. Tyr-tubulin staining (A). Glu-tubulin staining (B). Data are mean values \pm SD of 8 replicates.

with chemicals known for their activity on other biological targets such as proteins involved in actin dynamics, cell cycle regulation, protein synthesis, and so forth. All molecules were incubated 2 h with HeLa cells and tested at a final concentration of 25 μ M. The results of this experiment are summarized in **Table 1**.

None of the agents known to target other systems than the microtubular system, including agents directed on the actin cytoskeleton, were found to be bioactive in our assay. Known microtubule-destabilizing agents such as colchicine,²⁵ nocodazole,²⁵ combretastatin,^{25,53} and podophyllotoxin⁵⁴ were easily detected in the Tyr-tubulin Cy3 channel. Paclitaxel, docetaxel, and epothilone B were also scored as bioactive in the Glu-tubulin A488 channel.

However, several other agents known to show some microtubule-depolymerizing effects were not detected in this assay. These include *Vinca* alkaloids (vinblastine and vincristine),²⁵ benomyl,⁵⁵ griseofulvin,⁵⁶ noscapine,^{57,58} and BAPTA-AM.⁵⁹

Careful examination of the mode and field of action of these different substances can clearly explain why the assay failed to detect any effect of these substances.

Vinca alkaloids have been reported not only to depolymerize microtubules but also to give rise to stable paracrystallin bundles of protofilamentous tubulin, in a time and concentration dependent manner, both in cells⁴⁶ and in vitro.⁶⁰ Recently, the tubulin-binding site of vinblastine has been elucidated.⁶¹ Vinblastine's interdimer location gives the structural basis to this peculiar effect of vinblastine on tubulin assembly.⁶¹ We have checked that in our ex-

perimental conditions, vinblastine effectively induces tubulin paracrystals. As shown in **Figure 10A**, these stable paracrystals effectively occur after 2 h of incubation with 25 μ M vinblastine. They are brightly stained with Tyr-tubulin antibody. Clearly, the fluorescence reader could not allow any distinction between the signal given by such paracrystals (**Fig. 10A**) and a normal bright microtubule network (**Fig. 10C**). We have tested if shorter incubation of the cells with vinblastine, or incubation with lower concentration, induced a depolymerization that could be detected by the fluorescence reader (**Fig. 11**). For a concentration of 0.25 μ M, the depolymerizing effect of vinblastine was always detectable, however long the duration of incubation. A depolymerizing effect of 25 μ M vinblastine could be detected for 15- and 30-min incubation times. It was no longer detectable after 120 min of incubation because of tubulin paracrystals formation.

Benomyl as well as griseofulvin are antifungal drugs, known to interact with fungal tubulin. Although they have been shown to inhibit mammalian tubulin polymerization in vitro, their effects on interphase microtubules in HeLa cells are hardly detectable for such concentration and incubation duration.^{56,62,63}

The opium alkaloid noscapine shares some structural similarities with known microtubule assembly inhibitors such as colchicine and podophyllotoxin. It has been shown to bind to tubulin, to alter in vitro microtubule assembly, and to arrest cells in mitosis, after 24 h of treatment.⁵⁸ However, even at high doses and for a long time of incubation, a noscapine effect on the interphase microtubule network could not be detected.⁵⁷ Actually, we have

Table 1. Results of Experiment

Compound	Tyr-Tubulin Signal (%)	Glu-Tubulin Signal (%)	Hoechst Signal (%)
3-Aminobenzamide	105	1	101
Actinomycin D	109	2	89
Apigenin	111	4	101
BAPTA-AM	103	0	98
Benomyl	73	0	99
Brefeldin A	98	0	98
Camptothecin	81	0	98
Colchicine	0	0	97
Combretastatin A4	0	0	95
Costunolide	80	0	97
Cycloheximide	101	0	96
Cytochalasin D	79	0	89
Daidzein	97	0	100
Daunorubicin	100	5	55
DMSO	100	0	100
Docetaxel	125	96	100
Epothilone B	130	110	100
Etoposide	101	1	100
Griseofulvin	90	0	101
HA14-1	103	0	99
Homoharringtonine	106	0	96
Latrunculin A	98	0	91
Linomide	97	0	98
Methotrexate	106	2	99
Monastrol	123	3	101
Mycophenolic acid	117	1	101
Nocodazole	0	0	100
Noscapine	84	0	99
Paclitaxel	130	91	100
Parthenolide	77	0	97
Phalloidin	100	1	100
Pifithrin- α	110	0	100
Podophyllotoxin	0	0	94
Pregnenolone	112	1	101
Silibinin	107	1	101
Streptozocin	99	0	100
Vinblastine	82	0	96
Vincristine	90	0	96

checked by immunofluorescence visualization that no detectable effect on HeLa interphase microtubule could be found after 2 h of incubation with 25 μ M of noscapine (data not shown).

A calcium-independent microtubular disassembly induced by BAPTA-AM has been described recently.⁵⁹ This potent depolymerizing effect is observed for many cell types, with the exception of HeLa cells (Yasmina Saoudi, personal communication). This obviously explains why the present assay failed to detect any effect of BAPTA-AM.

Hoechst staining, which allows the measurement of DNA in the nuclei, was initially introduced in our assay to give an indirect estimation of the integrity of the cell monolayer. However, we found that this marker, in combination with the 2 other markers, can give additional information. For example, cells treated with

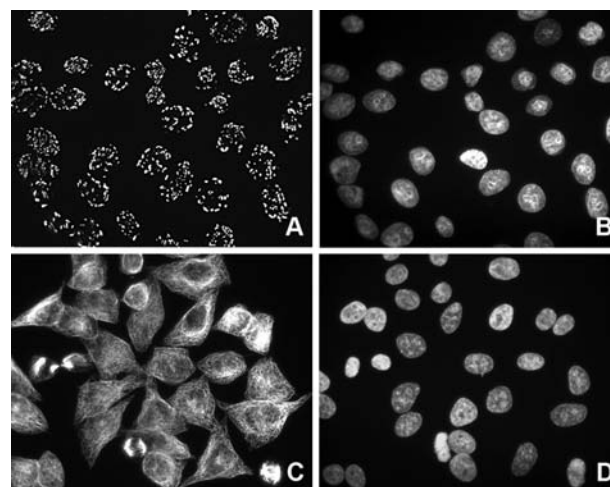


FIG. 10. Vinblastine-induced tubulin paracrystals. HeLa cells grown on coverslips were treated (A, B) or not (C, D) with vinblastine (25 μ M) for 2 h. They were then permeabilized with OPT buffer, fixed with methanol, and processed for immunofluorescence as described in the “Materials and Methods” section. Tyr-tubulin staining (A, C). Corresponding Hoechst staining (B, D).

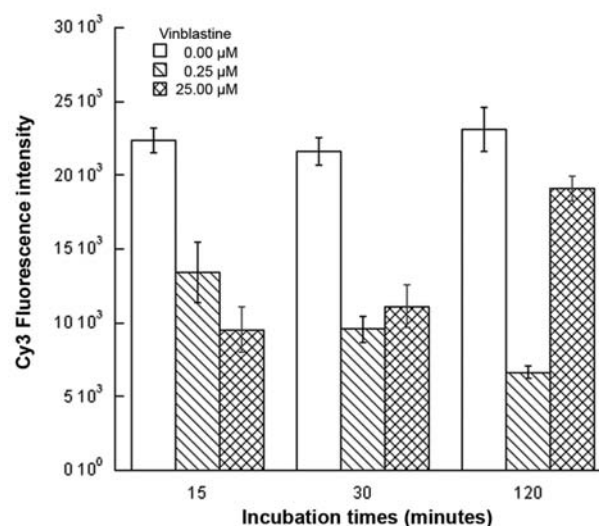


FIG. 11. Effect of the vinblastine's concentrations and incubation's duration on the Tyr-tubulin immunostaining. HeLa cells were seeded on microplates. After 24 h, they were treated for 15, 30, or 120 min with different concentrations of vinblastine as indicated. They were then processed for immunofluorescence as described in the “Materials and Methods” section. Data are mean values \pm SD of 8 replicates.

daunorubicin showed normal fluorescence intensity in Tyr- and Glu-tubulin channels together with a decrease of fluorescence intensity in the Hoechst channel. This decrease could not be the result of the uneven detachment of the cells as the Tyr- and Glu-tubulin signals are normal. In fact, daunorubicin is an

anthracycline antibiotic that is used in cancer chemotherapy.⁶⁴ It has the property to intercalate into the double strand of DNA.⁶⁵ The decrease observed in the Hoechst channel can thus be interpreted as the result of the competitive action of daunorubicin. Although the generalization of this single data should be done cautiously, this result indicates that our assay can also detect DNA intercalating agents, although it was not designed for that specific purpose.

DISCUSSION

Here, we describe a cell-based assay for microtubule poisons. When searching for therapeutic agents, cell-based assays are particularly valuable compared with cell-free assays because they select not only for activity against a particular molecular target but also for other desirable properties, such as the ability to permeate cells and to retain activity in tissue culture medium and in cells.⁶⁶

First-generation tubulin anticancer drugs were discovered via inhibition of cancer cell cultures⁶⁷ and animal studies,⁶⁸ whereas 2nd-generation compounds were mainly developed by direct screening for inhibition of tubulin assembly *in vitro*. Thus, the systematic screening of chemical libraries for antimicrotubule agents relies either on a rather unspecific cell-based assay (i.e., cytotoxicity assays) or on a specific but *in vitro* biochemical assay. Compounds selected by such *in vitro* assays further need to reach their cellular target, and only this one, by crossing the plasma membrane and by avoiding rapid degradation. Although other cell-based screens, suitable for high-throughput approaches, have been described for agents that cause mitotic arrest,^{66,69} a high-throughput assay probing the microtubule polymerization status has not been described to our knowledge.

The main qualities required for a good screening assay are high information content combined with high throughput. The assay we proposed is simple, robust, and multiparametric. It does not require a costly automated cellular imaging and analysis device, such as those designed for high-content screening. It allows the detection, in a single screening campaign, of both agents able to depolymerize the microtubular cytoskeleton and agents that enhance microtubule detyrosination. These latter compounds could be either direct microtubule stabilizers, such as paclitaxel, or compounds regulating the activity of the tubulin tyrosination enzymes. For example, TTL inhibition or TCP activation could result in an enhanced detyrosination of cell microtubules. Such pharmacological agents have not been described yet. However, the final selection of true microtubule-stabilizing agents could be done by secondary assays. These assays could include analysis of the effect of these agents on *in vitro* tubulin assembly or on cellular microtubule cold stability.⁴⁷

Although we have found that this assay is specific of the microtubule network, we could not exclude that, as for microtubule stabilization, microtubule disassembly could result from a direct action of the compounds on tubulin or from an indirect action on other cellular components. Again, the final selection of true microtubule-destabilizing agents would require additional

assays, such as analysis of the effect of the compounds on *in vitro* tubulin assembly.

Microtubule dynamics are highly regulated during the cell cycle by endogenous cellular regulators. The proposed assay is a mean to search not only agents that interact with microtubules but also those that modify microtubule dynamics by other mechanisms, for example, by interacting with microtubule effectors. In the context of the fight against cancer, such compounds, acting on different targets, could be of great interest.

In addition to the 3 measured parameters, we found that the comparative analysis of the results provided supplementary information. The analysis of the daunorubicin effects is an example (see above). Another example could be a compound that induces a decrease of the Tyr-tubulin signal together with a decrease of the Hoechst staining. Such a combinatorial effect could derive from a global effect on cell adhesion, leading to the detachment of cells rather than a true microtubule-depolymerizing effect.

The present assay failed to detect *Vinca* alkaloid agents because of the formation of bright tubulin paracrystals induced by an elevated concentration of these agents. However, we showed that the assay was able to detect such agents when they were tested at lower concentrations. Other depolymerizing drugs, such as maytansine, rhizoxin, or dolastatin⁷⁰ that bind to the *Vinca* domain of tubulin but do not induce paracrystals, should be detected by the assay.

We have used HeLa cells to set up this assay because of their human origin, their epithelial status, and their easy culture. However, this assay could be easily adapted to other cell lines such as cell lines resistant to known microtubule poisons.

In conclusion, the assay described in this article should greatly facilitate the discovery and development of novel microtubule poisons and their characterization in the context of living cells. Moreover, in the context of drug discovery, profiling technologies could be useful in measuring both drug action on a desired target in the cellular milieu and drug actions on other targets.⁷¹ The microtubular cytoskeleton components have been identified as toxicity-modulating hot spots.⁷² Thus, the cell-based assay described here could also find other applications in the context of drug profiling.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank S. Roy for helpful discussions and E. Maréchal and J. Tabony for carefully reading and correcting this article. Supported by grants from the French Région Rhône-Alpes and from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). E.V. is a fellow of the French Région Rhône-Alpes. X.F. is a fellow of ARC.

REFERENCES

1. Jordan MA, Wilson L: Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2004;4:253-265.
2. Wood KW, Cornwell WD, Jackson JR: Past and future of the mitotic spindle as an oncology target. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1:370-377.

3. Giannakakou P, Sackett D, Fojo T: Tubulin/microtubules: still a promising target for new chemotherapeutic agents. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:182-183.
4. Giannakakou P, Gussio R, Nogales E, Downing KH, Zaharevitz D, Bollbuck B, et al: A common pharmacophore for epothilone and taxanes: molecular basis for drug resistance conferred by tubulin mutations in human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2904-2909.
5. Honore S, Kamath K, Braguer D, Horwitz SB, Wilson L, Briand C, et al: Synergistic suppression of microtubule dynamics by discodermolide and paclitaxel in non-small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res* 2004;64:4957-4964.
6. Jordan MA: Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2002;2:1-17.
7. Stachel SJ, Biswas K, Danishefsky SJ: The epothilones, eleutherobins, and related types of molecules. *Curr Pharm Des* 2001;7:1277-1290.
8. Helft PR, Schilsky RL, Hoke FJ, Williams D, Kindler HL, Sprague E, et al: A phase I study of cantuzumab mertansine administered as a single intravenous infusion once weekly in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10:4363-4368.
9. Henry MD, Wen S, Silva MD, Chandra S, Milton M, Worland PJ: A prostate-specific membrane antigen-targeted monoclonal antibody-chemotherapeutic conjugate designed for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res* 2004;64:7995-8001.
10. Tolcher AW, Aylesworth C, Rizzo J, Izbicka E, Campbell E, Kuhn J, et al: A phase I study of rhizoxin (NSC 332598) by 72-hour continuous intravenous infusion in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol* 2000;11:333-338.
11. Perez EA, Hillman DW, Fishkin PA, Krook JE, Tan WW, Kuriakose PA, et al: Phase II trial of dolastatin-10 in patients with advanced breast cancer. *Invest New Drugs* 2005;23:257-261.
12. Simmons TL, Andrianasolo E, McPhail K, Flatt P, Gerwick WH: Marine natural products as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* 2005;4:333-342.
13. Andrieux A, Job D: A role for the cytoskeleton in mental diseases? [in French]. *Med Sci (Paris)* 2003;19:135-137.
14. Andrieux A, Salin PA, Vernet M, Kujala P, Baratier J, Gory-Faure S, et al: The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev* 2002;16:2350-2364.
15. Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J, et al: Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:227-231.
16. Watts NR, Sackett DL, Ward RD, Miller MW, Wingfield PT, Stahl SS, et al: HIV-1 rev depolymerizes microtubules to form stable bilayered rings. *J Cell Biol* 2000;150:349-360.
17. Ruthel G, Demmin GL, Kallstrom G, Javid MP, Badie SS, Will AB, et al: Association of Ebola virus matrix protein VP40 with microtubules. *J Virol* 2005;79:4709-4719.
18. Dohner K, Sodeik B: The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005;285:67-108.
19. Rodriguez A, Samoff E, Rioult MG, Chung A, Andrews NW: Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J Cell Biol* 1996;134:349-362.
20. Estes R, Vogel N, Mack D, McLeod R: Paclitaxel arrests growth of intracellular *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2036-2040.
21. Melo EJ, Carvalho TM, De Souza W: Behaviour of microtubules in cells infected with *Toxoplasma gondii*. *BioCell* 2001;25:53-59.
22. Morrisette NS, Sibley LD: Disruption of microtubules uncouples budding and nuclear division in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 2002;115:1017-1025.
23. Shaw MK, Compton HL, Roos DS, Tilney LG: Microtubules, but not actin filaments, drive daughter cell budding and cell division in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 2000;113(pt 7):1241-1254.
24. Fowler RE, Fookes RE, Lavin F, Bannister LH, Mitchell GH: Microtubules in *Plasmodium falciparum* merozoites and their importance for invasion of erythrocytes. *Parasitology* 1998;117(pt 5):425-433.
25. Peterson JR, Mitchison TJ: Small molecules, big impact: a history of chemical inhibitors and the cytoskeleton. *Chem Biol* 2002;9:1275-1285.
26. Valiron O, Caudron N, Job D: Microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:2069-2084.
27. Barra HS, Rodriguez JA, Arce CA, Caputto R: A soluble preparation from rat brain that incorporates into its own proteins (14 C)arginine by a ribonuclease-sensitive system and (14 C)tyrosine by a ribonuclease-insensitive system. *J Neurochem* 1973;20:97-108.
28. Arce CA, Rodriguez JA, Barra HS, Caputto R: Incorporation of L-tyrosine, L-phenylalanine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine as single units into rat brain tubulin. *Eur J Biochem* 1975;59:145-149.
29. Lafanechère L, Job D: The third tubulin pool. *Neurochem Res* 2000;25:11-18.
30. Barra HS, Arce CA, Argarana CE: Posttranslational tyrosination/detyrosination of tubulin. *Mol Neurobiol* 1988;2:133-153.
31. MacRae TH: Tubulin post-translational modifications—enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem* 1997;244:265-278.
32. Preston SF, Deanin GG, Hanson RK, Gordon MW: The phylogenetic distribution of tubulin:tyrosine ligase. *J Mol Evol* 1979;13:233-244.
33. Sasse R, Gull K: Tubulin post-translational modifications and the construction of microtubular organelles in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 1988;90(pt 4):577-589.
34. Alfa CE, Hyams JS: Microtubules in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* contain only the tyrosinated form of alpha-tubulin. *Cell Motil Cytoskeleton* 1991;18:86-93.
35. Badin-Larcon AC, Boscheron C, Soleilhac JM, Piel M, Mann C, Denarier E, et al: Suppression of nuclear oscillations in *Saccharomyces cerevisiae* expressing Glu tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:5577-5582.
36. Wehland J, Weber K: Tubulin-tyrosine ligase has a binding site on beta-tubulin: a two-domain structure of the enzyme. *J Cell Biol* 1987;104:1059-1067.
37. Wehland J, Weber K: Turnover of the carboxy-terminal tyrosine of alpha-tubulin and means of reaching elevated levels of detyrosination in living cells. *J Cell Sci* 1987;88(pt 2):185-203.
38. Arce CA, Hallak ME, Rodriguez JA, Barra HS, Caputto R: Capability of tubulin and microtubules to incorporate and to release tyrosine and phenylalanine and the effect of the incorporation of these amino acids on tubulin assembly. *J Neurochem* 1978;31:205-210.
39. Webster DR, Gundersen GG, Bulinski JC, Borisy GG: Assembly and turnover of detyrosinated tubulin in vivo. *J Cell Biol* 1987;105:265-276.
40. Gundersen GG, Khawaja S, Bulinski JC: Postpolymerization detyrosination of alpha-tubulin: a mechanism for subcellular differentiation of microtubules. *J Cell Biol* 1987;105:251-264.
41. Kreis TE: Microtubules containing detyrosinated tubulin are less dynamic. *Embo J* 1987;6:2597-2606.
42. Gundersen GG, Kalnoski MH, Bulinski JC: Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo. *Cell* 1984;38:779-789.
43. Schulze E, Asai DJ, Bulinski JC, Kirschner M: Posttranslational modification and microtubule stability. *J Cell Biol* 1987;105:2167-2177.

44. Bosc C, Cronk JD, Pirollet F, Watterson DM, Haiech J, Job D, et al: Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:2125-2130.
45. Westermann S, Weber K: Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:938-947.
46. Paturle-Lafanechère L, Manier M, Trigault N, Pirollet F, Mazarguil H, Job D: Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J Cell Sci* 1994;107(pt 6):1529-1543.
47. Lieuvain A, Labbe JC, Doree M, Job D: Intrinsic microtubule stability in interphase cells. *J Cell Biol* 1994;124:985-996.
48. Daxhelet GA, Coene MM, Hoet PP, Cocito CG: Spectrofluorometry of dyes with DNAs of different base composition and conformation. *Anal Biochem* 1989;179:401-403.
49. Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR: A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 1999;4:67-73.
50. Johnston PA: Cellular platforms for HTS: three case studies. *Drug Discov Today* 2002;7:353-363.
51. Wall ME: Camptothecin and taxol: discovery to clinic. *Med Res Rev* 1998;18:299-314.
52. Falconer M, Smith F, Surah-Narwal S, Congrave G, Liu Z, Hayter P, et al: High-throughput screening for ion channel modulators. *J Biomol Screen* 2002;7:460-465.
53. Pettit GR, Singh SB, Hamel E, Lin CM, Alberts DS, Garcia-Kendall D: Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combretastatin A-4. *Experientia* 1989;45:209-211.
54. Sackett DL: Podophyllotoxin, steganacin and combretastatin: natural products that bind at the colchicine site of tubulin. *Pharmacol Ther* 1993;59:163-228.
55. Davidse LC, Flach W: Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol* 1977;72:174-193.
56. Panda D, Rathinasamy K, Santra MK, Wilson L: Kinetic suppression of microtubule dynamic instability by griseofulvin: implications for its possible use in the treatment of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:9878-9883.
57. Landen JW, Hau V, Wang M, Davis T, Ciliax B, Wainer BH, et al: Noscapine crosses the blood-brain barrier and inhibits glioblastoma growth. *Clin Cancer Res* 2004;10:5187-5201.
58. Ye K, Ke Y, Keshava N, Shanks J, Kapp JA, Tekmal RR, et al: Opium alkaloid noscapine is an antitumor agent that arrests metaphase and induces apoptosis in dividing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:1601-1606.
59. Saoudi Y, Rousseau B, Doussiere J, Charrasse S, Gauthier-Rouviere C, Morin N, et al: Calcium-independent cytoskeleton disassembly induced by BAPTA. *Eur J Biochem* 2004;271:3255-3264.
60. Na GC, Timasheff SN: In vitro vinblastine-induced tubulin paracrystals. *J Biol Chem* 1982;257:10387-10391.
61. Gigant B, Wang C, Ravelli RB, Roussi F, Steinmetz MO, Curmi PA, et al: Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* 2005;435:519-522.
62. Gupta K, Bishop J, Peck A, Brown J, Wilson L, Panda D: Antimitotic antifungal compound benomyl inhibits brain microtubule polymerization and dynamics and cancer cell proliferation at mitosis, by binding to a novel site in tubulin. *Biochemistry* 2004;43:6645-6655.
63. Wehland J, Herzog W, Weber K: Interaction of griseofulvin with microtubules, microtubule protein and tubulin. *J Mol Biol* 1977;111:329-342.
64. Monneret C: Recent developments in the field of antitumour anthracyclines. *Eur J Med Chem* 2001;36:483-493.
65. Di Marco A, Cassinelli G, Arcamone F: The discovery of daunorubicin. *Cancer Treat Rep* 1981;65(4 Suppl):3-8.
66. Roberge M, Cinel B, Anderson HJ, Lim L, Jiang X, Xu L, et al: Cell-based screen for antimitotic agents and identification of analogues of rhizoxin, eleutherobin, and paclitaxel in natural extracts. *Cancer Res* 2000;60:5052-5058.
67. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT: Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971;93:2325-2327.
68. Noble RL: The discovery of the vinca alkaloids—chemotherapeutic agents against cancer. *Biochem Cell Biol* 1990;68:1344-1351.
69. Mayer TU, Kapoor TM, Haggarty SJ, King RW, Schreiber SL, Mitchison TJ: Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* 1999;286:971-974.
70. Gupta S, Bhattacharyya B: Antimicrotubular drugs binding to vinca domain of tubulin. *Mol Cell Biochem* 2003;253:41-47.
71. Perlman ZE, Slack MD, Feng Y, Mitchison TJ, Wu LF, Altschuler SJ: Multi-dimensional drug profiling by automated microscopy. *Science* 2004;306:1194-1198.
72. Begley TJ, Rosenbach AS, Ideker T, Samson LD: Hot spots for modulating toxicity identified by genomic phenotyping and localization mapping. *Mol Cell* 2004;16:117-125.

Address reprint requests to:

Laurence Lafanechère
CNRS, INSERM U366-CS/DRDC/CEA Grenoble
17, rue des Martyrs
38054 Grenoble Cedex 09, France

E-mail: laurence.lafanechere@cea.fr

Références bibliographiques

- Aiken, C. T., Tobin, A. J. and Schweitzer, E. S.** (2004). "A cell-based screen for drugs to treat Huntington's disease." *Neurobiol Dis* 16(3): 546-55.
- Aizawa, H., Kawasaki, H., Murofushi, H., Kotani, S., Suzuki, K. and Sakai, H.** (1989). "A common amino acid sequence in 190-kDa microtubule-associated protein and tau for the promotion of microtubule assembly." *J Biol Chem* 264(10): 5885-90.
- Altmann, K. H.** (2001). "Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs." *Curr Opin Chem Biol* 5(4): 424-31.
- Andersen, S. S. and Karsenti, E.** (1997). "XMAP310: a *Xenopus* rescue-promoting factor localized to the mitotic spindle." *J Cell Biol* 139(4): 975-83.
- Audebert, S., Koulakoff, A., Berwald-Netter, Y., Gros, F., Denoulet, P. and Edde, B.** (1994). "Developmental regulation of polyglutamylated alpha- and beta-tubulin in mouse brain neurons." *J Cell Sci* 107 (Pt 8): 2313-22.
- Bach, S., Knockaert, M., Reinhardt, J., Lozach, O., Schmitt, S., Baratte, B., Koken, M., Coburn, S. P., Tang, L., Jiang, T., Liang, D. C., Galons, H., Dierick, J. F., Pinna, L. A., Meggio, F., Totzke, F., Schachtele, C., Lerman, A. S., Carnero, A., Wan, Y., Gray, N. and Meijer, L.** (2005). "Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase." *J Biol Chem* 280(35): 31208-19.
- Baker, K., Sengupta, D., Salazar-Jimenez, G. and Cornish, V. W.** (2003). "An optimized dexamethasone-methotrexate yeast 3-hybrid system for high-throughput screening of small molecule-protein interactions." *Anal Biochem* 315(1): 134-7.
- Barron, D. M., Chatterjee, S. K., Ravindra, R., Roof, R., Baloglu, E., Kingston, D. G. and Bane, S.** (2003). "A fluorescence-based high-throughput assay for antimicrotubule drugs." *Anal Biochem* 315(1): 49-56.
- Becker, F., Murthi, K., Smith, C., Come, J., Costa-Roldan, N., Kaufmann, C., Hanke, U., Degenhart, C., Baumann, S., Wallner, W., Huber, A., Dedier, S., Dill, S., Kinsman, D., Hediger, M., Bockovich, N., Meier-Ewert, S., Kluge, A. F. and Kley, N.** (2004). "A three-hybrid approach to scanning the proteome for targets of small molecule kinase inhibitors." *Chem Biol* 11(2): 211-23.
- Belmont, L., Mitchison, T. and Deacon, H. W.** (1996a). "Catastrophic revelations about Op18/stathmin." *Trends Biochem Sci* 21(6): 197-8.
- Belmont, L. D. and Mitchison, T. J.** (1996b). "Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules." *Cell* 84(4): 623-31.
- Bernhardt, R. and Matus, A.** (1984). "Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeletons." *J Comp Neurol* 226(2): 203-21.

- Bode, C. J., Gupta, M. L., Jr., Reiff, E. A., Suprenant, K. A., Georg, G. I. and Himes, R. H.** (2002). "Epothilone and paclitaxel: unexpected differences in promoting the assembly and stabilization of yeast microtubules." *Biochemistry* 41(12): 3870-4.
- Bollag, D. M., McQueney, P. A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Lazarides, E. and Woods, C. M.** (1995). "Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action." *Cancer Res* 55(11): 2325-33.
- Bonnet, C., Boucher, D., Lazereg, S., Pedrotti, B., Islam, K., Denoulet, P. and Larcher, J. C.** (2001). "Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation." *J Biol Chem* 276(16): 12839-48.
- Borisy, G. G. and Taylor, E. W.** (1967). "The mechanism of action of colchicine. Binding of colchicine-3H to cellular protein." *J Cell Biol* 34(2): 525-33.
- Bosc, C., Andrieux, A. and Job, D.** (2003). "STOP proteins." *Biochemistry* 42(42): 12125-32.
- Bosc, C., Oenarier, E., Andrieux, A. and Job, D.** (1999). "STOP proteins." *Cell Struct Funct* 24(5): 393-9.
- Brenner, S.** (1974). "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." *Genetics* 77(1): 71-94.
- Brion, J. P., Guilleminot, J., Couchie, D., Flament-Durand, J. and Nunez, J.** (1988). "Both adult and juvenile tau microtubule-associated proteins are axon specific in the developing and adult rat cerebellum." *Neuroscience* 25(1): 139-46.
- Bu, W. and Su, L. K.** (2003). "Characterization of functional domains of human EB1 family proteins." *J Biol Chem* 278(50): 49721-31.
- Bulinski, J. C. and Borisy, G. G.** (1980). "Immunofluorescence localization of HeLa cell microtubule-associated proteins on microtubules in vitro and in vivo." *J Cell Biol* 87(3 Pt 1): 792-801.
- Bulinski, J. C., McGraw, T. E., Gruber, D., Nguyen, H. L. and Sheetz, M. P.** (1997). "Overexpression of MAP4 inhibits organelle motility and trafficking in vivo." *J Cell Sci* 110 (Pt 24): 3055-64.
- Burke, M. D. and Schreiber, S. L.** (2004). "A planning strategy for diversity-oriented synthesis." *Angew Chem Int Ed Engl* 43(1): 46-58.
- Caron, J. M.** (1997). "Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: I. In vivo and cell-free studies." *Mol Biol Cell* 8(4): 621-36.
- Caron, J. M., Vega, L. R., Fleming, J., Bishop, R. and Solomon, F.** (2001). "Single site alpha-tubulin mutation affects astral microtubules and nuclear positioning during anaphase in *Saccharomyces cerevisiae*: possible role for palmitoylation of alpha-tubulin." *Mol Biol Cell* 12(9): 2672-87.

- Cassimeris, L.** (2002). "The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers." *Curr Opin Cell Biol* 14(1): 18-24.
- Cassimeris, L., Pryer, N. K. and Salmon, E. D.** (1988). "Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells." *J Cell Biol* 107(6 Pt 1): 2223-31.
- Cassimeris, L. and Spittle, C.** (2001). "Regulation of microtubule-associated proteins." *Int Rev Cytol* 210: 163-226.
- Cavalier-Smith, T.** (1987). "The origin of eukaryotic and archaebacterial cells." *Ann N Y Acad Sci* 503: 17-54.
- Chang, P., Giddings, T. H., Jr., Winey, M. and Stearns, T.** (2003). "Epsilon-tubulin is required for centriole duplication and microtubule organization." *Nat Cell Biol* 5(1): 71-6.
- Chang, P. and Stearns, T.** (2000). "Delta-tubulin and epsilon-tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function." *Nat Cell Biol* 2(1): 30-5.
- Chardin, P. and McCormick, F.** (1999). "Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive." *Cell* 97(2): 153-5.
- Chretien, D. and Wade, R. H.** (1991). "New data on the microtubule surface lattice." *Biol Cell* 71(1-2): 161-74.
- Cleveland, D. W. and Havercroft, J. C.** (1983). "Is apparent autoregulatory control of tubulin synthesis nontranscriptionally regulated?" *J Cell Biol* 97(3): 919-24.
- Cleveland, D. W. and Sullivan, K. F.** (1985). "Molecular biology and genetics of tubulin." *Annu Rev Biochem* 54: 331-65.
- Cory, S., Huang, D. C. and Adams, J. M.** (2003). "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis." *Oncogene* 22(53): 8590-607.
- Curmi, P. A., Andersen, S. S., Lachkar, S., Gavet, O., Karsenti, E., Knossow, M. and Sobel, A.** (1997). "The stathmin/tubulin interaction in vitro." *J Biol Chem* 272(40): 25029-36.
- D'Ambrosio, M., Guerriero, A. and Pietra, F.** (1987). "Sarcodictyin A and sarcodictyin B, novel diterpenoidic alcohols esterified by (E)-N(1)-methylurocanic acid. Isolation from the Mediterranean stolonifer *Sarcodictyon roseum*." *Helvetica chimica acta* 70(8): 2019-2027.
- De Brabander, M., Geuens, G., Nuydens, R., Willebrords, R. and De Mey, J.** (1982). "Microtubule stability and assembly in living cells: the influence of metabolic inhibitors, taxol and pH." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 46 Pt 1: 227-40.

- De Brabander, M., Van de Veire, R., Aerts, F., Geuens, G. and Bornens, M.** (1975). Oncodazole (R17934): a new anti-cancer drug interfering with microtubules. Amsterdam:North Holland/, Elsevier.
- Denarier, E., Fourest-Lieuvin, A., Bosc, C., Pirollet, F., Chapel, A., Margolis, R. L. and Job, D.** (1998). "Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 6055-60.
- Denis, J. N., Greene, A. E., Guenard, D., Gueritte-Voegelein, F., Mangatal, L. and Potier, P.** (1988). "A highly efficient, practical approach to natural taxol." *J Am Chem Soc.*
- Desai, A. and Mitchison, T. J.** (1997). "Microtubule polymerization dynamics." *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 83-117.
- Desai, A., Verma, S., Mitchison, T. J. and Walczak, C. E.** (1999). "Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes." *Cell* 96(1): 69-78.
- Di Marco, A., Cassinelli, G. and Arcamone, F.** (1981). "The discovery of daunorubicin." *Cancer Treat Rep* 65 Suppl 4: 3-8.
- Diaz, J. F. and Andreu, J. M.** (1993). "Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: reversibility, ligand stoichiometry, and competition." *Biochemistry* 32(11): 2747-55.
- Dixon, S. L. and Villar, H. O.** (1998). "Bioactive diversity and screening library selection via affinity fingerprinting." *J Chem Inf Comput Sci* 38(6): 1192-203.
- Dolma, S., Lessnick, S. L., Hahn, W. C. and Stockwell, B. R.** (2003). "Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells." *Cancer Cell* 3(3): 285-96.
- Downing, K. H.** (2000). "Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics." *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 89-111.
- Dustin, P.** (1984). Microtubules. Berlin, Springer-Verlag.
- Dutcher, S. K. and Trabuco, E. C.** (1998). "The UNI3 gene is required for assembly of basal bodies of Chlamydomonas and encodes delta-tubulin, a new member of the tubulin superfamily." *Mol Biol Cell* 9(6): 1293-308.
- Edde, B., Rossier, J., Le Caer, J. P., Desbruyeres, E., Gros, F. and Denoulet, P.** (1990). "Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin." *Science* 247(4938): 83-5.
- Eggen, M. and Georg, G. I.** (2002). "The cryptophycins: their synthesis and anticancer activity." *Med Res Rev* 22(2): 85-101.
- Eipper, B. A.** (1972). "Rat brain microtubule protein: purification and determination of covalently bound phosphate and carbohydrate." *Proc Natl Acad Sci U S A* 69(8): 2283-7.

- Eldridge, G. R., Vervoort, H. C., Lee, C. M., Cremin, P. A., Williams, C. T., Hart, S. M., Goering, M. G., O'Neil-Johnson, M. and Zeng, L.** (2002). "High-throughput method for the production and analysis of large natural product libraries for drug discovery." *Anal Chem* 74(16): 3963-71.
- Enomoto, T.** (1996). "Microtubule disruption induces the formation of actin stress fibers and focal adhesions in cultured cells: possible involvement of the rho signal cascade." *Cell Struct Funct* 21(5): 317-26.
- Erickson, H. P.** (2000). "Gamma-tubulin nucleation: template or protofilament?" *Nat Cell Biol* 2(6): E93-6.
- Ersfeld, K., Wehland, J., Plessmann, U., Dodemont, H., Gerke, V. and Weber, K.** (1993). "Characterization of the tubulin-tyrosine ligase." *J Cell Biol* 120(3): 725-32.
- Farrell, K. W., Jordan, M. A., Miller, H. P. and Wilson, L.** (1987). "Phase dynamics at microtubule ends: the coexistence of microtubule length changes and treadmilling." *J Cell Biol* 104(4): 1035-46.
- Fink, S. L. and Cookson, B. T.** (2005). "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells." *Infect Immun* 73(4): 1907-16.
- Fonrose, X., Ausseil, F., Soleilhac, E., Masson, V., David, B., Pouny, I., Cintrat, J. C., Rousseau, B., Barette, C., Massiot, G. and Lafanechere, L.** (2007). "Parthenolide inhibits tubulin carboxypeptidase activity." *Cancer Res* 67(7): 3371-8.
- Fourest-Lieuvin, A., Peris, L., Gache, V., Garcia-Saez, I., Juillan-Binard, C., Lantéz, V. and Job, D.** (2006). "Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1." *Mol Biol Cell* 17(3): 1041-50.
- Frame, M. C. and Brunton, V. G.** (2002). "Advances in Rho-dependent actin regulation and oncogenic transformation." *Curr Opin Genet Dev* 12(1): 36-43.
- Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M. C., Friocourt, G., McDonnell, N., Reiner, O., Kahn, A., McConnell, S. K., Berwald-Netter, Y., Denoulet, P. and Chelly, J.** (1999). "Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons." *Neuron* 23(2): 247-56.
- Gaertig, J., Cruz, M. A., Bowen, J., Gu, L., Pennock, D. G. and Gorovsky, M. A.** (1995). "Acetylation of lysine 40 in alpha-tubulin is not essential in *Tetrahymena thermophila*." *J Cell Biol* 129(5): 1301-10.
- Gard, D. L. and Kirschner, M. W.** (1985). "A polymer-dependent increase in phosphorylation of beta-tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma cell line." *J Cell Biol* 100(3): 764-74.

- Garner, C. C. and Matus, A.** (1988). "Different forms of microtubule-associated protein 2 are encoded by separate mRNA transcripts." *J Cell Biol* 106(3): 779-83.
- Gerth, K., Bedorf, N., Hofle, G., Irschik, H. and Reichenbach, H.** (1996). "Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties." *J Antibiot (Tokyo)* 49(6): 560-3.
- Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N. and Wendoloski, J. J.** (1999). "A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases." *J Comb Chem* 1(1): 55-68.
- Gigant, B., Curmi, P. A., Martin-Barbey, C., Charbaut, E., Lachkar, S., Lebeau, L., Siavoshian, S., Sobel, A. and Knossow, M.** (2000). "The 4 Å X-ray structure of a tubulin:stathmin-like domain complex." *Cell* 102(6): 809-16.
- Gigant, B., Wang, C., Ravelli, R. B., Roussi, F., Steinmetz, M. O., Curmi, P. A., Sobel, A. and Knossow, M.** (2005). "Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine." *Nature* 435(7041): 519-22.
- Gonzales-Garay, M. L. and Cabral, F.** (1995). "Overexpression of an epitope-tagged β -tubulin in Chinese Hamster Ovary cells causes an increase in endogenous α -tubulin synthesis." *Cell Motil Cytoskeleton* 31: 259-272.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J. and David, M. M.** (1949). "Determination of serum proteins by means of the biuret reaction." *J Biol Chem* 177(2): 751-66.
- Gueritte-Voegelein, F., Guenard, D., Lavelle, F., Le Goff, M. T., Mangatal, L. and Potier, P.** (1991). "Relationships between the structure of taxol analogues and their antimitotic activity." *J Med Chem* 34(3): 992-8.
- Guiffant, D., Tribouillard, D., Gug, F., Galons, H., Meijer, L., Blondel, M. and Bach, S.** (2007). "Identification of intracellular targets of small molecular weight chemical compounds using affinity chromatography." *Biotechnol J* 2(1): 68-75.
- Guillaud, L., Bosc, C., Fourest-Lieuvin, A., Denarier, E., Pirollet, F., Lafanechere, L. and Job, D.** (1998). "STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells." *J Cell Biol* 142(1): 167-79.
- Gundersen, G. G., Kalnoski, M. H. and Bulinski, J. C.** (1984). "Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo." *Cell* 38(3): 779-89.
- Gundersen, G. G., Khawaja, S. and Bulinski, J. C.** (1987). "Postpolymerization detyrosination of alpha-tubulin: a mechanism for subcellular differentiation of microtubules." *J Cell Biol* 105(1): 251-64.
- Gupta, K., Bishop, J., Peck, A., Brown, J., Wilson, L. and Panda, D.** (2004). "Antimitotic antifungal compound benomyl inhibits brain microtubule

- polymerization and dynamics and cancer cell proliferation at mitosis, by binding to a novel site in tubulin." *Biochemistry* 43(21): 6645-55.
- Guyomard, C., Rialland, L., Fremond, B., Chesne, C. and Guillouzo, A.** (1996). "Influence of alginate gel entrapment and cryopreservation on survival and xenobiotic metabolism capacity of rat hepatocytes." *Toxicol Appl Pharmacol* 141(2): 349-56.
- Haggarty, S. J., Mayer, T. U., Miyamoto, D. T., Fathi, R., King, R. W., Mitchison, T. J. and Schreiber, S. L.** (2000). "Dissecting cellular processes using small molecules: identification of colchicine-like, taxol-like and other small molecules that perturb mitosis." *Chem Biol* 7(4): 275-86.
- Hamel, E. and Lin, C. M.** (1983). "Interactions of combretastatin, a new plant-derived antimetabolic agent, with tubulin." *Biochem Pharmacol* 32(24): 3864-7.
- Hari, M., Loganzo, F., Annable, T., Tan, X., Musto, S., Morilla, D. B., Nettles, J. H., Snyder, J. P. and Greenberger, L. M.** (2006). "Paclitaxel-resistant cells have a mutation in the paclitaxel-binding region of beta-tubulin (Asp26Glu) and less stable microtubules." *Mol Cancer Ther* 5(2): 270-8.
- Hartwell, L. H.** (1991). "Twenty-five years of cell cycle genetics." *Genetics* 129(4): 975-80.
- Heggeness, M. H., Simon, M. and Singer, S. J.** (1978). "Association of mitochondria with microtubules in cultured cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(8): 3863-6.
- Himes, R. H.** (1991). "Interactions of the catharanthus (Vinca) alkaloids with tubulin and microtubules." *Pharmacol Ther* 51(2): 257-67.
- Himmler, A.** (1989). "Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family." *Mol Cell Biol* 9(4): 1389-96.
- Homma, N., Takei, Y., Tanaka, Y., Nakata, T., Terada, S., Kikkawa, M., Noda, Y. and Hirokawa, N.** (2003). "Kinesin superfamily protein 2A (KIF2A) functions in suppression of collateral branch extension." *Cell* 114(2): 229-39.
- Horesh, D., Sapir, T., Francis, F., Wolf, S. G., Caspi, M., Elbaum, M., Chelly, J. and Reiner, O.** (1999). "Doublecortin, a stabilizer of microtubules." *Hum Mol Genet* 8(9): 1599-610.
- Howard, J. and Hyman, A. A.** (2003). "Dynamics and mechanics of the microtubule plus end." *Nature* 422(6933): 753-8.
- Howell, B., Larsson, N., Gullberg, M. and Cassimeris, L.** (1999). "Dissociation of the tubulin-sequestering and microtubule catastrophe-promoting activities of oncoprotein 18/stathmin." *Mol Biol Cell* 10(1): 105-18.
- Htun, H., Barsony, J., Renyi, I., Gould, D. L. and Hager, G. L.** (1996). "Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intranuclear organization in living cells with a green fluorescent protein chimera." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(10): 4845-50.

- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X. F. and Yao, T. P.** (2002). "HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase." *Nature* 417(6887): 455-8.
- Hung, D. T., Nerenberg, J. B. and Schreiber, S. L.** (1994). "Distinct binding and cellular properties of synthetic (+)- and (-)-discodermolides." *Chem Biol* 1(1): 67-71.
- Itoh, T. J. and Hotani, H.** (1994). "Microtubule-stabilizing activity of microtubule-associated proteins (MAPs) is due to increase in frequency of rescue in dynamic instability: shortening length decreases with binding of MAPs onto microtubules." *Cell Struct Funct* 19(5): 279-90.
- Janke, C., Rogowski, K., Wloga, D., Regnard, C., Kajava, A. V., Strub, J. M., Temurak, N., van Dijk, J., Boucher, D., van Dorsselaer, A., Suryavanshi, S., Gaertig, J. and Edde, B.** (2005). "Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family." *Science* 308(5729): 1758-62.
- Jin, Y., Yu, J. and Yu, Y. G.** (2002). "Identification of hNopp140 as a binding partner for doxorubicin with a phage display cloning method." *Chem Biol* 9(2): 157-62.
- Job, D., Valiron, O. and Oakley, B.** (2003). "Microtubule nucleation." *Curr Opin Cell Biol* 15(1): 111-7.
- Johnston, P. A.** (2002). "Cellular platforms for HTS: three case studies." *Drug Discov Today* 7(6): 353-63.
- Jordan, M. A., Margolis, R. L., Himes, R. H. and Wilson, L.** (1986). "Identification of a distinct class of vinblastine binding sites on microtubules." *J Mol Biol* 187(1): 61-73.
- Jordan, M. A. and Wilson, L.** (1990). "Kinetic analysis of tubulin exchange at microtubule ends at low vinblastine concentrations." *Biochemistry* 29(11): 2730-9.
- Jordan, M. A. and Wilson, L.** (2004). "Microtubules as a target for anticancer drugs." *Nat Rev Cancer* 4(4): 253-65.
- Joshi, H. C., Palacios, M. J., McNamara, L. and Cleveland, D. W.** (1992). "Gamma-tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation." *Nature* 356(6364): 80-3.
- Jourdain, L., Curmi, P., Sobel, A., Pantaloni, D. and Carlier, M. F.** (1997). "Stathmin: a tubulin-sequestering protein which forms a ternary T2S complex with two tubulin molecules." *Biochemistry* 36(36): 10817-21.
- Kalemkerian, G. P., Ou, X., Adil, M. R., Rosati, R., Khouli, M. M., Madan, S. K. and Pettit, G. R.** (1999). "Activity of dolastatin 10 against small-cell lung cancer in vitro and in vivo: induction of apoptosis and bcl-2 modification." *Cancer Chemother Pharmacol* 43(6): 507-15.

- Kar, S., Fan, J., Smith, M. J., Goedert, M. and Amos, L. A.** (2003a). "Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol." *EMBO J* 22(1): 70-7.
- Kar, S., Florence, G. J., Paterson, I. and Amos, L. A.** (2003b). "Discodermolide interferes with the binding of tau protein to microtubules." *FEBS Lett* 539(1-3): 34-6.
- Karsenti, E. and Vernos, I.** (2001). "The mitotic spindle: a self-made machine." *Science* 294(5542): 543-7.
- Kau, T. R., Schroeder, F., Ramaswamy, S., Wojciechowski, C. L., Zhao, J. J., Roberts, T. M., Clardy, J., Sellers, W. R. and Silver, P. A.** (2003). "A chemical genetic screen identifies inhibitors of regulated nuclear export of a Forkhead transcription factor in PTEN-deficient tumor cells." *Cancer Cell* 4(6): 463-76.
- Khodiyar, V. K., Maltais, L. J., Sneddon, K. M., Smith, J. R., Shimoyama, M., Cabral, F., Dumontet, C., Dutcher, S. K., Harvey, R. J., Lafanechere, L., Murray, J. M., Nogales, E., Piquemal, D., Stanchi, F., Povey, S. and Lovering, R. C.** (2007). "A revised nomenclature for the human and rodent alpha-tubulin gene family." *Genomics* 90(2): 285-9.
- Kim, M. H., Cierpicki, T., Derewenda, U., Krowarsch, D., Feng, Y., Devedjiev, Y., Dauter, Z., Walsh, C. A., Otlewski, J., Bushweller, J. H. and Derewenda, Z. S.** (2003). "The DCX-domain tandems of doublecortin and doublecortin-like kinase." *Nat Struct Biol* 10(5): 324-33.
- Kley, N.** (2004). "Chemical dimerizers and three-hybrid systems: scanning the proteome for targets of organic small molecules." *Chem Biol* 11(5): 599-608.
- Krendel, M., Zenke, F. T. and Bokoch, G. M.** (2002). "Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton." *Nat Cell Biol* 4(4): 294-301.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
- Lafanechere, L. and Job, D.** (2000). "The third tubulin pool." *Neurochem Res* 25(1): 11-8.
- Landen, J. W., Hau, V., Wang, M., Davis, T., Ciliax, B., Wainer, B. H., Van Meir, E. G., Glass, J. D., Joshi, H. C. and Archer, D. R.** (2004). "Noscapine crosses the blood-brain barrier and inhibits glioblastoma growth." *Clin Cancer Res* 10(15): 5187-201.
- Larsson, N., Marklund, U., Gradin, H. M., Brattsand, G. and Gullberg, M.** (1997). "Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis." *Mol Cell Biol* 17(9): 5530-9.

- LeDizet, M. and Piperno, G.** (1987). "Identification of an acetylation site of Chlamydomonas alpha-tubulin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(16): 5720-4.
- Lewis, S. A., Tian, G., Vainberg, I. E. and Cowan, N. J.** (1996). "Chaperonin-mediated folding of actin and tubulin." *J Cell Biol* 132(1-2): 1-4.
- Lieuvin, A., Labbe, J. C., Doree, M. and Job, D.** (1994). "Intrinsic microtubule stability in interphase cells." *J Cell Biol* 124(6): 985-96.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. and Feeney, P. J.** (2001). "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings." *Adv Drug Deliv Rev* 46(1-3): 3-26.
- Little, M. and Seehaus, T.** (1988). "Comparative analysis of tubulin sequences." *Comp Biochem Physiol B* 90(4): 655-70.
- Liu, S. Y., Hwang, B. D., Liu, Z. C. and Cheng, Y. C.** (1989). "Interaction of several nucleoside triphosphate analogues and 10-hydroxycamptothecin with human DNA topoisomerases." *Cancer Res* 49(6): 1366-70.
- Lokey, R. S.** (2003). "Forward chemical genetics: progress and obstacles on the path to a new pharmacopoeia." *Curr Opin Chem Biol* 7(1): 91-6.
- Long, B. H., Carboni, J. M., Wasserman, A. J., Cornell, L. A., Casazza, A. M., Jensen, P. R., Lindel, T., Fenical, W. and Fairchild, C. R.** (1998). "Eleutherobin, a novel cytotoxic agent that induces tubulin polymerization, is similar to paclitaxel (Taxol)." *Cancer Res* 58(6): 1111-5.
- Lowe, J., Li, H., Downing, K. H. and Nogales, E.** (2001). "Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution." *J Mol Biol* 313(5): 1045-57.
- Lu, Q. and Luduena, R. F.** (1994). "In vitro analysis of microtubule assembly of isotypically pure tubulin dimers. Intrinsic differences in the assembly properties of alpha beta II, alpha beta III, and alpha beta IV tubulin dimers in the absence of microtubule-associated proteins." *J Biol Chem* 269(3): 2041-7.
- Luduena, R. F.** (1998). "Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications." *Int Rev Cytol* 178: 207-75.
- Mabjeesh, N. J.** (2003). "2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF." *Cancer Cell* 3(4): 363-375.
- Maiato, H., Rieder, C. L. and Khodjakov, A.** (2004). "Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis." *J Cell Biol* 167(5): 831-40.
- Malo, N., Hanley, J. A., Cerquozzi, S., Pelletier, J. and Nadon, R.** (2006). "Statistical practice in high-throughput screening data analysis." *Nat Biotechnol* 24(2): 167-75.

- Mangatal, L., Adeline, M. T., Guénard, D., Guéritte-Voegelein, F. and Potier, P.** (1989). "Application of the vicinal oxyamination reaction with asymmetric induction to the hemisynthesis of taxol and analogues." *Tetrahedron* 45(13): 4177-4190.
- Mann, J.** (2002). "Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future." *Nat Rev Cancer* 2(2): 143-8.
- Margolis, R. L., Rauch, C. T. and Wilson, L.** (1980). "Mechanism of colchicine-dimer addition to microtubule ends: implications for the microtubule polymerization mechanism." *Biochemistry* 19(24): 5550-7.
- Margolis, R. L. and Wilson, L.** (1977). "Addition of colchicine--tubulin complex to microtubule ends: the mechanism of substoichiometric colchicine poisoning." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(8): 3466-70.
- Margolis, R. L. and Wilson, L.** (1978). "Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro." *Cell* 13(1): 1-8.
- Martin, M. A., Osmani, S. A. and Oakley, B. R.** (1997). "The role of gamma-tubulin in mitotic spindle formation and cell cycle progression in *Aspergillus nidulans*." *J Cell Sci* 110 (Pt 5): 623-33.
- Mathe, G., Hayat, M., De Vassal, F., Schwarzenberg, L., Schneider, M., Schlumberger, J. R., Jasmin, C. and Rosenfeld, C.** (1970). "Methoxy-9-ellipticine lactate. 3. Clinical screening: its action in acute myeloblastic leukaemia." *Rev Eur Etud Clin Biol* 15(5): 541-5.
- Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Horinouchi, S. and Yoshida, M.** (2002). "In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation." *EMBO J* 21(24): 6820-31.
- Mayer, T. U.** (2003). "Chemical genetics: tailoring tools for cell biology." *Trends Cell Biol* 13(5): 270-7.
- Mayer, T. U., Kapoor, T. M., Haggarty, S. J., King, R. W., Schreiber, S. L. and Mitchison, T. J.** (1999). "Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen." *Science* 286(5441): 971-4.
- Melander Gradin, H., Marklund, U., Larsson, N., Chatila, T. A. and Gullberg, M.** (1997). "Regulation of microtubule dynamics by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase IV/Gr-dependent phosphorylation of oncoprotein 18." *Mol Cell Biol* 17(6): 3459-67.
- Metoz, F., Arnal, I. and Wade, R. H.** (1997). "Tomography without tilt: three-dimensional imaging of microtubule/motor complexes." *J Struct Biol* 118(2): 159-68.
- Mitchison, T. and Kirschner, M.** (1984). "Dynamic instability of microtubule growth." *Nature* 312(5991): 237-42.

- Monneret, C.** (2001). "Recent developments in the field of antitumour anthracyclines." *Eur J Med Chem* 36(6): 483-93.
- Mooberry, S. L., Tien, G., Hernandez, A. H., Plubrukarn, A. and Davidson, B. S.** (1999). "Laulimalide and isolaulimalide, new paclitaxel-like microtubule-stabilizing agents." *Cancer Res* 59(3): 653-60.
- Moore, K. and Rees, S.** (2001). "Cell-based versus isolated target screening: how lucky do you feel?" *J Biomol Screen* 6(2): 69-74.
- Nguyen, H. L., Chari, S., Gruber, D., Lue, C. M., Chapin, S. J. and Bulinski, J. C.** (1997). "Overexpression of full- or partial-length MAP4 stabilizes microtubules and alters cell growth." *J Cell Sci* 110 (Pt 2): 281-94.
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R. A. and Downing, K. H.** (1999). "High-resolution model of the microtubule." *Cell* 96(1): 79-88.
- Nogales, E., Wolf, S. G. and Downing, K. H.** (1998). "Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography." *Nature* 391(6663): 199-203.
- Nogales, E., Wolf, S. G., Khan, I. A., Luduena, R. F. and Downing, K. H.** (1995). "Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site." *Nature* 375(6530): 424-7.
- North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M. and Verdin, E.** (2003). "The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase." *Mol Cell* 11(2): 437-44.
- Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E.** (1980). "Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*." *Nature* 287(5785): 795-801.
- Oakley, B. R.** (1995). "Cell biology. A nice ring to the centrosome." *Nature* 378(6557): 555-6.
- Oakley, C. E. and Oakley, B. R.** (1989). "Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*." *Nature* 338(6217): 662-4.
- Olson, K. R., McIntosh, J. R. and Olmsted, J. B.** (1995). "Analysis of MAP 4 function in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras." *J Cell Biol* 130(3): 639-50.
- Ozols, J. and Caron, J. M.** (1997). "Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: II. Identification of sites of palmitoylation." *Mol Biol Cell* 8(4): 637-45.
- Ozon, S., Maucuer, A. and Sobel, A.** (1997). "The stathmin family -- molecular and biological characterization of novel mammalian proteins expressed in the nervous system." *Eur J Biochem* 248(3): 794-806.
- Panda, D., DeLuca, K., Williams, D., Jordan, M. A. and Wilson, L.** (1998). "Antiproliferative mechanism of action of cryptophycin-52: kinetic stabilization

- of microtubule dynamics by high-affinity binding to microtubule ends." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16): 9313-8.
- Panda, D., Miller, H. P., Banerjee, A., Luduena, R. F. and Wilson, L.** (1994). "Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(24): 11358-62.
- Paturle-Lafanechere, L., Edde, B., Denoulet, P., Van Dorsselaer, A., Mazarguil, H., Le Caer, J. P., Wehland, J. and Job, D.** (1991). "Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated." *Biochemistry* 30(43): 10523-8.
- Paturle-Lafanechere, L., Manier, M., Trigault, N., Pirollet, F., Mazarguil, H. and Job, D.** (1994). "Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies." *J Cell Sci* 107 (Pt 6): 1529-43.
- Pedrotti, B. and Islam, K.** (1996). "Dephosphorylated but not phosphorylated microtubule associated protein MAP1B binds to microfilaments." *FEBS Lett* 388(2-3): 131-3.
- Pelish, H. E., Westwood, N. J., Feng, Y., Kirchhausen, T. and Shair, M. D.** (2001). "Use of biomimetic diversity-oriented synthesis to discover galanthamine-like molecules with biological properties beyond those of the natural product." *J Am Chem Soc* 123(27): 6740-1.
- Peterson, J. R. and Mitchison, T. J.** (2002). "Small molecules, big impact: a history of chemical inhibitors and the cytoskeleton." *Chem Biol* 9(12): 1275-85.
- Pettit, G. R., Singh, S. B., Hamel, E., Lin, C. M., Alberts, D. S. and Garcia-Kendall, D.** (1989). "Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combretastatin A-4." *Experientia* 45(2): 209-11.
- Pienta, K. J. and Coffey, D. S.** (1991). "Cell motility as a chemotherapeutic target." *Cancer Surv* 11: 255-63.
- Pugacheva, E. N., Jablonski, S. A., Hartman, T. R., Henske, E. P. and Golemis, E. A.** (2007). "HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium." *Cell* 129(7): 1351-63.
- Ramus, C., Gonzalez de Peredo, A., Dahout, C., Gallagher, M. and Garin, J.** (2006). "An optimized strategy for ICAT quantification of membrane proteins." *Mol Cell Proteomics* 5(1): 68-78.
- Ranganathan, S., Dexter, D. W., Benetatos, C. A., Chapman, A. E., Tew, K. D. and Hudes, G. R.** (1996). "Increase of beta(III)- and beta(IVa)-tubulin isotopes in human prostate carcinoma cells as a result of estramustine resistance." *Cancer Res* 56(11): 2584-9.
- Redeker, V., Levilliers, N., Schmitter, J. M., Le Caer, J. P., Rossier, J., Adoutte, A. and Bre, M. H.** (1994). "Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules." *Science* 266(5191): 1688-91.

- Reed, N. A., Cai, D., Blasius, T. L., Jih, G. T., Meyhofer, E., Gaertig, J. and Verhey, K. J.** (2006). "Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport." *Curr Biol* 16(21): 2166-72.
- Rehberg, M. and Graf, R.** (2002). "Dictyostelium EB1 is a genuine centrosomal component required for proper spindle formation." *Mol Biol Cell* 13(7): 2301-10.
- Rowinsky, E. K. and Donehower, R. C.** (1991). "The clinical pharmacology and use of antimicrotubule agents in cancer chemotherapeutics." *Pharmacol Ther* 52(1): 35-84.
- Saoudi, Y., Fotedar, R., Abrieu, A., Doree, M., Wehland, J., Margolis, R. L. and Job, D.** (1998). "Stepwise reconstitution of interphase microtubule dynamics in permeabilized cells and comparison to dynamic mechanisms in intact cells." *J Cell Biol* 142(6): 1519-32.
- Saxton, W. M., Stemple, D. L., Leslie, R. J., Salmon, E. D., Zavortink, M. and McIntosh, J. R.** (1984). "Tubulin dynamics in cultured mammalian cells." *J Cell Biol* 99(6): 2175-86.
- Schoenfeld, T. A., McKerracher, L., Obar, R. and Vallee, R. B.** (1989). "MAP 1A and MAP 1B are structurally related microtubule associated proteins with distinct developmental patterns in the CNS." *J Neurosci* 9(5): 1712-30.
- Schreiber, S. L.** (2000). "Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery." *Science* 287(5460): 1964-9.
- Shelanski, M. L. and Taylor, E. W.** (1967). "Isolation of a protein subunit from microtubules." *J Cell Biol* 34(2): 549-54.
- Singer, W. D., Jordan, M. A., Wilson, L. and Himes, R. H.** (1989). "Binding of vinblastine to stabilized microtubules." *Mol Pharmacol* 36(3): 366-70.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R.** (1990). "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening." *J Natl Cancer Inst* 82(13): 1107-12.
- Skoufias, D. A. and Wilson, L.** (1992). "Mechanism of inhibition of microtubule polymerization by colchicine: inhibitory potencies of unliganded colchicine and tubulin-colchicine complexes." *Biochemistry* 31(3): 738-46.
- Small, J. V. and Kaverina, I.** (2003). "Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity." *Current Opinion in Cell Biology* 15(1): 40-7.
- Sodeoka, M., Sampe, R., Kojima, S., Baba, Y., Usui, T., Ueda, K. and Osada, H.** (2001). "Synthesis of a tetronic acid library focused on inhibitors of tyrosine and dual-specificity protein phosphatases and its evaluation regarding VHR and cdc25B inhibition." *J Med Chem* 44(20): 3216-22.

- Specht, K. M. and Shokat, K. M.** (2002). "The emerging power of chemical genetics." *Curr Opin Cell Biol* 14(2): 155-9.
- Spittle, C., Charrasse, S., Larroque, C. and Cassimeris, L.** (2000). "The interaction of TOGp with microtubules and tubulin." *J Biol Chem* 275(27): 20748-53.
- Spring, D. R.** (2005). "Chemical genetics to chemical genomics: small molecules offer big insights." *Chem Soc Rev* 34(6): 472-82.
- Stiborova, M., Arlt, V. M., Henderson, C. J., Wolf, C. R., Kotrbova, V., Moserova, M., Hudecek, J., Phillips, D. H. and Frei, E.** (2008). "Role of hepatic cytochromes P450 in bioactivation of the anticancer drug ellipticine: studies with the hepatic NADPH:cytochrome P450 reductase null mouse." *Toxicol Appl Pharmacol* 226(3): 318-27.
- Stockwell, B. R.** (2000a). "Chemical genetics: ligand-based discovery of gene function." *Nat Rev Genet* 1(2): 116-25.
- Stockwell, B. R.** (2000b). "Frontiers in chemical genetics." *Trends Biotechnol* 18(11): 449-55.
- Stockwell, B. R.** (2004). "Exploring biology with small organic molecules." *Nature* 432(7019): 846-54.
- Stockwell, B. R., Haggarty, S. J. and Schreiber, S. L.** (1999). "High-throughput screening of small molecules in miniaturized mammalian cell-based assays involving post-translational modifications." *Chem Biol* 6(2): 71-83.
- Tanaka, T., Serneo, F. F., Higgins, C., Gambello, M. J., Wynshaw-Boris, A. and Gleeson, J. G.** (2004). "Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration." *J Cell Biol* 165(5): 709-21.
- Taylor, K. R., Holzer, A. K., Bazan, J. F., Walsh, C. A. and Gleeson, J. G.** (2000). "Patient mutations in doublecortin define a repeated tubulin-binding domain." *J Biol Chem* 275(44): 34442-50.
- Telzer, B. R. and Haimo, L. T.** (1981). "Decoration of spindle microtubules with Dynein: evidence for uniform polarity." *J Cell Biol* 89(2): 373-8.
- Thazhath, R., Liu, C. and Gaertig, J.** (2002). "Polyglycylation domain of beta-tubulin maintains axonemal architecture and affects cytokinesis in Tetrahymena." *Nat Cell Biol* 4(3): 256-9.
- Thery, M. and Bornens, M.** (2006). "Cell shape and cell division." *Curr Opin Cell Biol* 18(6): 648-57.
- Thery, M., Jimenez-Dalmaroni, A., Racine, V., Bornens, M. and Julicher, F.** (2007). "Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation." *Nature* 447(7143): 493-6.

- Thery, M., Racine, V., Pepin, A., Piel, M., Chen, Y., Sibarita, J. B. and Bornens, M.** (2005). "The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis." *Nat Cell Biol* 7(10): 947-53.
- Tian, G., Lewis, S. A., Feierbach, B., Stearns, T., Rommelaere, H., Ampe, C. and Cowan, N. J.** (1997). "Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors." *J Cell Biol* 138(4): 821-32.
- Tournebise, R., Andersen, S. S., Verde, F., Doree, M., Karsenti, E. and Hyman, A. A.** (1997). "Distinct roles of PP1 and PP2A-like phosphatases in control of microtubule dynamics during mitosis." *EMBO J* 16(18): 5537-49.
- Tuszynski, J. A., Carpenter, E. J., Huzil, J. T., Malinski, W., Luchko, T. and Luduena, R. F.** (2006). "The evolution of the structure of tubulin and its potential consequences for the role and function of microtubules in cells and embryos." *Int J Dev Biol* 50(2-3): 341-58.
- Usui, T.** (2007). "Actin- and microtubule-targeting bioprobes: their binding sites and inhibitory mechanisms." *Biosci Biotechnol Biochem* 71(2): 300-8.
- Vaillant, A. R., Muller, R., Langkopf, A. and Brown, D. L.** (1998). "Characterization of the microtubule-binding domain of microtubule-associated protein 1A and its effects on microtubule dynamics." *J Biol Chem* 273(22): 13973-81.
- van Dijk, J., Rogowski, K., Miro, J., Lacroix, B., Edde, B. and Janke, C.** (2007). "A targeted multienzyme mechanism for selective microtubule polyglutamylation." *Mol Cell* 26(3): 437-48.
- Vandecandelaere, A., Pedrotti, B., Utton, M. A., Calvert, R. A. and Bayley, P. M.** (1996). "Differences in the regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated proteins MAP1B and MAP2." *Cell Motil Cytoskeleton* 35(2): 134-46.
- Vasquez, R. J., Gard, D. L. and Cassimeris, L.** (1994). "XMAP from *Xenopus* eggs promotes rapid plus end assembly of microtubules and rapid microtubule polymer turnover." *J Cell Biol* 127(4): 985-93.
- Wade, R. H. and Hyman, A. A.** (1997). "Microtubule structure and dynamics." *Curr Opin Cell Biol* 9(1): 12-7.
- Walczak, C. E., Mitchison, T. J. and Desai, A.** (1996). "XKCM1: a *Xenopus* kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly." *Cell* 84(1): 37-47.
- Walss-Bass, C., Prasad, V., Kreisberg, J. I. and Luduena, R. F.** (2001). "Interaction of the betaIV-tubulin isotype with actin stress fibers in cultured rat kidney mesangial cells." *Cell Motil Cytoskeleton* 49(4): 200-7.
- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. and McPhail, A. T.** (1971). "Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*." *J Am Chem Soc* 93(9): 2325-7.

- Ward, G. E., Carey, K. L. and Westwood, N. J.** (2002). "Using small molecules to study big questions in cellular microbiology." *Cell Microbiol* 4(8): 471-82.
- Watts, N. R., Sackett, D. L., Ward, R. D., Miller, M. W., Wingfield, P. T., Stahl, S. S. and Steven, A. C.** (2000). "HIV-1 rev depolymerizes microtubules to form stable bilayered rings." *J Cell Biol* 150(2): 349-60.
- Weber, K., Wehland, J. and Herzog, W.** (1976). "Griseofulvin interacts with microtubules both in vivo and in vitro." *J Mol Biol* 102(4): 817-29.
- Webster, D. R., Wehland, J., Weber, K. and Borisy, G. G.** (1990). "Detyrosination of alpha tubulin does not stabilize microtubules in vivo." *Journal of Cell Biology* 111(1): 113-22.
- Wehland, J. and Weber, K.** (1987). "Turnover of the carboxy-terminal tyrosine of alpha-tubulin and means of reaching elevated levels of detyrosination in living cells." *J Cell Sci* 88 (Pt 2): 185-203.
- Weisenberg, R. C.** (1972). "Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations." *Science* 177(54): 1104-5.
- Westermann, S. and Weber, K.** (2003). "Post-translational modifications regulate microtubule function." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(12): 938-47.
- Whitesell, L., Mimnaugh, E. G., De Costa, B., Myers, C. E. and Neckers, L. M.** (1994). "Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(18): 8324-8.
- Willard, F. S. and Crouch, M. F.** (2001). "MEK, ERK, and p90RSK are present on mitotic tubulin in Swiss 3T3 cells: a role for the MAP kinase pathway in regulating mitotic exit." *Cell Signal* 13(9): 653-64.
- Wilson, L. and Farrell, K. W.** (1986). "Kinetics and steady state dynamics of tubulin addition and loss at opposite microtubule ends: the mechanism of action of colchicine." *Ann N Y Acad Sci* 466: 690-708.
- Wilson, L. and Friedkin, M.** (1967). "The biochemical events of mitosis. II. The in vivo and in vitro binding of colchicine in grasshopper embryos and its possible relation to inhibition of mitosis." *Biochemistry* 6(10): 3126-35.
- Wilson, L., Jordan, M. A., Morse, A. and Margolis, R. L.** (1982). "Interaction of vinblastine with steady-state microtubules in vitro." *J Mol Biol* 159(1): 125-49.
- Xiao, D., Pinto, J. T., Soh, J. W., Deguchi, A., Gundersen, G. G., Palazzo, A. F., Yoon, J. T., Shirin, H. and Weinstein, I. B.** (2003). "Induction of apoptosis by the garlic-derived compound S-allylmercaptocysteine (SAMC) is associated with microtubule depolymerization and c-Jun NH(2)-terminal kinase 1 activation." *Cancer Res* 63(20): 6825-37.

- Yarrow, J. C., Perlman, Z. E., Westwood, N. J. and Mitchison, T. J.** (2004). "A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods." *BMC Biotechnol* 4: 21.
- Yoshida, T., Imanaka-Yoshida, K., Murofushi, H., Tanaka, J., Ito, H. and Inagaki, M.** (1996). "Microinjection of intact MAP-4 and fragments induces changes of the cytoskeleton in PtK2 cells." *Cell Motil Cytoskeleton* 33(4): 252-62.
- Yu, J. and Zhang, L.** (2005). "The transcriptional targets of p53 in apoptosis control." *Biochem Biophys Res Commun* 331(3): 851-8.
- Zhang, J. H., Chung, T. D. and Oldenburg, K. R.** (1999). "A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays." *J Biomol Screen* 4(2): 67-73.
- Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S. and Matthias, P.** (2003). "HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo." *EMBO J* 22(5): 1168-79.