

AIX-MARSEILLE UNIVERSITE
FACULTE DE MÉDECINE DE MARSEILLE
ECOLE DOCTORALE des SCIENCES DE LA VIE et de la SANTE

T H È S E

Présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE

Le 09 septembre 2015

Par **Mlle Le Grand Marion**, née le 04 Janvier 1986 à Lannion (22)

**La protéine Akt, lien entre mitochondries et microtubules
dans le mécanisme d'action des agents anti-microtubules**

ou quand les MTA s'invitent dans de nouvelles stratégies thérapeutiques

Pour obtenir le grade de DOCTORAT d'AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ

SPÉCIALITÉ : Pathologies Humaines : Oncologie et Oncopharmacologie

Membres du Jury de la Thèse :

Dr Jean-Ehrland RICCI
Pr Christian POÛS
Dr Alice CARRIER
Dr Laurent POULAIN
Pr Jean-Paul BORG
Pr Diane BRAGUER

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Diane BRAGUER,

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre équipe durant mes années de thèse.

Je vous remercie aussi pour la confiance que vous m'avez accordée.

Soyez assurée de ma sincère et profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Jean-Ehrland RICCI,

Pour l'honneur que vous me faites d'avoir accepté de juger mon travail en tant que rapporteur.

Veillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Christian POÛS,

Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de participer à mon jury en qualité de rapporteur.

Je vous prie d'agréer toute ma considération.

A Madame le Docteur Alice CARRIER,

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à mon jury en tant qu'examineur.

Encore merci pour votre disponibilité.

A Monsieur le Docteur Laurent POULAIN,

Je vous exprime ma gratitude d'avoir bien voulu participer à mon jury en tant qu'examineur.

Merci pour ce temps que vous m'accordez.

A Monsieur le Professeur Jean-Paul BORG,

Je vous adresse également mes remerciements pour avoir accepté de prendre part à ce jury.

Veillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Je tiens également à remercier l'association **GEFLUC** de Marseille-Provence ainsi que la **SFPO** en partenariat avec l'**Académie Nationale de Pharmacie** pour leur soutien financier au cours de ces travaux de thèse.

DISCOURS DE REMERCIEMENTS

Suite à ces années passées au labo, si je suis bien convaincue de deux choses c'est d'une part que de faire une thèse est un passage « atypique » dans une vie et que, d'autre part, une thèse est loin voire même très loin d'être un travail solitaire. Pour ces raisons et n'étant pas forcément douée pour les remerciements sur la place publique, j'ai trouvé une entourage en vous racontant une histoire qui prend en compte ces deux certitudes.

Imaginez que mes années de thèse soit le script d'un film. Imaginez alors que chaque personne que j'ai côtoyée pendant le tournage de ce film soit le réalisateur, les figurants, les seconds rôles, le cadreur, la décoratrice, l'ingénieur du son... Et que le jour de ma thèse ce soit la cérémonie des oscars (ou des césars pour les pro-français !). Alors, bien sûr, je ne sais pas encore si je vais gagner (oui oui vous l'aurez compris, je suis nominée pour la meilleure interprétation féminine) mais comme tout acteur nommé, je dois écrire à l'avance mon discours de remerciements. C'est donc ce qu'il va suivre ! Bonne lecture !

Olalalala je ne m'y attendais pas du tout. Que d'émotions !! (*Oui n'oubliez pas je suis censée faire l'actrice récompensée*) Euh... Je ne sais pas quoi dire... J'ai rien préparé... Je tiens à remercier en tout premier lieu ma famille avec mes parents, ma sœur, ma grand-mère, mon oncle et ma tante sans qui je ne serai jamais arrivée jusque là (*oui oui quand on les écoute dire ça (les acteurs, en vrai, ceux qui se retrouvent vraiment sous les feux des projecteurs) on se dit toujours et gnagnagni et gnagnagna c'est toujours la même chose, aller abrège !! Mais en même temps, force est de constater que ben... c'est vrai quoi sans eux je ne serai pas là!!*). J'ai évidemment une pensée pour mes grands-parents partis au ciel pour les croyants ou juste quitter cette Terre pour les scientifiques (*Et oui, y a toujours aussi dans le discours le petit moment émotion. Personnellement, je dirais que je suis croyifque ou scientifyant donc merci à eux peu importe où ils sont*).

Je tiens ensuite à remercier les personnes de l'ombre. Celles qui ne se sont pas retrouvées devant la caméra pendant le tournage mais qui évidemment prennent une grande place dans ce film quand même. Je ne sais par qui commencer tant ils sont tous différents et ont tous joué une part importante dans ma réussite. Il y a évidemment Pch, rencontrée dès mes débuts scientifiques euh pardon mes débuts cinématographiques. Toujours là, peu importe la météo, peu importe la distance, peu importe le temps passé... fidèle au poste. Ensuite, il y a ma moitié. Tout nous oppose et tout nous rassemble. Vive toi ! Vive moi ! Vive-nous ! Toujours connectée avec moi aussi c'est évidemment madame « jet d'eau ». Nos pauses schoko-bon et nos discussions interminables dans la voiture, quand j'y pense, me font toujours sourire. Comment parler de Marseille et ne pas citer les plus marseillais des bretons ! A Rennes ou à Marseille, les moments passés avec vous alimentent à chaque fois la case des bons souvenirs (Note personnelle, si le public réagit au nom de Marseille, placer un petit mot sur l'OM mais surtout l'EAG). Une pensée aussi pour mon antillaise préférée toujours présente malgré l'océan qui nous sépare ! Et enfin, je terminerai par les plus mongolitos de tous !!! Deux gros dindons complètement tarés mais tellement adorables qu'on ne peut que les apprécier !

La France entière m'a séparée d'eux mais le lien est toujours resté, solide comme un rocher breton !!!! Merci à vous tous.

Passons maintenant aux personnes présentes au quotidien sur le tournage !! Evidemment je remercie la productrice en chef sans qui rien n'est possible. Mais si je dois insister sur quelqu'un c'est la réalisatrice de ce film. Celle à qui je dois tout. Celle qui m'a tout appris. Un subtil mélange de Steven Spielberg, de Woody Allen ou encore d'Orson Welles. J'espère, un jour, arriver à avoir ton talent et

ton regard sur le monde cinématographique. Ce film ne s'étant pas fait en un an, je tiens également à remercier le réalisateur adjoint qui est arrivé dans l'équipe cette dernière année. David Fincher, Pedro Almodovar ou encore Wong Kar-Wai ont du souci à se faire !! J'ai appris énormément à tes côtés. J'aurai aimé en apprendre encore beaucoup plus tant tu as à m'enseigner. Ne change rien surtout ! Le monde du cinéma a deux pépites entre les mains pour réaliser de très beaux films dans les années à venir. Qui sait peut-être qu'un jour je serai à nouveau sous votre réalisation !

Bien sur, il n'y aurait pas de film sans l'ingénieur du son et le cadreur. La musique et l'image sont essentielles dans un film ! Ces deux là en plus font la paire. Le noir et le blanc, le ying et le yang. Tout les oppose et pourtant l'une a besoin de l'autre et inversement. Parlons-en du cadreur. Toujours derrière sa caméra évidemment. Très discrète mais aucun détail ne lui échappe. Tu joues avec les images, avec les couleurs et tu as toujours su me montrer les meilleures séquences du film pour me diriger comme si de rien dans la bonne direction. Quant à l'ingénieur du son, quel travail d'artiste ! Pas une musique n'a de fausses notes dans ce film. Un parfait mélange des genres. Quand il fallait que ça déménage tu nous trouvais le morceau d'électro-rock adéquat. Quand il fallait un peu de calme, tu nous sortais le titre de jazzy-cool. Et pour bien rigoler, rien de mieux que les années disco ! On partait alors dans des délires, le tout sous les yeux du cadreur, parfois un poil agacée mais tellement souvent morte de rire ! Merci à vous deux, vous avez mis de la couleur et de la musique dans mon film !

Et puis bien sûr, je tiens à remercier la décoratrice également ma coloc de loge (la meilleure !) ; l'habilleuse, la reine de Nat&Nin ; le bruiteur ou plutôt bruiteuse, très discrète (paradoxalement) ; l'accessoiriste qui a permis de mettre en valeur certaines de mes scènes ; le perchiste, complètement perché mais à qui je dis à plus tard dans... ? ; la régie, complètement barrée mais efficace ; le mixeur, incollable sur tous les concerts du coin ; le cascadeur un brin ours mais il suffit de l'appivoiser... et j'en passe et j'en passe ! Tout le monde sur le plateau a son rôle. Une petite mention particulière pour les autres acteurs qui tournent leur film en ce moment ou qu'ils l'ont déjà fini ou qui vont le commencer bientôt je l'espère et, avec qui j'ai partagé mes expériences des bons moments de tournage comme des erreurs techniques ou périodes de grève !! Mais surtout beaucoup de fou-rires !!

Enfin, un petit arrêt sur image sur les seconds rôles ayant relevé ce film encore plus haut. Une pensée évidemment pour les 2 acolytes de l'habilleuse avec qui j'ai passé de très bons moments que ce soit en terrasse autour d'un verre, dans un restaurant, lors d'une exposition ou en balade le week-end (voir si je parle de l'anecdote du chat au Panier selon la température dans la salle). Et surtout un immense MERCI à la famille de l'ingénieur du son !!! Vous êtes aussi rock'n'roll qu'elle !! Surtout ne changez absolument rien ! A vous tous, on se retrouvera ici ou ailleurs c'est sur !

Je terminerai en remerciant tous les figurants sans qui le film ne serait pas crédible !! Merci pour leur aide, merci pour les pauses déjeuners, merci pour les petits conseils, merci pour les bons moments rigolades. Merci tout simplement.

RESUME

Découverts il y a maintenant plus d'un demi-siècle pour les *Vinca*-alcaloïdes ou quelques décennies pour les Taxanes, les premiers résultats antinéoplasiques obtenus alors avec ces composés avaient déclenché un véritable engouement sans précédent. De nos jours, les MTA sont administrés dans de nombreuses pathologies cancéreuses (cancers solides et hémopathies malignes) tant chez l'adulte que dans la population pédiatrique reflétant ainsi leur grande efficacité anti-tumorale. Cependant, leur utilisation se voit limitée pour deux raisons : (i) l'apparition d'effets indésirables et, (ii) l'émergence de cellules tumorales résistantes au traitement. Pour palier ces problèmes, les MTA font l'objet de nombreux travaux tant en recherche fondamentale qu'en recherche translationnelle et clinique faisant ainsi de ces composés des médicaments toujours dans l'ère du temps.

L'objectif principal des travaux présentés dans ce manuscrit repose sur l'étude du mécanisme d'action des MTA afin d'optimiser, par la suite, leur administration. Dans une première partie s'inscrivant dans le domaine de la recherche fondamentale, nous avons caractérisé les mécanismes moléculaires à l'origine de l'efficacité anticancéreuse de ces agents. En effet, nous avons mis en lumière l'existence d'un pont signalétique entre les mitochondries et les microtubules révélant le rôle crucial de la voie de signalisation Akt/GSK3 β dans cette communication intracellulaire. Fort de ces résultats fournissant un rationnel mécanistique aux stratégies thérapeutiques associant les MTA aux thérapies ciblées anti-Akt, nous avons alors mené une étude oncopharmacologique sur ces associations. Nous démontrons ici que l'association MTA/anti-Akt est fortement synergique dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses humaines. Par la suite, une étude approfondie sur le cancer du poumon a confirmé cette synergie *in vitro* et *in vivo*. D'un point de vue mécanistique, de façon intéressante, nos résultats ont mis en lumière l'impact de ces associations sur le métabolisme énergétique cellulaire, défini au cours de ces dernières années comme un élément clef pour cibler les cellules cancéreuses.

Mieux comprendre le mécanisme d'action des MTA, afin de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques aux cliniciens était l'objectif principal de cette thèse. Les résultats obtenus ici ouvrent ainsi la voie de l'association de ces agents avec les thérapies ciblées anti-Akt. Ainsi, l'ensemble des données obtenues au cours de ces travaux démontre l'intérêt de l'utilisation des MTA dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
TABLE DES MATIERES	2
LISTE DES ABREVIATIONS	6
<i>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</i>	11
CHAPITRE 1	12
DE LA TUBULINE AUX FONCTIONS MICROTUBULAIRES : PRESENTATION DE LA CIBLE HISTORIQUE DES AGENTS ANTI- MICROTUBULES	12
1. Edification du réseau microtubulaire	12
1.1. La tubuline : unité de base aux multiples identités	12
1.2. Le GTP : protagoniste de la polymérisation microtubulaire	14
2. Le réseau microtubulaire : structure dynamique, finement régulée	16
2.1. Propriétés dynamiques des microtubules	16
2.2. Contrôle de la dynamique du réseau microtubulaire : présentation des protéines régulatrices des microtubules	17
2.2.1. Les MAP stabilisatrices	18
2.2.2. Les MAP déstabilisatrices	18
2.2.3. Les +TIP	19
2.3. Zoom sur les protéines EB : chef d'orchestre de la dynamique des microtubules	22
2.3.1. Présentation, structure et régulation des protéines EB	22
2.3.2. EB1 : clef de voûte des complexes +TIP, au cœur de la dynamique microtubulaire	24
3. Implications des microtubules dans les fonctions cellulaires	25
3.1. Les microtubules : maîtres de la division cellulaire	26
3.2. Rôle des microtubules dans la migration cellulaire	27
3.3. Les microtubules comme rails de transport intracellulaire	28
4. Les microtubules en tant que cible en oncologie : succès et limites des agents anti-microtubules	30
4.1. D'hier à aujourd'hui : présentation des acteurs et de leurs propriétés	30
4.2. Utilisation clinique : un succès acquis depuis plusieurs décennies...	32
4.3. ... Un succès cependant mesuré exigeant de nouvelles stratégies	33

4.3.1. Emergence des phénomènes de résistance	34
4.3.2. Effets indésirables	35
4.3.3. Améliorations des stratégies de traitement	36
CHAPITRE 2	39
RESEAU MITOCHONDRIAL : FONCTIONS ET IMPLICATIONS EN ONCOLOGIE	39
1. La mitochondrie...? Le réseau mitochondrial !	39
1.1. Structure et architecture d'un organite complexe	39
1.2. Formation d'un réseau hautement dynamique	40
1.2.1. Fusion – fission : une chorégraphie bien orchestrée	41
1.2.2. Motilité mitochondriale	42
2. Fonctions des mitochondries : réseau aux multiples facettes	45
2.1. Centrale énergétique de la cellule : fonctionnement et régulation de la chaîne respiratoire	45
2.1.1. Production d'ATP	45
2.1.2. Régulation de la chaîne respiratoire mitochondriale	46
2.2. Mitochondries et apoptose	47
2.3. Le stress oxydatif : présentation des ROS	51
2.3.1. Production des ROS	51
2.3.2. Les systèmes antioxydants	52
2.3.3. Impact des ROS dans l'homéostasie cellulaire	53
3. Implications des mitochondries en oncopharmacologie	54
3.1. Mitochondries et cancers	54
3.1.1. ROS et carcinogénèse	54
3.1.2. Reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses	55
3.2. Le réseau mitochondrial, cible pharmacologique attractive	57
3.2.1. MTA : Mitochondria-Targeted Agents ?	57
3.2.2. Les mitochondries comme cible des thérapies anticancéreuses	58
CHAPITRE 3	61
LA KINASE AKT : CIBLE PROMETTEUSE EN THERAPEUTIQUE ANTICANCEREUSE	61
1. Présentation des acteurs	61
1.1. La protéine kinase Akt	61
1.1.1. Structure et isoformes d'Akt	62
1.1.2. Fonctions d'Akt : à l'assaut de nombreux substrats	63
1.2. GSK3 β , substrat d'Akt	65
1.2.1. Structure et isoformes de GSK3	66
1.2.2. Fonctions de GSK3 β	67

1.3. Régulation de la voie de signalisation Akt/GSK3 β : un jeu complexe de kinases et de phosphatases	70
1.3.1. Quand l'activation de l'une concourt... à l'inhibition de l'autre	70
1.3.2. Mise en jeu de boucles de rétrocontrôle	72
2. Rôles d'Akt dans la carcinogénèse et la chimiorésistance	73
2.1. Akt : médiateur central dans les cellules tumorales	73
2.1.1. Perturbations directes des kinases Akt	73
2.1.2. Dérégulation de la voie de signalisation PI3K/Akt	74
2.2. Implication thérapeutique d'Akt	75
2.2.1. Akt et résistance aux traitements	75
2.2.2. Akt comme cible thérapeutique	76
 RESULTATS EXPERIMENTAUX	 80
 PARTIE 1	 81
 EFFETS MICROTUBULAIRES DES MTA : QUAND LES MITOCHONDRIES S'EN MELENT	 81
1. Contexte de l'étude	82
2. Résultats	83
3. Discussion	84
 PARTIE 2	 89
 ASSOCIATION MTA/ANTI-AKT : NOUVELLE STRATEGIE THERAPEUTIQUE PROMETTEUSE	 89
1. Contexte de l'étude	90
2. Matériels et méthodes	92
3. Résultats	95
3.1. Les anti-Akt possèdent des propriétés cytotoxique et anti-migratoire <i>in vitro</i> sur différents modèles cellulaires de tumeurs solides	95
3.2. Les anti-Akt augmentent l'activité cytotoxique des MTA sélectivement dans les cellules cancéreuses et contournent la résistance <i>in vitro</i>	96
3.3. Les anti-Akt potentialisent les effets des MTA dans les sphéroïdes	97
3.4. La périfosine, à faible dose, améliore l'efficacité du paclitaxel <i>in vivo</i> dans le cancer du poumon	98
3.5. La périfosine augmente les effets pro-apoptotiques des MTA	100
3.6. La périfosine n'accroît pas les propriétés anti-mitotiques des MTA	101
3.7. Les associations MTA/anti-Akt présentent un haut potentiel anti-migratoire	101

3.8. L'association paclitaxel/périmfosine inhibe le métabolisme énergétique en altérant le processus glycolytique et la phosphorylation oxydative	102
4. Discussion	105
<i>CONCLUSION</i>	110
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	115

LISTE DES ABREVIATIONS

+TIP	microtubule + end TrackIng Protein
-TIP	microtubule minus-end targeting proteins
α -TAT1/2 :	α -Tubulin AcetylTransferase 1/2
γ -TuRC :	γ -Tubulin Ring Complex
γ -TuSC :	γ -Tubulin Small Complex
2-DG :	2-DésoxyGlucose
3-BrPA :	3-BRomoPyruvAte

A

AAA :	ATPases Associated with a number of cellular Activities
ABC :	ATP-binding cassette
ADC :	Antibody-drug conjugate
ADNmt :	Acide DésoxyRibonucléique mitochondrial
AIF :	Apoptosis-Inducing Factor
Akt :	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
ALK :	Anaplastic Lymphoma Kinase
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
AMPK :	AMP-Activated Protein Kinase
ANT :	Adenine Nucleotide Translocator
Apaf-1 :	Apoptosis protease-activating Factor 1
APC :	Adenomatous Polyposis Coli
Apo2/TRAIL :	Apo-2 ligans/Tumor necrosis factor related apoptosis-Inducing Ligand
ARN :	Acide RiboNucléique
ARNm :	Acide RiboNucléique messenger
ADP :	Adénine DiPhosphate
AS160 :	Akt Substrate of 160 kDa
ATP :	Adénine TriPhosphate

B

Bad :	Bcl-2 Associated Death promoter
Bak :	Bcl-2 homologous antagonist-killer
Bax :	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2 :	B-Cell Lymphoma 2
Bcl-xl :	B-Cell Lymphoma-eXtra Large
BDNF :	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BH3 :	Bcl-2 Homology domain 3
Bid :	BH3 Interacting-domain Death agonist
Bim :	Bcl-2 Interacting Mediator of cell death
BRAF :	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

C

CAP-Gly :	Cytoskeleton-Associated Proteins Glycine-rich
CCP :	CarboxyPeptidase Cytosolique

Cdk :	Cycline-Dependent Kinase
CH :	Calponin Homology
CIPN :	Neuropathies Périphériques Induites par la Chimiothérapie
CLASP :	Cytoplasmic Linker ASSociated Protein
CLIP-170 :	Cytoplasmic Linker Protein-170
CREB :	cAMP-Response Element Binding proteins
CTLA-4 :	Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
CYLD :	Cylindromatosis

D

DCA :	Dichloroacétate
DCX :	Doublecortine
DISC :	Death Inducing Signaling Complex
DLT :	Dose limite de toxicité
Drp1 :	Dynamine-related protein 1
Dyrk1A :	Dual-specificity tyrosine(Y)-phosphorylation-regulated kinase 1A

E

E3 TTC3 :	TetraTriCopeptide repeat domain 3
EB :	End Binding
EBH :	End Binding Homology
ECAR :	ExtraCellular Acidification Rate
EGF :	Epidermal Growth Factor
EGF-R :	Epidermal Growth Factor Receptor
eNOS :	Endothelial Nitric Oxide Synthase
Erk :	Extracellular signal-regulated kinase

F

FAD :	Flavine Adénine Dinucléotide
FASL :	Fas Ligand
FDA :	Food and Drug Administration
Fis1 :	mitochondrial FISSion 1 protein
FOXO :	Forkhead boX, class O

G

GDP :	Guanosine DiPhospate
GFP :	Green Fluorescent Protein
GLUT :	Glucose transporter
GPx :	Glutathione Peroxidase
GRx :	Glutathione Réductase
GSK3 β :	Glycogen Synthase Kinase-3 β
GTP :	Guanosine TriPhosphate

H

H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HDAC6 :	Histone DeAcetylase family member 6
HER2 :	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HIF-1 α :	Hypoxia-Inducible Factor 1 α
Hsp90 :	Heat shock protein 90
HUVEC :	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
HXK :	Hexokinase

I

IAP :	Inhibitor Apoptosis Proteins
IgE/IgG :	ImmunoGlobulines E/G
IGF-I :	Insulin-like Growth Factor-I
IKK α :	Inhibitor of KB Kinase α

J

JNK :	c-Jun-N-terminal Kinase
-------	-------------------------

K

KO :	Knock-Out
------	-----------

L

LDH :	Lactate Déshydrogénase
LLA Ph(-) :	Leucémie Lymphoïde Aigüe à chromosome Philadelphia négatif

M

MACF:	Microtubule Actin Crosslinking Factor
MAP :	Microtubule-Associated Proteins
MAPK :	Mitogen-Activated Proteins homolog
MARK :	Microtubules Affinity Regulating Kinase
MCAK :	Mitotic Centromere-Associated kinesin
Mel-1 :	Myeloïd Cell Leukemia-1
MDM2 :	Murine Double Minute 2
MDR :	MultiDrug Resistance
MID :	Mitochondrial Disorders
Mff :	Mitochondrial Fission Factor
MFN1/2 :	Mitofusines $\frac{1}{2}$
MOMP :	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation
MPT :	Modifications Post-Traductionnelles
MPT :	Mitochondrial Permability Transition
MRP :	Multidrug Resistance-associated Proteins

MTA :	Microtubule-Targeting Agents
MTD :	Dose Maximale Tolérée
MTOC :	Microtubule Organizing Center
Mtorc1 :	Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1

N

NAD :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NF- κ B :	Nuclear Factor Kappa B
NFAT :	Nuclear Factor of Activated T cells
NLS :	Nuclear Localization Sequence
NO :	Nitric Oxyde
NSCLC :	Non Small Cell Lung Cancer

O

O ₂ ⁻	Anion superoxyde
OCR :	Oxygen Consumption Rate
OH :	Radicaux hydroxyles
ONOO ⁻ :	Peroxynitrite
OPA1 :	OPTic Atrophy 1
OXPHOS :	phosphorylation oxidative

P

p38MAPK :	protein 38 Mitogen Activated Protein Kinase
PDGF :	Platelet-Derived Growth Factor
PDK1 :	Phosphatidyl inositol Dependant Kinase 1
PDK :	Pyruvate Déshydrogénase Kinase
PD-1/PD-L1 :	Programmed cell death 1 et son ligand
PET-scan :	Tomographie par Emission de Positons
P-gp :	P-glycoprotéine
PHF :	Paired Helical Filaments
PHLDA3 :	Pleckstrin Homology-Like Domain family A member 3
PHLPP :	Pleckstrin Homology domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatase
PI3K :	Phosphatidylinositol 3 Kinase
Pin1 :	Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerase 1
PIP2 :	(3, 4) diphosphate
PIP3 :	(3, 4, 5) triphosphate
PKB :	Protéines Kinases B
PKC :	Protéines Kinases C
PP2A :	Protein Phosphatase 2A
PRAS40 :	Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa
PS :	PhosphatidylSerine
PTEN :	Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10
PTP :	Pore de Transition de Perméabilité

R

Ras :	Rat Sarcoma
RNS :	Reactive Nitric Species
ROS :	Reactive Oxygen Species
RTK :	Récepteur Tyrosine Kinase

S

Sirt2 :	Sirtuin type 2
SLA :	Sclérose Latérale Amyotrophique
Smac/Diablo :	Second Mitochondrial Activator of Caspases/Direct IAP Binding protein of LOw PI
SOD :	SuperOxydes Dismutases
STE :	Système de Transport des Electrons
STIM1 :	STromal Interaction Molecule 1
STOP :	Stable Tubule Only Peptide
STTP :	Stéaryl TriPhosPhonium
SUMO1 :	Small Ubiquitin MODifier 1

T

TCP :	Tubuline CarboxyPeptidase
TTL :	Tubuline Tyrosine Ligase
TTLL :	Tubuline Tyrosine Ligase-Like
TNF :	Tumor Necrosis Factor
TOG :	Tumor Overexpressed Gene
TRAF6 :	TNF Receptor-Associated Factor 6
TUNEL :	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling

V

VDAC :	Voltage Dependant Anion Channel
VEGF :	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R :	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VSLI :	Vincristine Sulfate Liposome Injection

X

XIAP :	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
--------	---

***Introduction
bibliographique***

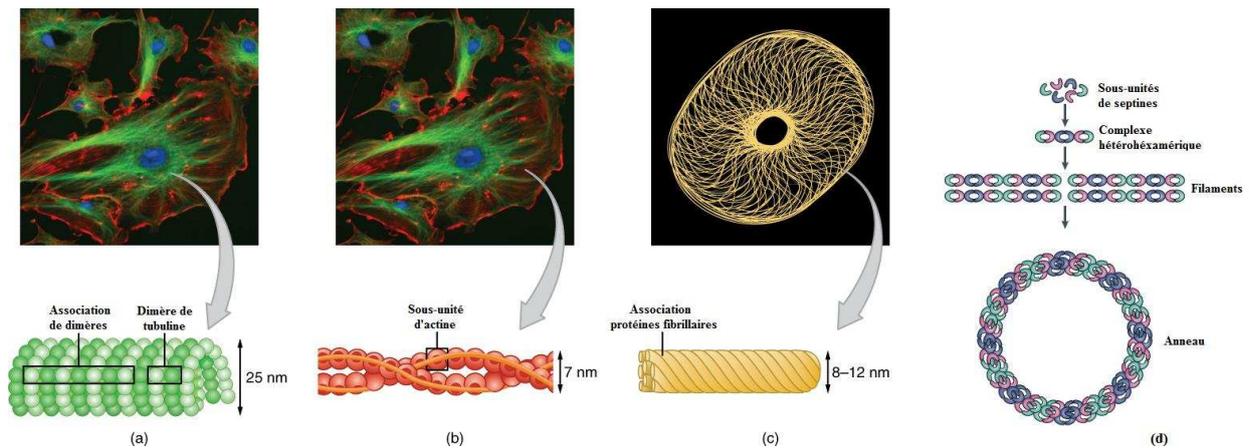


Figure 1 : Représentation des éléments constituant le cytosquelette d'une cellule.
 (a) réseau microtubulaire composé de l'association de dimères de tubuline ; (b) filaments d'actine formés par polymérisation d'homopolymères d'actine ; (c) filaments intermédiaires composés de protéines fibrillaires et (d) complexe de septines formé par l'association de petites protéines GTPasiques (Adaptation du website Scitable by nature education et Mostowy and Cossart, 2012).

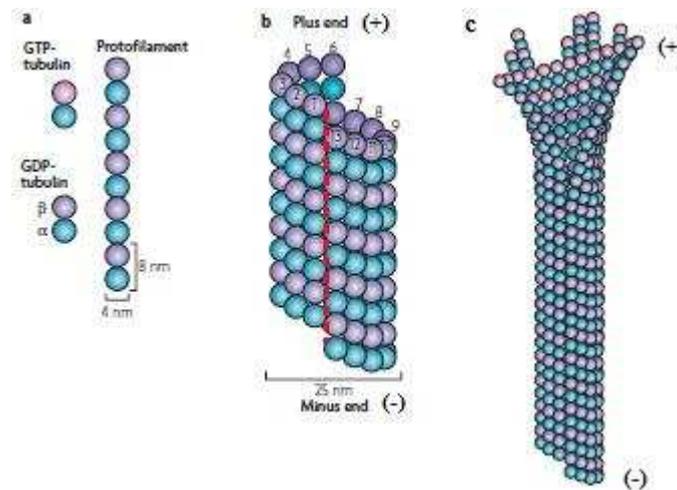


Figure 2 : Structure et organisation des microtubules.
 (a) : représentation du dimère de tubuline α/β et de son assemblage longitudinal en protofilament ; (b) association latérale de 13 protofilaments aboutissant à la formation du microtubule, tube creux de 25 nm de diamètre et (c) structure polarisée dans laquelle les sous-unités β sont localisées à l'extrémité (+) et les sous-unités α à l'extrémité (-) (Adaptation Akhmanova and Steinmetz, 2008).

CHAPITRE 1

DE LA TUBULINE AUX FONCTIONS MICROTUBULAIRES : PRESENTATION DE LA CIBLE HISTORIQUE DES AGENTS ANTI-MICROTUBULES

Le cytosquelette des cellules eucaryotes est constitué d'un réseau complexe de polymères biologiques composés de trois structures distinctes principales : les filaments intermédiaires, les microfilaments d'actine et les microtubules et, d'une quatrième structure : les septines considérée désormais comme un constituant à part entière du cytosquelette (Figure 1 ; Mostowy and Cossart, 2012). Contrairement à ce que son appellation sous-entendrait, le cytosquelette est une structure hautement dynamique où tous ses composants sont renouvelés perpétuellement par polymérisation. *Représentant un acteur principal de mes travaux de thèse, je vais, au cours de ce premier chapitre, présenter le cytosquelette microtubulaire de sa constitution et ses propriétés intrinsèques jusqu'à ses multiples fonctions et son rôle en oncopharmacologie.*

1. Edification du réseau microtubulaire

1.1. La tubuline : unité de base aux multiples identités

Pièces maîtresses des microtubules, les tubulines α et β sont deux protéines globulaires acides d'environ 50 kDa chacune, présentant plus de 40 % d'homologie de séquence entre elles. Ces protéines s'organisent spontanément avec la participation de cofacteurs tels que le GTP sous la forme d'un hétérodimère α/β (Nogales, 2000). L'assemblage de ces hétérodimères de tubuline forme, dans un premier temps, un protofilament correspondant ainsi à un polymère de tubuline. Par la suite, l'association de treize protofilaments parallèles entre eux va aboutir à une structure cylindrique creuse de 25 nm de diamètre dénommée microtubule. En raison de l'agencement régulier et ordonné des deux sous-unités α et β , les microtubules possèdent une **polarité structurale de façon intrinsèque**. Cette asymétrie de structure est apparente à chaque extrémité exposant, d'une part des sous-unités de tubuline α liées au GDP appelée extrémité (-) ancrée au niveau des centres organisateurs et, d'autre part des sous-unités de tubuline β liées au GTP définie comme extrémité (+) orientée vers la périphérie cellulaire (Figure 2 ; Akhmanova and Steinmetz, 2008).

Les microtubules sont capables **d'adapter leur structure** leur permettant de jouer un rôle important dans de nombreuses fonctions cellulaires variées. Deux mécanismes principaux portant sur la tubuline génèrent cette grande diversité structurale. Tout d'abord, l'hétérogénéité de la superfamille des tubulines est la résultante de l'existence d'**isotypes** de tubuline dont le nombre varie selon la sous-unité et l'espèce étudiée (Ludueña, 1998). Chaque isotype semblerait posséder ses propres fonctions. Cette hypothèse est notamment soutenue par le fait que plusieurs isotypes soient spécifiquement exprimés dans certaines cellules et que l'expression de ces isotypes puisse changer au cours du développement (Denoulet et al., 1986; Lewis et al., 1987). Chez l'homme, huit gènes α et sept gènes β ont été mis en évidence. Très conservées, les séquences des isotypes de tubuline α et β présentent de fortes homologues mais une variabilité importante est toutefois rencontrée pour les isotypes β qui se distinguent essentiellement par leurs vingt derniers résidus de l'extrémité C-terminale (Verdier-Pinard et al., 2009). Plusieurs isotypes ont une expression ubiquitaire comme par exemple les isotypes β I ou β IVb tandis que certains vont avoir une expression tissu-dépendante : isotype α 1 dans le cerveau, α 3 dans les testicules ou encore β III au niveau des cellules neuronales et gliales (Khodiyar et al., 2007; Leandro-García et al., 2010; Ludueña, 2013). Toutes les combinaisons isotypiques étant possibles, cela laisse imaginer la **grande diversité de structure du réseau microtubulaire**. Nous verrons par la suite que, d'un point de vue fonctionnel, la nature de l'isotype n'est pas sans conséquence dans la réponse aux traitements anticancéreux (*cf. chapitre 1 4.3.1*).

En parallèle, la tubuline est particulièrement sujette aux **modifications post-traductionnelles (MPT)** concourant à nouveau à sa grande diversité de structure au sein de la cellule. La plupart de ces MPT a lieu au niveau du domaine C-terminal de la tubuline situé sur la face externe des microtubules. Il est intéressant de noter que ce domaine C-terminal est également le siège de la variabilité des séquences entre les différents isotypes (Sullivan, 1988). D'un point de vue technique, l'émergence de nouvelles méthodes d'analyse ces dernières années telles que la spectrométrie de masse a permis la caractérisation des différentes MPT subies par la tubuline (Calligaris et al., 2010; Miller et al., 2010). A ce jour, la plus décrite dans la littérature est l'acétylation de la lysine 40 (K40) en position N-terminale de l' α -tubuline découverte dès 1985 (L'Hernault and Rosenbaum, 1985). Cette MPT a pour particularité d'être retrouvée dans la lumière du microtubule laissant supposer que son rôle dans la régulation des protéines motrices ou dans le trafic intracellulaire mette en jeu des mécanismes indirects (Godena et al., 2014; Walter et al., 2012). Elle est généralement corrélée à un enrichissement de la cellule en microtubules stabilisés et facilite l'assemblage des

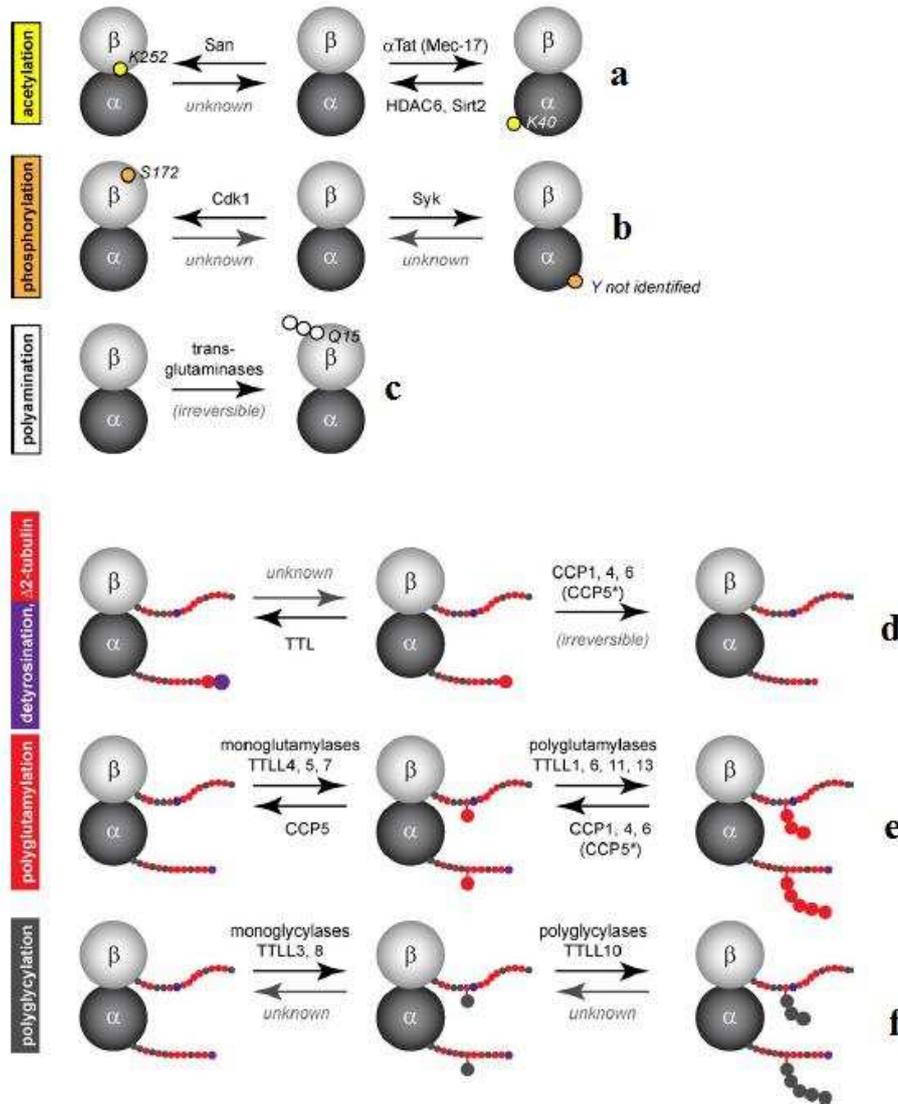


Figure 3 : Représentation schématique des principales MPT de la tubuline (Janke et al., 2014).

a : Les sous-unités α et β de la tubuline sont soumises à des acétylations. Celle du résidu lysine 40 (K40) sur la sous-unité α est la plus décrite et est corrélée à une population microtubulaire stabilisée.

b : La tubuline peut être soumise à des phénomènes de phosphorylation. La tubuline phosphorylée sur le résidu S172 de la β -tubuline entraîne une perturbation des fonctions microtubulaires puisqu'elle ne peut plus s'incorporer au cours de la polymérisation.

c : La polyamination est un phénomène irréversible provoquant la stabilisation des microtubules.

d : Cycle de détyrosination/(re)tyrosination sur la sous-unité α . Phénomène réversible, la forme détyrosinée entraîne une stabilisation des microtubules. En revanche, un 2nd clivage peut-être effectué aboutissant à une forme de tubuline dénommée $\Delta 2$ qui ne peut alors être retyrosinée.

e et f : Polyglutamylation et polyglycylation s'effectuent à la fois sur les sous-unités α et β et sont toujours des phénomènes réversibles.

microtubules (Cueva et al., 2012). Cependant, l'impact de cette MPT sur la stabilisation des microtubules reste encore controversé puisque de récentes découvertes font de l'acétylation de la tubuline un mauvais candidat pour stabiliser les microtubules (Pilon and Poüs, 2013). Un autre exemple de MPT subie par la tubuline est le phénomène réversible de détyrosination/(re)tyrosination de l'extrémité C-terminale de l' α -tubuline représentant la première MPT découverte (Arce et al., 1975). Il est clairement établi de nos jours que la forme détyrosinée de l' α -tubuline est associée à des microtubules plus stables et de demi-vie plus importante (Barra et al., 1988; Gundersen et al., 1987) et que cette MPT joue un rôle important dans le recrutement d'autres protéines associées aux microtubules qui reconnaissent spécifiquement la forme tyrosinée (Bieling et al., 2008; Peris et al., 2006). Dernièrement, le rôle de la tubuline détyrosinée a également été mis en lumière dans l'alignement des chromosomes au cours du processus mitotique (Barisic et al., 2015). Deux revues parues récemment effectuent un bel historique des découvertes des MPT subies par la tubuline (Garnham and Roll-Mecak, 2012; Janke, 2014 ; Figure 3).

A noter qu'en parallèle de ces isotypes et MPT, des cas de **mutations** ont été retrouvés au niveau de la tubuline accentuant à nouveau cette diversité. Par exemple, il a été décrit la mutation sur le résidu 26 de l'isotype β I de tubuline où l'acide aspartique est substitué par l'acide glutamique (Hari et al., 2006). Concernant la sous-unité α de la tubuline, peu d'études ont été réalisées en comparaison de la sous-unité β . Des cas de mutations ont tout de même été découverts (Yin et al., 2013) comme la substitution de la serine en position 379 par un résidu arginine conférant alors une plus grande stabilité du réseau microtubulaire (Martello et al., 2003).

Au sein de la cellule, la tubuline est donc retrouvée sous de multiples apparences contribuant à ce qui est dénommé « **code de la tubuline** » qui régule ainsi l'édification du réseau microtubulaire et à terme coordonne ses fonctions complexes.

1.2. Le GTP : protagoniste de la polymérisation microtubulaire

En plus des sous-unités α et β de tubuline, un autre élément indispensable à la polymérisation des microtubules est la **molécule de GTP**. Celle liée à la tubuline α ne peut être ni échangée ni hydrolysée contrairement à celle fixant la sous-unité β qui va pouvoir être hydrolysée en GDP ou échangée lorsque le dimère de tubuline se retrouve sous forme libre en solution (Mitchison, 1993). Au cours de la polymérisation des microtubules, les dimères de tubuline-GTP s'incorporent avant l'hydrolyse du GTP en GDP de la tubuline β . Cette hydrolyse du GTP intervenant après un délai, l'extrémité des microtubules est alors recouverte par une

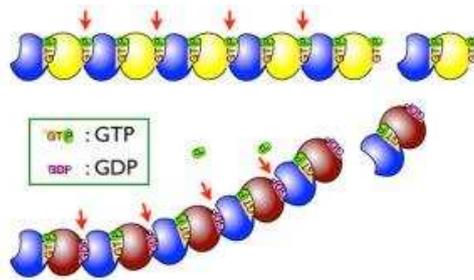


Figure 4 : Représentation schématique de l'association de dimères de tubuline-GTP ou de dimères de tubuline-GDP.

Les microtubules composés de dimères de tubuline GDP possèdent une conformation incurvée instable (panel du bas) provoquant rapidement la dépolymérisation des microtubules. L'incorporation de la tubuline aux extrémités (+) s'effectuent avec des dimères de tubuline couplés au GTP. L'hydrolyse du GTP n'étant pas immédiate cela crée une « coiffe » de tubuline-GTP de conformation droite (panel du haut) permettant ainsi de stabiliser les microtubules et d'empêcher leur dépolymérisation (Horio and Murata, 2014).

coiffe de tubuline-GTP également appelée « GTP-cap » facilitant la polymérisation des microtubules. Une fois hydrolysée, un changement de conformation du dimère de tubuline est observé (Carlier et al., 1989; Pantaloni and Carlier, 1986). En effet, les dimères liés au GTP possèdent une conformation droite tandis que les dimères fixés au GDP possèdent une conformation incurvée (Figure 4; Horio and Murata, 2014; Kueh and Mitchison, 2009). Le corps du microtubule, majoritairement constitué de dimères de tubuline GDP, est alors maintenu dans une forme droite par la présence de la coiffe GTP. Cette dernière protège de la dépolymérisation des microtubules en formant une structure stabilisatrice. En effet, il a été démontré que la perte de cette coiffe par hydrolyse du GTP induit rapidement la dépolymérisation du microtubule (Nogales and Wang, 2006; Panda et al., 2002) en provoquant notamment un relâchement des contraintes exercées par cette coiffe entre les différents protofilaments (Kueh and Mitchison, 2009). Cependant, tel qu'il est décrit, le modèle de la GTP-cap ne fait pas un consensus général. En effet, récemment, les travaux d'O. Valiron ont démontré que les dimères de tubuline-GDP étaient capables de s'incorporer lors de la polymérisation des microtubules modifiant alors le réseau microtubulaire qui devient ainsi plus stable (Valiron et al., 2010). Ces données suggèrent un fort lien entre l'hydrolyse du GTP et la stabilisation des microtubules. Par ailleurs, A. Dimitrov a généré en 2008 un anticorps reconnaissant spécifiquement la tubuline GTP. L'utilisation de cet anticorps a démontré l'existence de points localisés aléatoirement le long des microtubules, appelés îlots de tubuline GTP qui permettraient aux microtubules d'amorcer leur polymérisation (Dimitrov et al., 2008). De plus, une étude *in vitro* utilisant un analogue du GTP s'hydrolysant très lentement : le GMPCPP a permis de confirmer le rôle de ces îlots dans la polymérisation microtubulaire (Tropini et al., 2012).

Bien loin d'être une structure rigide, le réseau microtubulaire est hautement dynamique, organisé en un réseau modulable alternant les phases de : nucléation, assemblage, désassemblage ou stabilisation le tout à des échelles de temps allant de quelques secondes à quelques minutes. Ainsi, les microtubules vont pouvoir rapidement modifier leur organisation en réponse aux besoins de la cellule. Ce sont ces propriétés dynamiques, finement régulées au sein de la cellule, qui seront à l'origine de leurs nombreuses fonctions cellulaires.

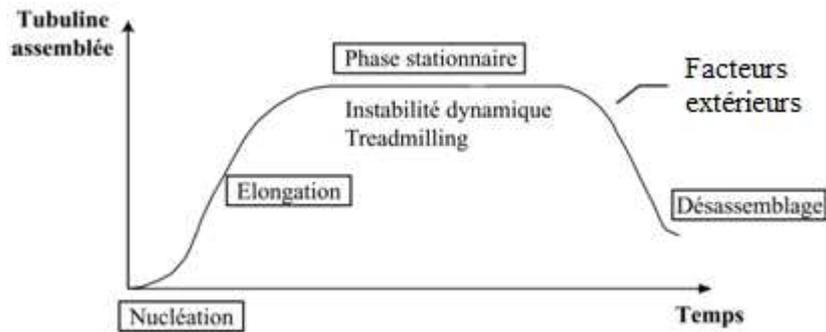


Figure 5 : Représentation de l'assemblage des microtubules *in vitro* par suivi turbidimétrique.

La réaction de polymérisation des microtubules par suivi turbidimétrique met en évidence 3 phases distinctes : une période de nucléation lente, une phase d'élongation suivie d'une phase stationnaire. Le désassemblage ou la dépolymérisation des microtubules peut être observé expérimentalement par ajouts de facteurs extérieurs ou par modifications des conditions environnementales favorisant ce phénomène comme par exemple une diminution de la température ou encore l'incorporation à la solution de composés tels que la colchicine (Valiron et al., 2010).

2. Le réseau microtubulaire : structure dynamique, finement régulée

L'assemblage des microtubules *in vitro* sur tubuline purifiée se décompose classiquement en trois phases : la phase de nucléation, d'élongation et la phase stationnaire (Kirschner and Williams, 1974 ; Figure 5). En réalité, en phase stationnaire, les microtubules sont loin d'être des structures stables mais sont plutôt en équilibre instable. A l'origine des nombreuses avancées dans la compréhension des propriétés dynamiques des microtubules, la **vidéomicroscopie** est devenue, de nos jours, la méthode standard d'analyse microtubulaire (Honore and Braguer, 2011). D'un point de vue technique, les microtubules pourront être étudiés sur cellules vivantes après micro-injection de protéines marquées (type rhodamine) ou après transfection avec un plasmide codant une protéine fluorescente (type GFP). Ces dernières années, une famille de protéines particulières : les +TIP (+ *end tracking proteins*) va se révéler être un formidable outil d'analyse de la dynamique des microtubules de part sa localisation idéale à l'extrémité (+) des microtubules. Dans ce contexte, des logiciels d'analyse qualitative et quantitative ont vu le jour permettant d'automatiser les mesures de la dynamique microtubulaire (Applegate et al., 2011; Matov et al., 2010). Cette avancée technologique, nous a ainsi permis de mieux déchiffrer le comportement dynamique des microtubules *in cellulo*.

2.1. Propriétés dynamiques des microtubules

Alors que les microtubules peuvent croître par leurs deux extrémités dans les systèmes *in vitro*, la nucléation dans les cellules de mammifères se fait généralement à partir du centrosome formant un complexe de grande ou petite taille nommé γ TURC ou γ TUSC, *i.e.* γ Tubulin Ring Complex et γ Tubulin Small Complex (Joshi, 1994; Pereira and Schiebel, 1997). Ces structures auraient pour fonction d'amorcer la polymérisation des microtubules et de stabiliser leurs extrémités (-) en les « coiffant » (Pereira and Schiebel, 1997). Une fois polymérisés, les microtubules ne vont pas se figer au cours d'une phase stationnaire mais, bien au contraire, vont être la cible de nombreux comportements dynamiques. Le premier phénomène observé, au cours des travaux réalisés par R.L. Margolis et L. Wilson, fut celui du **treadmilling** encore appelé effet du « tapis roulant » (Margolis and Wilson, 1978, 1981). Initialement mis en évidence *in vitro* par incorporation de GTP tritié dans une population de microtubules à l'état stationnaire, ce phénomène est fondé sur le fait que les deux extrémités des microtubules peuvent se comporter différemment en phase stationnaire. En effet, alors que le bout (+) incorpore continuellement de nouveaux dimères de tubuline, le bout (-) se

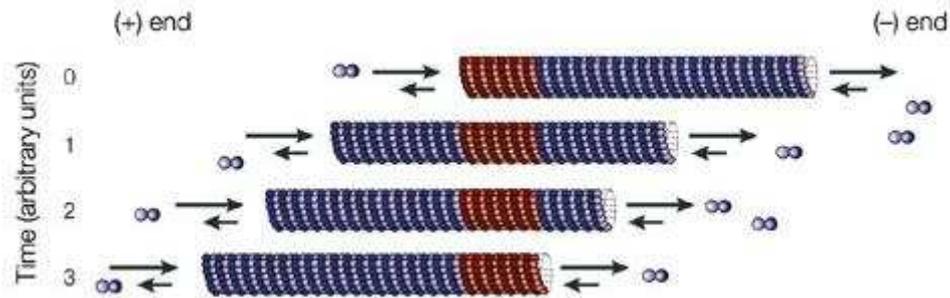


Figure 6 : Représentation schématique du phénomène de treadmilling.

Le phénomène du « tapis roulant » est basé sur la différence de comportement des extrémités des microtubules pour incorporer des dimères de tubuline. Le bout (+) polymérise de façon rapide et continue, contrairement au bout (-) qui se dépolymérise de façon lente, les nouveaux dimères de tubuline additionnés (représentés ici en rouge pour le suivi) sont ainsi « déplacés » le long des microtubules au cours du temps (Jordan and Wilson, 1998).

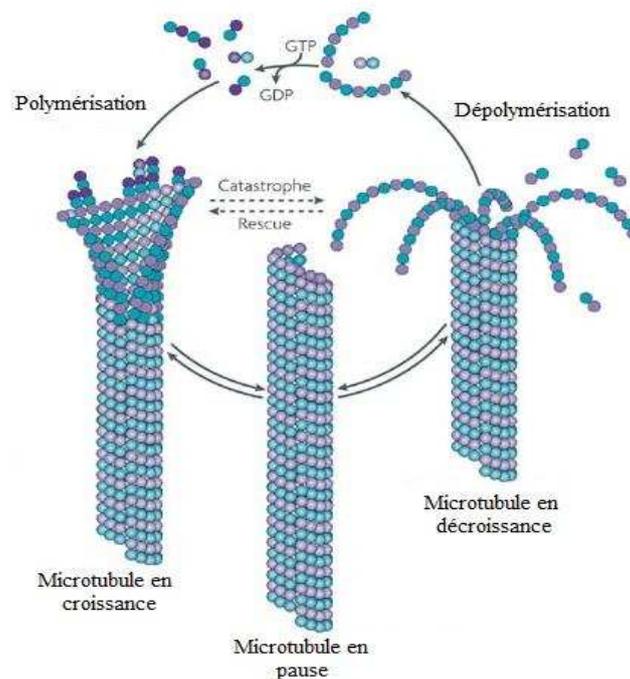


Figure 7 : Représentation schématique de l'instabilité dynamique des microtubules.

Les microtubules ne sont pas des structures rigides dans la cellule mais subissent continuellement des phénomènes dynamiques définis par l'instabilité dynamique des microtubules. L'addition de dimères de tubuline aux bouts (+) des microtubules porte le nom de polymérisation aboutissant à des microtubules en croissance (à gauche). Le phénomène inverse est la dépolymérisation (à droite). La transition entre ces deux phénomènes est dénommée phénomène de catastrophe ou rescue (sauvetage). Le dernier paramètre cinétique pouvant être observé correspond à des microtubules en pause où aucun phénomène dynamique n'est observé à leurs extrémités, même si de nos jours, l'existence de ce paramètre est de plus en plus controversée (Akhmanova and Steinmetz, 2008).

dépolymérise de façon lente et continue. Les dimères additionnés se retrouvent ainsi « déplacés » par le flux de nouvelles incorporations comme sur un tapis roulant (Figure 6). Le treadmilling a également été décrit au niveau cellulaire et identifié comme étant impliqué au cours de la division cellulaire dans la ségrégation des chromosomes (Margolis and Wilson, 1998). De plus, lorsque les extrémités (-) des microtubules ne sont pas ancrées dans une structure fixe (type γ -TURC), ce phénomène de treadmilling conduit au déplacement des microtubules au sein de la cellule (Jordan and Wilson, 1998; Shaw et al., 2003).

Par la suite, les nombreuses études menées, au niveau cellulaire, sur le réseau microtubulaire ont très vite mis en lumière que les microtubules étaient capables de subir des alternances de phases de polymérisation et de dépolymérisation dénommées « **instabilité dynamique** ». T. Mitchison et M. Kirschner furent les premiers à décrire dès 1984 ce phénomène en observant l'existence de microtubules de taille différente au sein d'une population de microtubules en phase stationnaire (Mitchison and Kirschner, 1984). La cryomicroscopie électronique a ensuite permis, de mieux comprendre ce phénomène d'instabilité dynamique (Chrétien et al., 1995; Erickson and O'Brien, 1992). La transition entre une phase de croissance et de décroissance est appelée « **phénomène de catastrophe** ». La transition opposée est nommée « **phénomène de sauvetage** » (rescue). De nos jours, l'existence des **temps de pause** reste discutée ; ils pourraient correspondre à une absence de dynamique ou alors il s'agirait uniquement d'un défaut de détection de valeurs de la dynamique des microtubules trop faibles à ces moments précis (Figure 7). La mesure des paramètres cinétiques d'assemblage de la tubuline à l'échelle du microtubule a montré que l'instabilité dynamique des microtubules peut-être modélisée en utilisant cinq paramètres distincts que sont : les vitesses de croissance (ou polymérisation) et de décroissance (ou dépolymérisation), les fréquences de catastrophe et de sauvetage ainsi que les fréquences de pause (Keller et al., 2008).

L'existence de cette instabilité dynamique est une **propriété intrinsèque des microtubules** jouant un rôle essentiel dans les différentes fonctions microtubulaires et, qui grâce à l'essor de la vidéomicroscopie, peut être aisément étudiée sur cellules vivantes. *Comme nous le verrons dans la partie expérimentale, cette technique nous a permis d'étudier l'impact des agents anti-microtubules sur l'instabilité dynamique des microtubules.*

2.2. Contrôle de la dynamique du réseau microtubulaire : présentation des protéines régulatrices des microtubules

Au niveau cellulaire, la vitesse de polymérisation et les fréquences de transition entre les événements de catastrophe et de sauvetage des microtubules sont nettement supérieures à

celles qui sont mesurées *in vitro* (Cassimeris, 1999). Ces différences sont la conséquence de facteurs intrinsèques permettant la régulation de la dynamique des microtubules parmi lesquels nous retrouvons, en plus de la molécule de GTP et de la tubuline décrites ci-dessus, les protéines associées aux microtubules (*MAP*). Classiquement, trois groupes de protéines sont distingués : les *MAP* structurales qui stabilisent les microtubules, les *MAP* déstabilisant les microtubules *et les +TIP, famille de protéines qui se fixent aux extrémités (+) des microtubules et qui vont particulièrement nous intéresser au cours de cette thèse, par le biais de la protéine EB1 (End binding protein 1).*

2.2.1. Les MAP stabilisatrices

Chez les mammifères, de nombreuses protéines stabilisatrices sont répertoriées parmi lesquelles nous retrouvons MAP1, MAP2, la famille des protéines STOP (*stable tubule only peptide* ou MAP6), la protéine Tau ou encore la doublecortine (*DCX*) (Cassimeris and Spittle, 2001). De manière générale, elles possèdent des domaines répétés au niveau de leur domaine de liaison aux microtubules situé dans la région C-terminale. Elles peuvent s'associer à plusieurs dimères de tubuline tout le long des microtubules empêchant alors la dissociation des sous-unités de tubuline (Desai and Mitchison, 1997). *In vitro*, les MAP stabilisatrices augmentent la vitesse d'assemblage des microtubules et les stabilisent. De plus, tout comme pour la tubuline, le niveau d'expression des MAP pourrait également être à l'origine des propriétés dynamiques différentes des microtubules selon le type cellulaire considéré, au même titre que leur composition isotypique (Maccioni and Cambiazo, 1995). La fixation de ces MAP est régulée par des jeux de kinases et de phosphatases – que nous ne détaillerons pas ici – permettant ainsi de contrôler leur activité (Cassimeris and Spittle, 2001).

2.2.2. Les MAP déstabilisatrices

Parmi les MAP déstabilisatrices, quatre modes d'action peuvent être distingués. Tout d'abord, nous retrouvons les protéines agissant par *séquestration* de la tubuline libre entraînant ainsi une diminution du pool de tubuline prête à être associée aux microtubules. Parmi ces protéines, la plus étudiée est la protéine Op18/Stathmine. Protéine ubiquitaire, elle est fortement exprimée dans les neurones et les cellules prolifératives. Elle peut lier et séquestrer deux dimères de tubuline aboutissant à la formation d'un complexe ternaire dénommé T2S. Cette protéine provoque également directement les phénomènes de catastrophe en induisant l'hydrolyse du GTP aux extrémités (+) des microtubules (Howell et al., 1999). Le deuxième mécanisme d'action met en jeu les *déphosphorylases* comprenant notamment les membres de

la superfamille des kinésines. Par exemple, la kinésine-13 augmente les processus de catastrophe en provoquant une conformation incurvée des protofilaments (Newton et al., 2004). Un autre exemple est celui de la kinésine-8 qui s'accumule aux extrémités (+) des microtubules. Elle y exerce alors son activité ATP-dépendante de facteur inducteur de catastrophe et ATP-indépendante de séquestration de la tubuline (Gupta et al., 2006; Newton et al., 2004). Le troisième mode d'action fait intervenir la superfamille des *protéases AAA* (*ATPases associated with a number of cellular activities*) comprenant notamment la katanine, la spastine et la fidgetine. Ces protéines vont réguler la longueur, le nombre et le comportement cinétique des microtubules par coupure ou « severing » (Sharp and Ross, 2012). Enfin, le quatrième mécanisme est la régulation des MAP stabilisatrices par phosphorylation de leur domaine de liaison aux microtubules par les *kinases MARK* (*microtubules affinity regulating kinase*) également dénommées partition-defective kinases (*Par-1*) entraînant la dissociation des MAP stabilisatrices des microtubules (Matenia and Mandelkow, 2009).

2.2.3. Les +TIP

Un groupe particulier de MAP, dénommé +TIP, a été mis en évidence dans le début des années 1990 avec la découverte, en premier lieu, de la protéine CLIP-170 (*Cytoplasmic Linker Protein-170* ; Rickard and Kreis, 1990). Contrairement aux MAP classiques localisées le long des microtubules, ces protéines, comme leur nom l'indique, vont se fixer préférentiellement aux extrémités (+) des microtubules. Ce groupe de protéines est hautement conservé chez tous les eucaryotes et joue un rôle important dans la dynamique des microtubules. Depuis, la découverte de CLIP-170, ce sont plus de vingt familles de +TIP qui ont été identifiées (Schuyler and Pellman, 2001). Elles vont s'accumuler aux extrémités (+) des microtubules leur conférant un aspect caractéristiques dit en « **comète** ». Elles possèdent des fonctions communes en régulant la dynamique des microtubules et interviennent ainsi notamment dans la division cellulaire ou encore la migration cellulaire (Ferreira et al., 2014). Une classification par rapport à leurs éléments structuraux leur permettant d'interagir entre elles ou avec les microtubules a été proposée (Akhmanova and Steinmetz, 2010). ***Cinq groupes en ressortent que je vais détailler succinctement ci-dessous hormis le groupe des protéines EB qui, représentant un des acteurs principaux de mes travaux de thèse, sera davantage développé ci-dessous dans le paragraphe 2.3.***

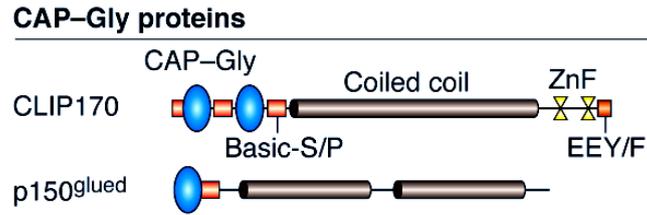


Figure 8 : Représentation schématique de la structure des protéines à domaine CAP-Gly. Les deux principales représentantes de cette famille sont CLIP-170 et p150^{glued}. Par l'intermédiaire de leur domaine CAP-Gly, elles vont pouvoir se fixer à la tubuline mais également à EB1 *via* leur domaine EEY/F. Au niveau de la dynamique des microtubules, elles sont définies comme stabilisatrices des microtubules en jouant notamment un rôle de facteur de sauvetage (Akhmanova and Steinmetz, 2010).

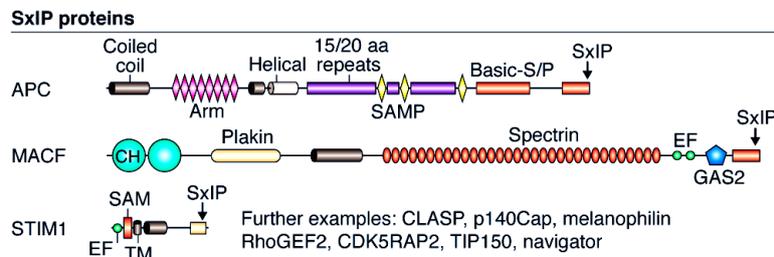


Figure 9 : Représentation schématique de la structure des protéines à motif SxIP. Composés de nombreuses protéines, ce groupe est principalement représenté par la protéine APC. Le motif SxIP va leur permettre de se fixer aux microtubules sous la dépendance d'EB1 et d'entraîner la stabilisation des microtubules voire de favoriser sa polymérisation (Akhmanova and Steinmetz, 2010).

- **Les protéines à domaine CAP-Gly**

Ces protéines possèdent dans leur structure un domaine particulier leur permettant de se fixer aux microtubules. Ce domaine, dénommé CAP-Gly est riche en glycine et est hautement conservé chez les eucaryotes (Riehemann and Sorg, 1993). Des études en cristallographie ont permis de mettre en évidence que le domaine CAP-Gly interagissait par sa cavité hydrophobe avec le motif C-terminal EEY/F présent au niveau de la tubuline α (Figure 8 ; Honnappa et al., 2006). Il est désormais admis que la forme tyrosinée de la tubuline est un facteur important pour le recrutement des protéines à domaine CAP-Gly aux extrémités (+) des microtubules (Bieling et al., 2008; Peris et al., 2006). Ce domaine ne va pas uniquement reconnaître le motif EEY/F mais peut aussi interagir avec les hélices α et β de la tubuline ou encore avec des motifs en doigt de zinc (Gouveia and Akhmanova, 2010). Les deux principales représentantes de ce groupe de protéines sont la protéine CLIP-170 et la sous-unité du complexe dynactine : la protéine p150^{Glued}. Ces protéines sont clairement impliquées dans la stabilisation des microtubules en jouant un rôle de facteur anti-catastrophe chez la levure ou comme facteur de sauvetage dans les cellules de mammifères (Brunner and Nurse, 2000; Komarova et al., 2002). CLIP-170 est une phosphoprotéine qui peut être régulée notamment par la kinase AMPK (*AMP-activated protein kinase*). Sa phosphorylation inhibe son interaction avec les microtubules perturbant alors leur polymérisation (Nakano et al., 2010).

- **Les protéines à motif SxIP**

Ce groupe de protéines comporte un vaste nombre de composés ayant tous dans leur séquence une région enrichie en résidus basiques et en résidus serines (Akhmanova and Steinmetz, 2008). Ce motif conservé dans l'évolution comprend quatre résidus : Ser-X-Ile-Pro (SxIP) où X est un acide aminé quelconque (Gouveia and Akhmanova, 2010). Parmi les protéines à motif SxIP, nous retrouvons notamment MACF (*microtubule actin crosslinking factor*), STIM1 (*stromal interaction molecule 1*) ou encore la protéine APC (*adenomatous polyposis coli* ; Figure 9). Cette dernière, au niveau de la régulation de la dynamique des microtubules, va permettre la stabilisation des microtubules et favoriser également la polymérisation (Nakamura et al., 2001). Tout comme CLIP-170, APC est une phosphoprotéine qui va être régulée par GSK3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*). APC phosphorylée va alors avoir une moindre affinité pour les microtubules entraînant ainsi sa dissociation (Zumbrunn et al., 2001).

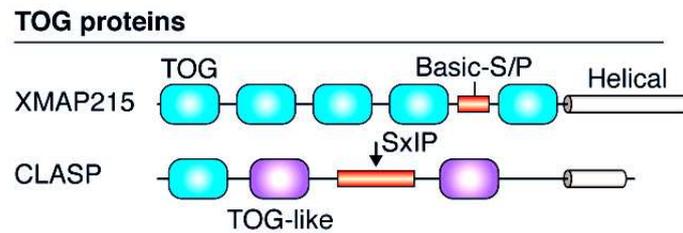


Figure 10: Représentation schématique de la structure des protéines à motif TOG.
 Les protéines de ce groupe vont favoriser la stabilisation et la polymérisation des microtubules. Composées de plusieurs motifs TOG ou TOG-like, elles vont pouvoir interagir avec les dimères de tubuline. Les protéines CLASP possèdent en plus dans leur structure un motif SxIP leur permettant d'interagir également avec EB1 (Akhmanova and Steinmetz, 2010).

- **Les protéines à domaine TOG**

Les protéines issues de cette famille sont caractérisées par la présence à leur extrémité N-terminale d'un nombre variable de motif TOG (*tumor overexpressed gene*). Ces motifs sont composés de douze hélices principales contenues dans une structure rectangulaire qui interagissent avec les dimères de tubuline (Slep, 2009 ; Figure 10). Deux représentantes majeures sont répertoriées : XMAP215/Dis1 et CLASP (*cytoplasmic linker associated protein*). XMAP215 a été identifiée comme un facteur protéique augmentant la croissance des microtubules (Gard and Kirschner, 1987) et favorisant la polymérisation en induisant l'addition de dimères de tubuline aux extrémités (+) des microtubules ; elle aurait ainsi un rôle de polymérase (Brouhard et al., 2008). Les protéines CLASP, quant à elles, comportent deux membres chez les mammifères : CLASP1 et CLASP2. Elles sont dénommées ainsi car initialement elles ont été identifiées comme des protéines associées à CLIP (Akhmanova et al., 2001). L'analyse de la séquence des protéines CLASP montre qu'elles possèdent un domaine TOG à leur extrémité N-terminale suivi de deux domaines TOG-like entrecoupés d'un motif SxIP (Mimori-Kiyosue et al., 2005; Slep, 2009). Ce dernier permet l'interaction avec les microtubules tandis que son extrémité C-terminale, hautement conservée, permet la fixation avec les protéines CLIP. CLASP permet la stabilisation des microtubules et possède un rôle de facteur de sauvetage (Bratman and Chang, 2007). Il est à noter que les protéines CLASP sont également retrouvées au niveau des centrosomes et de l'appareil de Golgi mais leurs fonctions à ces sites restent encore méconnues (Gouveia and Akhmanova, 2010).

- **Les protéines motrices**

Les protéines motrices sont représentées par les deux familles suivantes : la dynéine et les kinésines. Classiquement, elles sont connues pour leur implication dans le transport intracellulaire de protéines par les microtubules. Mais les protéines de la famille des kinésines Kin I (*kinesine internal*), aussi appelées kinésine 13, sont retrouvées majoritairement aux extrémités (+) des microtubules. Elles vont jouer un rôle essentiel dans l'organisation du réseau microtubulaire mais aussi dans la régulation de la dynamique microtubulaire lors de l'interphase et de la mitose (Daire and Poüs, 2011). Les protéines motrices sont connues pour favoriser principalement la dépolymérisation des microtubules en jouant le rôle de facteur de catastrophe (Hertzer et al., 2003; Howard and Hyman, 2007). Cependant, il a été démontré que la kinésine-1 jouait un rôle important dans la polymérisation des microtubules et dans les phénomènes de sauvetage notamment *via* l'activation de JNK (*c-June N-terminal Kinase*) et la protéine CLIP-170 (Daire et al., 2009).

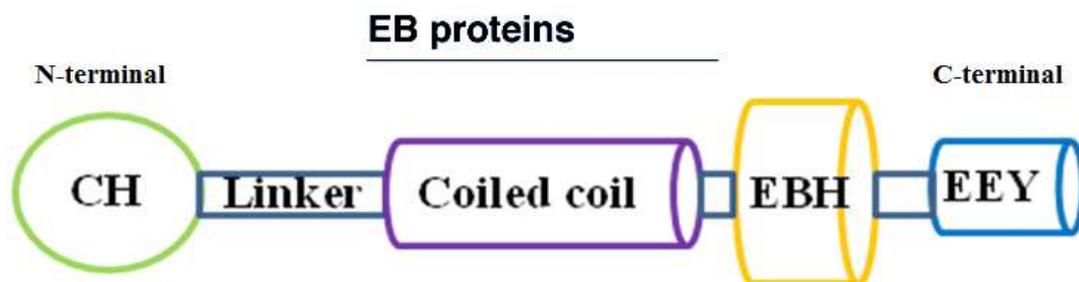


Figure 11 : Représentation schématique de la structure des protéines EB.

La structure d'EB1 a été caractérisée en cristallographie et a mis en évidence plusieurs structures essentielles. Le domaine CH en N-terminal est nécessaire et suffisant pour qu'EB1 se fixe aux microtubules. La région linker correspond à une séquence chargée positivement et participe à l'affinité de la protéine aux microtubules. La structure coiled-coil et le domaine EBH sont responsables de la dimérisation des protéines EB. Le domaine EBH joue également un rôle essentiel dans les interactions protéiques ainsi que dans l'auto-inhibition d'EB1. Enfin, l'extrémité C-terminale contient un motif EEY/F similaire à celui de la tubuline permettant le recrutement de nombreuses protéines (Adaptation Akhmanova and Steinmetz, 2010).

Il est à noter que de nombreuses autres +TIP existent mais ne peuvent être classées dans ces différents groupes prenant en compte principalement les structures protéiques. De plus, si les extrémités (+) avec les +TIP ont été particulièrement étudiées ces dernières années, une nouvelle classe de protéine est apparue dernièrement dénommée : **-TIP** (*microtubule minus-end targeting proteins*) dont la principale représentante à ce jour est la CAMSAP (*Calmodulin-regulated spectrin-associated protein*). Une revue parue dernièrement relate l'ensemble des informations connues à ce jour sur ces nouvelles protéines (Akhmanova and Hoogenraad, 2015).

2.3. Zoom sur les protéines EB : chef d'orchestre de la dynamique des microtubules

Les protéines EB correspondent au représentant majeur des protéines +TIP à l'origine de l'édification de réseaux protéiques aux extrémités (+) des microtubules. Leur rôle dans la dynamique des microtubules est, de nos jours, devenu incontestable et leur liaison aux microtubules est désormais utilisée en routine dans l'étude de l'instabilité dynamique des microtubules par vidéomicroscopie. *La protéine EB1 correspond à l'un des acteurs majeurs de mes travaux de thèse ; c'est pourquoi je vais présenter ci-dessous sa structure ainsi que sa régulation intracellulaire, puis son rôle dans la dynamique microtubulaire. Dans les parties suivantes de ce chapitre, elle constituera un fil rouge avec son rôle dans les fonctions microtubulaires ainsi que son implication dans le domaine de l'oncologie.*

2.3.1. Présentation, structure et régulation des protéines EB

Les protéines EB représentent une famille de protéines hautement conservée au cours de l'évolution. Chez les mammifères, trois membres sont connus : EB1, EB2 et EB3 d'environ 30 kDa chacun et codés par les gènes MAPRE. Ce sont des protéines ubiquitaires sauf EB2 dont les niveaux d'expression varient selon les tissus (Su and Qi, 2001). Les homologues d'EB1 sont Bim1p et Mal3 respectivement dans la levure à bourgeonnement et la levure se divisant par scission (Beinhauer et al., 1997; Schwartz et al., 1997). Les études réalisées en cristallographie sur EB1 ont permis de caractériser sa structure (Figure 11). Le domaine N-terminal est constitué du domaine CH (*calponin homology*). Ce domaine est nécessaire et suffisant pour se fixer aux microtubules et reconnaître les extrémités (+) en croissance (Komarova et al., 2009; Skube et al., 2010). Le domaine CH est suivi d'une séquence chargée positivement dénommée région linker. Cette dernière est variable selon les protéines EB et participe à leur affinité pour les microtubules (Komarova et al., 2009; Xia et al., 2014). La région C-terminale est composée du domaine EBH (*end binding homology*) associé à une

structure coiled-coil responsable de la dimérisation des protéines EB (Su and Qi, 2001). De plus, ce domaine est impliqué dans les interactions avec les nombreux partenaires protéiques des EB (Akhmanova and Steinmetz, 2008). Le domaine EBH est suivi d'une région acide d'une vingtaine d'acides aminés jouant un rôle dans l'auto-inhibition des protéines EB ainsi que dans les interactions protéiques (Hayashi et al., 2005; Honnappa et al., 2005; Kanaba et al., 2013). Enfin, l'extrémité du domaine C-terminal contient un motif EEY/F similaire à celui retrouvé sur l' α -tubuline (Komarova et al., 2005). Les protéines EB possèdent une structure similaire hormis EB2 qui possède une extension d'une quarantaine d'acides aminés en position N-terminale ainsi qu'une augmentation des résidus acides en C-terminal expliquant probablement son affinité réduite pour de nombreux partenaires comme APC ou encore CLIP-170 (Komarova et al., 2005, 2009). Enfin, d'un point de vue structurale, les protéines EB vont pouvoir former des hétérodimères (essentiellement EB1 et EB3) *in vivo* et *in vitro* (De Groot et al., 2010; Komarova et al., 2009). Une étude parue récemment montre que les protéines EB sont, en réalité, obligatoirement assemblées sous forme de dimères dans le cytoplasme (Sen et al., 2013). Lorsque ces dimères s'associent aux microtubules, la présence du GTP entrainerait alors un changement de conformation responsable de la dissociation des dimères d'EB qui retrouveraient ainsi une forme monomérique (Gireesh et al., 2014).

De nos jours, les mécanismes de **régulation intracellulaire des protéines EB** restent encore mal connus et font l'objet de nombreux travaux de recherche. Deux études ont mis en évidence la régulation cellulaire des protéines EB1 et EB3 par le protéasome. En effet, EB1 se fixerait au complexe COP9 signalosome la protégeant ainsi de son ubiquitinylation et donc de sa dégradation par le protéasome (Peth et al., 2007). De même, il a été mis en évidence qu'EB3 serait régulée par la kinase SIAH-1, une ubiquitine ligase, entraînant sa dégradation par le protéasome (Ban et al., 2009). Cette même étude a également mis en lumière que les kinases Aurora A et B pouvaient phosphoryler EB3 sur le résidu serine 176 (S176) de la région linker de la protéine. Cette phosphorylation protégerait EB3 de l'ubiquitinylation par SIAH-1. Par la suite, deux autres études ont démontré la phosphorégulation d'EB3. La première met en évidence la phosphorylation sur le résidu serine 162 (S162), toujours dans la région linker de la protéine, entraînant alors une diminution de l'affinité d'EB3 pour les microtubules (Komarova et al., 2012). La deuxième rapporte la phosphorylation d'EB3 sur le résidu serine 176 par Aurora B (Ferreira et al., 2013). En revanche, la phosphorylation d'EB1 n'a été démontrée jusqu'à présent que chez ses homologues. En effet, il a été révélé la phosphorylation de Bim1p par l'homologue d'Aurora (Ip11p) ainsi que la phosphorylation de

mal3. Ces deux phosphorylation se situent dans la région linker de la protéine entraînant une diminution de l'accumulation des homologues d'EB1 aux extrémités (+) des microtubules (Imori et al., 2012; Zimniak et al., 2009). Deux autres MPT d'EB1 ont récemment été mises en lumière : d'une part, l'acétylation d'EB1 sur le résidu lysine 220 (K220) par la kinase PCAF (*P300/CBP-associated factor*) provoquant une diminution de la fixation d'EB1 aux microtubules et, d'autre part, la présence d'un cycle de détyrosination/(re)tyrosination sur la séquence EEY/F d'EB1 similaire à celui décrit sur l' α -tubuline (Rovini et al., 2013a; Xia et al., 2012). Enfin, une étude a mis en lumière le rôle régulateur de MAP1B dans la concentration intracellulaire des protéines EB1 et EB3. En effet, MAP1B serait à l'origine d'une séquestration des protéines EB entraînant alors une diminution de leur accumulation aux extrémités (+) des microtubules et donc, une inhibition de la dynamique des microtubules (Tortosa et al., 2013).

2.3.2. EB1 : clef de voûte des complexes +TIP, au cœur de la dynamique microtubulaire

De par leur polarité structurale intrinsèque, les microtubules possèdent une extrémité (+) siège de l'accumulation de nombreux facteurs protéiques que sont les +TIP et, notamment les protéines EB. Les études *in vitro* ont mis en évidence qu'elles reconnaissent uniquement les extrémités (+) des microtubules en croissance et ceci de façon indépendante aux autres +TIP (Bieling et al., 2007; Dixit et al., 2009; Komarova et al., 2009). Elles vont ainsi s'y accumuler formant une structure caractéristique dite en comète. Ne co-polymérisant pas avec la tubuline et se fixant uniquement aux extrémités (+) en croissance et non au niveau du lattice des microtubules, il a été émis l'hypothèse qu'elles interagissaient spécifiquement avec une structure caractéristique des extrémités en croissance. Les nombreuses études réalisées ces dernières années sur les protéines EB ont permis de mettre en évidence qu'elles reconnaîtraient les extrémités (+) des microtubules nouvellement polymérisées en se fixant alors sur la GTP-cap. En effet, une première étude avait démontré qu'EB1-GFP s'associait préférentiellement aux microtubules en présence de GMPCPP, un analogue du GTP s'hydrolysant lentement (Zanic et al., 2009). Par la suite ces travaux ont été confortés par ceux de SP. Maurer qui démontra par l'utilisation d'un analogue non hydrolysable du GTP (GTP γ S) une forte accumulation d'EB1 aux extrémités (+) des microtubules (Maurer et al., 2011). La poursuite de ses travaux a mis en lumière que la fixation des EB entraînerait des changements de conformation du nucléotide GTP expliquant le rôle de facteur pro-catastrophe d'EB1 (Maurer et al., 2014). Ce rôle pro-catastrophe est, cependant, associé à des effets

positifs sur la dynamique des microtubules notamment en favorisant et en augmentant la vitesse de polymérisation (Komarova et al., 2009; Tirnauer et al., 2002).

Les membres de la famille des EB et, plus particulièrement EB1, sont désormais reconnus comme étant des **régulateurs clefs de la dynamique des microtubules**. Pour assurer ses fonctions, ils vont recruter d'autres membres protéiques et sont généralement considérés comme les clefs de voûte nécessaires à **l'édification de complexes +TIP** donnant naissance à de véritables réseaux protéiques aux extrémités (+) des microtubules (Lansbergen and Akhmanova, 2006). Par exemple, des études en cristallographie ont permis de mettre en évidence que le domaine CAP-Gly interagissait par sa cavité hydrophobe avec le motif C-terminal EEY/F présent au niveau d'EB1. Ce domaine ne va pas uniquement reconnaître le motif EEY/F mais peut aussi interagir avec le domaine EBH d'EB1 permettant alors la fixation de protéines telles que CLIP-170 aux extrémités (+) des microtubules (Gouveia and Akhmanova, 2010). De plus, initialement, EB1 avait été caractérisée comme un partenaire d'APC, protéine à motif SxIP. En réalité, c'est la fixation d'EB1 aux extrémités (+) des microtubules qui va permettre le recrutement d'APC (Morrison, 2009).

D'un point de vue technique, les EB étant les représentants majeurs des +TIP, couplées à des protéines fluorescentes, elles représentent de nos jours un outil de biologie moléculaire indispensable dans l'étude, par vidéomicroscopie, de la dynamique microtubulaire *in vitro* comme désormais *in vivo* (Oddoux et al., 2013). ***C'est notamment par transfection cellulaire du plasmide EB1-GFP que les travaux exposés dans la partie 1 des données expérimentales ont été réalisés pour étudier la dynamique microtubulaire sous l'effet des agents anti-microtubules.***

3. Implications des microtubules dans les fonctions cellulaires

Organite indispensable au bon fonctionnement de la cellule, le réseau microtubulaire intervient aussi bien dans la mitose que dans les fonctions interphasiques. ***Dans le paragraphe qui va suivre, je ne vais pas dresser la liste exhaustive des nombreuses activités cellulaires des microtubules mais j'ai choisi de détailler les principales fonctions de ce réseau, essentielles au développement et à la prolifération des masses tumorales, et qui seront ciblées par les agents anticancéreux.***

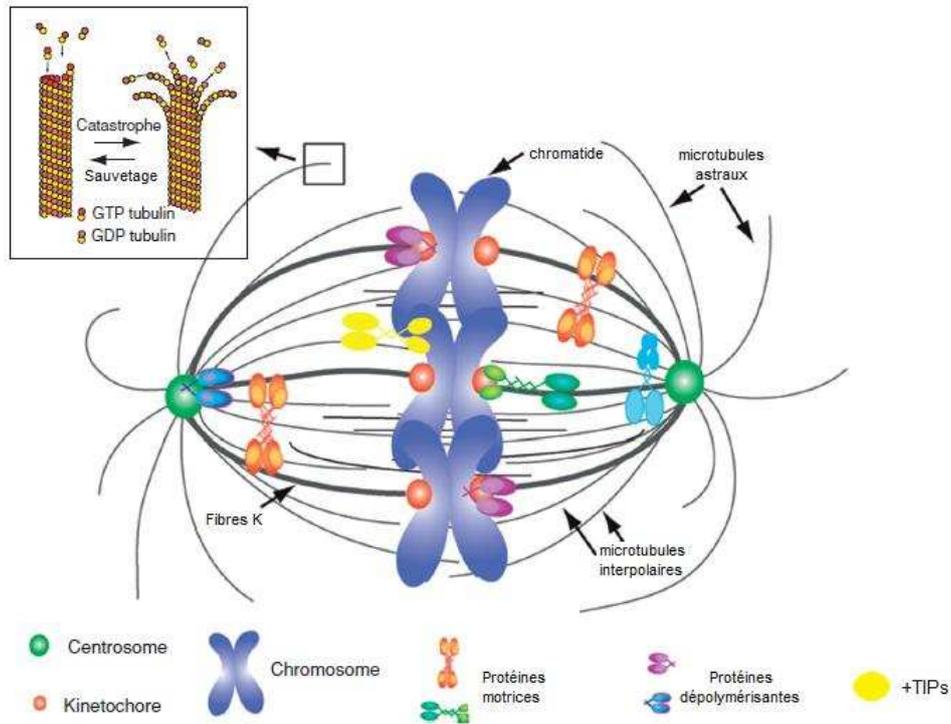


Figure 12 : Représentation schématique des éléments clés constituant le fuseau mitotique.
 Au cours de la mitose, les centrosomes vont permettre la polymérisation des microtubules astraux et interpolaire ainsi que les fibres K. Ces dernières, grâce à l'instabilité dynamique des microtubules, vont sonder le cytoplasme jusqu'à obtenir une interaction avec un kinétochore permettant par la suite d'aligner les chromosomes. Les protéines motrices ainsi que les MAP et notamment les +TIP sont essentielles pour assurer le bon déroulement de la mitose en régulant la dynamique des microtubules. (Walczak and Heald, 2008).

3.1. Les microtubules : maîtres de la division cellulaire

La mitose, du grec « *mitos* » signifiant filament en référence à l'aspect des chromosomes durant ce phénomène, permet à **partir d'une cellule mère de former deux cellules filles**. Processus indispensable à la prolifération cellulaire, il repose sur la formation du fuseau mitotique constitué par le réseau microtubulaire (Figure 12). La représentation classique de la mitose où chaque kinétochore des chromosomes est rattaché à un seul microtubule est erronée. En réalité, ce sont plusieurs microtubules qui vont venir fixer chaque chromosome grâce à leurs propriétés dynamiques leur permettant d'alterner des phases de croissance (ou de sauvetage) et de raccourcissement (ou de catastrophe) (Desai and Mitchison, 1997; Mitchison and Kirschner, 1984) indispensables aux différentes étapes de la mitose. Les microtubules kinétochoriens ou fibres K vont ainsi sonder le cytoplasme grâce à des mouvements rapides de croissance et de raccourcissement de leurs extrémités (+) jusqu'à ce qu'une liaison avec un kinétochore soit établie. Ce processus est appelé « search-and-capture » (McIntosh et al., 2002; Vos et al., 2004). Cependant, des études tendent à montrer que ce processus n'est pas suffisant pour l'alignement des chromosomes pendant la mitose (Wollman et al., 2005). Un autre modèle, dénommé « self-assembly », part du principe que les microtubules vont polymériser de façon indépendante des centrosomes à proximité des chromosomes. Il semblerait que ces deux modèles puissent coexister au sein de la même cellule (Walczak and Heald, 2008). Par la suite, la ségrégation chromosomique est possible grâce à la dépolymérisation rapide des fibres K au niveau des extrémités (+) (Coue et al., 1991) et à l'activité des protéines motrices notamment les membres de la famille des kinésines 13 appartenant aux +TIP (Hyman and Mitchison, 1991; Sharp and Rogers, 2004). Comme nous l'avons vu ci-dessus, la dynamique des microtubules est sous la dépendance notamment des MAP et en particulier des +TIP. Ces dernières jouent donc un rôle crucial dans les différentes phases de la mitose. Par exemple, la **protéine EB1** retrouvée au niveau des centrosomes (comme APC) possède un rôle important dans l'initiation de la croissance des microtubules (Louie et al., 2004; Rehberg and Gräf, 2002). Elle va également fixer les microtubules à l'interface entre les kinétochores et les extrémités en croissance suggérant qu'elle va moduler le comportement dynamique des microtubules durant la mitose (Tirnauer et al., 2002). EB1 va aussi promouvoir l'activité de la kinase Aurora B qui assure la ségrégation des chromatides au cours de la mitose (Sun et al., 2008). En stimulant l'activité de ces kinases, EB1 va permettre à Aurora B de phosphoryler EB3, qui semble jouer un rôle dans la phase tardive de la mitose en stabilisant les microtubules au niveau des plaques d'adhésion (Ban et al., 2009; Ferreira et

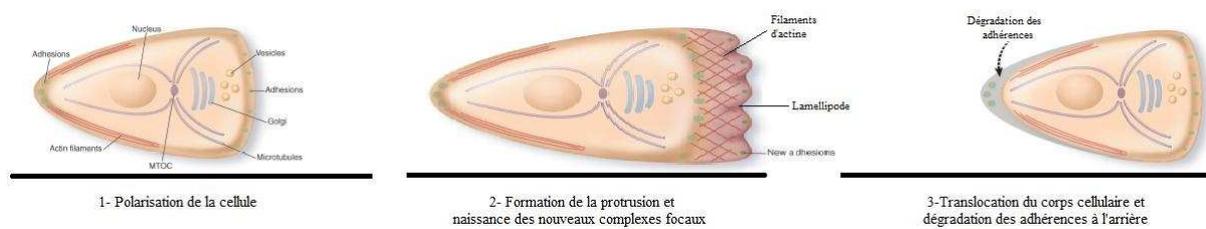


Figure 13 : Représentation schématique des étapes de la migration cellulaire.

La migration des cellules fait intervenir le réseau actinique mais également les microtubules à plusieurs niveaux. Au cours de la 1^{ère} phase (à gauche), correspondant à la polarisation cellulaire, le réseau microtubulaire va orienter le MTOC dans le sens de la migration. De plus, au front de migration, les microtubules sont stabilisés par MPT de la tubuline permettant alors le transport intracellulaire des vésicules et des protéines. Les microtubules interviennent enfin lors de la 3^{ème} phase correspondant à la translocation cellulaire (à droite) en dépolymérisant son réseau pour dégrader les plaques d'adhérences (Adaptation Ridley et al., 2003).

al., 2013). Enfin, il a été démontré l'augmentation de la forme acétylée d'EB1 pendant la mitose suggérant un rôle particulier de cette MPT pendant la division cellulaire (Xia et al., 2012). En plus des protéines EB, d'autres +TIP vont aussi intervenir dans la régulation du processus mitotique. La revue de J.G. Ferreira, parue dernièrement, répertorie l'ensemble des fonctions de ces +TIP au cours de la mitose (Ferreira et al., 2014).

3.2. Rôle des microtubules dans la migration cellulaire

La motilité cellulaire, ou migration cellulaire, correspond à la **capacité des cellules à se déplacer activement, spontanément ou en réagissant à des stimuli, de façon aléatoire ou dans une direction dirigée, individuellement ou collectivement**. Ce processus est finement contrôlé au sein de la cellule et, lors d'une dérégulation, la migration cellulaire va pouvoir concourir à des processus pathologiques tels que **l'angiogénèse tumorale** ou la **dissémination métastatique des tumeurs**. Pendant longtemps, la migration cellulaire a été considérée comme exclusivement actine-dépendante sous le contrôle des protéines de la famille des Rho GTPases. En effet, chacun des évènements qui permettent le déplacement des cellules peut être, en théorie, gouverné par les filaments d'actine en l'absence de microtubules (Borisy and Svitkina, 2000). Cependant, dès 1970, les travaux de J.M. Vasiliev ont mis en lumière l'implication des microtubules dans la migration des cellules dans la majorité des types cellulaires (Vasiliev et al., 1970). Schématiquement, le processus migratoire peut être divisé en trois étapes : polarisation de la cellule, puis formation de la protrusion avant la translocation du corps cellulaire (Figure 13 ; Lauffenburger and Horwitz, 1996; Ridley et al., 2003). Dès 1982, il a été démontré que les microtubules participaient à la polarisation cellulaire par l'orientation du MTOC (*Microtubule organizing center*) face au « leading edge », c'est-à-dire dans le sens de migration (Kupfer et al., 1982). De plus, la polarisation du réseau microtubulaire passe également par la stabilisation de certains microtubules au niveau du front de migration *via* mDia, molécule effectrice des Rho GTPases (Palazzo et al., 2001). Cette stabilisation des microtubules implique des MPT de la tubuline comme la détyrosination ou l'acétylation (Gundersen and Bulinski, 1988; Palazzo et al., 2003). Les microtubules stabilisés serviraient alors de rails de transport pour les différentes vésicules et protéines intracellulaires et permettraient la réorientation du MTOC et de l'appareil de Golgi vers le front de migration. Lors de la dernière étape de la migration cellulaire, il est désormais admis que les microtubules contribuent à la translocation du corps cellulaire. En effet, il a été démontré qu'ils participaient au renouvellement des sites d'adhérence à l'arrière de la cellule en entraînant la dépolymérisation de certains des microtubules (Enomoto et al., 2015;

Kaverina et al., 2000; Wehrle-Haller and Imhof, 2003). Enfin, de nombreux travaux ont mis en lumière le dialogue entre le réseau microtubulaire et les protéines Rho GTPases lors de la migration (Grigoriev et al., 2006; Wittmann and Waterman-Storer, 2001a). Cette famille de protéines joue notamment un rôle important dans la régulation de l'instabilité dynamique des microtubules en interagissant avec de nombreuses +TIP telles que CLASP, APC ou encore **la protéine EB1** (Watanabe et al., 2005). Cette dernière, en association avec APC, va également promouvoir la migration cellulaire en permettant la stabilisation des microtubules aux points d'attache (Wen et al., 2004). De récents travaux parus en 2014 indiquent qu'EB1 interviendrait en association avec la protéine CYLD (*cylindromatosis*) dans la réorientation du centrosome, dans la stabilisation du front de migration et dans la rétraction cellulaire chez la levure (Li et al., 2014). De plus, il a été mis en lumière le rôle primordial d'EB1 dans la réorganisation cellulaire au cours de la migration (Gierke and Wittmann, 2012) ainsi que son rôle clef dans la formation de la protrusion dans les cellules de mélanome (Schober et al., 2009).

Au cours des pathologies cancéreuses, le processus migratoire des cellules joue un rôle fondamental à deux niveaux. Le premier est dans l'angiogénèse : **processus par lequel les cellules endothéliales vont former de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux pré-existants**. Il a été démontré que les cellules tumorales étaient capables de produire des chimiokines (en particulier les membres de la famille des chimiokines CXC) qui vont cibler les cellules endothéliales pour promouvoir leur prolifération ainsi que leur migration par chimiotactisme. Cette activation, *in fine*, va concourir à l'apport des nutriments et de l'oxygène nécessaire pour la prolifération des cellules tumorales (Folkman, 2002; Mehrad et al., 2007; Orimo et al., 2005). Le deuxième point clef de la migration cellulaire dans le processus tumoral est la **dissémination métastatique des cellules**. Malgré les nombreuses études entreprises, le mécanisme de l'invasion tumorale reste de nos jours peu compris. Il ferait intervenir le phénomène de chimiotactisme associé aux interactions entre cellules cancéreuses et celles du microenvironnement tumoral comme les fibroblastes ou les macrophages (Orimo et al., 2005). De récentes études ont notamment démontré que les organes possédant un haut niveau de chimiokines seraient ainsi davantage soumis à un risque d'invasion tumorale (Zlotnik et al., 2011).

3.3. Les microtubules comme rails de transport intracellulaire

Une autre fonction essentielle des microtubules est leur implication dans le trafic intracellulaire d'organites, de vésicules, d'ARN et de protéines. Ce rôle fait du réseau

microtubulaire **un acteur**, à part entière, **des voies de transduction des signaux intra et extracellulaires**. Dans un premier temps, il est clairement établi que le réseau microtubulaire est capable de transporter les ARNm permettant ainsi leur expression aux sites cellulaires où ils sont attendus. De plus, les microtubules peuvent réguler leur expression par séquestration jouant ainsi un rôle dans la répartition protéique intracellulaire et donc le maintien de la polarité cellulaire (López de Heredia and Jansen, 2004; Stebbings, 2001). Comme nous l'avons vu ci-dessus, les microtubules vont être capables d'interagir avec de nombreuses protéines cellulaires. Le réseau microtubulaire constitue ainsi un véritable **réservoir protéique**. Ils jouent notamment un rôle important dans la séquestration de nombreuses protéines qui peuvent être libérées après un stimulus donné. C'est le cas par exemple de l'activation de la voie NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) sous l'effet des agents anti-microtubules (Mistry et al., 2004). Les protéines p53 et Bim (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*) intervenant dans le phénomène de l'apoptose – qui sera détaillé dans le chapitre 2 ci-dessous – sont également dépendantes du réseau microtubulaire. Il a été démontré, par exemple, que l'acétylation du résidu lysine 40 de la tubuline favorise le recrutement microtubulaire de la protéine p53 *via* la protéine chaperonne hsp90 (*heat shock protein 90*) puis sa translocation nucléaire lui permettant alors d'assurer ses fonctions de facteur de transcription. Ce même mécanisme d'action faisant intervenir l'acétylation de l' α -tubuline et la protéine hsp90 pourrait aussi permettre l'activation de la protéine kinase Akt qui sera présentée dans le chapitre 3 ci-dessous (Giustiniani et al., 2009). Ainsi, le réseau microtubulaire constitue également un élément clef dans les différentes voies de signalisation cellulaire. Enfin, les microtubules sont impliqués dans le **transport intracellulaire des différents organites** tels que l'appareil de Golgi et de nombreuses vésicules de sécrétion, le réticulum endoplasmique ou encore les mitochondries (Boldogh and Pon, 2007; Fokin et al., 2014). Ce processus est observé à la fois pendant l'interphase et pendant la mitose permettant une répartition équivalente des organites dans les deux cellules filles. Ce transport dirigé le long des microtubules, servant ainsi de véritables rails de locomotion, est assuré par des protéines motrices que sont les kinésines et les dynéines principalement. ***Dans le chapitre suivant, nous verrons, de façon plus détaillée, le transport des mitochondries le long des microtubules.***

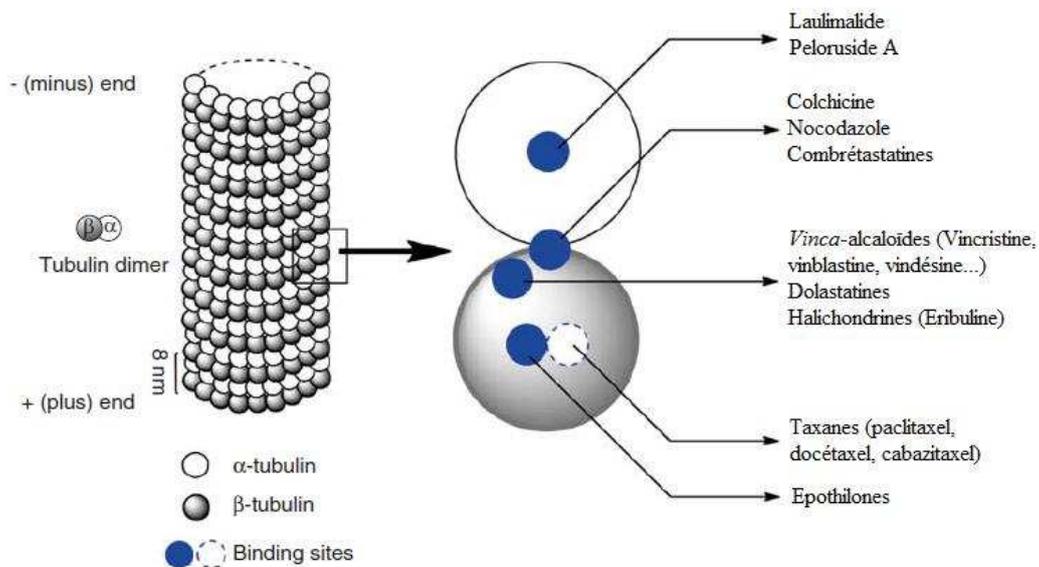


Figure 14 : Représentation des cinq sites de fixation des MTA à la tubuline.

Le site du Laulimalide situé sur la sous-unité α de la tubuline, le site des Epothilones et des Taxanes – proches l'un de l'autre – se trouve sur la sous-unité β de la tubuline à l'intérieur des microtubules. Ces trois sites sont toujours communément appelés sites de fixation des agents stabilisants les microtubules. Les deux autres sites sont, eux, dénommés sites de fixation des agents dépolymérisants les microtubules et comprennent le site des *Vinca*-alcaloïdes situé sur la sous-unité β de la tubuline et le site de la colchicine retrouvé à l'interface des sous-unités α et β (Liu et al., 2014).

4. Les microtubules en tant que cible en oncologie : succès et limites des agents anti-microtubules

Comme nous venons de le voir, les microtubules jouent un rôle fondamental dans de nombreux processus cellulaires et notamment dans la prolifération et la migration : deux phénomènes clefs dans le développement des masses tumorales. C'est pourquoi, rapidement, le réseau microtubulaire est apparu comme une cible thérapeutique prometteuse dans la lutte contre le cancer. Dès la fin des années 1950, les premiers composés furent développés et dénommés les agents anti-microtubules, communément appelés les MTA. Ce sont de puissants agents occupant toujours une place prépondérante dans l'arsenal thérapeutique anticancéreux mis à la disposition des cliniciens. Ces composés, souvent dérivés de produits d'origine naturelle, sont fréquemment administrés dans de nombreuses pathologies cancéreuses tant chez l'adulte que dans la population pédiatrique. Cependant, **le succès clinique qui les caractérise s'accompagne de la survenue de phénomènes de résistance et d'effets indésirables soulignant l'intérêt de mieux déchiffrer le mécanisme d'action cellulaire de ces agents afin de pouvoir les utiliser à bon escient.**

4.1. D'hier à aujourd'hui : présentation des acteurs et de leurs propriétés

Longtemps, les agents anti-microtubules ont été appelés « anti-mitotiques » ou encore « poisons du fuseau ». La découverte de leur action sur le système tubuline/microtubule a permis de mieux les caractériser et ainsi de les dénommer **agents anti-microtubules** (MTA) ou encore agents anti-tubuline. Ayant initialement démontré des effets opposés sur les microtubules *in vitro*, ces agents ont été catégorisés en deux familles : d'une part les agents dépolymérisants (exemples des *Vinca*-alcaloïdes et colchicinoïdes) et d'autre part les agents stabilisants (exemples des Taxanes et Épothilones) (Jordan and Wilson, 2004). A ce jour, cinq sites de fixation ont été découverts pour les MTA et sont dénommés en fonction de la famille de médicaments qui les ciblent : sites des *Vinca*-alcaloïdes, site de la colchicine, site des Taxanes, sites des Epothilones et site du laulimalide (Figure 14 ; Field et al., 2014; Liu et al., 2014).

Les nombreuses recherches réalisées sur la compréhension de leur mécanisme d'action ont révélé que, en réalité, tous ces agents perturbaient de façon commune les propriétés dynamiques des microtubules, et ainsi possédaient **un impact sur l'ensemble des fonctions mitotiques et interphasiques microtubulaires.**

D'un point de vue mécanistique, les premières études faites sur les MTA avaient démontré qu'ils entraînaient un blocage de la cellule en mitose provoquant un arrêt de la prolifération cellulaire (Jordan et al., 1991, 1993). Depuis, les nombreux travaux entrepris ont mis en lumière que les MTA possédaient différentes fonctions selon les doses auxquelles ils sont administrés. En effet, à de **fortes concentrations**, *in vitro*, les MTA vont perturber l'assemblage des microtubules pouvant former alors des bundles ou des paracristaux selon la classe de MTA (Turner and Margolis, 1984; Verdier-Pinard et al., 1999). Utilisés à des **doses dites cliniques**, il est désormais admis que les MTA impactent sur l'instabilité dynamique du réseau microtubulaire entraînant l'inhibition des fonctions interphasiques et mitotiques des microtubules essentielles aux cellules cancéreuses telles que la migration, la prolifération ou encore la division cellulaire (Field et al., 2014; Honore et al., 2005). Les travaux réalisés ces dernières années ont démontré que les MTA ciblaient tout particulièrement les complexes protéiques des +TIP aux extrémités (+) des microtubules et notamment la **protéine EB1** (Mohan et al., 2013). En effet, elle représente un acteur majeur dans le mécanisme d'action de ces agents anticancéreux puisqu'en inhibant son accumulation aux extrémités (+) des microtubules, les MTA provoquent une suppression de la dynamique microtubulaire et donc un dérèglement des fonctions cellulaires telles que la migration (Kapoor and Panda, 2012; Pagano et al., 2012; Rovini et al., 2010). Ces agents provoquent également un dérèglement du trafic intracellulaire comme par exemple la perturbation de la translocation nucléaire de HIF-1 α (*Hypoxia-inducible factor 1 α*), facteur pro-angiogénique et pro-survie (Carbonaro et al., 2012). Ces anticancéreux se sont révélés avoir également des effets sur la migration, la motilité et la prolifération des cellules endothéliales (Field et al., 2014). Ainsi, ils vont endommager directement les vaisseaux sanguins au sein de la tumeur suite à la déstructuration du réseau microtubulaire altérant alors l'activité des Rho-GTPases jouant un rôle important au niveau des plaques d'adhésion (Kanthou and Tozer, 2009; Wittmann and Waterman-Storer, 2001). Enfin, ces dernières années, des propriétés anti-angiogéniques ont été découvertes lorsque les MTA sont utilisés à **de faibles doses**. Ils ont alors la capacité d'inhiber la formation de structures similaires à des vaisseaux sanguins dans les tests *in vitro* (Honoré et al., 2008; Pourroy et al., 2006; Schwartz, 2009). Au sein de la tumeur, ces nouveaux vaisseaux sont indispensables pour la prolifération et l'invasion tumorale puisque source d'énergie pour les cellules cancéreuses et, à terme, pour le développement de métastases.

Les effets anticancéreux des MTA ne se limitent pas aux activités citées ci-dessus. ***En effet, il est clairement établi de nos jours, que ces agents n'agissent pas uniquement sur le réseau***

Vinblastine (Velbé®)	Vincristine (Oncovin®)	Vindésine (Eldisine®)	Vinorelbine (Navelbine®)	Vinflunine (Javlor®)
Lymphome hodgkinien	Leucémie aigüe lymphoblastique	Cancer Bronchopulmonaire	Cancer poumon non à petite cellule	Carcinome urothélial de la vessie
Lymphome malin non-hodgkinien	Lymphomes (LH, LNH)	Leucémie aigüe lymphoblastique	Cancer du sein métastatique	
Cancer du testicule	Myélome multiple	Lymphomes (LH, LNH)		
Sarcome de Kaposi	Cancer du sein métastatique	Cancer du sein		
Choriocarcinome placentaire	Cancer poumon	Cancer Œsophage		
Cancer du sein	Cancer col utérin	Carcinome des voies aérodigestives supérieures		
Cancer du rein	Osteosarcome			
Cancer de la vessie	Sarcome d'Ewing			
Histiocytose	Medulloblastome			
	Neuroblastome			
	Retinoblastome			

Tableau 1 : Indications thérapeutiques majeures des *Vinca*-alcaloïdes en France (d'après Thériaque).

microtubulaire mais possèdent également une action complémentaire sur les mitochondries notamment en y déclenchant le phénomène d'apoptose. Ce chapitre étant consacré aux microtubules, cet impact mitochondrial sera détaillé dans le chapitre 2 ci-dessous.

4.2. Utilisation clinique : un succès acquis depuis plusieurs décennies...

Les MTA sont fréquemment administrés en clinique, seuls ou en association avec d'autres agents de chimiothérapie, dans le traitement de nombreux cancers solides et d'hémopathies malignes chez l'adulte et l'enfant. L'utilisation clinique des *Vinca*-alcaloïdes remonte maintenant à plusieurs décennies. A la différence des Taxanes, la vincristine et la vinblastine sont administrés fréquemment dans la population pédiatrique. Cinq composés sont actuellement administrés dans de nombreux cancers solides (neuroblastome, cancers du sein, du poumon ou encore des testicules) mais également pour le traitement d'un certain nombre d'hémopathies malignes (leucémies aiguës, maladie de Hodgkin et lymphomes non-hodgkiniens). Ces agents sont administrés par voie intraveineuse hormis la Navelbine® qui possède aussi une forme galénique encapsulée qui peut ainsi être administrée *per os* chez le patient. L'ensemble de leurs indications est répertorié dans le Tableau 1. En ce qui concerne les Taxanes, au cours de ces vingt dernières années, ils se sont imposés comme des agents anticancéreux majeurs dans l'arsenal thérapeutique des cliniciens. Les AMM obtenues, à ce jour, par les Taxanes en France sont présentées dans le Tableau 2 (au dos de la page). En plus de ces indications, ils sont aussi administrés dans d'autres pathologies après échec ou intolérance des protocoles de traitement habituels.

Malgré leur utilisation en clinique depuis maintenant plusieurs décennies, ces composés suscitent toujours autant d'intérêt et sont inclus dans de nombreux travaux de recherche fondamentale et clinique afin d'améliorer encore leur efficacité. Par exemple, des études ont été entreprises afin de développer de nouvelles formulations galéniques du paclitaxel ne possédant plus de crémosolone EL dans ses excipients, à l'origine de réactions d'hypersensibilité. Dans ce contexte, ces dernières années, le domaine des nanotechnologies, devenu un domaine en pleine effervescence, semble prometteur. Le meilleur exemple de l'efficacité de ces nanoparticules est le nab-paclitaxel (Nanoparticle-Albumin bound ; Abraxane®) qui a permis une meilleure tolérance du paclitaxel ainsi qu'une meilleure efficacité en augmentant la sélectivité de l'agent thérapeutique pour les cellules tumorales (« drug delivery ») (Wilczewska et al., 2012; Yardley, 2013). Suite à deux essais cliniques de phase III concluants (Gradishar et al., 2005; Von Hoff et al., 2013), l'Abraxane® a obtenu

Paclitaxel (Taxol®)	Docétaxel (Taxotère®)	Cabazitaxel (Jevtana®)	nab-paclitaxel (Abraxane®)
Cancer de l'ovaire	Cancer du poumon non- à-petites cellules	Cancer métastatique, hormono-résistant de la prostate	Adénocarcinome pancréatique métastatique
Cancer du sein	Cancer du sein		Cancer du sein métastatique
Cancer du poumon non- à-petites cellules	Cancer métastatique, hormono-résistant de la prostate		
Sarcome de Kaposi	Adénocarcinome gastrique		
	Cancer épidermoïde des voies aérodigestives supérieures		

Tableau 2 : Indications thérapeutiques majeures des Taxanes en France (d'après Thériaque).

l'AMM en 2nde ligne en monothérapie du traitement du cancer du sein métastatique et, en association avec la gemcitabine, dans le traitement de première ligne de l'adénocarcinome du pancréas métastatique (Tableau 2). Une étude de phase III réalisée chez des patients atteints d'un cancer du poumon non-à-petites cellules avancé a également démontré l'intérêt d'associer l'Abraxane[®] au carboplatine par rapport à la formulation « classique » du Taxol[®] (Gupta et al., 2014; Satouchi et al., 2013; Socinski et al., 2012).

De nouveaux composés ont également été découverts dernièrement comme par exemple l'éribuline (Halaven[®]). Il fait partie de la famille des halichondrines aux côtés des *Vinca*-alcaloïdes et des Taxanes dans la classe des MTA. Il possède des propriétés anti-vasculaires et anti-angiogéniques et il cible l'extrémité (+) des microtubules inhibant alors la dynamique microtubulaire (Dybdal-Hargreaves et al., 2015; Jordan et al., 2005; Smith et al., 2010). Récemment, une étude a mis en évidence l'impact de l'éribuline sur la **délocalisation d'EB1** probablement à l'origine des effets sur la dynamique des microtubules (O'Rourke et al., 2014). Ce composé est administré en monothérapie dans le traitement de 2nde intention des patientes atteintes d'un cancer du sein localement avancé ou métastatique (Cortes et al., 2012; Shetty and Gupta, 2014). Enfin, dans les derniers nés de la classe des agents anti-microtubules, nous pouvons citer le Kadcyła[®] faisant partie de la classe des médicaments couplés à des anticorps (ADC – *antibody-drug conjugate*) puisqu'il correspond à l'association du trastuzumab avec le DM1, inhibiteur des microtubules dérivé de la maytansine. Il est administré en monothérapie dans le cancer du sein HER2 positif métastatique ou localement avancé non résecable (Wong and Hurvitz, 2014).

4.3. ... Un succès cependant mesuré exigeant de nouvelles stratégies

L'administration des MTA dans de nombreuses pathologies cancéreuses est le reflet de leur grande efficacité anti-tumorale. Mais malgré leur place prépondérante incontestable dans l'arsenal thérapeutique anticancéreux, les MTA voient leur utilisation limitée pour deux raisons. D'une part, **l'émergence de cellules tumorales résistantes** au traitement est de plus en plus rencontrée entraînant un échec au protocole thérapeutique chez ces patients et, d'autre part, ils sont fréquemment responsables **d'effets indésirables majeurs** altérant grandement la qualité de vie des patients et nécessitant ainsi l'adaptation des posologies voire l'arrêt du traitement. Mais pour pallier ces phénomènes, la recherche s'oriente dans différents domaines comme le développement de nouvelles formulations galéniques des MTA ou encore la mise en place de nouveaux schémas de traitement. Dans ce contexte, malgré leur découverte il y a maintenant plusieurs décennies, ces composés restent toujours dans l'ère du temps et font

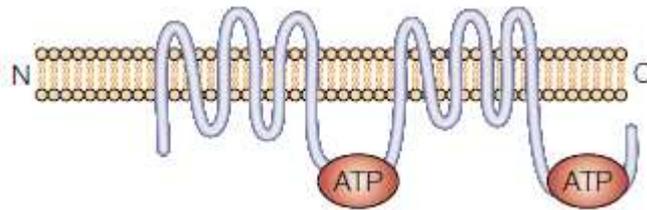


Figure 15 : Représentation schématique de la P-gp.

Issue de l'expression du gène MDR1, la P-gp est une protéine transmembranaire possédant deux sites de liaison à l'ATP permettant l'efflux de nombreuses molécules. Sa sur-expression est responsable de résistance non-spécifique à de nombreux anticancéreux, notamment les MTA, et est ainsi corrélée à un facteur de mauvais pronostic (Gottesman et al., 2002).

l'objet de nombreux travaux tant en recherche fondamentale qu'en recherche translationnelle et clinique.

4.3.1. Emergence des phénomènes de résistance

Le premier obstacle à l'utilisation des MTA en clinique est l'existence de phénomènes de résistance. Le premier mécanisme de résistance pouvant être développé par les cellules cancéreuses est associé à l'acquisition du phénotype MDR (*Multidrug resistance*) par l'intermédiaire des pompes à efflux (ou transporteurs) retrouvées au niveau de la membrane cellulaire avec en tête de file la protéine P-gp (*P-glycoprotéine*) issue de l'expression du gène MDR1 (*multi-drug resistance 1* appelé aussi ABCB1) (Fojo and Menefee, 2005; Nobili et al., 2012 ; Gottesman et al., 2002 ; Figure 15). Sa sur-expression corrèle généralement avec une **résistance non-spécifique** notamment aux Taxanes comme aux *Vinca*-alcaloïdes (Cordo Russo et al., 2008; Estève et al., 2006; Shirakawa et al., 1999). Pour pallier ce phénomène, plusieurs stratégies thérapeutiques ont vu le jour comme l'utilisation de composés antagonistes de ces pompes, tels que les cyclosporines et les inhibiteurs calciques ou d'autres composés en développement dits de 3^{ème} génération (Helgason et al., 2006; Kelly et al., 2012; Lee et al., 2014). Cependant, leur efficacité thérapeutique semble pour le moment limitée. D'autres travaux sont en cours afin de développer de nouveaux composés n'étant pas substrat de ces pompes à efflux. Parmi eux, les agents de la famille des Épothilones promettaient un bel avenir pour remédier à ce problème de résistance (Perez, 2009; Pronzato, 2008). Cependant, à ce jour, aucune Épothilone n'a obtenu d'AMM même si elles font toujours l'objet de nombreux essais cliniques. Enfin, récemment, plusieurs approches ont mis en lumière l'intérêt des nanotechnologies pour contourner la résistance due à l'expression membranaire de la P-gp. En 2014, des travaux réalisés *in vitro* et *in vivo* dans le cancer hépatique a montré une plus grande efficacité du paclitaxel couplé à des micelles (Jin et al., 2014). Une autre stratégie serait de coupler dans des nanoparticules du paclitaxel avec un inhibiteur pharmacologique de la P-gp. Cette association, dans le cancer du poumon, a montré une plus grande efficacité que l'utilisation du paclitaxel seul *in vitro* et *in vivo* (Gao et al., 2014).

En parallèle de ces mécanismes de résistance non-spécifiques, un des phénomènes de résistance aux MTA bien connu est **l'altération directe d'une de ses cibles**. En effet, l'expression différentielle des isotypes de tubuline et leurs différentes MPT (modifications qualitatives et quantitatives) influencent le comportement de la cellule vis-à-vis des MTA.

L'exemple le plus fréquemment rencontré et le plus documenté est celui de la sur-expression de l'isotype β III de tubuline retrouvée dans de nombreux cancers - poumon, sein, ovaire, estomac (Sève and Dumontet, 2008). Mais les conséquences de l'expression de cet isotype ne sont pas aussi linéaires sur la réponse des cellules cancéreuses aux MTA. En effet, des travaux réalisés en 2013 par l'équipe de C. Ferlini ont porté sur une méta-analyse de 59 études translationnelles comportant différentes pathologies cancéreuses (poumon, sein, ovaire, colorectal...) afin d'étudier le rôle de l'isotype β III dans la réponse aux MTA. Suite à ces travaux, ils en ont conclu que, en réalité, la sur-expression de β III agirait plutôt comme un facteur pronostic en association avec l'analyse d'autres biomarqueurs plutôt qu'un facteur prédictif de la réponse aux traitements (Karki et al., 2013).

A côté de la tubuline, d'autres cibles peuvent être impliquées dans la réponse aux MTA comme les différentes MAP. C'est le cas notamment de la **protéine EB1**. En effet, une récente étude réalisée *in vitro* a démontré que la sur-expression de la protéine EB1 diminuait l'efficacité du paclitaxel dans des cellules de carcinomes mammaires (Thomas et al., 2015). Cependant, à ce jour, peu de travaux ont été réalisés et des effets contradictoires ont été observés puisque les travaux d'Y. Luo démontrent qu'EB1 sensibilise l'action du paclitaxel dans des cellules de cancer du sein (Luo et al., 2014). Ces données sont en accord avec une étude réalisée *in vitro* qui a montré que la présence de la protéine EB1 sensibiliserait les microtubules à l'action des MTA (Mohan et al., 2013). Enfin, au sein du laboratoire, les travaux de R. Bergès ont corrélé la sur-expression d'EB1 à la sensibilisation des cellules à l'efficacité des *Vinca*-alcaloïdes *in vitro* et *in vivo* sur greffes orthotopiques de glioblastome (Berges et al., 2014).

4.3.2. Effets indésirables

Toute chimiothérapie anticancéreuse est contraignante, notamment à cause des effets indésirables qu'elle engendre et qui affectent considérablement la qualité de vie des patients. L'administration des MTA peut provoquer l'apparition d'effets indésirables dits « classiquement associés aux traitements anticancéreux », à savoir : l'alopécie, les toxicités digestives (nausées, vomissements, diarrhées) ainsi que les toxicités hématologiques (neutropénie, leucopénie, anémie) correspondant à l'atteinte des lignées cellulaires à prolifération rapide. Dans la majorité des cas, une chimioprophylaxie par prescription de sétrons – médicaments anti-émétiques antagonistes des récepteurs 5-HT3 de la sérotonine – est réalisée pour lutter contre les nausées et vomissements.

A côté de ces nombreux effets indésirables, les MTA engendrent des effets plus spécifiques. En effet, les Taxanes, et en particulier le Taxol[®], provoquent fréquemment des réactions d'hypersensibilité qui peuvent être sévères et qui seraient dues à la présence du crémophore EL comme excipient (Picard and Castells, 2014). De plus, les MTA sont également connus pour entraîner des neuropathies périphériques induites par la chimiothérapie (*CIPN*) nécessitant la plupart du temps des adaptations de posologie. L'apparition de ces neuropathies est dose-dépendante et dose-cumulative. Dans la majorité des cas, les symptômes sont réversibles mais nécessitent l'arrêt du traitement (Argyriou et al., 2008). Les mécanismes à l'origine de ces CIPN ne sont encore que partiellement élucidés. Lutter contre l'apparition de ces troubles par association de neuroprotecteurs aux traitements anticancéreux est une piste sérieusement étudiée *in vitro* et *in vivo* (Bordet et al., 2008; Rovini et al., 2010) mais aucune molécule-candidat n'a pour le moment montré une efficacité prometteuse en clinique.

4.3.3. Améliorations des stratégies de traitement

En plus du développement d'inhibiteurs spécifiques de la P-gp et de l'amélioration des formulations galéniques avec le couplage aux nanoparticules, les recherches effectuées sur les MTA pour améliorer leur rapport efficacité/toxicité s'orientent vers l'élaboration de nouveaux schémas de traitement avec notamment la mise en place de **protocole d'administration dit métronomique**. Ce schéma est défini par l'administration fréquente et répétée d'agents anticancéreux à faibles doses, sans intervalle de pause contrairement au schéma dit MTD (*dose maximale tolérée*) où les agents anticancéreux sont prescrits à fortes doses le plus souvent toutes les trois semaines avec des intervalles de pause entre chaque cure. Les nombreuses études sur la chimiothérapie métronomique ont permis de définir ce traitement comme un traitement « multi-cibles » puisqu'il peut agir notamment sur l'immuno-modulation *via* l'adaptation des cellules dendritiques ou encore la déplétion des lymphocytes T régulateurs, avoir un effet direct sur les cellules cancéreuses ou encore jouer un rôle dans l'évolution clonale des tumeurs. En plus, de leur rôle « multi-cibles », l'intérêt de la chimiothérapie métronomique est d'utiliser de faibles doses limitant ainsi le risque d'apparition d'effets indésirables chez le patient. La revue de N. André parue en 2014 synthétise de façon complète les dernières avancées réalisées dans le domaine de la chimiothérapie métronomique impliquant notamment l'utilisation des MTA (André et al., 2014). De façon intéressante, la forme orale étant particulièrement prédisposée au schéma métronomique (administration quotidienne), la Navelbine[®] forme orale s'est alors révélée être très attractive. Dans ce contexte, des travaux sur le développement d'une forme orale de

paclitaxel sont également en cours d'évaluation pour permettre son administration quotidienne plus aisément (Lim et al., 2015; Sharma et al., 2015).

Une autre stratégie thérapeutique émergeant depuis quelques années fait appel aux **thérapies ciblées**. Les découvertes faites en cancérologie ont permis de mieux comprendre le phénomène de carcinogénèse et, ainsi, de développer des composés dirigés spécifiquement contre des cibles moléculaires connues (récepteurs, gènes, protéines) impliquées dans les voies de signalisation intracellulaire jouant un rôle dans la transformation des cellules cancéreuses ou dans le développement des tumeurs malignes. Ces thérapies ciblées sont utilisées dans le protocole de traitement de nombreux cancers en association avec des agents de chimiothérapie conventionnelle comme les MTA. C'est le cas notamment de l'Herceptin[®] en association avec le Taxol[®] ou le Taxotère[®] dans le cancer du sein métastatique avec sur-expression tumorale de HER2 ou encore de l'Avastin[®] en association avec le Taxol[®] dans le cancer du sein métastatique en première intention et dans le cancer de l'ovaire dans les formes avancées. Ils font aussi l'objet de nombreux essais cliniques de phase II et III parmi lesquels nous pouvons citer : l'association du Nexavar[®] (anti-VEGF-R) avec le Taxol[®] [NCT00300885] ou le Taxotère[®] [NCT00619996] ou encore de l'Erbitux[®] (anti-EGF-R) avec le Docétaxel [NCT00042939]. En plus des thérapies ciblées citées ci-dessus, de très nombreuses molécules sont actuellement en cours de développement ciblant de nombreux composés intervenant dans les voies de signalisation intracellulaire. Parmi celles-ci, une de ces voies de signalisation va particulièrement nous intéresser ; il s'agit de la **voie Akt** jouant un rôle central dans les fonctions cellulaires et qui fait l'objet de nombreuses études en oncologie ces dernières années. *Dans le chapitre 3 de ce manuscrit, nous nous intéresserons à cette protéine Akt et notamment à son rôle dans les pathologies cancéreuses. Comme nous le verrons, des inhibiteurs spécifiques d'Akt sont actuellement en cours de développement et vont se trouver au cœur de la deuxième partie de mes travaux de thèse. Mais avant cela, dans le chapitre suivant, nous allons faire plus ample connaissance avec un autre réseau essentiel à la cellule qu'est le réseau mitochondrial et, qui comme nous le verrons, joue un rôle crucial en cancérologie et en oncopharmacologie via l'utilisation des MTA.*

Box 1

Les **Agents Anti-Microtubules** représentent une classe d'anticancéreux prépondérante dans l'arsenal thérapeutique actuel. Mais leur utilisation se voit limitée par la survenue d'effets indésirables ou l'apparition de phénomènes de résistance. Mieux comprendre leur mécanisme d'action permettrait alors de les utiliser à meilleur escient. Dans ce contexte, au cours de ces travaux de thèse, nous nous intéresserons à la **protéine EB1**, représentante majeure de la régulation de la dynamique des microtubules et cible des MTA. Ainsi, les données obtenues enrichiront les connaissances acquises jusqu'à présent sur la régulation intracellulaire de cette protéine et amélioreront la compréhension de son rôle dans la réponse aux MTA.

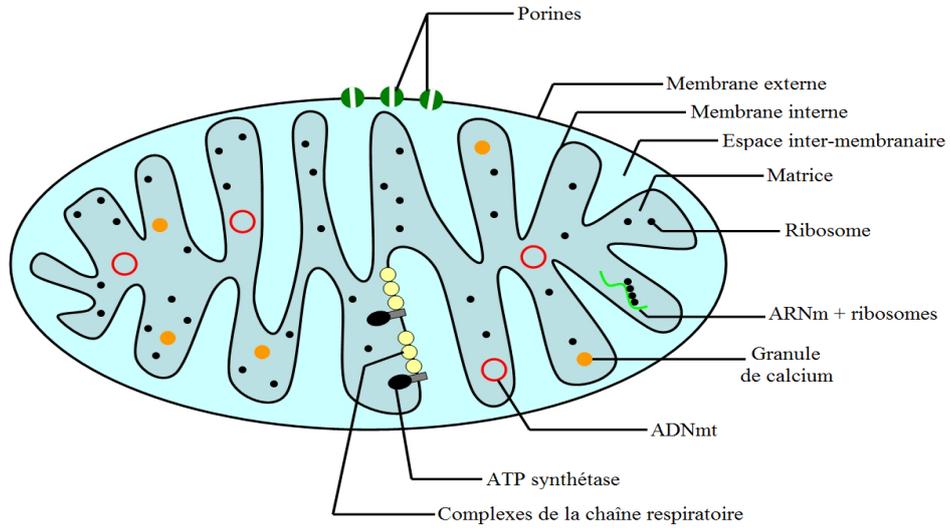


Figure 16 : Représentation schématique de la structure et de la composition des mitochondries. La mitochondrie est composée de deux membranes séparées par l'espace inter-membranaire. Le cœur de la mitochondrie, dénommé matrice, contient les crêtes mitochondriales où se situent les complexes de la chaîne respiratoire : lieu de la production d'ATP et des ROS (Adapté du website BSCB).

CHAPITRE 2

RESEAU MITOCHONDRIAL : FONCTIONS ET IMPLICATIONS EN ONCOLOGIE

La mitochondrie naquit il y a de ça plusieurs millions d'années de la fusion de deux bactéries pour donner un eucaryote primitif possédant son propre génome de 16 kb chez les mammifères (ADNmt – *acide désoxyribonucléique mitochondrial*). C'est en 1858 que les travaux d'Albrecht von Kölliker décrivent pour la première fois des structures particulières présentes sous forme de grains au sein de la cellule musculaire. Les progrès réalisés en microscopie dans les années suivantes ont permis de constater que ces structures pouvaient également s'organiser sous forme de filaments. Le terme de mitochondrie fut alors retenu provenant du grec « *mitos* » et « *chondros* » respectivement filaments et graines (proposé initialement par C. Benda en 1898). Les études réalisées par la suite sur ce compartiment intracellulaire ont été riches en découvertes même si, à ce jour, les mitochondries gardent encore quelques secrets.

1. La mitochondrie...? Le réseau mitochondrial !

1.1. Structure et architecture d'un organe complexe

Dans les années 1950, par microscopie électronique à transmission, l'équipe de G.E. Palade a décrit la **mitochondrie** comme un organe ovoïde de taille moyenne, comprise entre 0,5 et 1 μm , composé de deux membranes – une membrane externe et une membrane interne – qui délimitent deux sous-compartiments : l'espace inter-membranaire et la matrice (Figure 16 ; Palade, 1952). La membrane externe a pour fonction principale de protéger la mitochondrie du reste de la cellule. Elle est perméable à toutes les petites molécules de moins de 10 kDa grâce à la présence de porines dont fait partie le VDAC (*voltage dependent anion channel*). Elle contient également des protéines permettant l'import, le tri et l'assemblage de protéines. La membrane interne se replie pour former les crêtes mitochondriales aux morphologies variables rattachées à la membrane interne sous-jacente par des structures appelées jonctions de crêtes (Frey and Mannella, 2000). C'est au niveau de ces crêtes mitochondriales que les complexes du système OXPHOS se situent, représentant ainsi la zone la plus active en synthèse d'ATP de la cellule (Dudkina et al., 2008). L'espace résiduel entre les deux

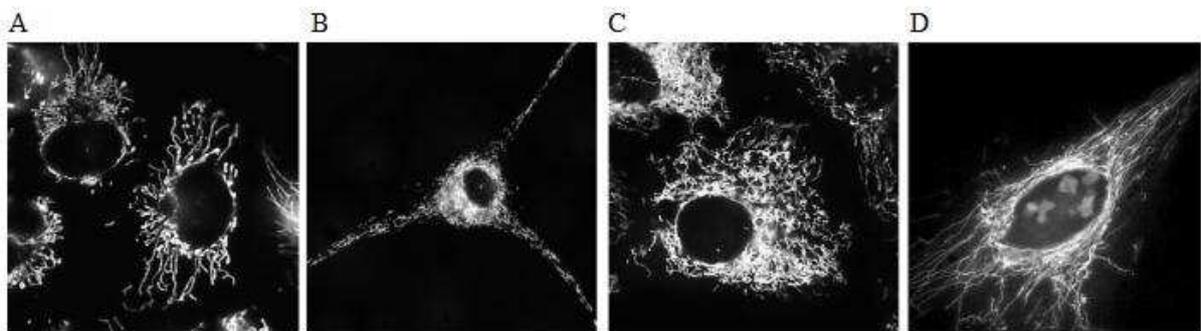


Figure 17 : Représentation par microscopie à épifluorescence du réseau mitochondrial grâce au marquage avec la protéine *mtDsRed* dans différents types cellulaires humains.

(A) adénocarcinome pulmonaire (A549), (B) glioblastome (U87-MG), (C) adénocarcinome du colon (HT29-D4) et (D) cellules endothéliales de veine ombilicale (HUVEC) (photos réalisées au sein du laboratoire CRO₂– microscope Leica IM-DRBE). Comme le montre ces différentes photos, les mitochondries sont, en réalité, retrouvées dans la cellule sous forme d'un réseau capable d'adapter sa morphologie en fonction de l'état physiologique de la cellule pour, ainsi, mieux répondre aux besoins énergétiques cellulaires.

membranes de la mitochondrie est appelé l'espace inter-membranaire et a une composition ionique proche de celle du cytosol. Enfin, le cœur de la mitochondrie est dénommé matrice mitochondriale en raison de sa forte viscosité due à la présence de nombreuses enzymes solubles des voies métaboliques telles que le cycle de Krebs, la β -oxydation des acides gras ou encore une partie du cycle de l'urée. La matrice renferme également le génome mitochondrial composé de plusieurs copies identiques d'ADNmt ainsi que les protéines nécessaires à sa transcription puis la traduction en protéines. Il est important de noter que la protéosynthèse mitochondriale ne concerne qu'un nombre restreint de protéines (au nombre de 13 chez les mammifères) ; la majorité des protéines mitochondriales étant importée du cytoplasme (Alexeyev et al., 2013; Friedman and Nunnari, 2014).

Lorsque nous parlons de mitochondries, nous devrions, en réalité, parler plutôt d'un **réseau mitochondrial**. En effet, elles vont, au sein de la cellule, s'assembler sous forme de petits bâtonnets ou de filaments de longueur variable ainsi que de localisation intracellulaire diverse en fonction des types cellulaires (Figure 17). Classiquement, le réseau mitochondrial est défini comme soit tubulaire soit fragmenté. En réalité, il peut prendre de nombreux aspects différents, en fonction de l'état physiologique de la cellule (initiation apoptotique, division cellulaire, phase de synthèse de l'ADN...) afin de répondre aux besoins énergétiques cellulaires de façon localisée. Dans la revue de G. Benard et R. Rossignol, douze qualificatifs ont été donnés pour classifier les différentes morphologies du réseau mitochondrial observées dans les cellules HeLa (Benard and Rossignol, 2008).

1.2. Formation d'un réseau hautement dynamique

Ce réseau, tout comme le réseau microtubulaire cité dans le chapitre précédent, est une structure **hautement dynamique**. Les mitochondries peuvent fusionner et mélanger aussi bien leur membrane que leur contenu soluble. Inversement, un tube mitochondrial va être capable de se diviser pour donner naissance à deux mitochondries « filles ». Entre elles, les mitochondries vont donc pouvoir former des connexions physiques aboutissant à la formation d'un réseau capable de changer régulièrement et très rapidement à la fois de forme et de localisation cellulaire. Ce réseau peut être également qualifié de **polarisé** puisque les mitochondries sont capables de se déplacer le long des microtubules vers les extrémités (+) comme les extrémités (-) en fonction des demandes cellulaires. Cette dynamique des mitochondries est, comme nous le verrons ci-dessous, finement régulée au sein de la cellule

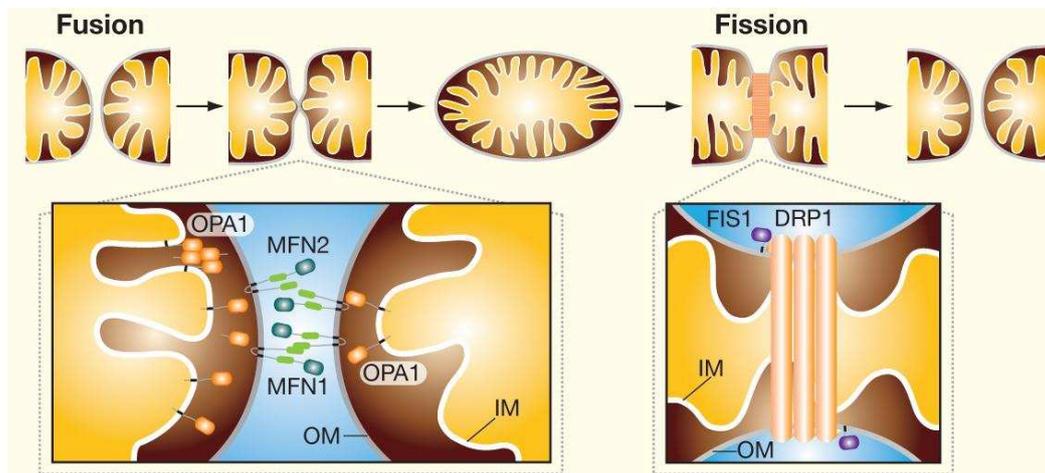


Figure 18 : Représentation schématique des phénomènes de fusion et de fission des mitochondries avec leurs principaux régulateurs protéiques.

Le réseau mitochondrial va être soumis constamment à des phénomènes dynamiques lui permettant d'adapter sa morphologie. Les deux phénomènes observés sont les phénomènes de fusion où les mitochondries vont échanger leur contenu, à l'opposé du phénomène de fission où une mitochondrie va donner naissance à deux mitochondries. Dans le premier cas, les principaux acteurs sont représentés par les protéines OPA1 et MFN 1 et 2 (panel de gauche) tandis que dans la fission interviendront DRP1 et FIS1 (panel de droite) (Heymann and Hinshaw, 2009).

en faisant intervenir de nombreux acteurs et sera à l'origine des nombreuses fonctions mitochondriales vitales pour la cellule.

1.2.1. Fusion – fission : une chorégraphie bien orchestrée

La forme du réseau mitochondrial et, de surcroît, ses fonctions, sont maintenues grâce aux mécanismes de fusion et de fission dont il est doté. Le phénomène de fusion des mitochondries facilite la communication entre ces organites ainsi que le mélange de leur contenu leur permettant de palier des défauts de production et, ainsi, de maintenir leur fonctionnalité (Chen and Chan, 2010). A l'inverse, le mécanisme de fission (ou de division) favorise le transport et la distribution des mitochondries au sein de la cellule (Lackner and Nunnari, 2009). L'équilibre entre ces deux phénomènes assure l'intégrité du réseau mitochondrial et est médié par de nombreuses protéines. Parmi elles, celles dont le rôle central n'est plus discuté sont OPA1 (*optic atrophy 1*) et MFN 1 et 2 (*mitofusines 1 et 2*) pour la fusion, Drp1 (*dynamine-related protein 1*) et Fis1 (*mitochondrial fission 1 protein*) pour la fission (Figure 18 ; Heymann and Hinshaw, 2009).

Etant donné que les mitochondries possèdent une double membrane, le **phénomène de fusion** va se faire en deux étapes. Il est initié par MFN1 et MFN2 ; protéines ubiquitaires faisant partie de la famille des dynamines GTPases et localisées à la membrane mitochondriale externe (Santel and Fuller, 2001). Elles vont interagir entre elles pour former des homo- ou hétérodimères concourant au rapprochement des deux mitochondries. Le mécanisme permettant la fusion des membranes externes est encore mal connu mais il semblerait que l'activité GTPasique des MFN permettrait de fournir l'énergie nécessaire pour initier cette fusion (Chan, 2012). De plus, la formation de ces homo- ou hétérodimères entraînerait un changement de conformation des membranes mitochondriales déstabilisant la bicouche lipidique facilitant alors la fusion (Lackner, 2014). Les mitofusines peuvent être sous le contrôle de protéines particulières que sont les membres de la famille de Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) jouant un rôle important dans l'apoptose. Par exemple, il a été démontré que la protéine pro-apoptotique Bax (*Bcl-2-associated X protein*) interagissait avec MFN2 stimulant alors la fusion des mitochondries (Hoppins et al., 2011). D'autres protéines peuvent réguler les mitofusines en inhibant leur activité pro-fusion comme par exemple la protéine MIB ou en stimulant la fusion mitochondriale comme la E3-ubiquitine ligase MARCH-V (Nakamura et al., 2006). Cette première étape réalisée, les membranes internes vont alors fusionner sous l'action d'OPA1. Plusieurs travaux ont démontré que l'absence d'OPA1 conduisait à une fragmentation du réseau mitochondrial par défaut de fusion (Chan, 2006; Griparic et al., 2004;

Meeusen et al., 2006). Le mécanisme d'action d'OPA1 dans ce processus reste pourtant très mal connu. Son activation se fait par clivage protéolytique opéré par la protéase de la membrane interne OMA1 ou encore Yme1L (Anand et al., 2014; Head et al., 2009). Deux études récentes ont notamment mis en lumière que ce clivage protéolytique était sous la dépendance de la phosphorylation oxydative et du potentiel membranaire mitochondrial (Mishra et al., 2014; Zhang et al., 2014a).

Le phénomène de fission des mitochondries, aboutissant à la fragmentation du réseau, contribue quant à lui à assurer une distribution correcte de l'énergie en réponse aux besoins cellulaires en ATP. Il participe également au maintien des capacités bioénergétiques des mitochondries par turn-over naturel des mitochondries par autophagie (Twig et al., 2008). Le mécanisme d'action passe par l'interaction entre Fis1, enchâssée dans la membrane externe du compartiment mitochondrial et Drp1 initialement cytosolique (Smirnova et al., 2001). Le recrutement de Drp1 à la mitochondrie met également en jeu la protéine Mff (*mitochondrial fission factor*) (Otera et al., 2010). Une fois recrutée aux sites de fission, Drp1 agirait comme une mécano-enzyme utilisant l'hydrolyse du GTP pour permettre la constriction puis la scission membranaire. Le recrutement de plusieurs protéines Drp1 entraîne leur assemblage sous forme d'une structure hélicoïdale qui encercle alors la mitochondrie. L'hydrolyse du GTP provoque alors la scission des membranes mitochondriales (Lackner and Nunnari, 2009). Drp1 est soumise à de nombreux événements de régulation. Par exemple, elle peut-être phosphorylée par le couple cycline B/CDK1 régulateur de l'entrée en mitose de la cellule. A l'opposé, la phosphorylation de Drp1 par la kinase AMPK inhibe la fission du réseau mitochondrial de façon réversible (Cribbs and Strack, 2007), tout comme son ubiquitination par la protéine MARCH-V. Cette dernière est également responsable de l'inhibition de Fis1 par ubiquitination (Nakamura et al., 2006).

1.2.2. Motilité mitochondriale

La motilité mitochondriale est indissociable des phénomènes de fusion-fission. Le transport des mitochondries joue un rôle très important pour assurer leur bonne distribution au sein de la cellule afin de répondre aux besoins énergétiques localisés. Chez les mammifères, ce transport s'effectue **le long du réseau microtubulaire servant alors de véritables rails pour les mitochondries**. Les premières études réalisées en utilisant des agents perturbant spécifiquement le réseau microtubulaire, tels que le nocodazole ou la vinblastine, ont démontré la corrélation entre dynamique microtubulaire et distribution mitochondriale (Ligon

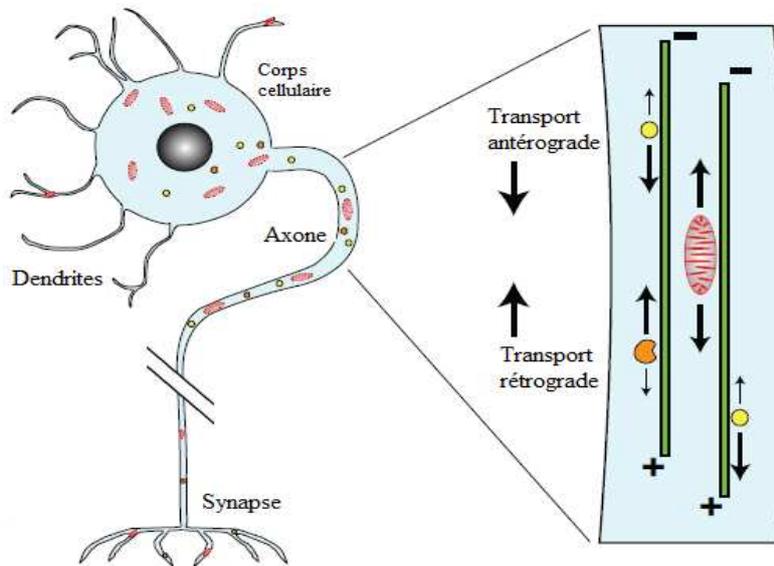


Figure 19 : Représentation schématique du transport antérograde et rétrograde des mitochondries au niveau des axones des neurones.

Les mitochondries sont capables de se déplacer dans la cellule le long des microtubules qui leur servent de rails de support. Pour étudier ce mécanisme, le modèle neuronal est le plus souvent utilisé de part la longueur importante des axones. Lorsque les mitochondries se déplacent vers la périphérie cellulaire, il s'agit du transport antérograde et, inversement, vers le corps cellulaire c'est le transport rétrograde (Saxton and Hollenbeck, 2012).

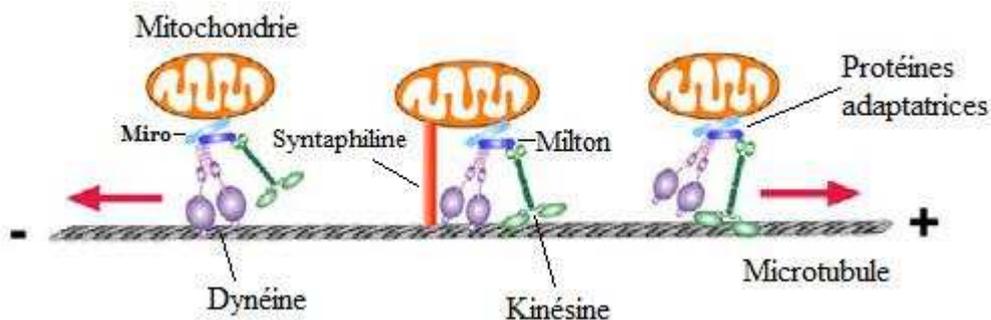


Figure 20 : Représentation schématique de l'interaction des mitochondries avec le réseau microtubulaire via les protéines motrices et adaptatrices.

Pour se déplacer le long des microtubules, les mitochondries vont interagir avec des protéines motrices que sont les kinésines et les dynéines. Classiquement, les premières interviennent dans le transport antérograde et les dynéines dans le transport rétrograde. Des protéines adaptatrices sont également présentes dans le transport des mitochondries parmi lesquelles nous pouvons citer les protéines Miro, Milton ou encore la syntaphiline (Adaptation de Sheng et al., 2014).

and Steward, 2000; Morris and Hollenbeck, 1995). Par la suite, les travaux faits en microscopie électronique ont permis de mettre en évidence des points de contacts entre mitochondries et microtubules (Yaffe et al., 2003). Le transport des mitochondries dans les axones des neurones, effectué sur de longues distances, est par excellence le modèle d'étude des mécanismes de transport et de distribution du réseau mitochondrial. Très vite, deux types de transport ont été décrits : le **transport antérograde** s'effectuant du corps cellulaire vers les terminaisons axonales et, inversement, le **transport rétrograde** allant des synapses vers le corps cellulaire (Figure 19 ; Saxton and Hollenbeck, 2012). Le mouvement des mitochondries le long des microtubules semblerait dépendant de leur fonction énergétique puisqu'il a été démontré que les mitochondries dépolarisées sont principalement transportées dans le sens rétrograde tandis que celles dont le potentiel membranaire est maintenu se dirigent dans le sens antérograde (Miller and Sheetz, 2004). Ce dernier interviendrait donc dans l'apport des mitochondries à leur site d'action alors que le transport rétrograde permettrait la dégradation et le recyclage des organites au niveau du corps cellulaire. Cependant, cette corrélation reste encore controversée puisque des études ont montré qu'une diminution du potentiel membranaire des mitochondries ne perturberait pas leur sens de direction dans les axones, voire même qu'elle réduirait le transport des mitochondries dans les deux sens (Baqri et al., 2009; Verburg and Hollenbeck, 2008).

Les déplacements intracellulaires des mitochondries nécessitent l'intervention de protéines motrices spécifiques. Interacteurs directs des microtubules, ces dernières sont divisées en deux grandes familles : les kinésines et les dynéines. Leur structure inclut des chaînes lourdes qui possèdent un domaine hautement conservé permettant l'hydrolyse de l'ATP, générant ainsi la force motrice nécessaire au déplacement des mitochondries (Carter et al., 2011; Rice et al., 1999). Les dynéines sont formées d'un complexe composé de plusieurs sous-unités comme le complexe dynactine (comportant un domaine CAP-Gly) ou encore la protéine p150^{Glued}. Le domaine moteur se trouve au niveau des chaînes lourdes du complexe et permet le déplacement vers les extrémités (-) des microtubules (Höök and Vallee, 2006). Le cas des kinésines est plus complexe. Elles sont classées selon la position de leur domaine moteur au sein de leur séquence. Lorsqu'il est en position N-terminale, les kinésines vont se déplacer vers les extrémités (+) des microtubules et, inversement, lorsqu'il est retrouvé en position C-terminale, les protéines avancent vers les extrémités (-) des microtubules. Le domaine moteur peut également être situé en position centrale et, dans ce cas les kinésines sont dites non-motrices (Kinésines 13 ou MCAK) (Boldogh and Pon, 2007; Gouveia and Akhmanova, 2010 ; Sheng, 2014 ; Figure 20). Deux membres de la famille des kinésines sont plus

particulièrement décrits comme impliqués dans le transport des mitochondries : la KIF5B de la famille des kinésine-1 et la KIF1B de la famille des kinésine-3 (Hirokawa and Takemura, 2005).

L'interaction des mitochondries avec les protéines motrices – et donc avec le système microtubulaire – se fait par l'intermédiaire de protéines adaptatrices (Figure 20). Les mieux caractérisées sont les protéines Miro et Milton. Ces dernières permettent le mouvement antérograde des mitochondries en assurant leur interaction avec les kinésines. Milton a été démontrée comme interagissant directement avec la chaîne lourde de KIF1B et également avec la protéine Miro reliée aux mitochondries (Boldogh and Pon, 2007). Enfin, d'autres protéines sont répertoriées pour faciliter l'ancrage des mitochondries sur les microtubules. C'est le cas de la syntrophine, transportée le long des axones en même temps que les mitochondries. Lorsqu'elle est associée aux mitochondries, une stabilisation de celles-ci est alors observée permettant un enrichissement des synapses en mitochondries indispensable au bon fonctionnement neuronal (Das et al., 2003; Kang et al., 2008).

Les liens étroits unissant réseau microtubulaire et réseau mitochondrial sont encore renforcés par l'existence de plusieurs MAP ayant une fonction régulatrice des protéines motrices kinésines et dynéines. Par exemple, il a été montré que l'inhibition de MAP1B et de Tau entraînait respectivement une augmentation de la vitesse de transport rétrograde et antérograde des mitochondries dans des cultures de neurones de souris KO pour chaque protéine (Jiménez-Mateos et al., 2006). La **protéine EB1** joue également un rôle dans la régulation du transport des mitochondries. En effet, il a été démontré le rôle primordial d'EB1 dans le recrutement de la dynéine pour initier le mouvement rétrograde des mitochondries le long des axones. En effet, EB1 accumulée aux extrémités (+) des microtubules permet le recrutement de CLIP-170. Cette dernière permet alors la fixation de p150^{glued} via son domaine CAP-Gly aboutissant au recrutement du complexe dynactine (Moughamian et al., 2013). Enfin, des études ont mis en évidence que les modifications post-traductionnelles de la tubuline pouvaient également intervenir dans la régulation du trafic mitochondrial. L'acétylation de l' α -tubuline ou encore sa détyrosination ainsi que la polyglutamylation de l' α - et β -tubuline entraînent une augmentation de l'affinité pour la kinésine-1 et donc, favorise le transport antérograde des mitochondries (Bulinski, 2007; Daire et al., 2009; Reed et al., 2006).

Le réseau mitochondrial est donc capable de moduler rapidement sa structure et de s'adapter aux besoins énergétiques cellulaires. Cette plasticité mitochondriale, ou

« mitoplasticité », est essentielle au bon déroulement de diverses fonctions cellulaires qui reposent sur des processus gouvernés par les mitochondries.

2. Fonctions des mitochondries : réseau aux multiples facettes

Si le rôle premier des mitochondries reste celui de producteur efficace d'ATP cellulaire, il ne faudrait cependant pas les cantonner uniquement au rôle de centrale énergétique. En effet, les mitochondries possèdent bien d'autres fonctions au sein de la cellule. Elles sont notamment capables de réguler les niveaux de messagers secondaires tels que les espèces réactives de l'oxygène (*ROS*). Par conséquent, les mitochondries se retrouvent au carrefour des voies de signalisation intracellulaire et participent ainsi à la régulation de nombreuses fonctions telles que la différenciation, l'immunité, l'autophagie ou encore l'homéostasie cellulaire (Tait and Green, 2012). Dans le paragraphe qui va suivre, *je vais décrire uniquement le rôle du réseau mitochondrial dans la production d'énergie, la synthèse des ROS ainsi que dans le déclenchement de l'apoptose. Comme nous le verrons par la suite, la dérégulation de ces trois fonctions est désormais caractérisée comme à la fois cruciale dans le développement tumoral et induite par les traitements anti-cancéreux.*

2.1. Centrale énergétique de la cellule : fonctionnement et régulation de la chaîne respiratoire

Les mitochondries peuvent être définies comme **l'organite du métabolisme énergétique** de la cellule. Elles sont impliquées dans de nombreux processus tels que la β -oxydation des acides gras, le cycle de Krebs, certaines étapes de la néoglucogénèse ou encore le cycle de l'urée. Mais leur principale fonction repose sur la **production d'ATP** : molécule énergétique fondamentale pour la survie cellulaire.

2.1.1. Production d'ATP

Le fonctionnement du système de transport des électrons (*STE*) et des complexes de la phosphorylation oxydative (*OXPHOS*), composant la chaîne respiratoire mitochondriale, a été décrit pour la première fois par l'équipe de P. Mitchell sous le nom de la théorie chimio-osmotique (Mitchell, 1961). Le catabolisme des glucides, acides aminés et acides gras va permettre la réduction de coenzymes que sont le NAD^+ (*nicotinamide adénine dinucléotide*) et le FAD (*flavine adénine dinucléotide*). Les équivalents réduits sous forme de $\text{NADH} + \text{H}^+$ et FADH_2 vont être fournis à la chaîne d'oxydoréduction mitochondriale constituée de quatre complexes protéiques : le complexe I (*NADH-ubiquinone oxydoréductase*), le complexe II

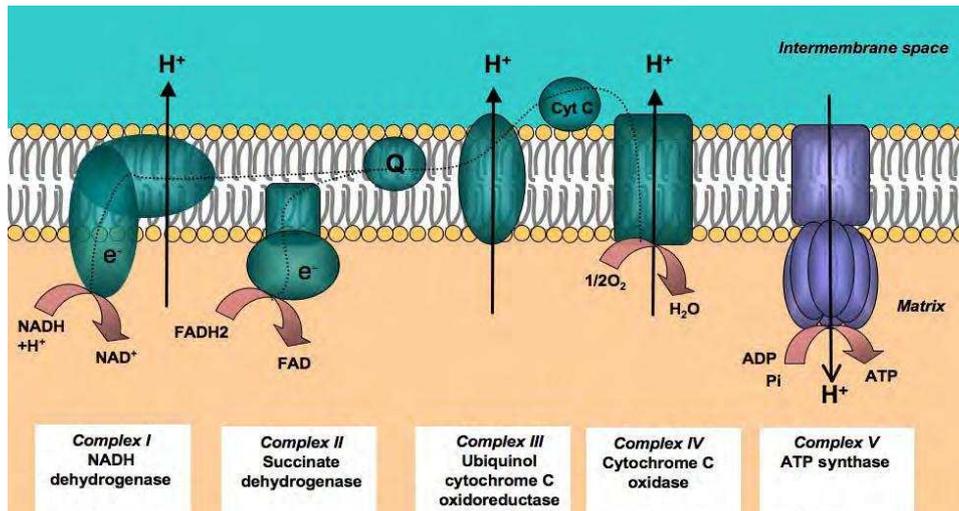


Figure 21 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Située au niveau des crêtes mitochondriales, la chaîne respiratoire est constituée de quatre complexes associés à deux transporteurs d'électrons mobiles. Le fonctionnement de la chaîne respiratoire provoque le relargage dans l'espace inter-membranaire des protons H⁺ créant ainsi un gradient de pH et engendrant un potentiel de membrane. Grâce au couplage du complexe V, les protons H⁺ retournent dans la matrice mitochondriale permettant ainsi la phosphorylation de l'ADP en ATP (Bellance et al., 2009).

(*succinate-ubiquinone oxydoréductase*), le complexe III (*ubiquinone-cytochrome c oxydoréductase*) et le complexe IV (*cytochrome c oxydase*). A ces complexes s'associent deux transporteurs d'électrons mobiles : l'ubiquinone et le cytochrome *c* (Figure 21). Les coenzymes réduits sont alors à nouveau oxydés par transfert de leurs électrons le long de cette chaîne vers un accepteur final qui est l'oxygène. Chronologiquement, le NADH cède ses électrons au complexe I tandis que le FADH₂ le fait au niveau du complexe II. Les électrons sont ensuite transportés par l'ubiquinone jusqu'au complexe III. A ce stade, ils sont pris en charge par le cytochrome *c* puis libérés au niveau du complexe IV où ils sont utilisés pour la réduction de l'oxygène en eau. Le transfert des électrons s'accompagne d'un pompage de protons H⁺ de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire au niveau des complexes I, III et IV. Ce flux de protons crée alors un gradient de pH et engendre un potentiel de membrane. Il en résulte un gradient électrochimique de proton, dénommé la force proton-motrice (Δp), qui permet alors le retour des H⁺ dans la matrice au niveau du complexe V (*complexe F₀-F₁ ATP synthase*) et ainsi, la **phosphorylation de l'ADP en ATP** (Bellance et al., 2009; Benard and Rossignol, 2008).

Le principal nutriment utilisé par la cellule comme source d'énergie est le **glucose**. Pour une molécule consommée, le rendement énergétique va dans ces conditions fournir 36 molécules d'ATP. Avant d'aboutir à la synthèse d'ATP, trois grandes étapes sont alors nécessaires :

- 1) La glycolyse, qui a lieu dans le cytoplasme de la cellule, aboutissant à la production de pyruvate
- 2) Le cycle de Krebs, permis grâce à l'entrée du pyruvate dans la matrice mitochondriale qui fournit l'acétyl-CoA
- 3) Le fonctionnement de la chaîne respiratoire, alimentée par les coenzymes NADH+H⁺ et FADH₂ générés par le cycle de Krebs.

2.1.2. Régulation de la chaîne respiratoire mitochondriale

La bioénergétique des mitochondries est intimement liée à leur dynamique. En effet, les premiers travaux réalisés dès la fin des années 1960 ont permis d'observer que la structure du réseau mitochondrial changeait en fonction du statut métabolique de la cellule (Hackenbrock, 1966). Depuis, de nombreuses études ont été réalisées permettant de mieux comprendre cette étroite relation. Par exemple, il a été démontré dans différents modèles cellulaires (cancéreux et non cancéreux) que l'apport de galactose/glutamine à la place de glucose entraînait une adaptation des mitochondries à la fois au niveau morphologique (condensation des mitochondries et ramification du réseau) et au niveau de son activité de phosphorylation

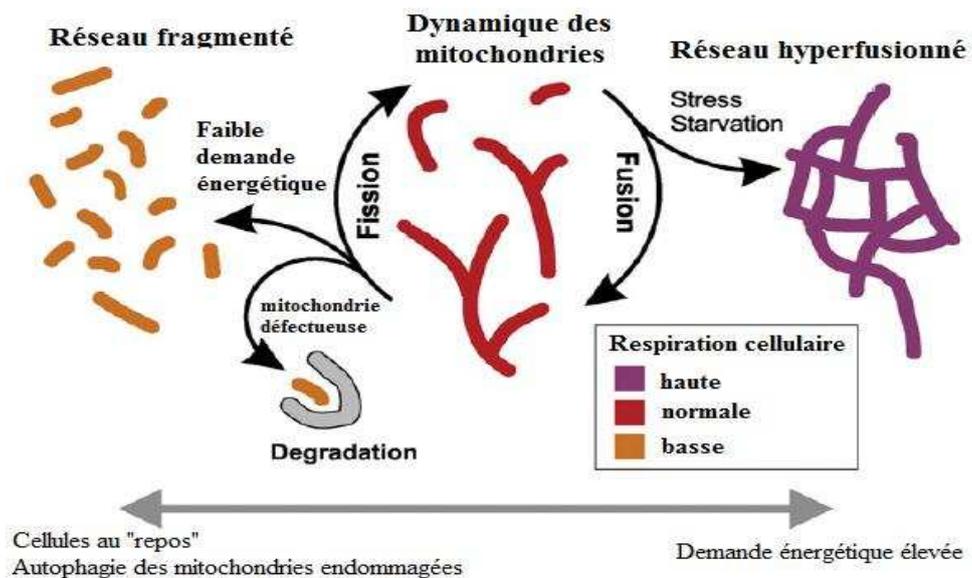


Figure 22 : Représentation schématique de l'adaptation de la dynamique des mitochondries en fonction de la demande énergétique de la cellule.

De nos jours, l'hypothèse que les mitochondries adapteraient leur réseau en fonction du statut énergétique de la cellule semble la plus probable. La fusion des mitochondries serait ainsi augmentée lorsque la demande énergétique de la cellule est élevée (à droite) et, inversement, dans les cellules dites « au repos », le réseau serait fragmenté permettant notamment l'élimination des mitochondries endommagées (Adaptation Westermann, 2012).

oxydative (synthèse protéique des complexes respiratoires, production de ROS) (Rossignol et al., 2004). De plus, l'inhibition endogène (lignées $\rho^{(-)}$ dépourvues d'ADNmt) ou exogène (inhibiteurs pharmacologiques) des complexes de la chaîne respiratoire induit une fragmentation du réseau mitochondrial, démontrant encore une fois le lien étroit entre la fonction énergétique de la mitochondrie et la structure de son réseau (Benard et al., 2007; Gilkerson et al., 2000; De Vos et al., 2005).

Par ailleurs, si la modification des fonctions énergétiques des mitochondries concourt à un changement dans l'équilibre fission/fusion, des effets similaires s'observent lorsque des perturbations des protéines de la dynamique mitochondriale existent. Par exemple, l'inhibition de l'expression de MFN2 entraîne la diminution du potentiel de membrane mitochondrial et de l'expression des complexes de la chaîne respiratoire (Bach et al., 2003; Pich et al., 2005). De même, l'inhibition de l'expression d'OPA1 conduit à une dissipation du potentiel de membrane mitochondrial associée à une fragmentation accrue du réseau (Olichon et al., 2003). Toutes ces données suggèrent ainsi une **relation bidirectionnelle entre structure du réseau mitochondrial et fonctions énergétiques**. De nos jours, l'hypothèse que le réseau mitochondrial adapterait sa morphologie aux besoins énergétiques de la cellule semble la plus probable. La fusion des mitochondries serait augmentée lorsque les besoins énergétiques cellulaires sont importants. A l'opposé, la fragmentation mitochondriale s'observerait majoritairement dans les cellules où la demande en énergie est faible (Twig et al., 2008 ; Westermann, 2012 ; Figure 22).

2.2. Mitochondries et apoptose

La **mort cellulaire programmée** aboutit à la destruction des cellules. C'est un processus physiologique finement régulé intervenant dans de nombreuses fonctions de l'organisme telles que l'embryogénèse, la morphogénèse ou l'immunité (Meier et al., 2000; Rathmell and Thompson, 2002). Historiquement, le mot apoptose provient du grec signifiant « chute » et a été employé dès l'Antiquité par Hippocrate de Kos (460-377 avant Jésus Christ) pour décrire la décomposition post-mortem des corps (« chute des os »). Mais ce n'est qu'en 1972 que J. Kerr, A. Wyllie et A. Currie introduisirent cette notion pour désigner un modèle de mort cellulaire nouvellement observé, différent du modèle de nécrose. Leurs travaux décrivaient alors la nécrose comme un phénomène passif faisant suite à une agression extérieure, tandis que la mort par apoptose était définie comme un processus actif, organisé temporellement, au cours duquel la cellule exprimait un ensemble de gènes entraînant des modifications morphologiques, biochimiques et structurales aboutissant à sa destruction complète (Kerr et

al., 1972). Par la suite, ce sont des travaux menés par J. Sulston, S. Brenner et R. Horvitz sur les nématodes qui ont permis de mieux comprendre ce phénomène de mort programmée (Marx, 2002) ; avancée majeure dans la connaissance de la biologie de la cellule leur permettant de recevoir le prix Nobel de Médecine et de Physiologie en 2002. Il est à noter que, de nos jours, la nécrose est désormais définie également comme une mort cellulaire programmée et non un phénomène passif.

Au cours de l'apoptose, de nombreuses modifications biochimiques sont rencontrées : modification des flux calciques à l'origine de l'activation de nombreuses enzymes telles que les endonucléases, activation des protéinases cystéine-aspartate dépendantes (*caspases*), génération de radicaux libres ou encore perte de l'asymétrie de la membrane plasmique avec externalisation de la phosphatidylserine (PS). Tous ces changements surviennent en réponse à une grande variété de signaux (carence en facteurs de croissance, cytokines, exposition aux ultra-violets, carence en glucose, radiothérapie, chimiothérapie...) définissant deux voies de signalisation apoptotique : la voie extrinsèque dite des récepteurs de mort et la voie intrinsèque dite mitochondriale.

Ces deux voies vont, de façon commune, concourir à l'activation de protéinases spécifiques de l'apoptose que sont **les caspases**. Elles présentent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu aspartique (Alnemri et al., 1996). Toutes les caspases ont une structure hautement conservée et sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs dans le cytoplasme ou zymogènes. Douze caspases sont à ce jour connues chez l'homme et peuvent classiquement être divisées en trois groupes : les caspases jouant un rôle dans l'inflammation, les caspases initiatrices et les caspases effectrices ; ces deux derniers regroupant les caspases à activité pro-apoptotique. Le groupe des initiatrices rassemblent les caspases 2, 8, 9 et 10 possédant un pro-domaine N-terminal long et jouant un rôle dans l'activation de la cascade protéolytique. Les effectrices, possédant un pro-domaine court, réunissent les caspases 3, 6 et 7 et ont pour rôle de cliver les substrats nucléaires et cytoplasmiques (Kuranaga, 2012; Poreba et al., 2013; Riedl and Shi, 2004). Ces enzymes sont finement régulées au sein de la cellule, mettant en jeu notamment leur phosphorylation inactivatrice par différentes kinases telles que Akt ou encore ERK (Allan et al., 2003; Cardone et al., 1998). Certaines protéines dénommées IAP (*inhibitor apoptosis proteins*) empêchent le clivage des pro-caspases et donc leur activation par liaison compétitive. Ces protéines sont connues pour inhiber les caspases 3, 7 et 9 (Schimmer, 2004). D'autres acteurs majeurs à côté des caspases sont les membres de la **famille protéique Bcl-2**. Ils vont notamment permettre une fine régulation de l'apoptose de la voie mitochondriale. Cette superfamille est composée de près de trente protéines qui peuvent

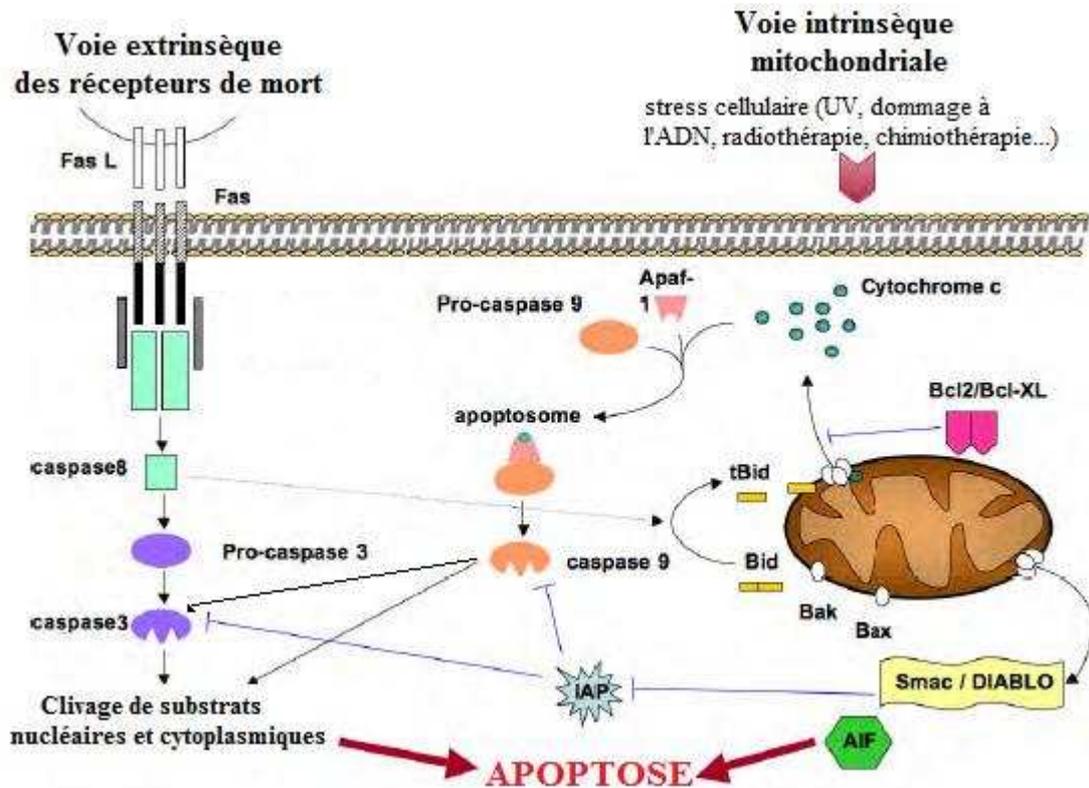


Figure 23 : Représentation schématique des voies apoptotiques.

A gauche, la voie extrinsèque dite des récepteurs de mort mettant en jeu la caspase 8 et, à droite, la voie intrinsèque dite mitochondriale qui libère les facteurs pro-apoptotiques et active, notamment, la caspase 9. Nous retrouvons aussi à ce niveau, quelques membres pro et anti-apoptotiques de la superfamille des protéines Bcl-2 (Adaptation Bellance and Rossignol, 2009).

être réparties en trois groupes : les membres anti-apoptotiques « Bcl-2-like » partageant trois à quatre domaines d'homologie (BH) avec la protéine Bcl-2, et les membres pro-apoptotiques « Bax-like » dépourvus de domaines d'homologie et « BH3-only » car ne possédant en commun avec les « Bcl-2-like » que ce domaine d'homologie (*Bcl-2 homology domain 3*) (Cory and Adams, 2002).

La voie extrinsèque met en jeu les récepteurs de mort transmembranaires. Les cytokines membres de la famille du TNF (*tumor necrosis factor*) tels que FASL (*Fas ligand*), le TNF- α ou encore Apo2/TRAIL (*Apo-2 ligans* ou *tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand*) vont se fixer sur leur récepteur entraînant la trimérisation de ces récepteurs puis, la formation de complexes multi-protéiques comme le complexe DISC (*death inducing signaling complex*). Ce processus va initier la signalisation apoptotique *via* l'activation de la pro-caspase 2, 8 ou encore 10 qui, par la suite, va activer par clivage protéolytique les caspases effectrices 3 et 7 (Bellance et al., 2009; Estève et al., 2007; Longthorne and Williams, 1997 ; Figure 23).

La voie intrinsèque met en jeu la mitochondrie. Elle est déclenchée suite à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale permettant ainsi la libération dans le cytoplasme de protéines initialement présentes dans l'espace inter-membranaires. Ces protéines vont alors être capables d'initier et de réguler l'activation des caspases. Le mécanisme de perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP pour *mitochondrial outer membrane permeabilisation*), considérée comme un événement irréversible dans l'engagement vers l'apoptose, fait toujours l'objet de nombreux travaux. Deux modèles sont proposés : la perméabilisation membranaire mitochondriale entraînant l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) ou la formation d'un pore par des protéines de la famille Bcl-2. Le PTP est un complexe multi-protéique localisé au niveau des sites de contact entre la membrane externe et interne et, serait composé du VDAC, de l'ANT (*adenine nucleotide translocator*) et de la cyclophiline-D (Bonora and Pinton, 2014; Forte and Bernardi, 2006). L'ouverture du PTP conduit à une entrée d'eau et de petits solutés au sein de la matrice provoquant sa dilatation et menant à la rupture de la membrane externe avec libération des protéines de l'espace inter-membranaire. Le second mécanisme proposé consiste en la formation d'un pore par les protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2, Bax et Bak. Cette dernière est constitutivement ancrée à la membrane externe mitochondriale, tandis que Bax est principalement présente sous forme monomérique dans le cytoplasme ou faiblement associée à la membrane externe (Esposti and Dive, 2003; Ferrer et al., 2012). Suite à un stimulus pro-apoptotique, Bax et Bak vont s'oligomériser induisant la formation de pores

à travers la membrane externe mitochondriale. De nos jours, il semblerait que ce soit ce deuxième mécanisme responsable de la MOMP. Ce phénomène serait notamment sous la régulation des membres de la superfamille Bcl-2 (Lopez and Tait, 2015). Une fois perméabilisée, la mitochondrie va libérer dans le cytoplasme des protéines dites apoptogènes. Parmi elles, la plus largement décrite est le cytochrome *c*. Une fois dans le cytoplasme, il va s'associer avec des molécules d'ATP et le cofacteur Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor 1*), constituant alors l'apoptosome (Riedl and Salvesen, 2007). Ce complexe multimoléculaire va conduire au recrutement et à l'activation de la caspase 9, qui activera à son tour les caspases effectrices 3 et 7 (*cf.* Figure 23). D'autres membres pro-apoptotiques sont également libérés lors de la perméabilisation membranaire : il s'agit de Smac/Diablo (*second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein of low PI*). Ils interagissent dans le cytoplasme avec les IAP entraînant leur inhibition et donc favorisant l'activation des caspases (Vaux and Silke, 2003). Il existe également une voie apoptotique ne mettant pas en jeu la cascade des caspases. Cette voie implique deux protéines mitochondriales que sont AIF (*apoptosis-inducing factor*) et l'endonucléase G. Suite à un stimulus apoptotique, elles sont libérées dans le cytoplasme et vont par exemple transloquer vers le noyau où elles sont capables d'induire à elles seules la condensation de la chromatine et de générer des fragments d'ADN (Daugas et al., 2000; Ye et al., 2002) (*cf.* Figure 23). Cependant, ces deux composés sembleraient jouer qu'un rôle mineur dans l'apoptose et possèdent de nombreuses autres fonctions cellulaires telles que le contrôle du métabolisme cellulaire pour AIF ou la régulation de la biomasse mitochondriale pour l'endonucléase G (Joza et al., 2009; McDermott-Roe et al., 2011).

Il est important de noter que les voies intrinsèques et extrinsèques ne sont pas complètement indépendantes. En effet, lors de l'activation de l'apoptose par les récepteurs de mort, la protéine cytoplasmique pro-apoptotique Bid (*BH3 interacting-domain death agonist*) va être clivée par la caspase 8 en une forme tronquée tBid qui va se relocaliser à la membrane mitochondriale. A ce niveau, tBid va soit inhiber les membres anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*) soit favoriser l'oligomérisation de Bax avec Bak dans la membrane externe mitochondriale (Gross et al., 1999; Yin, 2000) (*cf.* Figure 23) et, ainsi, activer la voie intrinsèque.

Une fois l'apoptose enclenchée, des modifications morphologiques cellulaires vont être observées. En effet, la dynamique du réseau mitochondrial va être fortement perturbée. Notamment, il a été démontré que Bax colocalisait avec Drp1 et stimulait sa sumoylation et donc sa stabilisation, entraînant ainsi la fragmentation des mitochondries (Karbowski et al.,

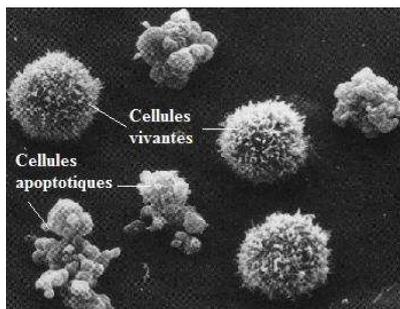


Figure 24 : Photographie par microscopie électronique à balayage de cellules de sarcome de souris vivantes et en apoptose.

Au cours de l'apoptose, les cellules possèdent des caractéristiques biochimiques et morphologiques typiques. Sur cette photo, les cellules apoptotiques sont facilement reconnaissables par le bourgeonnement de la membrane plasmique (Adaptation Webb et al., 1997).

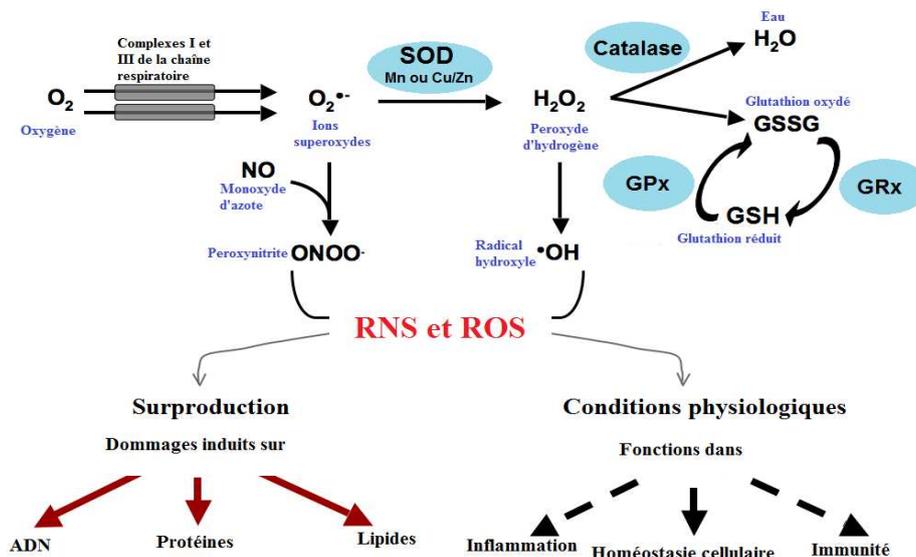


Figure 25 : Représentation schématique du devenir des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) dans la cellule ainsi que leurs fonctions cellulaires selon l'équilibre redox.

Les ROS sont les dérivés de l'oxygène tandis que les RNS proviennent de l'azote. La source principale de ROS intracellulaires est la mitochondrie et, les deux principaux représentants sont les ions superoxydes et le peroxyde d'hydrogène. Ces deux composés sont rapidement dégradés par les différentes enzymes anti-oxydantes comme la catalase et la SOD. Les ROS sont essentiels au bon fonctionnement cellulaire (fonctions de droite) mais en cas de déséquilibre du statut redox, ils provoqueront de nombreux dommages cellulaires (fonctions de gauche)

(Adaptation Bellance et al., 2009).

2002; Wasiak et al., 2007). Il a aussi été démontré le rôle de Bim dans le déclenchement de la fragmentation mitochondriale induite par le paclitaxel (Savry et al., 2013). En parallèle, de nombreuses altérations cellulaires vont intervenir avec la ségrégation de la chromatine à la périphérie de l'enveloppe nucléaire, la condensation du cytoplasme ainsi qu'un bourgeonnement de la membrane plasmique. L'évolution du processus aboutit alors à la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques (Kerr et al., 1972; Webb et al., 1997 ; Figure 24). *In vivo*, ces corps apoptotiques sont rapidement phagocytés, empêchant ainsi la libération du cytoplasme de la cellule dans le milieu environnant et évitant ainsi tout état inflammatoire, par opposition au phénomène de nécrose (Allen et al., 1997).

2.3. Le stress oxydatif : présentation des ROS

A l'état physiologique, les espèces réactives présentes dans la cellule sont le reflet d'un équilibre redox ; c'est-à-dire d'un équilibre entre leur taux de production et celui de leur élimination par des systèmes antioxydants. Il est classiquement admis que la principale source cellulaire de ces composés est la mitochondrie *via* la chaîne respiratoire. Ce sont de puissants oxydants qui peuvent altérer la structure des constituants cellulaires. Les ROS sont considérés comme des sous-produits normaux du métabolisme aérobie. Ces molécules sont impliquées dans plusieurs fonctions physiologiques telles que la prolifération cellulaire, l'apoptose, ou encore les fonctions immunitaires (Alfadda and Sallam, 2012). Cependant, lorsque les niveaux de ROS deviennent trop importants, le terme de **stress oxydatif** apparaît, qui entraîne de nombreux dommages dans la cellule à l'origine de multitudes de pathologies allant des maladies cancéreuses aux maladies neurodégénératives en passant par le phénomène de vieillissement (Figure 25).

2.3.1. Production des ROS

Au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, 0,1 à 4 % de l'oxygène utilisé serait détourné vers la production de ROS. Ils sont, plus précisément, formés majoritairement au niveau du système de transport des électrons (*STE*). Les complexes I et III sont reconnus comme les principaux producteurs de ROS puisqu'ils génèrent l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), précurseur de la plupart des ROS (Grivennikova and Vinogradov, 2006). Les superoxydes sont fortement réactifs mais diffusent peu dans la cellule où ils sont vite transformés. S'ils ne sont pas dégradés par des antioxydants, ils peuvent réagir avec le NO pour former le peroxynitrite ($ONOO^-$) et par la suite aboutir à la formation de radicaux hydroxyles (OH^{\cdot}). Ces derniers correspondent aux espèces radicalaires les plus réactives et les plus délétères

(Turrens, 2003). Cependant, dans la majorité des cas, les superoxydes sont rapidement pris en charge par une famille de métalloenzymes détoxifiantes, les superoxydes dismutases (*SOD*), qui entraînent la dismutation des superoxydes en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier peut alors, par la réaction de Fenton, engendrer également des radicaux hydroxyles. L' H_2O_2 n'est pas un radical libre mais diffuse aisément à travers les membranes et joue un rôle oxydant ou réducteur dans plusieurs fonctions physiologiques (Gamaley and Klyubin, 1999).

2.3.2. Les systèmes antioxydants

Dans les conditions physiologiques, la production cellulaire de ROS est régulée par des systèmes antioxydants pour maintenir l'équilibre redox. Il existe un important répertoire de molécules capables de contrer les effets néfastes des ROS qui sont répertoriées en deux catégories : les antioxydants enzymatiques et les non-enzymatiques. Parmi les enzymes identifiées à ce jour comme ayant de telles habilités, la SOD représente le premier rempart de dégradation des ROS. La matrice mitochondriale contient une forme spécifique de SOD avec un ion manganèse à son site actif (nommée ainsi MnSOD ou SOD2) tandis que dans l'espace intermembranaire et dans le cytosol sont retrouvées les Cu/ZnSOD (ou SOD1) contenant un ion cuivre ou zinc à la place du manganèse (Fridovich, 1995). La dismutation des ions superoxydes est catalysée par les ions métalliques (Hassan, 1980) et produit ainsi du peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est alors pris en charge par la catalase, 2^{ème} enzyme anti-oxydante entraînant la formation d'eau et d'oxygène. L' H_2O_2 peut aussi être transformé par une sélénoprotéine : la glutathione peroxydase (*GPx* ou *GSH peroxydase*) qui, en présence de glutathion, va fournir deux molécules d'eau et du glutathion oxydé (*GS-SG*). Celui-ci pourra ensuite être réduit en glutathion grâce à l'intervention d'une flavoprotéine, la glutathione réductase (*GRx* ou *GSSG réductase*) (cf. Figure 25 ; Pham-Huy et al., 2008).

Les antioxydants non-enzymatiques sont sous-divisés en deux groupes : les antioxydants métaboliques ou endogènes et les antioxydants exogènes provenant de l'alimentation. Dans les composés endogènes, nous pouvons citer le glutathion, le CoEnzyme Q10, la mélatonine ou encore l'acide lipoïque. Les antioxydants exogènes comptent, quant à eux, la vitamine C et E, des omégas 3 et 6, ou encore des composés flavonoïdes. Tous ces acteurs posséderaient un rôle dans la prévention des maladies cancéreuses et neurodégénératives mais leur implication reste encore débattue à ce jour (Pham-Huy et al., 2008).

2.3.3. Impact des ROS dans l'homéostasie cellulaire

Les ROS possèdent de nombreuses fonctions au sein de la cellule parmi lesquelles nous pouvons citer leur **rôle dans l'homéostasie cellulaire**, qui pourrait sembler paradoxal au premier abord. En effet, les ROS sont capables à la fois de promouvoir la croissance et la prolifération cellulaire, mais également de déclencher la mort cellulaire. Ces fonctions seront activées selon le niveau basal de ROS intracellulaire qui doit ainsi être finement régulé. Plusieurs études ont démontré que les ROS allaient pouvoir réguler la voie de signalisation PI3K/Akt en activant ou inhibant certains des acteurs de cette voie. Les ROS vont aussi pouvoir réguler la voie des MAPK (*mitogen-activated proteins kinases*) jouant un rôle important dans la croissance et la prolifération cellulaire (Son et al., 2013). Une revue parue en 2012 relate les différentes fonctions des ROS notamment dans la régulation des voies de signalisation cellulaire (Ray et al., 2012). En opposition, les ROS jouent un rôle primordial lors de la mort cellulaire programmée et sont désormais admis comme étant des **facteurs pro-apoptotiques** (Franklin, 2011). Par exemple, plusieurs études ont démontré que leur production était à l'origine de la libération du cytochrome *c* via la peroxydation des cardiolipines de la membrane interne des mitochondries (Ott et al., 2002; Petrosillo et al., 2001, 2004). De plus, il a également été mis en lumière que l'activation des caspases pouvait engendrer une boucle de rétrocontrôle positif sur la production de ROS. En effet, une étude a démontré que l'inhibition de la caspase 8 était à l'origine de l'inhibition de production de ROS mitochondriaux (Roberge et al., 2014). L'activation de la caspase 3 induit, quant à elle, des dommages au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire, entraînant une perte du potentiel transmembranaire ainsi qu'une augmentation de la production de ROS (Ricci et al., 2003). Ce dialogue ROS-caspases pourrait d'ailleurs être à double sens puisqu'une inhibition de la production des ROS mitochondriaux empêche l'activation des caspases et notamment celle de la caspase 8 (Kim and Chung, 2007). Enfin, les ROS vont également réguler les protéines de la famille Bcl-2, en diminuant l'expression de Bcl-xL (Herrera et al., 2001) et de Mcl-1 (*myeloid cell leukemia-1*) (Chiu et al., 2012), en stimulant l'activation de Bax via sa phosphorylation (Quast et al., 2013), ou encore en provoquant la translocation mitochondriale de Bim (Khawaja et al., 2008).

Impliquées à de nombreux égards dans la balance survie/apoptose, les mitochondries jouent donc un rôle central dans le destin de la cellule. Une perturbation de l'organisation et/ou des fonctions du réseau mitochondrial peut mener à une baisse de la production énergétique, mais aussi à une production exagérée de ROS. Dans ce contexte, il est désormais admis que

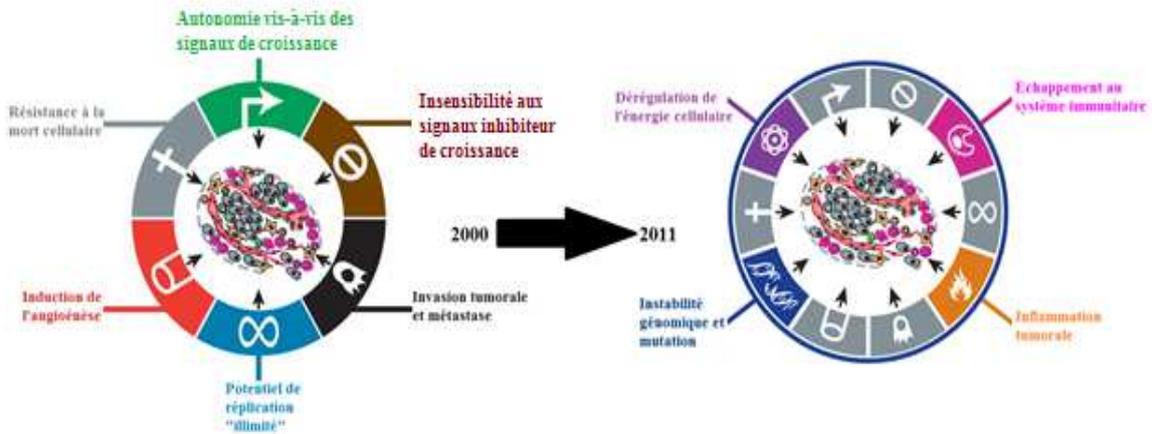


Figure 26 : Les différents marqueurs caractéristiques des cellules cancéreuses.

En 2000, l'équipe de D. Hanahan proposait de définir les cellules cancéreuses par six paramètres cellulaires dérégulés qui les différenciaient des cellules non-cancéreuses (schéma de gauche). Les travaux réalisés en oncologie dans la décennie qui suivit ont permis, en 2011, de mieux caractériser les perturbations physiologiques induisant la malignité des cellules. Quatre nouveaux paramètres ont ainsi intégré le schéma de D. Hanahan (schéma de droite) parmi lesquels nous pouvons citer la dérégulation de l'énergétique cellulaire médiée par les mitochondries (Hanahan et al., 2000 and 2011).

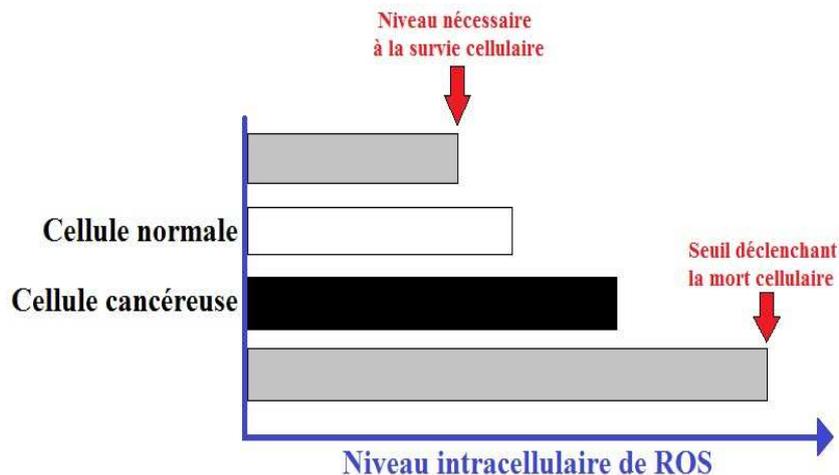


Figure 27 : Représentation schématique des niveaux de ROS dans les cellules.

En conditions physiologiques, la cellule doit produire un niveau basal de ROS lui permettant d'assurer sa survie sans dépasser un certain seuil critique synonyme du déclenchement de la mort cellulaire (barres grises). Il est désormais admis, que les cellules cancéreuses (barre noire) possèdent un niveau basal de ROS supérieur aux cellules dites normales (barre blanche) sans pour autant dépasser ce seuil critique (Adapté de Wang and Yi, 2008).

certaines dérégulations mitochondriales sont impliquées dans des pathologies sévères telles que le cancer et les maladies neurodégénératives (Boland et al., 2013; Fernández-Moriano et al., 2015). *Dans le paragraphe qui va suivre, je vais présenter l'impact des dysfonctionnements mitochondriaux dans les maladies cancéreuses, puis je m'attarderai sur le rôle des mitochondries comme cible pharmacologique et, en particulier, leur importance dans l'efficacité des MTA.*

3. Implications des mitochondries en oncopharmacologie

3.1. Mitochondries et cancers

Au cours de cette dernière décennie, les nombreux travaux menés en cancérologie ont permis de caractériser les cellules tumorales par différents marqueurs. La plupart des changements génétiques et épigénétiques relatifs au phénotype cancéreux serait une succession de perturbations, qui, cumulée, induit la malignité de la cellule (Hanahan and Weinberg, 2011; Hanahan et al., 2000 ; Figure 26). Il est désormais admis que la dérégulation des fonctions mitochondriales joue un rôle prépondérant dans les pathologies cancéreuses que ce soit dans l'initiation de la carcinogène *via* la sur-production de ROS, ou dans l'expansion tumorale par adaptation du métabolisme énergétique pour subvenir aux besoins de la cellule cancéreuse (Boland et al., 2013).

3.1.1. ROS et carcinogénèse

De nombreux travaux ont mis en évidence que la concentration intracellulaire de ROS dans les cellules cancéreuses est plus élevée que dans les cellules normales, sans pour autant atteindre le seuil critique de déclenchement de la mort cellulaire (Figure 27). Cette sur-production est due, d'une part, à une augmentation de la production de ROS et, d'autre part, à des anomalies au niveau des systèmes antioxydants (Wang and Yi, 2008). De nos jours, il est clairement établi que cette augmentation du niveau basal de ROS joue un rôle déterminant dans la mise en place des différents processus emblématiques du cancer. Par exemple, les ROS sont impliqués dans l'angiogénèse tumorale *via* l'activation du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et de l'angiopoïétine, permettant alors la formation de nouveaux vaisseaux essentiels à la croissance des tumeurs et à leur dissémination menant aux métastases (Maulik, 2002). En accord avec ce rôle des ROS dans l'angiogénèse, une étude récente a mis en évidence que des micelles contenant des antioxydants inhibaient la formation de tubes capillaires *in vitro* (Moriyama et al., 2014). La prolifération anarchique des cellules

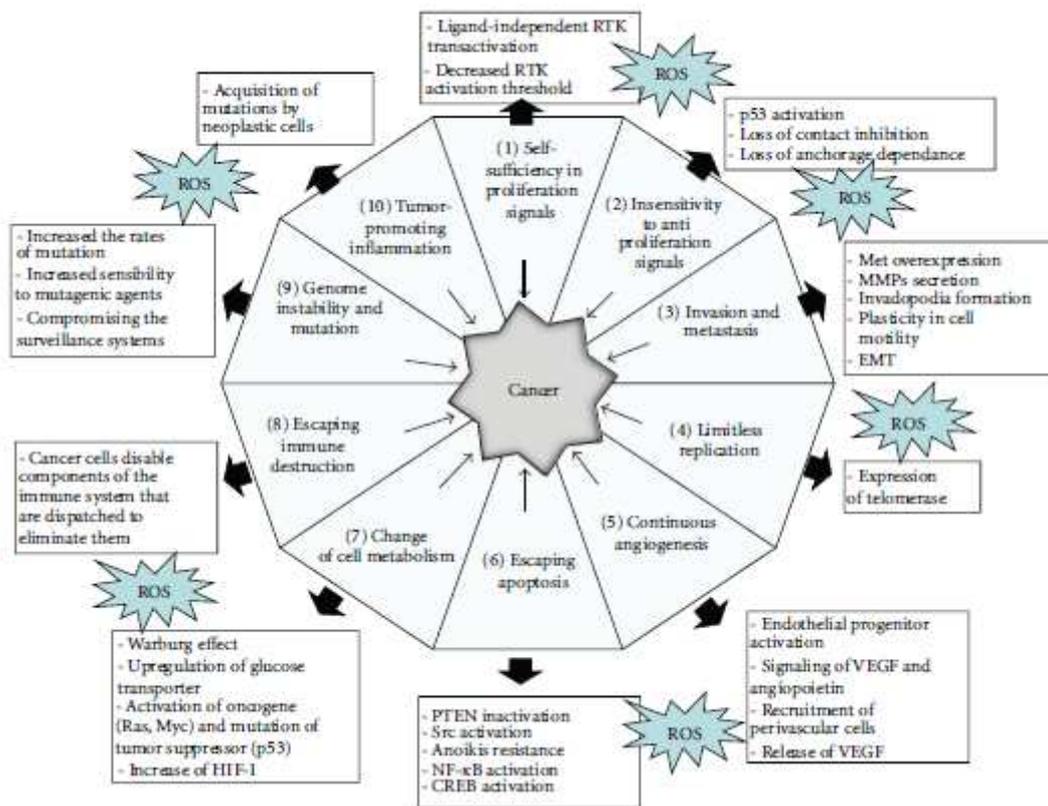


Figure 28 : Implication des ROS dans les processus menant à la carcinogénèse.

Sont représentés ici les 10 phénomènes dérégulés dans la cellule aboutissant au développement tumoral. Le rôle des ROS dans chacun de ces processus est détaillé dans les cadres par les voies ou mécanismes qu'ils gouvernent (Fiaschi and Chiarugi, 2012).

cancéreuses représente un autre exemple de l'implication des ROS dans le processus de carcinogénèse. En effet, les ROS sont capables d'activer de façon constitutive p38MAPK et ERK1/2 jouant un rôle important dans la prolifération et la survie cellulaire (Benhar et al., 2001; Gupta et al., 1999). L'ensemble des altérations provoquées par la sur-production des ROS dans les cellules cancéreuses est détaillé dans la revue de T. Fiaschi et P. Chiarugi parue en 2012 (Figure 28 ; Fiaschi and Chiarugi, 2012).

3.1.2. Reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses

Si une première version du schéma des « marqueurs du cancer » a été proposée par D. Hanahan en 2000, il a fallu attendre sa réactualisation en 2011 pour voir la dérégulation de l'énergétique cellulaire, ou **reprogrammation métabolique**, y faire son apparition comme facteur caractéristique permettant de distinguer les cellules cancéreuses des cellules normales (*cf.* Figure 26 ; Hanahan and Weinberg, 2011). En effet, la prolifération cellulaire anarchique nécessite des ajustements du métabolisme énergétique pour fournir les métabolites et cofacteurs nécessaires à la croissance et à la division cellulaire. Ce concept de reprogrammation métabolique ne date cependant pas de 2011. Dès 1927, O. Warburg, médecin, physiologiste et biochimiste allemand, avait observé que les cellules cancéreuses produisaient une quantité anormale de lactate ; composé issu de la fermentation. Il en déduisit que les cellules cancéreuses utiliseraient davantage le glucose que les cellules normales et produiraient l'ATP principalement *via* la glycolyse malgré la présence d'oxygène (Warburg et al., 1927). Cette hypothèse connut un véritable engouement dans la population scientifique et d'innombrables études ont mis en évidence, par la suite, dans tous types de cancers, cette reprogrammation métabolique appelée « **effet Warburg** ». De nos jours, cette modification énergétique est exploitée cliniquement en oncologie par imagerie PET-scan (*tomographie par émission de positons*) basée sur la consommation accrue de glucose par les cellules cancéreuses. De ces mêmes observations, O. Warburg proposa l'hypothèse que les pathologies cancéreuses surviendraient lorsque le métabolisme oxydatif mitochondrial est altéré (Warburg, 1956). Or, si la préférence glycolytique d'une large majorité des cellules cancéreuses est incontestable, la théorie Warburg supposant des mitochondries non-fonctionnelles a depuis été revisitée. Dès les années 1950, les travaux de S. Weinhouse montrèrent que les cellules néoplasiques et les cellules normales ne présentaient pas de différence dans leur habilité à convertir le glucose et les acides gras en dioxyde de carbone ; processus qui requiert la respiration et donc des mitochondries fonctionnelles (Weinhouse, 1955; Weinhouse and Wenner, 1956; Weinhouse et al., 1951). Ces dernières années, de

Symbiose métabolique :
"Reverse Warburg Effect"

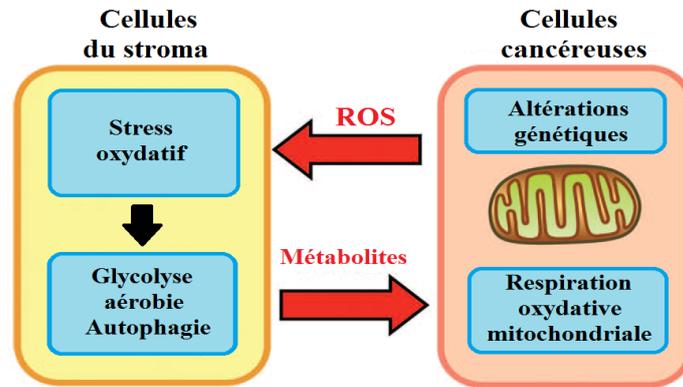


Figure 29 : Représentation schématique de la symbiose métabolique entre les cellules du stroma tumoral et les cellules cancéreuses.

Dans la théorie de l'effet Warburg inverse, en premier lieu, les cellules cancéreuses subiraient des altérations génétiques entraînant la génération accrue de ROS. Ces derniers induiraient alors un stress oxydatif à l'origine de la mise en place de l'effet Warburg dans les cellules du stroma. Celles-ci sécrèteraient alors, en condition de glycolyse aérobie, différents métabolites (lactate, pyruvate) captés par les cellules cancéreuses comme nutriments qui seraient oxydés au niveau des mitochondries pour produire de l'ATP (Adaptation Martinez-Outschoorn et al., 2012).

nombreuses études ont montré qu'il existait une grande variabilité dans le remodelage métabolique des cellules cancéreuses. En effet, il a été démontré que certains types de cellules cancéreuses pouvaient utiliser davantage la respiration oxydative pour produire l'ATP (Herst and Berridge, 2007; Moreno-Sánchez et al., 2007). De plus, il a été mis en évidence que dans les cellules de phénotype glycolytique, les mitochondries sont en fait moins efficaces – plutôt que non fonctionnelles – notamment à cause d'une diminution de la biogénèse mitochondriale intracellulaire (Bellance et al., 2009; Sánchez-Aragó et al., 2010). Enfin, de nombreux travaux ont mis en lumière que l'augmentation de la glycolyse aérobie avait pour conséquence une stabilisation du réseau mitochondrial, entraînant une diminution de leurs fonctions ainsi qu'une résistance au déclenchement de l'apoptose *via* notamment la sur-expression de l'hexokinase (*HXX*) régulée par Akt (Vander Heiden et al., 2001; Majewski et al., 2004; Mathupala et al., 2006; Pastorino et al., 2002). Ainsi, le réseau mitochondrial serait en réalité simplement « **mis sous silence** » et conserverait sa capacité à être réactivé si les besoins énergétiques de la cellule le requièrent.

De nos jours, l'hypothèse que les cellules tumorales adapteraient leur métabolisme en fonction des oncogènes et suppresseurs de tumeur exprimés, des substrats disponibles ainsi que du microenvironnement tumoral semble être la plus plausible (Jose and Rossignol, 2013; Martinez-Outschoorn et al., 2011; Rossignol et al., 2004). Dans ce contexte, l'étude du **microenvironnement tumoral** a permis de mettre à jour une nouvelle théorie nommée « **reverse Warburg effect** ». En effet, il est désormais établi qu'une masse tumorale correspond à une population cellulaire hétérogène dans laquelle le microenvironnement joue un rôle essentiel. Le stroma, composé de tissus conjonctifs et inflammatoires, participe ainsi au soutien et à la nutrition des cellules tumorales (Martinez-Outschoorn et al., 2012). Plusieurs travaux ont mis en évidence que les cellules épithéliales cancéreuses induisaient l'effet Warburg dans les fibroblastes du stroma (CAF pour *cancer associated fibroblasts*) *via* un stress oxydatif accru suite à des altérations génétiques dans ces cellules cancéreuses. Ces fibroblastes secréteraient alors du lactate et du pyruvate en condition aérobie (glycolyse aérobie) et fourniraient également des acides aminés et des corps cétoniques (autophagie) finalement captés par les cellules cancéreuses. Ces dernières oxyderaient alors ces métabolites au niveau de leur mitochondrie pour produire de l'ATP permettant une meilleure capacité de prolifération (Capparelli et al., 2012; Martinez-Outschoorn et al., 2014; Pavlides et al., 2009; Salem et al., 2012). Cette coopération entre les différentes cellules composant la masse tumorale est maintenant définie comme une « **symbiose métabolique** » (Figure 29).

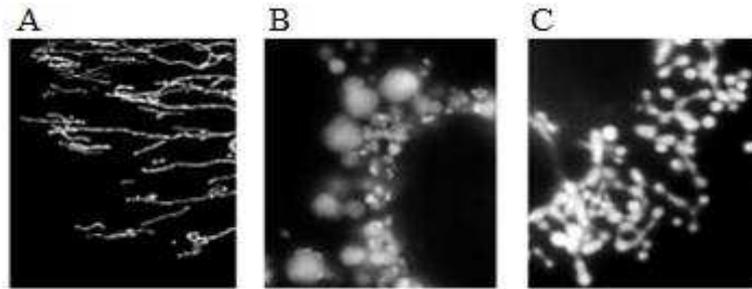


Figure 30 : Représentation par microscopie à épifluorescence du réseau mitochondrial grâce au marquage avec la protéine *mtDsRed*.

(A) condition contrôle ou (B et C) sous l'effet d'un traitement par paclitaxel dans des cellules d'adénocarcinome pulmonaire (A549) (photos réalisées au sein du laboratoire CRO₂- microscope Leica IM-DRBE). Le traitement par les MTA provoque la fragmentation du réseau mitochondrial ainsi que la suppression de sa dynamique à l'origine de la perte des fonctions mitochondriales.

3.2. Le réseau mitochondrial, cible pharmacologique attractive

Comme nous venons de le voir, les mitochondries jouent un rôle essentiel dans l'initiation mais également le développement tumoral, faisant de cet organite intracellulaire une cible de choix pour les stratégies thérapeutiques anticancéreuses. *Dans le présent paragraphe, je vais présenter brièvement les différentes stratégies élaborées pour cibler les mitochondries après m'être attardée un peu plus sur le rôle de ce réseau intracellulaire dans l'efficacité des MTA.*

3.2.1. MTA : Mitochondria-Targeted Agents ?

L'importance des mitochondries dans l'efficacité des MTA n'est plus controversée, puisqu'il est clairement établi que ces anticancéreux déclenchent la mort cellulaire *via* la voie mitochondriale (Bhalla, 2003; Fulda and Debatin, 2006). Des travaux, réalisés en partie au sein du laboratoire, ont montré l'impact des MTA sur la régulation des protéines de la famille Bcl-2 ou sur les caspases, tous deux acteurs principaux de l'apoptose. Par exemple, les *Vinca*-alcaloïdes sont capables d'inactiver le membre anti-apoptotique Bcl-2 par hyperphosphorylation (Pathan et al., 2001) tandis que la paclitaxel, par l'intermédiaire de l'activation de la caspase 3, entraîne le clivage de Bcl-2 (Tudor et al., 2000). De plus, plusieurs études ont montré que le paclitaxel ou encore la vinorelbine augmentaient le niveau d'expression de membres pro-apoptotiques tels que Bax, Bad (*Bcl-2 associated death promoter*), Bak ou encore Bim en fonction du type de cancer (Li et al., 2005; Sunter et al., 2003). Chaque acteur de la voie intrinsèque mitochondriale se révèle donc être un candidat potentiel à l'induction d'une **résistance** aux MTA si son activité et/ou son niveau d'expression sont modifiés en faveur de l'inhibition de la mort cellulaire (Savry et al., 2013; Sawa et al., 2000; Strobel et al., 1998; Wang et al., 2013). L'ensemble des effets des différentes classes de MTA est répertorié dans une revue publiée en 2007 révélant le rôle primordial de l'apoptose dans le mécanisme d'action de ces agents anticancéreux (Estève et al., 2007). D'un point de vue structural, il a également été démontré l'impact des MTA sur le réseau mitochondrial entraînant une fragmentation de ce réseau ainsi qu'une suppression de la dynamique mitochondriale (Figure 30 ; Savry et al., 2013).

Par ailleurs, bien que leur nom d'agents anti-microtubules suggère le ciblage exclusif du réseau microtubulaire, les preuves d'un rôle du réseau mitochondrial très en amont du mécanisme d'action des MTA se sont accumulées ces dernières années. En effet, notamment au sein du laboratoire, il a été mis en lumière l'importance de la génération de ROS mitochondriaux dans le mécanisme d'action initiateur de la patupilone, MTA de dernière

génération (Khawaja et al., 2008). De plus, il a été démontré que les MTA possédaient des cibles directes au niveau des mitochondries puisqu'ils sont capables d'agir sur mitochondries isolées (André et al., 2000; Carré et al., 2002), contrairement à d'autres agents tels que la doxorubicine. Parmi les candidats potentiels de ces anticancéreux présents au niveau des mitochondries, la protéine Bcl-2 (Ferlini et al., 2009), mais également la tubuline elle-même dont la présence dans la membrane mitochondriale en association avec le VDAC a été démontrée (Carré et al., 2002), représentent ainsi des cibles directes des MTA. Il a également été observé que les MTA pouvaient perturber la perméabilisation mitochondriale (Varbiro et al., 2001). L'ensemble de ces données indique donc bien **le rôle direct et indispensable du réseau mitochondrial dans l'efficacité des MTA** à déclencher la mort cellulaire.

3.2.2. Les mitochondries comme cible des thérapies anticancéreuses

Plusieurs approches thérapeutiques sont actuellement étudiées parmi lesquelles nous pouvons citer par exemple, l'activation de l'apoptose, l'induction de la production de ROS ainsi que la modulation du métabolisme énergétique. Une revue parue en 2012 répertorie ces différentes stratégies avec les composés utilisés définis alors sous le terme de « mitocans » (Neuzil et al., 2013).

Les cellules cancéreuses sont souvent caractérisées par leur capacité à **échapper au phénomène d'apoptose** dû à des dérégulations de la superfamille de protéines Bcl-2. Actuellement, deux approches thérapeutiques sont en cours de développement : l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et les BH3-mimétiques ayant un rôle pro-apoptotique. L'Oblimersen (Genasense[®]) est le chef de file des oligonucléotides anti-sens qui va cibler les six premiers codons de l'ARNm codant pour Bcl-2 (Dean and Bennett, 2003). Il a fait l'objet de plusieurs études de phase III notamment dans les myélomes multiples, les mélanomes ou encore les leucémies lymphoïdes chroniques, mais n'a montré qu'une efficacité médiocre (Bedikian et al., 2006; Chanan-Khan et al., 2009; O'Brien et al., 2009). Les BH3-mimétiques, quant à eux, sont de petites molécules organiques qui vont inhiber les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Mcl-1 ou encore Bcl-xl. Cette catégorie de molécules compte par exemple l'AT-101 faisant l'objet d'études cliniques de phase II notamment dans le cancer de la prostate ou du poumon (Ready et al., 2011; Sonpavde et al., 2012) ou encore l'ABT-737, l'ABT-263 ou l'Obatoclax actuellement en études précliniques ou essais de phase I/II (Chiappori et al., 2014; Paik et al., 2011; Potter et al., 2014; Rudin et al., 2012). Cependant, tout comme les stratégies anti-sens, les résultats obtenus avec les BH3-mimétiques restent, à ce jour, médiocres.

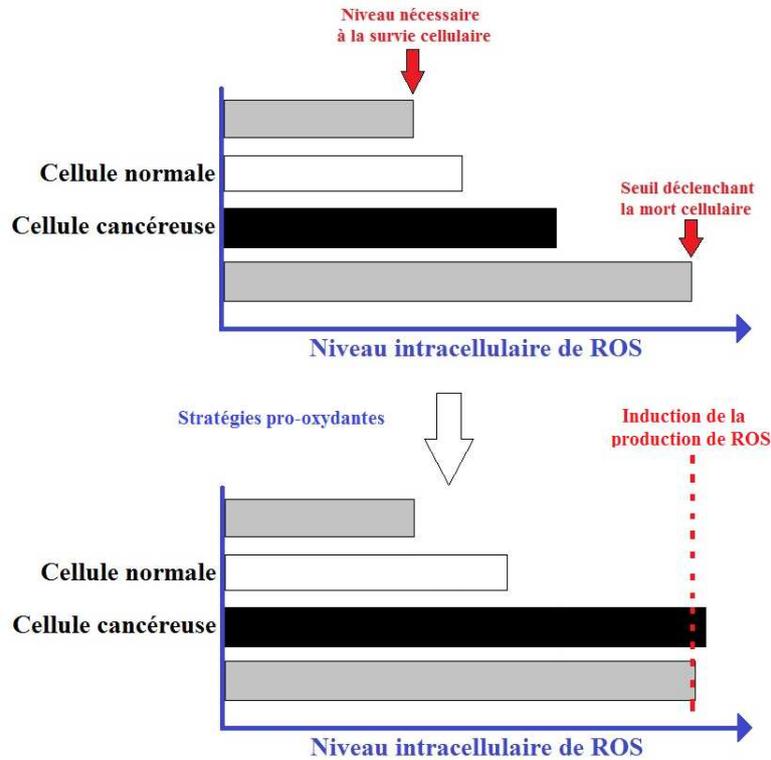


Figure 31 : Représentation schématique de la stratégie anticancéreuse pro-oxydante.

L'objectif de cette stratégie est d'augmenter le niveau de ROS au-delà du seuil limite déclenchant la mort cellulaire en fonction des niveaux de base dans les cellules cancéreuses (barre noire) et les cellules normales (barre blanche). Le niveau de ROS dans les cellules cancéreuses étant plus élevé de base que dans les cellules normales, le seuil limite à dépasser serait donc atteint plus rapidement dans ces cellules sans enclencher la mort dans les cellules normales (Adapté de Wang and Yi, 2008).

Décrit ci-dessus, nous avons vu que les cellules cancéreuses tendaient à avoir un **niveau de ROS** plus élevé que les cellules normales. Cette différence peut alors être exploitée cliniquement. En effet, au-delà d'un seuil limite de tolérance, l'augmentation aiguë des ROS peut entraîner des dommages cellulaires irréversibles et ainsi enclencher le programme de mort cellulaire. L'augmentation du stress oxydatif au-delà de ce seuil – plus facilement atteignable pour les cellules cancéreuses que pour les cellules saines – peut se montrer efficace pour limiter la prolifération tumorale et déclencher l'apoptose cellulaire (Figure 31 ; Wang and Yi, 2008). Cependant, cette stratégie reste critiquée au regard des risques d'effets secondaires sur les cellules non cancéreuses ; les ROS étant, ne l'oublions pas, pro-cancérigènes dans certaines conditions. Une autre approche est également à ce jour évaluée consistant à inhiber la production de ROS considérée dans ces cas là comme responsable de l'initiation et de la progression tumorale. Une revue parue en 2009 décrit les différentes molécules utilisées pour contrer cette production de ROS (Fang et al., 2009).

En parallèle du ciblage de l'apoptose ou des ROS, le dernier point présenté ici est la modulation du **métabolisme énergétique** des cellules cancéreuses. Plusieurs stratégies thérapeutiques sont ainsi en cours de développement. La première piste explorée est l'inhibition de la voie glycolytique où nous retrouvons principalement deux inhibiteurs que sont le 2-DG (*2-désoxyglucose*) et le 3-BrPA (*3-bromopyruvate*). Le premier est un analogue du glucose qui ne peut-être métabolisé tandis que le 2^{ème} va inhiber l'hexokinase, première enzyme métabolisant le glucose de façon irréversible. Ces deux composés ont démontré leur capacité *in vitro* et *in vivo* à déclencher la mort cellulaire dans différents types de cancer tels que les cancers du sein, les cancers gastriques, les cancers de la prostate ou encore les cancers pulmonaires, seuls ou en association à des agents anticancéreux ou à la radiothérapie (Xian et al., 2015; Zhang et al., 2014b; Zhou et al., 2013b). Actuellement, seul le 2-DG fait l'objet d'essais cliniques de phase I ou I/II. Une autre stratégie consiste à switcher le métabolisme énergétique de la glycolyse à la respiration oxydative. Pour cela, deux enzymes clefs seront ciblées : la pyruvate déshydrogénase ou la lactate déshydrogénase (Gogvadze et al., 2010). Le composé le plus prometteur est le dichloroacétate (*DCA*). Il va inhiber la pyruvate déshydrogénase kinase (*PDK-1*) engendrant une augmentation de la synthèse d'AcétylCoA stimulant ainsi la respiration oxydative. L'ensemble de ses activités est répertorié dans une revue parue en 2014 (Kankotia and Stacpoole, 2014). La revue de C. Jose parue en 2013 insiste sur le fait qu'une masse tumorale étant composée de cellules hétérogènes d'un point de vue du métabolisme, la caractérisation du profil énergétique de la tumeur avant tout traitement serait nécessaire (Jose and Rossignol, 2013). Un autre point important ressortant de ces études

pharmacologiques est que certains acteurs signalétiques, initialement caractérisés pour leur rôle dans des processus tels que la survie ou la prolifération des cellules cancéreuses, seraient aussi impliqués dans le statut énergétique des cellules tumorales et pourraient ainsi constituer de nouvelles stratégies thérapeutiques prometteuses. La kinase Akt à laquelle nous consacrerons le chapitre 3 en est un bel exemple.

Comme nous venons de le voir au cours de ces deux premiers chapitres, les MTA exercent leur efficacité par action à la fois sur le réseau microtubulaire et mitochondrial. Un des objectifs de mes travaux de thèse est d'essayer de déchiffrer les acteurs moléculaires pouvant intervenir entre ces deux réseaux indissociables, et ainsi concourir à l'efficacité des MTA. Comme nous le verrons dans la première partie des travaux expérimentaux, la voie Akt/GSK3 β s'est révélée être centrale dans le mécanisme d'action des MTA ; le chapitre suivant s'attache donc à en présenter ses acteurs.

Box 2

Les **mitochondries** constituent une deuxième cible intracellulaire des MTA notamment *via* le déclenchement de l'apoptose. Cet orgaite possède d'autres fonctions primordiales comme la production de **ROS** intracellulaires ou encore la régulation du **métabolisme énergétique**. Au cours de ces travaux de thèse, visant à déchiffrer le mécanisme d'action des MTA, nous nous sommes attachés à étudier le rôle des ROS puis du métabolisme énergétique dans l'efficacité de ces anticancéreux. La **reprogrammation métabolique** étant considérée depuis maintenant quelques années comme un marqueur des cellules cancéreuses, les mitochondries bénéficient ainsi d'un nouveau regain d'intérêt de la part de la communauté scientifique. Dans ce contexte, les résultats acquis au cours de ces travaux alimenteront les données actuelles de la littérature démontrant l'importance du ciblage des mitochondries dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

CHAPITRE 3

LA KINASE AKT : CIBLE PROMETTEUSE EN THERAPEUTIQUE ANTICANCEREUSE

Comme nous venons de le voir dans les deux chapitres précédents, les microtubules et les mitochondries sont deux organites intracellulaires jouant des rôles cruciaux au sein de la cellule. La régulation de ces deux réseaux intracellulaires passe notamment par des modifications post-traductionnelles des protéines associées à ces deux réseaux comme décrit ci-dessus. Ces modifications mettent en jeu de nombreuses voies de signalisation intracellulaire parmi lesquelles nous pouvons citer la voie Akt/GSK3 β . *Dans le chapitre qui va suivre, je vais présenter ces deux acteurs en détaillant davantage la kinase Akt puisqu'elle va se révéler être une pièce centrale de la deuxième partie de mes travaux de thèse. Après leur présentation, je m'attacherai à exposer les fonctions d'Akt dans les pathologies cancéreuses que ce soit en termes d'implications dans la carcinogénèse, dans la chimiorésistance ou encore en tant que cible thérapeutique.*

1. Présentation des acteurs

1.1. La protéine kinase Akt

Si la protéine kinase Akt (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*) est de nos jours connue de tous dans le monde de la biologie et de la santé, sa découverte a été quelque peu laborieuse. Les premiers travaux ont été menés par l'américain S. Staal dans la fin des années 1970. A partir de souris issues de la lignée AKR présentant spontanément des leucémies, il a extrait un rétrovirus originaire d'un lymphome localisé dans le thymus (improprement appelé Thymoma) qu'il dénomma AKT8 (Staal et al., 1977). Par la suite, il observa que ce provirus contenait une séquence non virale dont il isola deux homologues humains Akt1 et Akt2 (Staal, 1987). L'analyse séquentielle de ces oncogènes a permis de révéler d'une part qu'il s'agissait de serine/thréonine kinases et, d'autre part, par degré d'homologie avec les familles de protéines kinases A et C, de les classer dans une nouvelle famille de protéines dénommée protéines kinases B (PKB) (Bellacosa et al., 1991; Coffey and Woodgett, 1991).

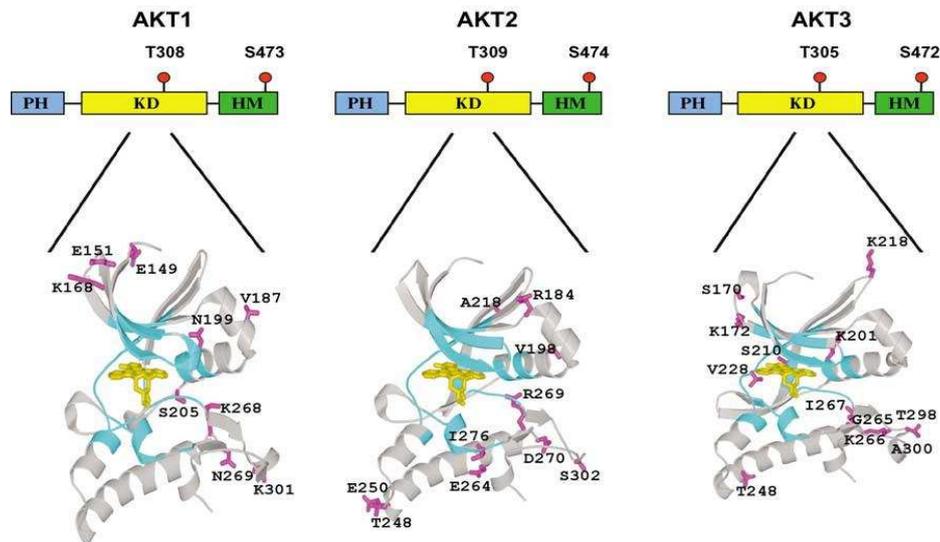


Figure 32 : Domaines structuraux et représentation tridimensionnelle des isoformes d'Akt.
 La kinase Akt possède trois isoformes dénommées Akt1, 2 et 3 composées de la même structure de base avec trois régions spécifiques : le domaine PH permettant le recrutement membranaire d'Akt ; le domaine KD lieu de l'activité catalytique et, enfin, le domaine HM correspondant au domaine régulateur de la kinase (Bellacosa et al., 1991).

Isoformes	Homologie des différents domaines			Isoformes	Éléments de régulation		Expression tissulaire
	PH	KD	HM		Thréonine	Serine	
Akt1/Akt2	80%	90%	66%	Akt1	308	473	Ubiquitaire
Akt2/Akt3	76%	87%	70%	Akt2	309	474	Ubiquitaire
Akt1/Akt3	84%	88%	76%	Akt3	305	472	Cerveau, poumons, testicules

Tableau 3 : Caractéristiques des isoformes d'Akt.

Les trois isoformes d'Akt possèdent plus de 80 % d'homologie dans leur séquence mais diffèrent grandement par leur expression tissulaire où Akt1 et Akt2 sont ubiquitaires tandis qu'Akt3 est plus rarement exprimée à l'exception du cerveau, des poumons et des testicules. La régulation d'Akt s'effectue au niveau de deux éléments de régulation : un résidu thréonine et un résidu serine qui diffèrent légèrement selon les isoformes (Masure et al., 1999 ; Kumar and Madison, 2005).

1.1.1. Structure et isoformes d'Akt

Chez l'homme, il existe trois isoformes de la protéine Akt appartenant toutes à la classe des protéines kinases AGC pour AMP/GMP kinases. Si Akt1 (PKB α) et Akt2 (PKB β) ont été découvertes rapidement, Akt3 (PKB γ) le fut plus tardivement et ses fonctions restent encore imprécises (Nakatani et al., 1999; Staal, 1987). Les gènes de ces trois isoformes sont localisés sur les chromosomes 14q32, 19q13 et 1q43 respectivement pour Akt1, 2 et 3. Chaque membre possède la même structure de base composée de trois régions (Figure 32) :

- Domaine PH en position N-terminale : domaine d'homologie à la pleckstrine permettant le recrutement aux membranes cellulaires au niveau de domaines enrichis en phospholipides et notamment le phosphatidyl-inositol (3, 4, 5) triphosphate ou (3, 4) diphosphate (*PIP3* et *PIP2*). A noter que ce domaine sert de modèle pour élaborer les inhibiteurs d'Akt (Castillo et al., 2004).
- Domaine KD en position centrale : domaine catalytique de la kinase comportant un élément de régulation post-traductionnelle par l'intermédiaire de la thréonine 308 (T308) ; résidu conservé selon les isoformes dont la phosphorylation est nécessaire à l'activité de la protéine.
- Domaine HM en position C-terminale : domaine hydrophobe étant un élément caractéristique hautement conservé chez toutes les protéines appartenant à la classe des kinases AGC. Ce domaine possède également un élément de régulation conservé *via* la serine en position 473 (S473) dont l'état de phosphorylation détermine l'état d'activation de la kinase. Ce domaine correspond au domaine régulateur de la kinase (Bellacosa et al., 1991).

Les trois isoformes d'Akt présentent plus de 80 % d'homologie de séquence ((Kumar and Madison, 2005; Masure et al., 1999 ; Tableau 3) mais diffèrent par leur expression tissulaire et par la nature de leurs substrats (Zinda et al., 2001). Akt1 et 2 sont ubiquitaires mais un niveau d'expression plus important d'Akt2 est observé dans les tissus insulino-dépendants tels que les cellules adipeuses, le foie et les muscles. Akt3 est retrouvée à plus faible niveau dans les tissus à l'exception des poumons, du cerveau et des testicules. Malgré leur forte homologie, les trois isoformes possèdent cependant des activités spécifiques mises en évidence par des études réalisées chez la souris où Akt1, 2 et/ou 3 ont été inhibées. De plus, la mise en place de souris double KO pour les isoformes d'Akt a permis de révéler l'existence de fonctions communes pour ces isoformes(Gonzalez and McGraw, 2009 ; Figure 33, *au dos de la page*).



Figure 33 : Fonctions spécifiques et communes des isoformes d’Akt.

Les isoformes d’Akt vont différencier en fonction de la nature de leurs substrats et donc, *in fine*, de leurs rôles intracellulaires. La mise en place de souris KO pour une ou plusieurs isoformes d’Akt a permis de mettre en évidence les fonctions de chaque isoforme (représentées en jaune, bleu et rose).

Cependant, l’existence de fonctions communes entre les isoformes a également été démontrée (fonctions en vert, orange et violet) ainsi qu’une compensation des activités d’Akt (Adaptation de Gonzales and McGraw, 2009).

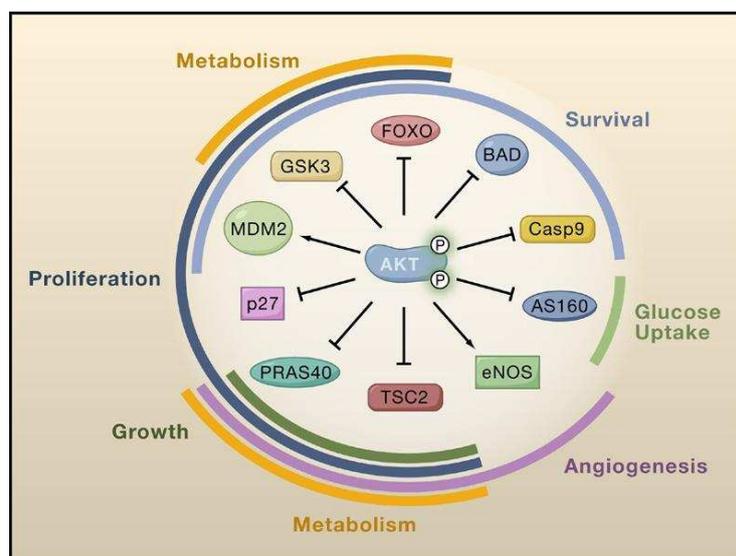


Figure 34 : Les différentes fonctions d’Akt en fonction de ses substrats.

La kinase Akt est un élément crucial dans la signalisation intracellulaire. Elle possède de nombreux substrats (liste non-exhaustive ci-dessus) lui conférant des fonctions dans de nombreux processus physiologiques tels que le métabolisme cellulaire, la prolifération, la survie cellulaire ou encore dans l’angiogénèse (Manning and Cantley, 2007).

1.1.2. Fonctions d'Akt : à l'assaut de nombreux substrats

La protéine Akt est un élément pivot dans la signalisation cellulaire. Son implication dans un très grand nombre de processus physiologiques a été démontrée par la sur-expression ou l'extinction de son activité dans différents organismes. De nombreux substrats ont été identifiés pour Akt qui reconnaît préférentiellement des séquences consensus et notamment le motif suivant Arg-X-Arg-Y-Z-Ser/Thr-B où X représente un acide aminé quelconque, Y et Z sont de petits résidus autre que la glycine et B un résidu hydrophobe volumineux tel que la phenylalanine ou la leucine (Alessi et al., 1996). Dans la plupart des cas, la phosphorylation catalysée par Akt a un effet inhibiteur sur sa cible. Cependant, certaines exceptions existent comme pour eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) ou encore IKK α (*inhibitor of KB kinase a*) ou MDM2 (*murine double minute 2*). Par l'intermédiaire de ces cibles variées, Akt possède de multiples fonctions jouant notamment un rôle important dans la survie, la croissance, la migration ainsi que la prolifération cellulaire mais également dans l'angiogénèse et le métabolisme énergétique (Figure 34). Ces différentes fonctions vont être détaillées succinctement ci-dessous. Il est à noter que le rôle de la kinase GSK3 β ne sera pas mentionné ici mais fera l'objet d'un paragraphe ci-dessous.

• Survie cellulaire

Les protéines Akt peuvent promouvoir la survie cellulaire en interagissant notamment avec les membres de la famille des protéines Bcl-2 ayant un rôle important dans l'apoptose comme décrit ci-dessus. Par exemple, Akt phosphoryle et inhibe directement le membre pro-apoptotique Bad. En effet, la phosphorylation de Bad entraîne sa séquestration par les protéines de la famille 14-3-3, empêchant ainsi son interaction avec les membres anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL qui deviennent alors actives (Datta et al., 1997, 2000). Akt peut également phosphoryler MDM2, entraînant alors son activation et ainsi sa translocation nucléaire. Une fois dans le noyau, cette E3 ubiquitine ligase va s'associer à p53 pour l'ubiquitinyler. Ce complexe va alors transloquer dans le cytoplasme où p53 sera dégradée par le protéasome favorisant ainsi une survie et une prolifération cellulaires incontrôlées (Mayo and Donner, 2001). Enfin, la protéine Akt peut aussi intervenir sur la régulation des facteurs de transcription et notamment les facteurs FOXO (*forkhead box, class O*). En phosphorylant ces derniers, Akt entraîne leur séquestration cytoplasmique et inhibe ainsi le rôle (transcription-dépendant) des FOXO dans l'apoptose. Un des gènes cibles des membres FOXO est par exemple le gène codant pour la protéine Bim membre pro-apoptotique de la famille des Bcl-2 (Gilley et al., 2003).

- **Croissance cellulaire**

Une des plus importantes fonctions cellulaires conservées par Akt est son rôle dans la croissance cellulaire. Ce processus passe principalement par la régulation indirecte de la protéine mTORC1 (*mammalian Target Of Rapamycin Complex 1*). Son activation joue un rôle primordial dans la croissance cellulaire puisque ce facteur intervient dans l'initiation de la transcription, la biogénèse des ribosomes ainsi que la synthèse protéique (Wullschleger et al., 2006). Akt va réguler son activité en phosphorylant TSC2 entraînant l'inhibition du complexe TSC1/TSC2 (*tuberous sclerosis 1 et 2* encore appelés *hamartine* et *tubérine*) connu pour inhiber les fonctions de mTORC1 (Mak and Yeung, 2004). De plus, Akt peut également réguler mTORC1 *via* une voie indépendante de TSC1/TSC2 en intervenant sur la protéine PRAS40 (*proline-rich Akt substrate of 40 kDa*). Cette dernière, sans activation d'Akt, est fixée à mTORC1 bloquant alors son activité. La protéine Akt est capable de la phosphoryler directement, provoquant ainsi sa séquestration par les protéines de la famille 14-3-3 (Wang et al., 2012b).

- **Prolifération cellulaire**

Une partie des effets pro-prolifératifs d'Akt est expliquée par une modulation directe ou indirecte de l'activité de protéines connues pour réguler le cycle cellulaire. C'est le cas notamment de la protéine p27 qui régule négativement les CDK responsables de la phosphorylation et de l'activation des protéines cyclines permettant aux cellules de proliférer. En phosphorylant p27, Akt provoque sa translocation du noyau vers le cytosol où elle se retrouve séquestrée par les protéines de la famille 14-3-3 (Sekimoto et al., 2004). Akt peut également réguler la protéine p27 de façon indirecte en phosphorylant et ainsi inhibant les facteurs de transcription FOXO responsables de la régulation génique de p27 (Medema et al., 2000). Il a aussi été démontré que la kinase Akt pouvait réguler la protéine p21 ; inhibitrice des CDK ; en favorisant sa translocation cytoplasmique (Zhou et al., 2001). Tout comme p27, p21 peut aussi être régulée de façon indirecte par Akt *via* la protéine MDM2 inhibitrice de p53 (Mayo and Donner, 2001).

- **Migration cellulaire**

Le rôle de la protéine Akt dans l'invasion et la migration cellulaire n'est encore que partiellement élucidé. Les études montrent que selon les isoformes les impacts diffèrent (Manning and Cantley, 2007). De façon surprenante, l'activation d'Akt1 a été découverte comme corrélée à l'inhibition de la migration des cellules. Il semblerait que cet effet passe par une inhibition de la voie Erk (*Extracellular signal-regulated kinase*) (Irie et al., 2005). De son

côté, l'isoforme d'Akt2 est définie comme facteur pro-migratoire et pro-métastatique notamment dans les cellules de carcinomes mammaires (Arboleda et al., 2003; Dillon et al., 2009). A ce jour, le mécanisme de régulation des isoformes d'Akt impactant dans la migration cellulaire n'est pas encore identifié.

- **Angiogenèse**

Akt joue un rôle physiologique important dans l'angiogenèse. Dans les cellules endothéliales, la voie Akt est en effet activée par le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) entraînant la prolifération et la croissance de ces cellules (Olsson et al., 2006). De plus, Akt active directement la protéine eNOS entraînant le relargage de NO responsable de la vasodilatation et du remodelage vasculaire (Fulton et al., 1999; Morbidelli et al., 2003). Il est à noter ici, que le réseau microtubulaire va également jouer un rôle dans l'activation d'eNOS puisqu'il a été démontré que l'enrichissement en α -tubuline acétylée était responsable d'une augmentation de l'activation d'Akt et ainsi de la protéine eNOS (Giustiniani et al., 2009). Enfin, Akt est connue pour activer les facteurs de transcription HIF1 α et 2 α provoquant la transcription et la sécrétion de nombreux facteurs pro-angiogéniques dont le VEGF (Agani and Jiang, 2013). Ce mécanisme cellulaire va ainsi entraîner une boucle d'activation *via* le VEGF sur Akt.

- **Métabolisme énergétique**

Une autre fonction physiologique d'Akt est de stimuler l'absorption du glucose en réponse à la sécrétion d'insuline. Pour cela, il a été démontré qu'Akt2 stimulait la synthèse protéique du transporteur GLUT1 (*glucose transporter*) et favorisait la localisation membranaire de GLUT4 (Kohn et al., 1996) *via* la phosphorylation inhibitrice d'AS160 (*Akt substrate of 160 kDa* aussi appelé TBC1D4) et de TBC1D1 jouant un rôle dans la migration des vésicules intracellulaires (Sakamoto and Holman, 2008). De plus, l'utilisation du glucose intracellulaire est également augmentée par Akt qui favorise la conversion irréversible du glucose en glucose-6-phosphate au cours de la glycolyse en intervenant sur différents facteurs tels que FOXO ou encore HIF1 α (Accili and Arden, 2004; Harada et al., 2009). Ce dernier va notamment favoriser la transcription du gène codant pour la protéine HXKII (hexokinase II) catalysant la première réaction de la glycolyse (Roberts and Miyamoto, 2014).

1.2. GSK3 β , substrat d'Akt

La protéine GSK3 a été découverte au début des années 1980 par N. Embi suite à des travaux sur des cellules musculaires squelettiques de rat. Elle a alors été caractérisée comme une serine/thréonine kinase inhibant par phosphorylation la glycogène synthétase ; dernière enzyme de la biosynthèse du glycogène (Embi et al., 1980). Mais GSK3 ne se cantonne pas à

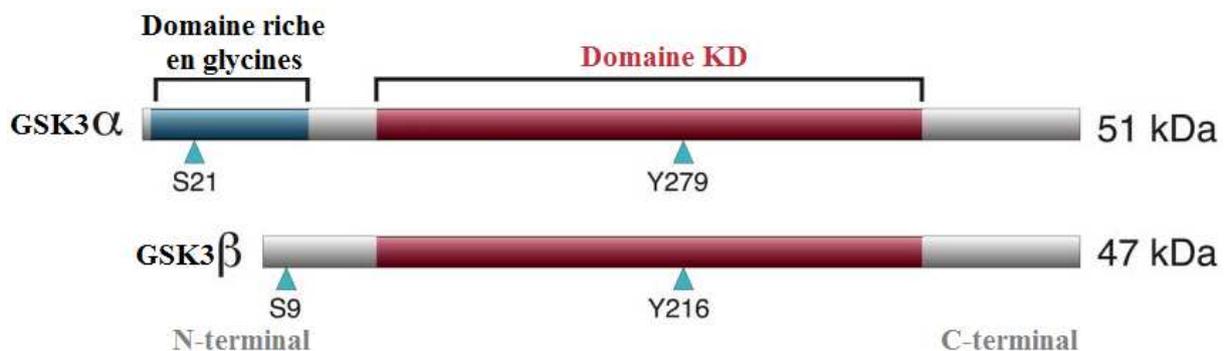


Figure 35 : Représentation schématique de la structure de GSK3 α et β .

La kinase GSK3 possède deux isoformes de structure de base commune composée de trois régions distinctes. Seul un domaine riche en glycines est retrouvé en position N-terminale de l'isoforme α conférant la différence de masse moléculaire entre les deux isoformes. Deux éléments de régulation sont connus pour ces kinases : la serine 21 ou serine 9 dont la phosphorylation inhibe l'activité de GSK3 et, le résidu tyrosine 279 ou tyrosine 216 qui peut également être sujet à la phosphorylation entraînant l'activité de la kinase (Adapté de Doble and Woodgett, 2003).

son unique action sur le métabolisme glucidique. Les études menées par la suite sur cette kinase ont, en effet, révélé une multitude d'effets cellulaires gouvernés par cette protéine parmi lesquels nous pouvons citer son implication dans la migration cellulaire, dans la prolifération cellulaire mais également dans la survie cellulaire notamment en régulant les protéines de la famille Bcl-2 (Rayasam et al., 2009).

1.2.1. Structure et isoformes de GSK3

La kinase GSK3 est une protéine hautement conservée chez l'homme. Il en existe deux isoformes : GSK3 α et GSK3 β codées par deux gènes distincts sur les chromosomes 19q12 et 3q13 respectivement. GSK3 α et β sont des protéines ubiquitaires possédant une masse protéique de 51 kDa et de 47 kDa respectivement. Ces deux isoformes possèdent la même structure de base composée de trois régions (Figure 35 ; Doble et al., 2007 ; Doble and Woodgett, 2003) :

- Domaine en position N-terminale : région possédant un élément de régulation post-traductionnelle *via* la serine en position 21 (S21) ou en position 9 (S9) selon les isoformes et dont la phosphorylation entraîne l'inhibition de la protéine. Un domaine riche en glycines est retrouvé dans cette région uniquement pour la GSK3 α , à l'origine de la différence de masse protéique entre les deux isoformes.
- Domaine KD en position centrale : domaine catalytique de la kinase comportant un élément de régulation post-traductionnelle par l'intermédiaire de la tyrosine 279 (Y279) ou de la tyrosine 216 (Y216) selon les isoformes dont la phosphorylation gouverne leur degré d'activation. Cette région est hautement conservée et possède plus de 98 % d'homologie entre les deux isoformes.
- Domaine en position C-terminale : région « neutre » de la protéine ne possédant que 36 % d'homologie entre les isoformes de GSK3.

Il est à noter qu'une étude parue en 2007 a mis en lumière la présence dans le site catalytique de GSK3 β une séquence NLS (*nuclear localization sequence*) permettant la translocation nucléaire de GSK3 β afin de moduler la régulation transcriptionnelle de ses substrats. Cette étude a révélé que d'une part, des complexes protéiques cytoplasmiques sont capables de bloquer cette séquence et, que d'autre part, la séquence NLS est masquée par une boucle contenant le résidu Y216 qui, suite à sa phosphorylation, permet de dévoiler la séquence et ainsi d'adresser GSK3 β au noyau (Meares and Jope, 2007). Malgré une structure quasiment similaire avec plus de 98 % d'homologie dans leur domaine catalytique, ces deux isoformes

de GSK3 ne sont pas fonctionnellement homologues et leur expression est régulée différemment. En effet, l'analyse de leur localisation dans les différents tissus humains a dévoilé une régulation spécifique tissus-dépendante. Par exemple, l'isoforme α est hautement exprimée dans les reins, les ovaires ou encore les testicules tandis que GSK3 β présente des taux élevés dans le cerveau, les cellules musculaires ainsi que les poumons (Jope and Johnson, 2004). De plus, de nombreuses études mettant en place des modèles KO pour GSK3 α et/ou β ont permis de mettre en évidence que les deux isoformes peuvent se compenser dans certains cas, et dans d'autres, jouer des rôles distincts voire même opposés. Par exemple, la génération de souris KO pour GSK3 β entraîne une létalité avant leur naissance tandis que des souris KO pour GSK3 α sont viables présentant des dysfonctionnements métaboliques (sensibilité accrue au glucose et à l'insuline) ainsi que des altérations du développement neuronal (Hoeflich et al., 2000; Kaidanovich-Beilin et al., 2009; MacAulay et al., 2007). Si GSK3 α ne semble pas pouvoir compenser l'absence totale de GSK3 β , il a été démontré, en revanche, que les deux isoformes possédaient des fonctions redondantes dans la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (Wu and Pan, 2010). De plus, les deux isoformes jouent des rôles importants dans le métabolisme cellulaire puisque comme cité ci-dessus les souris KO pour GSK3 α provoque des anomalies métaboliques et un KO de GSK3 β dans des tissus spécifiques (muscles, foie, pancréas) entraîne également une sensibilité plus accrue au glucose et à l'insuline (Patel et al., 2008; Tanabe et al., 2008). En revanche, seule GSK3 β est connue pour pouvoir réguler différentes protéines associées aux microtubules entraînant ainsi une régulation des fonctions microtubulaires (Tamura and Draviam, 2012).

Dans le paragraphe suivant, je vais aborder les différentes fonctions de GSK3 en me focalisant uniquement sur GSK3 β qui représente l'isoforme qui nous intéressera spécifiquement dans mes travaux de thèse.

1.2.2. Fonctions de GSK3 β

Longtemps restreinte à son rôle dans le métabolisme du glycogène, la kinase GSK3 se révèle, en réalité, être une enzyme très importante dans de nombreuses voies de signalisation. En effet, à ce jour, plus de cent substrats peuvent être régulés par GSK3. Bien qu'elle soit capable de phosphoryler des substrats sur les sites composés d'un résidu serine suivi d'un résidu proline (Ser-Pro), une séquence consensus est, cependant, majoritairement retrouvée dans les substrats actuels de GSK3. Cette séquence est composée de deux résidus serine ou thréonine séparés par trois résidus quelconque : S/T-X-X-X-S/T(P) où GSK3 va phosphoryler le résidu

serine ou thréonine situé quatre résidus en position N-terminale d'une serine ou thréonine déjà phosphorylée (Beurel et al., 2014). Cependant, cette séquence n'est pas toujours retrouvée. En effet, le nombre de résidus entre les sites de phosphorylation peuvent être supérieurs ou inférieurs à quatre, et, une phosphorylation pré-requise avant l'action de GSK3 n'est pas toujours nécessaire (Cole et al., 2004; Singh et al., 2012). Tout comme Akt, la kinase GSK3 possède donc de nombreuses fonctions notamment par son implication dans les voies PI3K/Akt, Wnt/ β -caténine et Raf/Mek/Erk (McCubrey et al., 2014). Seules les fonctions de GSK3 β seront détaillées ci-dessous en se focalisant particulièrement sur ses fonctions au niveau des microtubules et des mitochondries.

- **Impact sur les protéines microtubulaires**

La voie de signalisation Akt/GSK3 β est désormais connue pour jouer un rôle important dans la régulation microtubulaire. GSK3 β possède une forte affinité pour les microtubules puisqu'elle co-sédimente avec la tubuline polymérisée (Buttrick and Wakefield, 2008) et, il est désormais admis qu'elle est impliquée dans la régulation de nombreuses MAP contrôlant ainsi la migration cellulaire mais également la division cellulaire ou encore le trafic intracellulaire. La régulation de la protéine Tau par GSK3 β est la plus documentée dans la littérature de part son rôle dans la physiopathologie d'Alzheimer. En effet, GSK3 β va phosphoryler la protéine Tau entraînant sa dissociation des microtubules et provoquant des agrégats de Tau dans le cytoplasme. Dans la maladie d'Alzheimer, GSK3 β est dérégulée entraînant une hyperphosphorylation de Tau constituant des filaments cytoplasmiques dénommés PHF (*paired helical filaments*) provoquant la dégénérescence neuronale (Lovestone et al., 1994; Takashima, 2006; Takashima et al., 1998). GSK3 β va pouvoir également réguler des MAP déstabilisatrices comme la protéine Op18/Stathmine entraînant alors une diminution de l'affinité de la protéine pour la tubuline (Devaux et al., 2012). GSK3 β est également connue pour réguler de **nombreuses +TIP** parmi lesquelles nous pouvons citer la protéine APC composante du complexe Wnt/Axine/ β -caténine/GSK3 β . Cette protéine joue également un rôle essentiel dans la régulation des microtubules et notamment au cours de la migration cellulaire. En effet, APC interagit avec EB1 aux extrémités (+) des microtubules facilitant ainsi la polymérisation microtubulaire (Morrison, 2009). La protéine GSK3 β en phosphorylant APC va entraîner une diminution de son affinité pour les microtubules et ainsi sa délocalisation microtubulaire (Zumbrunn et al., 2001). Une autre +TIP intervenant dans la migration cellulaire va également être inhibée par la phosphorylation *via* GSK3 β : il s'agit de CLASP (Akhmanova et al., 2001). Enfin, GSK3 β peut également inhiber le transport axonal

via la phosphorylation de la chaîne légère de kinésine entraînant sa dissociation des microtubules. Cette phosphorylation va alors permettre à GSK3 β de réguler le trafic intracellulaire (Morfini et al., 2002, 2004).

• Rôles dans l'apoptose

De façon prépondérante, GSK3 β est une protéine cytoplasmique mais comme nous l'avons vu ci-dessus, elle contient dans sa structure une séquence NLS lui permettant d'être localisée dans le noyau et, notamment, au cours du phénomène apoptotique. En effet, dès les premiers signes de l'apoptose, il a été démontré que les taux intranucléaires de GSK3 β étaient augmentés (Bijur and Jope, 2001). Une fois dans le noyau, GSK3 β va pouvoir réguler de nombreux facteurs de transcription jouant un rôle dans l'apoptose. Par exemple, il a été démontré qu'elle pouvait se fixer sur la protéine p53 entraînant alors une activation de l'expression des gènes régulés par p53 comme notamment celui codant pour la caspase 3 (Watcharasit et al., 2002). Inversement, GSK3 β va pouvoir inhiber des facteurs de transcriptions anti-apoptotiques comme les facteurs CREB (*cAMP-response element binding proteins*). GSK3 β possède donc une **activité pro-apoptotique** et va pouvoir également moduler l'activité des protéines de la famille Bcl-2. Par exemple, elle va phosphoryler directement la protéine pro-apoptotique Bax induisant alors sa translocation mitochondriale pour favoriser la MOMP et le relargage du cytochrome *c* (Linseman et al., 2004). Un autre exemple, est celui de la phosphorylation de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 entraînant alors sa dégradation (Maurer et al., 2006; Ren et al., 2013). Cependant, dans certains cas, il a été démontré que la protéine GSK3 β pouvait avoir une activité anti-apoptotique. Par exemple, une étude réalisée dans les cellules cancéreuses de pancréas a mis en évidence qu'une inhibition prolongée de GSK3 β était à l'origine d'une augmentation du niveau d'expression de la protéine pro-apoptotique Bim (Marchand et al., 2012). Enfin, il est maintenant admis qu'il existe au sein de la cellule un pool de GSK3 β au niveau des mitochondries (Bijur and Jope, 2003; Hoshi et al., 1996). Une de ses fonctions au niveau de la mitochondrie va être la régulation du VDAC. En effet, il a été démontré que GSK3 β pouvait phosphoryler le VDAC entraînant alors l'inhibition de son interaction avec l'hexokinase II. L'association de cette enzyme au VDAC étant connue pour stabiliser les mitochondries et inhiber l'apoptose, la phosphorylation du pore mitochondrial par GSK3 β va donc stimuler l'apoptose (Pastorino et al., 2005; Tanno et al., 2014).

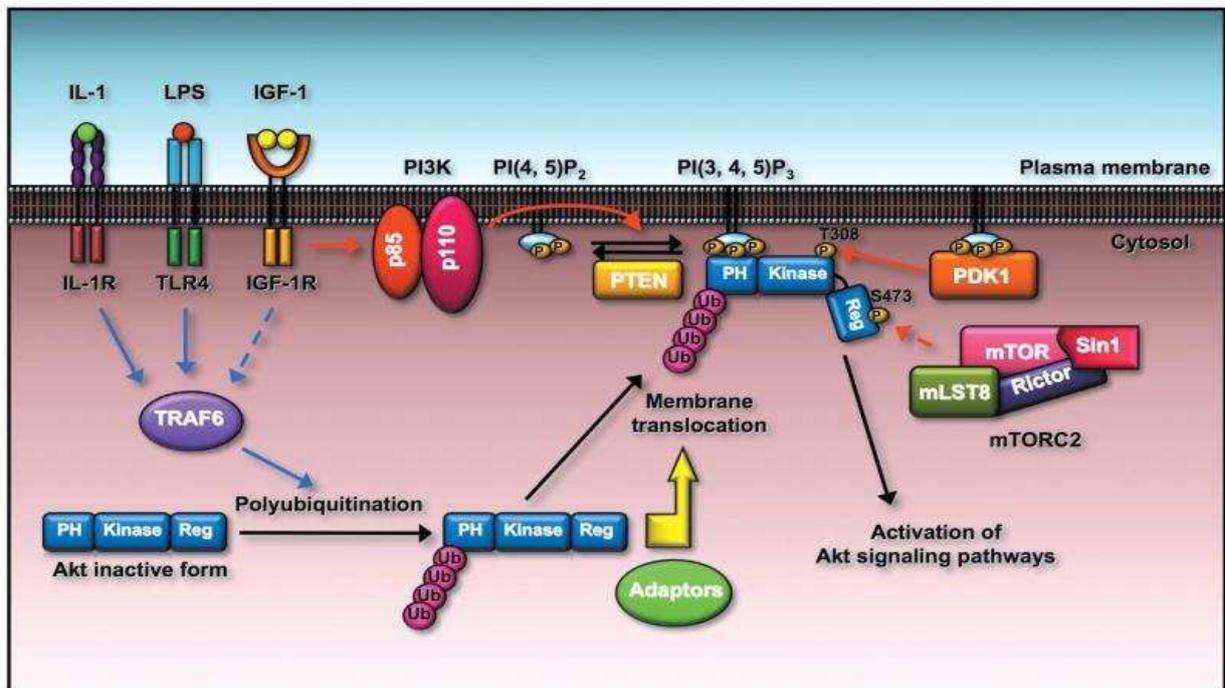


Figure 36 : Cascade d'activation d'Akt.

L'activation de la kinase Akt se fait *via* une cascade d'activation intracellulaire. Suite à l'activation de PI3K (composé de deux sous-unités p85 et p110), les phospholipides membranaires PIP2 sont transformés en PIP3 qui va permettre le recrutement de PDK1 et d'Akt. PDK1 va alors phosphoryler Akt sur le résidu T308 provoquant une boucle d'activation avec la phosphorylation de S473 par le complexe mTORC2. De plus, sur ce schéma la régulation d'Akt par ubiquitylation est représentée. Cette modification post-traductionnelle est importante dans le recrutement d'Akt à la membrane cellulaire (Yang et al., 2010).

1.3. Régulation de la voie de signalisation Akt/GSK3 β : un jeu complexe de kinases et de phosphatases

1.3.1. Quand l'activation de l'une concourt... à l'inhibition de l'autre

L'activation d'Akt nécessite la coopération de différentes enzymes sous la forme d'une cascade d'activation. Elle se fait principalement *via* l'activation des récepteurs tyrosine kinase (RTK) tels que l'épidermal growth factor (EGF) ou l'insulin-like growth factor I (IGF-I) ainsi que par les récepteurs couplés aux petites protéines G. En l'absence de ligand pour ces récepteurs, les trois isoformes d'Akt sont catalytiquement inactives dans le cytoplasme. La fixation des ligands sur leur récepteur permet l'activation de PI3K (*phosphatidylinositol 3 kinase*). Cette kinase va phosphoryler spécifiquement le groupement hydroxyle situé en 3' des phosphatidylinositols et phosphoinositides. Le PIP2 contenu dans les membranes plasmiques est alors converti en PIP3. Ce dernier va permettre le recrutement de protéines possédant un domaine PH comme PDK1 (*phosphatidyl inositol dependant kinase 1*). De la même façon, le domaine PH en C-terminal d'Akt permet sa translocation à la membrane plasmique à proximité de PDK1. Cette translocation et fixation d'Akt aux phospholipides imposent un changement conformationnel de la protéine qui voit alors ses deux sites de phosphorylation (T308 et S473) ainsi que son motif hydrophobe (HM) accessibles aux protéines intracellulaires et notamment PDK1 qui va phosphoryler la T308. Cette première phosphorylation – indispensable à l'activité de la kinase – provoque une boucle d'activation permettant la phosphorylation de la S473 par le complexe mTORC2 (*mammalian Target Of Rapamycin Complex 2*) résultant en l'activation complète d'Akt (Bellacosa et al., 2005). De plus, il a été démontré qu'Akt était également phosphorylée sur les résidus serine 124 et thréonine 450 de façon indépendante de la PI3K ; l'hypothèse émise étant que la phosphorylation de ces résidus constitue la première étape de l'activation d'Akt (Liao and Hung, 2010). Plus récemment, une nouvelle modification post-traductionnelle d'Akt a été mise à jour. En effet, Akt a été démontrée comme substrat de TRAF6 (*TNF Receptor-Associated Factor 6*), une E3 ubiquitine ligase. Cette dernière va cibler les résidus lysines en position 8 et 14 se trouvant dans le domaine PH entraînant l'ubiquitination de la protéine. Cette modification joue un rôle important dans le trafic intracellulaire de la protéine favorisant ainsi son recrutement à la membrane (Yang et al., 2009, 2010 ; Figure 36). De plus, les nombreux travaux réalisés récemment pour tenter de mieux comprendre la régulation intracellulaire des kinases Akt ont révélé d'autres modifications post-traductionnelles comme des acétylations, des sumoylations ou encore des glycosylations ainsi que d'autres

phosphorylations. L'ensemble de ces modifications est répertorié dans une revue parue en 2014 (Chan et al., 2014).

Puisqu'Akt, en présence de ligand pour les récepteurs RTK, est catalytiquement active, la kinase GSK3 β est donc, elle, inactivée principalement par phosphorylation du résidu serine en position 9 (S9). En effet, une des kinases responsable de l'inactivation de GSK3 β est la protéine Akt (Bellacosa et al., 2005). Il est à noter que d'autres enzymes sont capables de réguler GSK3 β sur la S9 (PKA, PKC, p90rsk...). L'inactivation de GSK3 β passe donc par la phosphorylation du résidu serine 9 situé dans le domaine N-terminal de la protéine. Cette phosphorylation va entraîner un changement conformationnel de la protéine provoquant un blocage du site catalytique de l'enzyme qui ne peut alors plus phosphoryler ses substrats (Frame et al., 2001). Un autre site de phosphorylation entraînant l'inhibition de GSK3 β a été mis en évidence. Il s'agit du résidu serine en position 389 (S389) se trouvant dans la partie C-terminale de la structure protéique. Sa phosphorylation par la kinase p38MAPK concourt également à l'inhibition de GSK3 β (Thornton et al., 2008). Enfin, récemment le site de la tyrosine 356 (Y356) a été défini comme un site de régulation négative de l'activité de GSK3 β *via* sa phosphorylation par la kinase Dyrk1A (*Dual-specificity tyrosine(Y)-phosphorylation-regulated kinase 1A*) (Song et al., 2014). A l'opposé de la phosphorylation inhibitrice des résidus serines, la GSK3 β contient dans son domaine catalytique un résidu tyrosine en position 216 (Y216) qui, lorsqu'il est phosphorylé, augmente son activité en facilitant l'accès des substrats au site catalytique de GSK3 β (Hughes et al., 1993). Il semblerait que cette phosphorylation ne soit pas un pré-requis à l'activité de GSK3 β mais entraînerait une augmentation de son activité. En dehors des cycles de phosphorylation/déphosphorylation, GSK3 β va subir d'autres modifications post-traductionnelles récemment découvertes comme une acétylation, une mono-ADP-ribosylation ou encore une citrullination (Feijs et al., 2013; Monteserin-Garcia et al., 2013; Stadler et al., 2013). Enfin, GSK3 β peut également être régulée par clivage protéolytique *via* les calpaïnes. En effet, plusieurs études ont mis en évidence le rôle des calpaïnes dans le clivage de GSK3 β à la fois en position N-terminale (Thr38-Thr39) et C-terminale (Ile384-Gln385) engendrant des fragments de GSK3 β ayant une activité enzymatique augmentée. Le clivage protéique permettant de supprimer de la structure protéique le domaine possédant les résidus S9 et S389, GSK3 β deviendrait ainsi plus active puisque dépourvue de son domaine auto-inhibiteur (Feng et al., 2013; Goñi-Oliver et al., 2007).

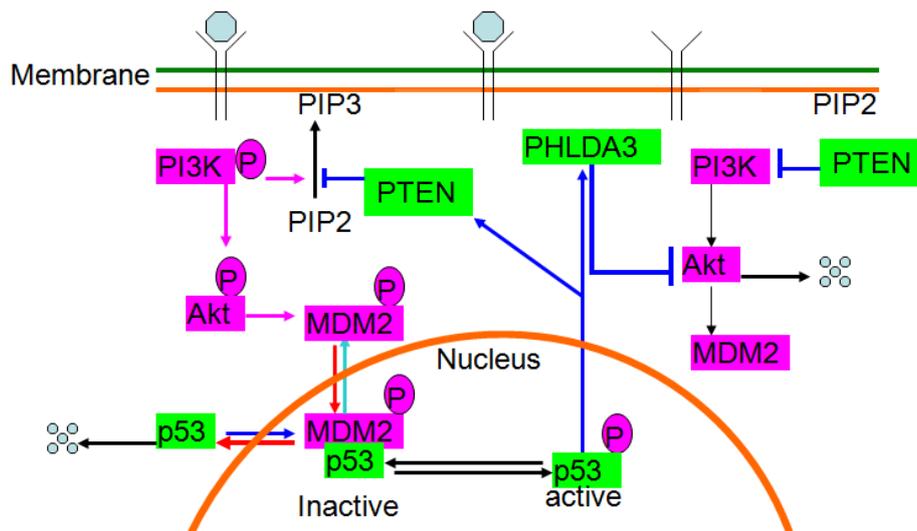


Figure 37 : Boucle de rétrocontrôle de la voie Akt/MDM2/p53/PHLDA3.

La protéine PHLDA3 a pour fonction d'inhiber le recrutement d'Akt. Cette dernière, lorsqu'elle est active, phosphoryle MDM2 entraînant sa translocation nucléaire. Une fois dans le noyau, MDM2 va se fixer à p53 provoquant sa dégradation. Or p53 activée induit la protéine PHLDA3. Akt *via* son activité sur MDM2 va ainsi provoquer une boucle de rétrocontrôle positif en diminuant l'activité de PHLDA3 (Liao et al., 2010).

1.3.2. Mise en jeu de boucles de rétrocontrôle

Parmi les mécanismes permettant la régulation de la voie Akt/GSK3 β , le recrutement d'Akt aux membranes cellulaires constitue une étape cruciale de son activation. Elle est soumise à une inhibition permanente par la protéine PTEN. Cette dernière est une phosphatase dont la principale cible est le PIP3. En hydrolysant spécifiquement la liaison 3-phosphate du PIP3, PTEN catalyse la conversion du PIP3 en PIP2. La diminution de la concentration membranaire de PIP3 s'oppose alors au recrutement des protéines à domaine PH comme Akt et PDK1 (Di Cristofano and Pandolfi, 2000). La kinase GSK3 β va pouvoir réguler la protéine PTEN créant alors une boucle de rétrocontrôle négatif sur sa propre activité. En effet, il a été démontré que GSK3 β pouvait phosphoryler PTEN sur le résidu Thréonine 366 (Thr366) entraînant alors une déstabilisation de son activité. Dans ce cas, Akt reste alors active et permet l'inhibition de GSK3 β en phosphorylant le résidu S9 (Maccario et al., 2007). Une autre protéine intervient également dans le recrutement membranaire d'Akt : la PHLDA3 (*pleckstrin homology-like domain family A member 3*). Cette dernière se fixe aux PIP3 membranaires et entre ainsi en compétition directe avec Akt et PDK1. Elle empêche donc la localisation membranaire d'Akt sans pour autant avoir d'interaction physique directe (Kawase et al., 2009). Il est intéressant de noter que PHLDA3 est une protéine induite par p53. Akt diminuant l'expression de p53 *via* la phosphorylation de MDM2, va de ce fait inhiber indirectement PHLDA3 provoquant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif (Figure 37 ; Oren et al., 2002). Une déphosphorylation sélective des protéines Akt et GSK3 β représente un deuxième mécanisme de régulation de leur activité. Les principales enzymes mises en jeu sont les protéines phosphatases PP2A (*protein phosphatase 2A*) et les phosphatases de la famille PHLPP (*pleckstrin homology domain and leucine rich repeat protein phosphatase*). Cette dernière déphosphoryle sélectivement le site S473 d'Akt (Brognard et al., 2007). Bien que PP2A déphosphoryle préférentiellement Akt sur le site T308, elle peut également agir sur le site S473 (Yang et al., 2010). Tout comme pour PTEN, GSK3 β va pouvoir inhiber l'action de PP2A permettant alors un rétrocontrôle négatif de son activité. En effet, il a été démontré que GSK3 β pouvait indirectement induire la phosphorylation du résidu Y307 de PP2A ou induire la déméthylation du résidu L309 entraînant alors son inactivation (Yao et al., 2011, 2012). Les mécanismes de régulation décrits ci-dessus n'entraînent pas nécessairement la dégradation de la protéine mais uniquement son inactivation. Il a été démontré qu'Akt pouvait être dégradée par le protéasome. En effet, la protéine ligase E3 TTC3 (*tetratricopeptide repeat domain 3*) a été identifiée comme une ubiquitine ligase liant spécifiquement Akt (Suizu et al., 2009). En

parallèle de cette voie protéasomale, il a été constaté qu'Akt était dégradée lorsque la cellule retraits en apoptose. Il semblerait que les caspases soient responsables de cette dégradation puisque des études *in vitro* ont montré que les caspases 3, 6 et 7 clivaient Akt engendrant sa dégradation (Xu et al., 2002).

2. Rôles d'Akt dans la carcinogénèse et la chimiorésistance

Comme nous venons de le voir, les kinases Akt et GSK3 β sont dorénavant connues et reconnues comme des régulateurs décisifs de nombreuses fonctions cellulaires intervenant dans les différents marqueurs des cellules cancéreuses proposés par D.Hanahan (*cf.* Figure 26). *Dans cette seconde partie du chapitre 3, je vais me focaliser uniquement sur la kinase Akt ; élément clef de la deuxième partie de mes travaux de thèse.* De plus en plus d'études alimentant la littérature indiquent l'importance d'Akt dans l'initiation tumorale ainsi que dans son expansion. Il est de nos jours admis que la dérégulation des kinases Akt est une des principales perturbations moléculaires retrouvées en pathologies cancéreuses humaines. Akt possède ainsi un rôle clef au sein des cellules tumorales et devient, par la même occasion, une cible thérapeutique prometteuse.

2.1. Akt : médiateur central dans les cellules tumorales

2.1.1. Perturbations directes des kinases Akt

Les protéines kinases Akt ont été définies comme des **protéines oncogéniques**. Plusieurs mécanismes peuvent être responsables de ce phénomène. En effet de très nombreux travaux ont démontré l'existence de modifications des gènes d'Akt dans un large panel de cancers humains (sein, ovaire, poumon, cerveau...) ainsi que d'une hyperactivation de ces protéines. L'expression génique de ces kinases ainsi que leur état d'activation intracellulaire font encore l'objet actuellement de nombreuses études. Le pouvoir oncogénique de l'**amplification** du gène d'Akt2 a été découvert en 1992 pour la première fois dans des carcinomes ovariens (Cheng et al., 1992). Par la suite, ces résultats ont été confirmés dans d'autres études notamment sur les carcinomes mammaires, hépatocellulaires ou encore dans les lymphomes non Hodgkiniens (Arranz et al., 1996; Bellacosa et al., 1995; Xu et al., 2004). L'amplification d'Akt1 a également été découverte dans les carcinomes gastriques, les carcinomes mammaires et prostatiques ainsi que dans les tumeurs des tissus mous et les carcinomes pulmonaires (Dobashi et al., 2012; Kirkegaard et al., 2010; Staal, 1987). De nos jours, l'amplification de l'isoforme Akt3 reste plus rare. Quelques cas ont été observés notamment

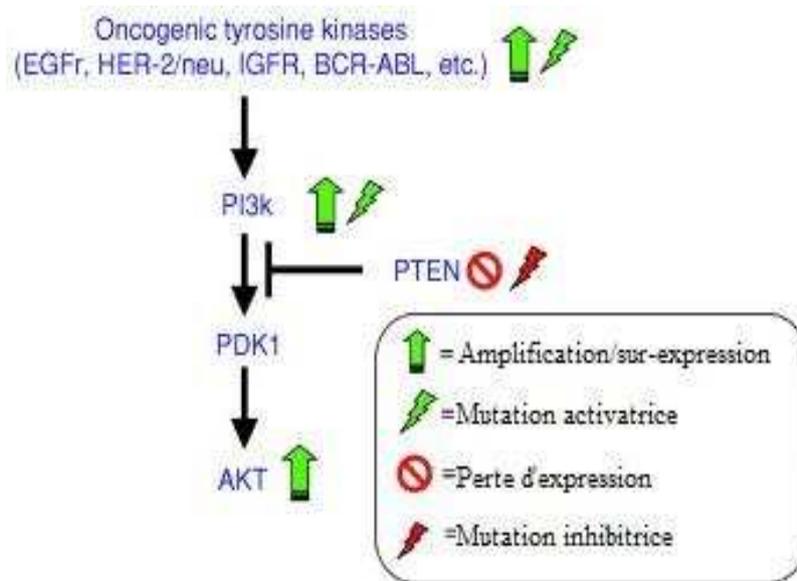


Figure 38 : Dérégulations de la voie de signalisation PI3K aboutissant à l'activation d'Akt.
 Dans les cellules cancéreuses, l'activation d'Akt est fréquemment observée soit par dérégulation directe de la kinase due à des amplifications géniques ou à une hyperactivation soit par des dérégulations indirectes de la voie PI3K parmi lesquelles nous pouvons citer l'hyperactivation de PI3K, la perte de fonction de PTEN par mutation inhibitrice ou encore une dérégulation des récepteurs tyrosine kinase (Bellacosa et al., 2005).

dans les médulloblastomes pédiatriques ou encore dans les carcinomes mammaires (Kirkegaard et al., 2010). L'amplification et la sur-expression des protéines Akt ont été corrélées au caractère agressif et invasif de ces cellules tumorales en premier lieu dans les cancers pancréatiques humains (Cheng et al., 1996). Les cas de **mutations** ou de **délétions chromosomiques** sont plus rarement observés. Une mutation du gène d'Akt1 a été découverte dans les cancers du sein, celle du gène d'Akt2 dans les cancers colorectaux et enfin un cas de mutation au niveau d'Akt3 a été identifié dans les mélanomes (Davies et al., 2008; Rychahou et al., 2008; Stemke-Hale et al., 2008). Il a été décrit exceptionnellement des mutations oncogéniques activatrices d'Akt, comme par exemple la substitution de l'acide glutamique du codon 17 par une lysine se trouvant dans le domaine PH de la kinase Akt1. Cette mutation a notamment été rencontrée dans des cancers du sein, colorectaux et ovariens (Carpten et al., 2007). En parallèle, une **hyperactivation** des kinases Akt a été répertoriée dans un large panel de cancers humains. Dans la plupart de ces pathologies, cette hyperactivation est corrélée à un stade avancé de la maladie et/ou à un mauvais pronostic. L'augmentation de l'activité d'Akt1 a été démontrée dans plus de 40 % des cancers de l'ovaire et du sein et dans plus de 50 % des carcinomes prostatiques et pulmonaires (Sun et al., 2001). L'hyperactivation d'Akt2 a été observée par exemple dans 30 à 40 % des cancers ovariens et pancréatiques et dans plus de 50 % des cancers bronchiques, tandis que l'hyperactivation d'Akt3 est plus rarement rencontrée et semblerait jouer un rôle en particulier dans les cancers hormono-résistants (Altomare et al., 2002; Balsara et al., 2004; Yuan et al., 2000).

2.1.2. Dérégulation de la voie de signalisation PI3K/Akt

Comme nous l'avons vu précédemment, Akt se trouve au cœur d'une voie de signalisation intracellulaire faisant intervenir de nombreux éléments souvent reliés au processus de tumorigénèse. L'hyperactivation d'Akt, fréquemment rencontrée dans les pathologies cancéreuses, est le plus souvent la conséquence de la sur-expression ou de mutations activatrices de ses activateurs et/ou la perte d'expression ou l'apparition de mutations inhibitrices de ses inhibiteurs (Figure 38). L'étape cruciale de l'activation d'Akt est le recrutement de PI3K permettant la formation de PIP3 indispensable à l'activation d'Akt. Plusieurs mécanismes sont répertoriés dans la littérature aboutissant à l'hyperactivation de PI3K induisant ainsi l'activité d'Akt. Par exemple, des mutations activatrices du gène PIK3R1 codant pour la sous-unité régulatrice p85, ainsi qu'une amplification du gène codant la sous-unité catalytique p110 (gène PIK3Ca), ont été découvertes aboutissant à l'hyperactivation de PI3K (Jimenez et al., 1998; Shayesteh et al., 1999). De plus, les kinases Akt sont régulées de

façon négative par PTEN se comportant ainsi comme un suppresseur de tumeur. Dans de nombreux cancers primitifs et métastatiques, l'activité de PTEN est dérégulée provoquant son inhibition et ainsi une perte du contrôle négatif sur Akt. Des mutations somatiques ainsi que des délétions chromosomiques du gène codant PTEN sont fréquemment observées dans les glioblastomes, les mélanomes ou encore les cancers de la prostate (Sansal and Sellers, 2004). De plus, la perte de l'activité de PTEN a également été corrélée à une méthylation de son promoteur, notamment dans les cancers du poumon non-à-petites cellules (Soria et al., 2002). Enfin, de nombreuses mutations activatrices ou sur-expression des récepteurs tyrosine kinase ont été décrites dans de multiples cancers pouvant entraîner en aval l'activation d'Akt. C'est le cas notamment pour l'EGF-R (*epidermal growth factor receptor*), HER2 (*human epidermal growth factor 2*) ou encore PDGF (*platelet-derived growth factor*) (Giatromanolaki et al., 1996; Rusch et al., 1997; Vignaud et al., 1994).

2.2. Implication thérapeutique d'Akt

2.2.1. Akt et résistance aux traitements

Incontestablement, l'émergence de cellules malignes possédant une forte capacité de résistance à la chimiothérapie et/ou à la radiothérapie pose un problème majeur dans la prise en charge des patients atteints de pathologies cancéreuses. Dans ce contexte, de nombreuses études ont démontré le rôle clef d'Akt dans la génération de ces cellules malignes et ceci dans un large panel de cancers solides et d'hémopathies malignes. Par exemple, la mise en place de mutants d'Akt1 ou 2 constitutivement actifs a montré une forte résistance aux traitements comme le topotécan ou encore le paclitaxel (Nakashio et al., 2000; Page et al., 2000). De plus, en soumettant les cellules à l'analyse des puces à ADN, de récents travaux ont confirmé l'implication de la voie Akt dans les phénomènes de résistance à la radiothérapie et aux chimiothérapies. C'est le cas notamment dans les tumeurs gastriques traitées par paclitaxel ou encore dans les adénocarcinomes pulmonaires non-à-petites cellules avec la vinorelbine (Chen et al., 2012; Fan et al., 2014; Wu et al., 2014). De plus, il a été démontré récemment que la voie de signalisation PI3K/Akt joue un rôle important au niveau des cellules souches cancéreuses. Ces dernières, identifiées par l'expression membranaire de la protéine CD133 (*prominin-1*) (Grosse-Gehling et al., 2013), sont caractérisées par un fort potentiel de résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie. A la suite d'une première cure de traitement, ces cellules peuvent alors reconstituer une masse tumorale hautement résistante à tout traitement (Annabi et al., 2008; Sartelet et al., 2012). Plusieurs études ont montré que l'activation de la voie PI3K/Akt induisait l'expansion des cellules souches cancéreuses,

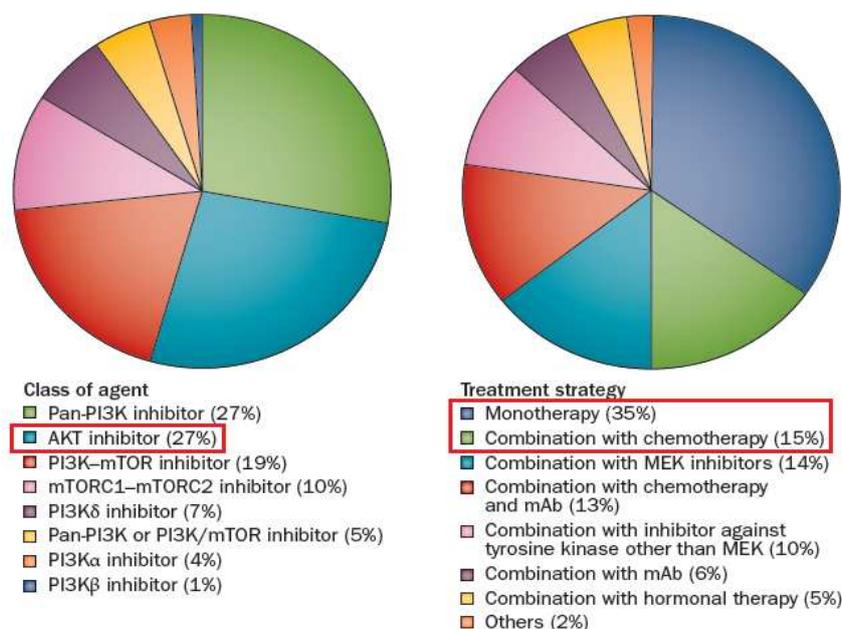


Figure 39 : Etude sur les essais cliniques comportant un inhibiteur de PI3K/Akt.

Répartition des essais cliniques en cours avec un inhibiteur de la voie PI3K/Akt en fonction de la classe d'agents administrés ou de la stratégie thérapeutique. Les inhibiteurs directs de la kinase Akt représentent 27 % des molécules testées. 35 % des stratégies de traitement étudiées fait appel à une monothérapie et seulement 15 % associe un inhibiteur de PI3K/Akt à un agent de chimiothérapie conventionnelle type MTA. Données issues du site www.clinicaltrials.gov en novembre 2012.

notamment dans les tumeurs de la prostate (Dubrovskaja et al., 2009). Plus récemment, un autre mécanisme d'action a été mis en lumière. Il semblerait que l'activation de la kinase Akt serait capable de transformer une population cellulaire cancéreuse (sein et vessie) en une population ayant un phénotype proche de celui des cellules souches, possédant ainsi toutes leurs caractéristiques : fort potentiel tumorigène et résistance aux traitements (He et al., 2014). Toutes ces données permettent ainsi de suggérer qu'**Akt pourrait être un potentiel biomarqueur de mauvaise réponse aux traitements.**

2.2.2. Akt comme cible thérapeutique

• Inhibiteurs de la voie PI3K/Akt

Le rôle pro-survie d'Akt et son implication dans la résistance au traitement fait de cette kinase une cible thérapeutique privilégiée. Dans ce contexte, le développement d'inhibiteurs de PI3K/Akt a considérablement augmenté ces dernières années, comme le montre le nombre croissant d'essais cliniques réalisés avec de nombreuses molécules différentes et dans différents schémas de traitement (Figure 39). Les premiers essais cliniques de phase I ont permis d'évaluer les doses maximales tolérées (*MTD*) et de suivre l'éventuelle apparition des effets indésirables chez les patients. De façon générale (toutes classes d'inhibiteurs confondues), ces composés possèdent une tolérance modérée sans effets toxiques inattendus. Cependant, aux *MTD*, des effets indésirables de grade III et/ou IV ont été observés nécessitant alors de diminuer les posologies voire même d'interrompre le traitement. Parmi les principaux effets rencontrés, nous trouvons : une hyperglycémie réfractaire à l'insulinothérapie, des rashes cutanés non acnéiformes (contrairement aux thérapies ciblées anti-EGF-R), des intolérances gastro-intestinales (anorexie, nausées, vomissements, diarrhées) ainsi qu'une asthénie importante (Rodon et al., 2013). Les effets pharmacodynamiques des inhibiteurs de PI3K/Akt sont évalués sur prélèvement de sang périphérique, sur biopsie ou sur prélèvements cutanés. Les examens réalisés les plus fréquemment sont l'évaluation du statut de phosphorylation de la kinase Akt ou de ses substrats type PRAS40 par immunohistochimie semi-quantitative. De plus, étant donné que la voie PI3K/Akt joue un rôle dans le métabolisme du glucose, et que les cellules tumorales sont caractérisées comme étant hautement dépendante de la glycolyse (Gatenby and Gillies, 2004), l'analyse des biomarqueurs du métabolisme énergétique peut être évaluée comme paramètre pharmacodynamique des inhibiteurs de PI3K/Akt. Pour cela, la consommation de glucose par les cellules tumorales est mesurée *via* le ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG)-PET scan. De plus, les taux d'insuline et de peptide-C (issu du clivage de la pro-insuline) peuvent être quantifiés

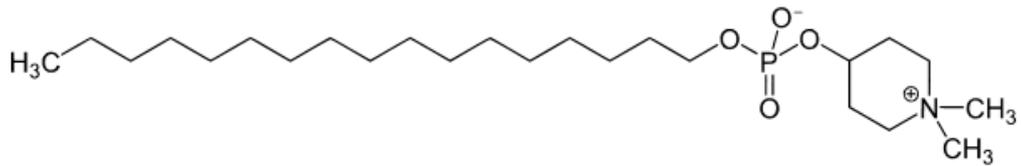


Figure 40 : Structure chimique de la périfosine.

Composé synthétique analogue des alkyl-phospholipides, la périfosine va s'incorporer dans la membrane plasmique et bloquer ainsi le recrutement d'Akt et donc, son activation. Actuellement, c'est le composé le plus avancé dans les essais cliniques. Il est administré oralement de façon quotidienne.

sur prélèvements sanguins. Enfin, certaines études ont évalué le potentiel pharmacodynamique des inhibiteurs de PI3K/Akt sur des marqueurs de prolifération type Ki-67 ou encore sur des marqueurs pro-apoptotiques *via* la méthode TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) recherchant les fragments d'ADN (Rodon et al., 2014; Shapiro et al., 2014).

Les premiers résultats obtenus avec une monothérapie (35 % des essais cliniques actuels ; *cf.* Figure 39) montrent une efficacité dans de nombreux cancers (sein, poumon, ovaire, prostate, pancréas, rein, mélanomes, sarcomes et lymphomes). De plus, ces premières études mettent en lumière que l'utilisation de ces inhibiteurs pourrait contourner certains phénomènes de résistance aux agents de chimiothérapie conventionnelle tels que les sels de platine, les Taxanes ou encore la doxorubicine (Hafsi et al., 2012). Cependant, les réponses au traitement observées sont moins importantes que celles rencontrées avec d'autres thérapies ciblées comme celles ciblant ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) ou encore BRAF (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) (Rodon et al., 2013). Si les inhibiteurs de PI3K/Akt sont administrés en association avec des agents de chimiothérapie conventionnelle dans seulement 15 % des essais cliniques en 2012 (*cf.* Figure 39), ce pourcentage devrait s'accroître dans les années à venir afin d'augmenter l'efficacité de ces agents et de diminuer le risque d'apparition d'effets indésirables.

• Inhibiteurs spécifiques d'Akt

27 % des agents utilisés dans les essais cliniques en 2012 sont des inhibiteurs directs d'Akt (*cf.* Figure 39). Plusieurs molécules sont actuellement en cours de développement. Parmi elles, deux sont particulièrement intéressantes : **la périfosine** et **le MK-2206** qui seront décrits ci-dessous. De plus, la bibliographie est riche d'études réalisées *in vitro* à l'aide du **LY294002** (2-(4-morpholinyl)-8-phenylchromone). Ce dernier, fréquemment défini comme inhibiteur d'Akt, est en réalité un inhibiteur de PI3K qui se fixe sur la sous-unité catalytique p110. Contrairement à la wortmannin, l'inhibition engendrée est réversible (Thomas et al., 1997). Cependant, l'utilisation de ce composé est limitée par une forte toxicité (notamment cutanée) observée lors d'expérience *in vivo* chez la souris.

❖ La périfosine

La périfosine (octadecyl-(1,1-diméthyl-piperidinio-4-yl)-phosphate) est un nouveau composé synthétique analogue des alkyl-phospholipides (Figure 40). Il est administré oralement et agit par incorporation dans les membranes plasmiques cellulaires bloquant ainsi le recrutement

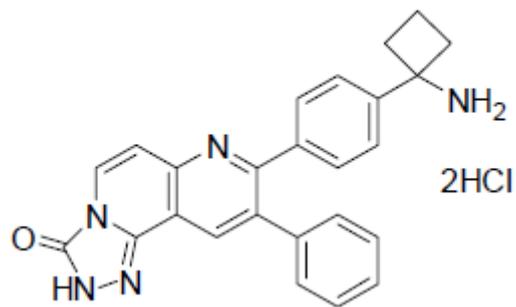


Figure 41 : Structure chimique du MK-2206.

Inhibiteur allostérique d'Akt, il se fixe au niveau du domaine PH de la kinase entraînant alors un changement de conformation de la protéine qui ne peut plus se localiser aux membranes cellulaires. Tout comme la périfosine, il est administré oralement et, de nos jours, il est retrouvé dans plusieurs essais cliniques de phase II en monothérapie ou en association à des agents de chimiothérapie conventionnelle.

d'Akt à la membrane. Des études *in vitro* ont démontré qu'elle agissait comme un inhibiteur d'Akt n'affectant pas directement l'activité de la PI3K et de la PDK1 (Kondapaka et al., 2003). Elle affecte également d'autres voies de signalisation comme JNK et NF-κB ou encore la voie Erk (Alexander, 2011; Martelli et al., 2010). Les études précliniques de ce composé montrent un effet anti-tumoral dans de nombreux types de cancers : mélanome, adénocarcinome pulmonaire, cancer du sein, du colon et myélomes multiples. Plusieurs études de phase I ont été conduites afin de connaître la tolérance et les effets indésirables engendrés. De façon générale, la périfosine entraîne principalement des troubles gastro-intestinaux et de l'asthénie pouvant cependant nécessiter l'arrêt du traitement (grade III/IV). Aucune toxicité hématologique n'a été décrite. Le schéma posologique le plus fréquemment rencontré est 200 mg en une prise orale par jour (Ernst et al., 2005; Vink et al., 2006). Les études ont été réalisées sur des patients souffrant de cancers solides incurables, dans des cancers pédiatriques ou encore lors d'association avec la radiothérapie et elles ont montré une efficacité partielle de la périfosine [NCT00398814 ; NCT01049841 ; NCT00776867]. Par la suite, des essais cliniques de phase II ont été entrepris dans un large spectre de pathologies cancéreuses. Certaines de ces études ont mis en lumière l'absence d'efficacité de la périfosine en monothérapie notamment dans les mélanomes, les sarcomes, dans les cancers du sein ou encore de la prostate (Argiris et al., 2006; Ernst et al., 2005; Knowling et al., 2006; Leighl et al., 2008). Dans ce contexte, de nouveaux essais cliniques ont été et sont effectués sur des protocoles de traitement associant la périfosine à des agents de chimiothérapie conventionnelle. A ce jour, deux études de phase III ont été réalisées. La première s'effectue sur des patients souffrants de myélomes multiples. L'étude comporte deux bras : périfosine + bortezomib + dexaméthasone *versus* placebo + bortezomib + dexaméthasone [NCT01002248 ; terminé en attente des résultats]. La deuxième est effectuée sur des patients souffrants de cancers colorectaux avancés. L'association périfosine + capécitabine sera étudiée *versus* capécitabine seule [NCT01097018].

❖ MK-2206

MK-2206 est un inhibiteur allostérique d'Akt (Figure 41). Il se fixe au niveau du domaine PH d'Akt entraînant un changement de conformation de la protéine qui ne peut alors plus être recrutée à la membrane. Il inhibe ainsi son activité en diminuant à la fois la phosphorylation des résidus thréonine 308 et serine 473. Ce composé oral a été testé *in vitro* en association avec différentes classes d'agents anticancéreux et sur différents modèles cellulaires. Les résultats ont démontré une efficacité clinique prometteuse ayant permis de l'inclure dans un

premier temps dans des essais cliniques de phase I (Hirai et al., 2010). Les principaux effets indésirables rencontrés sont des troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissements, diarrhées), une hyperglycémie et des cas de déshydratation. Dans certains cas, des grades III/IV ayant nécessité l'arrêt immédiat du traitement ont été recensés (Fouladi et al., 2014; Yap et al., 2011). A ce jour, ce composé a été inclus dans plusieurs essais cliniques de phase II tels qu'en monothérapie chez des patients souffrant de cancer ovarien ou péritonéal résistant aux sels de platine [NCT01283035] ou en association avec le selumetinib (AZD6244 – inhibiteur de MAPK/ERK) dans les cancers colorectaux avancés [NCT01333475]. Une seule étude teste l'association du MK-2206 avec un MTA : le paclitaxel ainsi que le trastuzumab dans un essai clinique de phase I chez des patients souffrant de cancers solides avec sur-expression de HER2 [NCT01235897].

Box 3

Le couple **Akt/GSK3 β** joue un rôle pivot dans la signalisation cellulaire en régulant de nombreuses fonctions intracellulaires. Au cours de la première partie de mes travaux de thèse, nous avons recherché le rôle de ce couple protéique dans le mécanisme d'action des MTA. Par la suite, nous avons alors étudié l'intérêt d'associer les MTA à des **thérapies ciblées anti-Akt**. La protéine kinase Akt étant de nos jours considérée comme une protéine oncogénique jouant un rôle clef dans le développement cancéreux mais également dans la mise en place des phénomènes de résistance, de nombreux inhibiteurs de cette protéine sont actuellement en cours de développement. Ainsi, les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse fourniront les premières bases à l'intérêt de développer de nouvelles associations thérapeutiques entre agents de chimiothérapie conventionnelle que sont les MTA avec les thérapies ciblées anti-Akt.

***Résultats
expérimentaux***

PARTIE 1

EFFETS MICROTUBULAIRES DES MTA : QUAND LES MITOCHONDRIES S'EN MELENT

Dans cette première partie de mes travaux de thèse, l'objectif principal était d'améliorer notre compréhension de la **signalisation liant de façon si intime le réseau mitochondrial au réseau microtubulaire**. Comme nous allons le voir au travers de l'article qui suit, cette recherche fondamentale a aussi permis de révéler de **nouveaux acteurs dans le mécanisme de réponse des cellules cancéreuses aux MTA**, soulevant l'intérêt pour de nouvelles associations thérapeutiques qui correspondent au besoin actuel des cliniciens d'optimiser les stratégies existantes.

www.impactjournals.com/oncotarget/

Oncotarget, Vol. 5, No. 10

ROS-mediated EB1 phosphorylation through Akt/GSK3 β pathway: implication in cancer cell response to microtubule-targeting agents

Marion Le Grand^{1,2}, Amandine Rovini^{1,3}, Veronique Bourgarel-Rey^{1,2}, Stephane Honore^{1,2}, Sonia Bastonero¹, Diane Braguer¹ and Manon Carre¹

¹ Aix Marseille Université, Inserm, CRO2 UMR_S 911, Marseille, France

² APHM, Hopital Timone, Marseille, France

³ Department of Neurology, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA.

Correspondence to: Manon Carré, **email:** manon.carre@univ-amu.fr

Keywords: EB1 phosphorylation, microtubule dynamics, mitochondrial ROS, chemotherapy, Akt/GSK3 β pathway

Received: March 6, 2014

Accepted: May 16, 2014

Published: May 18, 2014

1. Contexte de l'étude

Les mitochondries et les microtubules sont deux réseaux intracellulaires le plus généralement analysés de façon dissociée. L'étude de leurs relations s'est longtemps limitée au cadre du trafic intracellulaire des mitochondries pour lequel les microtubules servent de rails (Saxton and Hollenbeck, 2012; Yaffe et al., 2003). Cependant, depuis plus de 10 ans, des données dévoilant les influences réciproques des deux réseaux se sont accumulées. Ainsi, l'ouverture du pore mitochondrial VDAC pourrait être régulée par la tubuline elle-même (Carré et al., 2002; Guzun et al., 2012). Inversement, la dynamique microtubulaire régulée par la +TIP CLIP-170 est sous le contrôle de sa phosphorylation par la kinase AMPK, directement régulée par la concentration intracellulaire en ATP (Nakano et al., 2010).

En phase avec l'émergence de ces données tendant à souligner l'existence d'une relation étroite entre mitochondries et microtubules, les travaux de notre équipe ont posé les premières bases d'un dialogue entre ces deux réseaux en réponse aux MTA. Les conséquences de la perturbation de la dynamique microtubulaire sur la régulation des protéines mitochondriales Bcl-2 et Bax, *via* p53, ont ainsi été démontré sous l'effet de la vinflunine et du paclitaxel dans les cellules cancéreuses et endothéliales (Bourgarel-Rey et al., 2009; Pasquier et al., 2004; Pourroy et al., 2004). Notre équipe a ensuite révélé que, au-delà de leur rôle d'intégrateur des signaux apoptotiques, les mitochondries assumaient des fonctions d'initiateur dans le mécanisme d'action des MTA par leur capacité à produire des ROS (Khawaja et al., 2008), soulevant l'épineuse question du caractère indispensable du ciblage des microtubules par les MTA (André et al., 2006; Carré et al., 2002; Estève et al., 2007).

L'ensemble de ces travaux apportaient un rationnel fort à l'hypothèse de l'existence d'une réelle communication intracellulaire entre mitochondries et microtubules sous l'effet des MTA, sans pour autant que ses principaux acteurs aient été identifiés. Nous avons choisi d'aborder cette question en nous interrogeant sur *l'influence que la génération des ROS par le réseau mitochondrial pouvait avoir sur la dynamique et les fonctions du réseau microtubulaire.* En parallèle de l'initiation de mes travaux de thèse, l'étude menée par J.W. Smyth a permis de soulever une piste intéressante. Ils ont démontré, dans des cellules d'adénocarcinome du col de l'utérus (cellules HeLa) et dans des cardiomyocytes murins, que l'apport d'un stress oxydatif exogène *via* l'H₂O₂ entraînait une diminution de l'accumulation des protéines EB1 aux extrémités (+) des microtubules à l'origine d'une perturbation des jonctions intercellulaires (Smyth et al., 2010).

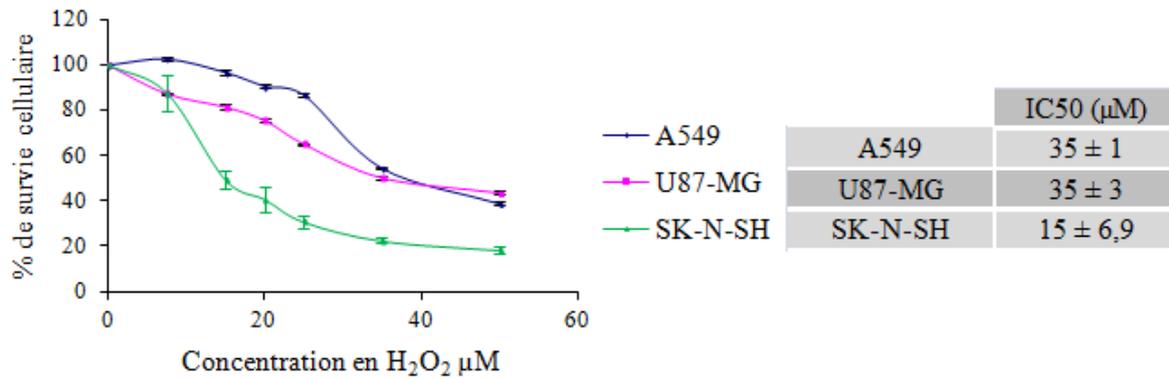


Figure 1 : Détermination de l'effet de l'H₂O₂ sur la survie cellulaire dans trois lignées cellulaires cancéreuses humaines : A549, SK-N-SH et U87-MG.

Cytotoxicité de l'H₂O₂ à 72 heures sur les 3 lignées (panel de gauche). Tableau avec les IC₅₀ de l'H₂O₂ sur les différentes lignées (panel de droite).

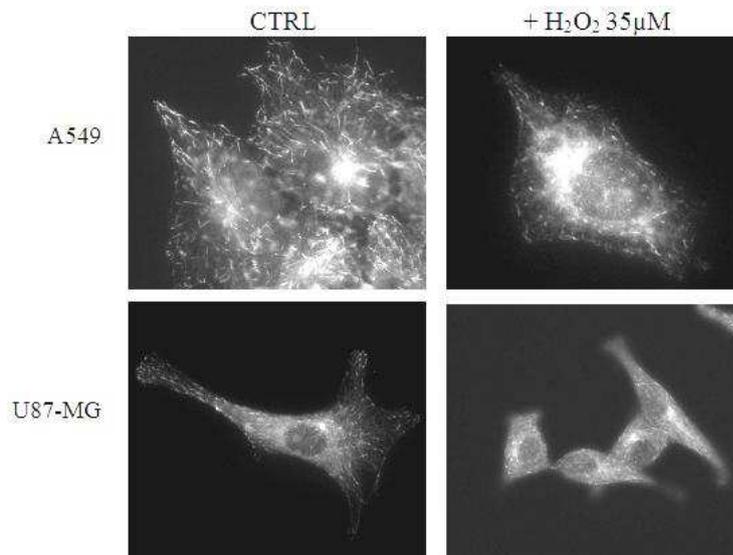


Figure 2 : Visualisation de la distribution intracellulaire de la protéine EB1 sous l'effet d'un traitement par 35 μM d'H₂O₂ pendant 6h.

Marquage d'EB1 en immunofluorescence indirecte – microscopie à épifluorescence – grossissement 100X.

2. Résultats

Un des pré-requis avant de débiter cette étude « ROS mitochondriaux/fonctions microtubulaires » était de s'assurer qu'un stress oxydatif exogène induisait bien une perturbation du système microtubulaire dans nos modèles d'étude, *i.e.* les lignées cellulaires humaines d'adénocarcinome pulmonaire (A549), de neuroblastome (SK-N-SH) et de glioblastome (U87-MG). Les concentrations d'H₂O₂ utilisées dans la littérature étant souvent élevées et rapidement toxiques, nous avons commencé par déterminer les valeurs des IC₅₀ (concentrations inhibant 50 % de la survie cellulaire), respectivement de 35 ± 1, 15 ± 6,9 et 35 ± 3 μM dans les lignées de cellules cancéreuses A549, SK-N-SH et U87-MG (**Figure 1**). Par immunofluorescence, nous avons ensuite pu observer que le H₂O₂ exogène induisait un marquage punctiforme et diffus de la +TIP EB1, alors qu'elle s'accumule classiquement à l'extrémité (+) des microtubules sous forme de comètes dans les cellules non traitées (**Figure 2**). Ces observations confirment donc les travaux réalisés par J.W. Smyth et ont constitué le point de départ de notre étude visant à déterminer *si les mitochondries, en tant que source principale de ROS intracellulaires, sont impliquées (i) dans la régulation de la dynamique et des fonctions du réseau microtubulaire et (ii) dans l'activité anti-microtubulaire des MTA.*

ROS-mediated EB1 phosphorylation through Akt/GSK3 β pathway: implication in cancer cell response to microtubule-targeting agents

Marion Le Grand^{1,2}, Amandine Rovini^{1,3}, Veronique Bourgarel-Rey^{1,2}, Stephane Honore^{1,2}, Sonia Bastonero¹, Diane Braguer¹ and Manon Carre¹

¹ Aix Marseille Université, Inserm, CRO2 UMR_S 911, Marseille, France

² APHM, Hopital Timone, Marseille, France

³ Department of Neurology, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA.

Correspondence to: Manon Carré, **email:** manon.carre@univ-amu.fr

Keywords: EB1 phosphorylation, microtubule dynamics, mitochondrial ROS, chemotherapy, Akt/GSK3 β pathway

Received: March 6, 2014

Accepted: May 16, 2014

Published: May 18, 2014

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Microtubule-targeting agents (MTAs) are largely administered in adults and children cancers. Better deciphering their mechanism of action is of prime importance to develop more convenient therapy strategies. Here, we addressed the question of how reactive oxygen species (ROS) generation by mitochondria can be necessary for MTA efficacy. We showed for the first time that EB1 associates with microtubules in a phosphorylation-dependent manner, under control of ROS. By using phospho-defective mutants, we further characterized the Serine 155 residue as critical for EB1 accumulation at microtubule plus-ends, and both cancer cell migration and proliferation. Phosphorylation of EB1 on the Threonine 166 residue triggered opposite effects, and was identified as a requisite molecular switch in MTA activities. We then showed that GSK3 β activation was responsible for MTA-triggered EB1 phosphorylation, resulting from ROS-mediated inhibition of upstream Akt. We thus disclosed here a novel pathway by which generation of mitochondrial ROS modulates microtubule dynamics through phosphorylation of EB1, improving our fundamental knowledge about this oncogenic protein, and pointing out the need to re-examine the current dogma of microtubule targeting by MTAs. The present work also provides a strong mechanistic rationale to the promising therapeutic strategies that currently combine MTAs with anti-Akt targeted therapies.

INTRODUCTION

Mitochondria are dynamic organelles that are organized in cells as a network closely connected to microtubules. They constitute a major source of Reactive Oxygen Species (ROS), which can form as a natural byproduct of the normal metabolism of oxygen through oxidative phosphorylation. ROS mainly consist in superoxide anion radical (O₂⁻), hydroxyl radical (OH) and hydrogen peroxide (H₂O₂). Among them, H₂O₂ acts as a second messenger for many cellular processes such as migration, proliferation and differentiation [1-3]. While a basal level of ROS is essential for cell viability, a mitochondria-governed oxidative stress has been linked

to cell death induction through the intrinsic apoptotic pathway [4-5] and to mitochondrial network fragmentation that contributes to cell dysfunctions [6-7]. This growing set of data paved the way for new strategies that take into account the functional capacity of mitochondria to produce ROS in cancer cells, and that aim at interfering with mitochondrial energetics to improve cancer treatment [8-9].

Microtubule-Targeting agents (MTAs) are a broad group of anticancer drugs that are currently administered in a large range of indications in adults and children. It is well established that MTAs activate the intrinsic apoptotic pathway, and especially mitochondria membrane permeabilization and cytochrome c release

[extensively reviewed in 10-11]. MTA anti-mitochondrial activities can result from a modulation of Bcl-2 family members' expression levels [12-14] or from a direct targeting of mitochondrial membranes [15-16]. MTAs are largely described to primarily alter microtubule dynamic instability, resulting in suppression of both essential mitotic and interphase processes, such as cell proliferation, polarization and migration [17-19]. A growing set of data shows that MTA efficacy depends on microtubule plus end-tracking proteins (+TIPs), which control multiple aspects of microtubule dynamic instability [20-21]. The End-Binding protein 1 (EB1) forms comet-like accumulation at the growing microtubule plus-ends – by recognizing the GTP-cap and tubulin conformational intermediate states induced by GTP hydrolysis [22-23] – and plays a central role in assembly of +TIPs complexes [24-25]. The physiological functions of EB1 have been largely reviewed in a variety of microtubule-mediated cellular activities, including migration and cell division [26-27]. In addition, EB1 is overexpressed in several cancers [28-29] and we recently showed that this overexpression selectively sensitized glioblastoma to *in vitro* and *in vivo* MTA treatment (Berges *et al.*, submitted). Our previous works also reported that alteration of EB1 accumulation at microtubule plus-ends was a fundamental event in MTA mechanism of action [30-32]. The intracellular machinery responsible for regulation of EB1 binding at microtubules is still under extensive investigations and discussions. Recent studies reported phosphorylation of EB3, another member of the EB family [33-34], increasing the range of +TIPs subjected to this post-translational modification [35-36]. While a phosphorylation of EB1 homologues (Bim1p and Mal3) has been pointed out in budding and fission yeasts [37-38], this process has not been yet identified in mammalian cells.

To date, the role of mitochondrial ROS in microtubule dynamics regulation has never been evaluated. However, in 2010, Smith [39] showed that an exogenous H₂O₂-mediated oxidative stress led to EB1 release from microtubule plus-ends, in cervix adenocarcinoma cells and cardiomyocytes from mice. Here, we aimed at characterizing the influence of mitochondrial ROS on microtubule dynamics and functions, and its involvement in cell response to MTA chemotherapy. We first showed that mitochondrial ROS overproduction was determining for MTA-mediated alteration of EB1 accumulation and cell response to drug cytotoxic and anti-migratory activities, in cancer cells of various tissue origins. We then highlighted that EB1 was subjected to phosphorylation, which regulates its ability to bind to microtubules. We further characterized Serine 155 and Threonine 166 as the potential phosphorylated residues, which exerted distinct effects on EB1 accumulation and microtubule dynamics. GSK3 β activation, that resulted from ROS-mediated inhibition of Akt, was lastly identified as responsible for MTA-triggered EB1 phosphorylation.

Altogether, our results revealed a novel signaling pathway between mitochondria and microtubules, which could have high potential for therapeutic strategies and better understanding of cellular processes.

RESULTS

Mitochondrial ROS overproduction governs MTA cytotoxic and anti-migratory activities.

To evaluate the ability of MTAs to modulate mitochondrial ROS generation, several human cancer cell lines were used, originating from non-small cell lung carcinoma (A549), neuroblastoma (SK-N-SH), and glioblastoma (U87-MG). As shown in Fig.1A, 2nM vincristine, paclitaxel and patupilone (*i.e.* representative of the main MTA sub-classes used in the clinic at concentrations around IC₅₀ *in vitro*) promoted O₂⁻ production in the three cell lines. For example, in SK-N-SH cells, O₂⁻ production by mitochondria was increased by 36.6 \pm 4.5 % after a 6 h-treatment with vincristine, and was maintained to a similar level after 24 h (32.9 \pm 2.7 %; *p*<0.01). In agreement, H₂O₂ intracellular levels were significantly increased by MTAs, whatever the cancer cell line evaluated (Fig.1B and Supplementary Fig.1A). The anticancer drugs were then combined to KCN, rotenone or tiron. These co-incubations resulted in the entire suppression of O₂⁻ and H₂O₂ overproduction leading to ROS basal level return whatever the inhibitor used (Fig.1B and Supplementary Fig.1B). To definitely ascertain the mitochondrial origin of the MTA-triggered ROS overproduction, we developed mtDNA-mutated ρ^0 SK-N-SH cells, that were characterized by a decrease in ROS production from mitochondria (-29 \pm 3 %; *p*<0.001; Fig.1C). Unlike parental *wt*SK-N-SH cells, ρ^0 SK-N-SH cells were unable to overproduce O₂⁻ after a 6 h-treatment with vincristine (Fig.1C). Altogether, these data clearly show that MTAs share the capacity to selectively enhance ROS generation from mitochondria in different human cancer cell lines.

To specify the role of ROS overproduction in MTA activity, we first measured the drug effects on *wt* and ρ^0 SK-N-SH cell survival. As shown in Fig.1D and Supplementary Fig.1C, ρ^0 SK-N-SH cells were highly resistant to a 72 h-treatment with vincristine or patupilone. Even concentrations that caused up to a 90 % decrease in *wt*SK-N-SH cell survival remained ineffective in ρ^0 SK-N-SH cells. Consistently, the time-dependent induction of A549 cell death by vincristine was suppressed when combined with tiron (Fig.1E and Supplementary Fig.1D). Transwell® assays further revealed that ROS overproduction was also essential for the anti-migratory effects of MTAs. These experiments have been performed in U87-MG cells, since glioblastoma are among the

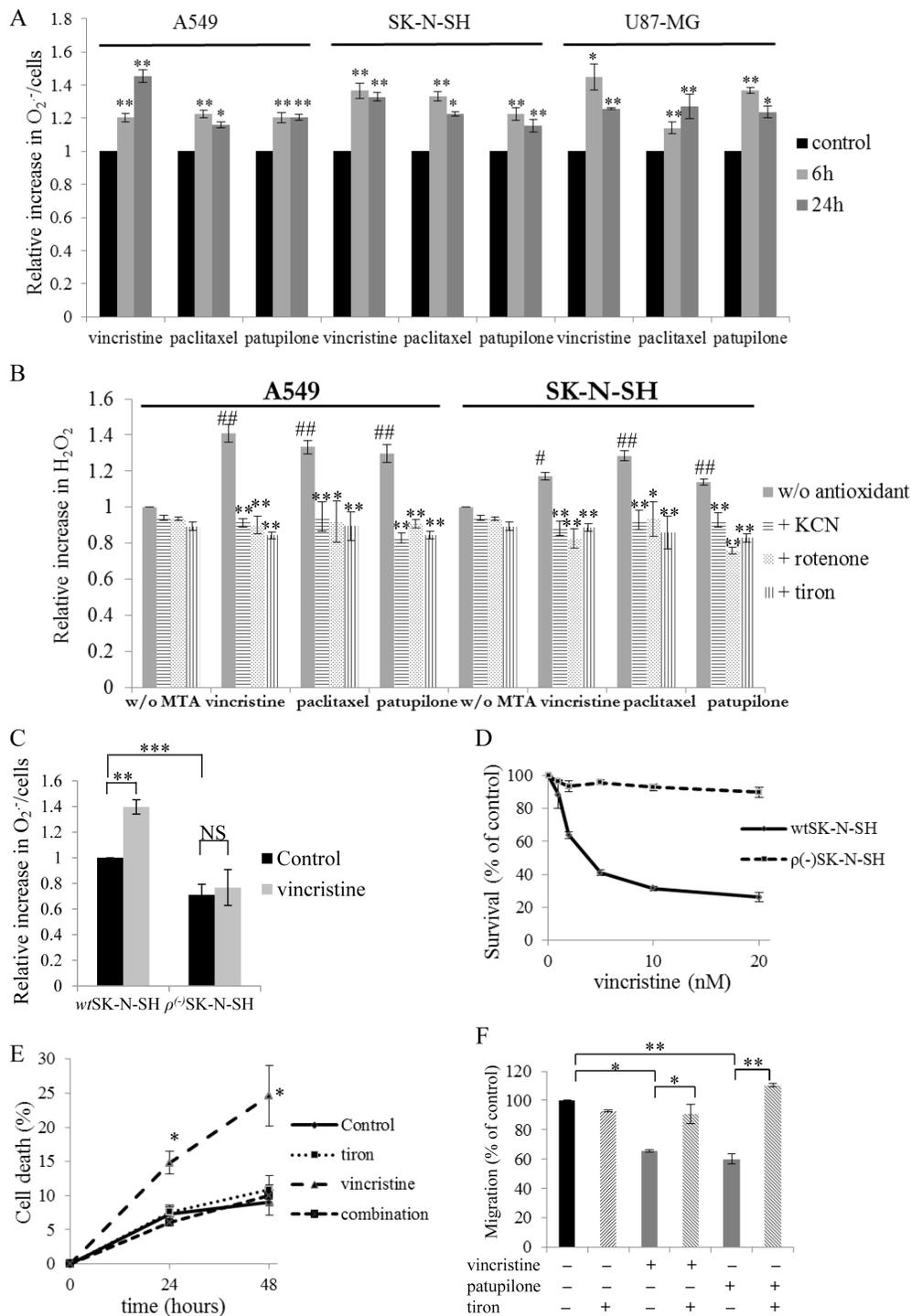


Figure 1: Mitochondrial ROS overproduction governs MTA cytotoxic and anti-migratory activities. (A) Relative production of superoxides by WST-1 assay in A549, SK-N-SH and U87-MG cells during vincristine, paclitaxel or patupilone treatment at 2 nM at 6 and 24 h. (B) Relative generation of hydrogen peroxide by the H_2 DCFDA fluorescence test in A549 and SK-N-SH cells incubated with 2 nM of vincristine, paclitaxel or patupilone, ROS inhibitors/scavengers or their combination for 6 h (MTAs are compared to control, while combinations are compared to MTAs alone). (C) Relative production of superoxides measured by WST-1 assay in wtSK-N-SH and $\rho^{(-)}$ SK-N-SH cells treated with 2 nM vincristine for 6 h. (D) wtSK-N-SH and $\rho^{(-)}$ SK-N-SH cell survival revealed by the MTT test after a 72 h-exposition to vincristine. (E) Detection of apoptosis by flow cytometry analysis of annexin-V and propidium iodide staining in A549 cells treated with vincristine (2nM), tiron or their combination for 24 and 48 h. (F) Measurement of transwell migration in U87-MG cells in the presence of 2 nM of vincristine or patupilone, tiron or their combination for 6 h. Data are presented as mean \pm S.E.M. Student's *t*-test *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

most invasive cancers. As shown in Fig.1F, vincristine and patupilone treatment significantly decreased cell migration, by $34 \pm 6\%$ ($p < 0.05$) and $40 \pm 3\%$ ($p < 0.01$) respectively. However, when combined with tiron, MTAs did not display anti-migratory properties anymore. Inhibition of mitochondrial ROS overproduction is thus a source of cell resistance to both cytotoxic and anti-migratory effects of treatment.

ROS overproduction by MTAs is responsible for inhibition of EB1 accumulation at microtubule plus-ends.

MTAs are known to affect cell proliferation and migration *via* inhibition of EB1 accumulation at microtubule plus-ends and alteration of microtubule

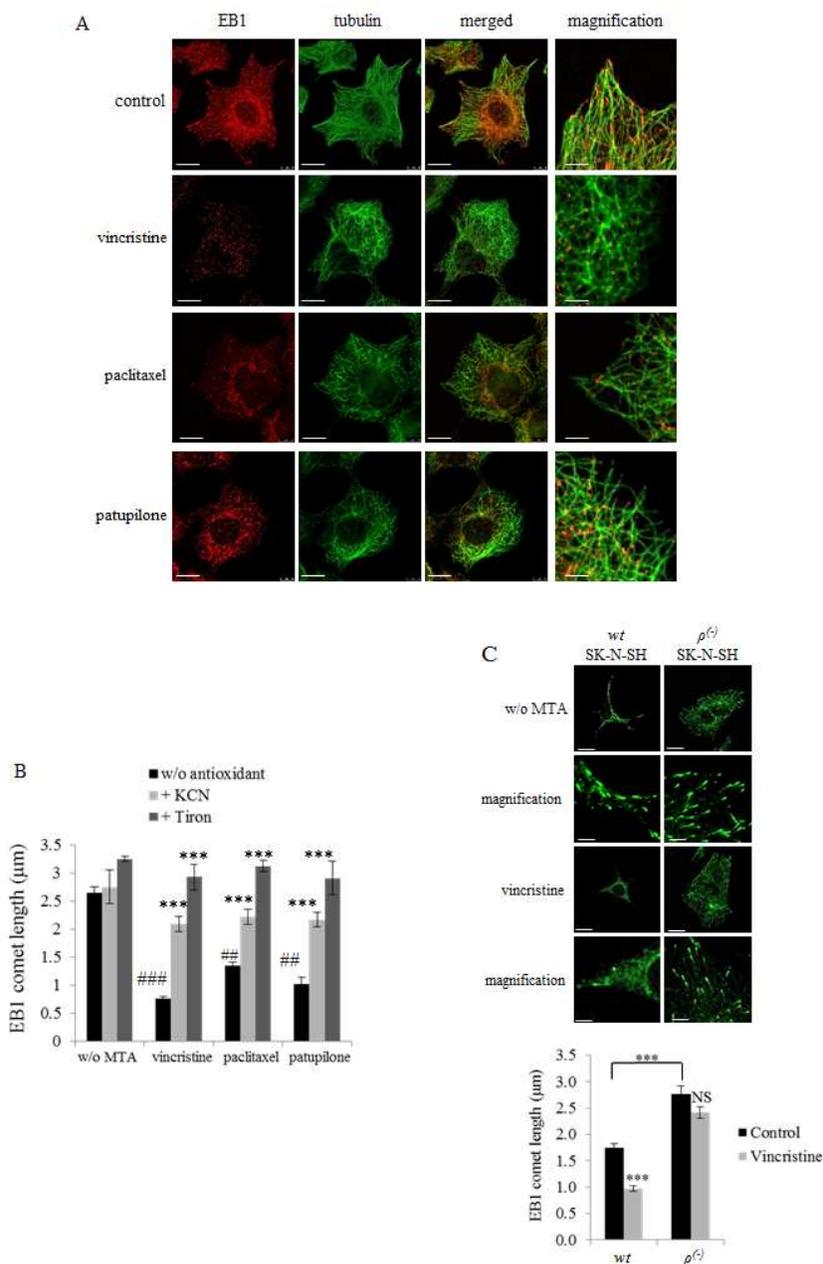


Figure 2: MTA-mediated ROS overproduction inhibits EB1 accumulation at microtubule plus-ends. (A) Double indirect immunofluorescence staining of EB1 (red) and α -tubulin (green) in A549 cells incubated with 2 nM of vincristine, paclitaxel or patupilone for 6 h. Scale bars, 20µm. Magnified images: Scale bars, 5µm. (B) Quantification of EB1 comet length in A549 cells treated with MTAs and/or antioxidants for 6 h. Scale bars, 2.5µm. (MTAs are compared to control while combinations are compared to MTAs alone). (C) Immunofluorescence staining of EB1 and quantification of EB1 comet length in wtSK-N-SH and $\rho^{(-)}$ SK-N-SH under 6 h-treatment of vincristine at 2nM. Scale bars, 10µm. Magnified images: Scale bars, 2.5µm. Data are presented as mean \pm S.E.M. Student's t-test **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

dynamics instability. Here, we intended to understand whether mitochondrial ROS are involved in such processes caused by MTAs. Confocal microscopy revealed a typical pattern of EB1 with comet-like structures at the plus-ends of microtubules in A549 control cells (Fig.2A, control panels). As expected, treatment with MTAs for 6

h significantly inhibited EB1 accumulation at microtubule plus-ends (Fig.2A). Measurement of EB1 comets yielded a length from $2.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$ in control cells to 1.4 ± 0.1 , 0.8 ± 0.1 and $1.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$ respectively in cells incubated with paclitaxel, vincristine and patupilone ($p < 0.01$) (Fig.2B). It is noteworthy that EB1 expression level was not

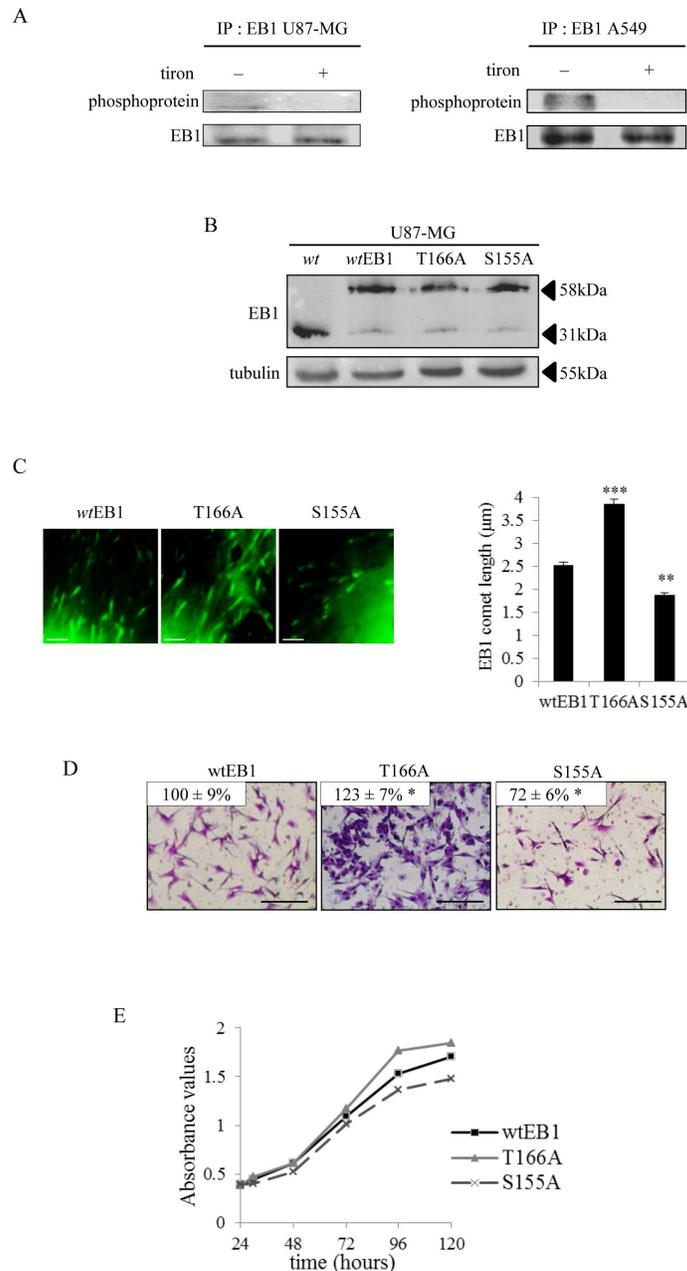


Figure 3: Phosphorylation of EB1 modulates its microtubule binding, microtubule dynamics and the microtubule-governed cell functions. (A) Immunoprecipitation (IP) was performed in U87-MG and A549 cell lysates with anti-EB1 monoclonal antibody and the precipitates were analysed by western blot probed with anti-phosphoprotein total and anti-EB1 antibodies. (B) Western Blot analysis of EB1 expression in *wtEB1*-GFP, EB1 T166A-GFP, EB1 S155A-GFP transfected U87-MG cells. Parental U87-MG wild type (wt) was used as a negative control and α -tubulin was used as loading control. (C) Representative images and quantification of EB1 comet length in U87-MG cells transfected with *wtEB1*-GFP, EB1 T166A-GFP and EB1 S155A-GFP. Scale bars, 2.5 μm . (D) Measurement of transwell migration in EB1 T166A and EB1 S155A U87-MG transfected cells, expressed as a percentage of transmigrated cells in *wtEB1* cells. Panel shows representative images of the lower surface filter taken with an Olympus microscope. Scale bars, 200 μm . (E) Proliferation assay in *wtEB1*, EB1 T166A and EB1 S155A U87-MG transfected cells. Data are presented as mean \pm S.E.M. Student's t-test *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Table 1: Measurement of EB1 comet length in wtEB1-GFP, EB1 T155A-GFP and EB1 S166A-GFP transfected U87-MG cells treated with vehicle (control) or vincristine 2 nM for 6 h. Data are presented as mean \pm S.E.M. Student's t-test ****, $p < 0.001$; NS, $p > 0.05$.

EB1 comet length (μm)	control	vincristine	vincristine vs control
wtEB1	2.5 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	- 60 % ***
T166A	3.9 \pm 0.1	3.4 \pm 0.1	- 13 % NS
S155A	1.9 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	- 47 % ***

Table 2: Measurement of microtubule dynamics parameters by live microscopy of EB1 at microtubule plus-ends in wtEB1-GFP, EB1 T155A-GFP and EB1 S166A-GFP transfected U87-MG cells exposed to vehicle (control) or vincristine 2 nM for 6 h. EB1 comets were tracked over time to measure microtubule growth rate and catastrophe frequency. Data are presented as mean \pm S.E.M. Student's t-test *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; NS, $p > 0.05$.

	variables	control	vincristine	vincristine vs control
	Growth rate ($\mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$)	10.6 \pm 0.4	7.5 \pm 0.5	- 30 % ***
wtEB1	Catastrophe frequency (μm^{-1})	1.0 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1	+ 65 % ***
	Decoration time (s)	14.2 \pm 0.1	8.0 \pm 0.3	- 56 % ***
	Growth rate ($\mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$)	15.9 \pm 0.6	15.9 \pm 0.7	< 1 % NS
T166A	Catastrophe frequency (μm^{-1})	0.7 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	+ 26 % *
	Decoration time (s)	14.7 \pm 0.2	12.8 \pm 0.3	- 13 % NS
	Growth rate ($\mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$)	12.5 \pm 0.5	8.5 \pm 0.7	- 31 % ***
S155A	Catastrophe frequency (μm^{-1})	0.9 \pm 0.1	1.5 \pm 0.2	+ 56 % **
	Decoration time (s)	9.0 \pm 0.1	7.0 \pm 0.2	- 23 % *

modulated by MTA treatment (Supplementary Fig.2A), strongly suggesting that EB1 proteins were delocalized at the microtubule plus-ends. We then evaluated the impact of KCN and tiron on EB1 localization in A549 cells. Interestingly, their simultaneous combination with MTAs prevented drug-induced EB1 delocalization (Fig.2B). For instance, the impact of vincristine on EB1 comet length was limited to 30 % when combined with KCN and totally suppressed by tiron. These results were similarly obtained in U87-MG and SK-N-SH cells (Supplementary Fig.2B, 2C and data not shown). It should be noticed that treatment with tiron alone increased the length of EB1-decorated plus-end of microtubules by 23 % in A549 cells (Fig.2B) and by 13 % in U87-MG cells (Supplementary Fig.2C), strengthening the link between intracellular ROS levels and EB1 ability to accumulate at microtubule plus-ends.

To further confirm these unexpected results, we measured EB1 comet length in *wt* and $\rho^{-/-}$ SK-N-SH cells. Consistently with the 29 \pm 3 % decrease in basal mitochondrial O_2^- levels (Fig.1C), comet length was increased in $\rho^{-/-}$ SK-N-SH cells to 2.8 \pm 0.2 μm (Fig.2C), as compared with the parental *wt* cells (1.7 \pm 0.1 μm ; $p < 0.001$). We also quantified the median number of EB1 comets per cell, that increased from 160 \pm 10 in *wt*SK-N-SH cells to more than 270 \pm 22 in $\rho^{-/-}$ cells suggesting that number of growth microtubules increased (data not shown). Vincristine treatment (for 6 h), which was highly effective in *wt*SK-N-SH cells, caused a complete disappearance of EB1 accumulation at microtubule plus-ends in 88 % of the cell population (data not shown). In cells that still contained EB1 comets, vincristine decreased their length from 1.7 \pm 0.1 μm to 1.0 \pm 0.1 μm ($p < 0.001$;

Fig. 2C). Interestingly, in $\rho^{-/-}$ SK-N-SH cells, vincristine did neither alter EB1 comet length (2.8 \pm 0.2 to 2.4 \pm 0.1 μm ; $p > 0.05$) nor comet number (data not shown) in the majority of cell population (92 % of cells; data not shown). These data definitely involve ROS generation by mitochondria in regulation of EB1 accumulation at microtubule plus-ends.

Phosphorylation of EB1 regulates its accumulation at microtubule plus-ends, microtubule dynamics and microtubule-governed cell functions.

A growing body of evidence has recently demonstrated that +TIPs, including EB3, can be subjected to phosphorylation. To analyze whether such a process could be responsible for changes in EB1 accumulation at microtubule plus-ends, we performed EB1 immunoprecipitation associated with anti-phosphoprotein antibody. For the first time, we found a phosphorylated form of EB1 in U87-MG cell lysates (Fig.3A, left panel). We also revealed that EB1 phosphorylation was suppressed by the O_2^- scavenger tiron. This ROS-dependent post-translational modification of EB1 was then confirmed in A549 cells (Fig.3A, right panel). Since tiron also increased EB1 comet length (see Fig.2B and Supplementary Fig.2C), one can reasonably hypothesize that phosphorylation may control EB1 ability to form comets at microtubule plus-ends. Using PhosphoSite, we thus generated constructs encoding for phospho-defective human EB1 protein, *via* substitution of threonine 166 or serine 155 residues by an alanine residue. We first ascertained that endogenous EB1 expression was repressed in favor of exogenous EB1-

GFP in the stably transfected U87-MG cells with the EB1 T166A-GFP, EB1 S155A-GFP, and non-mutated *wtEB1*-GFP constructs (Fig.3B). We also ensured that the length of *wtEB1*-GFP comets was similar to the endogenous EB1 comets stained by immunofluorescence ($2.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ vs. $2.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$; $p > 0.05$; Fig 3C and supplemental Fig 2C). We then measured that comet length was significantly increased to $3.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$ in T166A mutant cells, as compared with comets in *wtEB1* cells that were $2.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ($p < 0.001$) (Fig.3C and Table 1). Consistently with this, we showed by live imaging fluorescence microscopy that the T166A mutation of EB1 significantly increased microtubule growth rate ($15.9 \pm 0.6 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ vs. $10.6 \pm 0.4 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ in *wtEB1* cells) and reduced catastrophe frequency ($0.7 \pm 0.1 \mu\text{m}^{-1}$ vs. $1.0 \pm 0.1 \mu\text{m}^{-1}$ in *wtEB1* cells) (Table 2 and supplementary videos 1 and 2). The time of existence of EB1 binding sites at microtubule plus-ends, termed “decoration time”, was not different in

the T166A-EB1 cells and in the *wtEB1* cells (14.7 ± 0.2 s and 14.2 ± 0.1 s respectively), since EB1 comet length and microtubule growth rate increased in a similar way (Table 2). The S155A mutation differently interfered with the microtubule system. EB1 comet length was conversely decreased to $1.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$ in S155A mutant cells ($p < 0.01$; Fig.3C and Table 1), microtubule growth rate was only increased by 18 % ($p < 0.05$) and the catastrophe frequency was not significantly modified ($p > 0.05$) as compared with *wtEB1* cells (Table 2 and supplementary videos 1 and 3). In addition, decoration time of microtubule plus-ends by EB1 S155A was decreased by 40 %, indicating that regulation of EB1 binding by phosphorylation on the S155 residue is distinct to what occurs when EB1 is phosphorylated on the T166 residue.

Lastly, we explored the relevance of EB1 phosphorylation in microtubule-governed cell functions. T166A mutation led to slight increases in cell migration

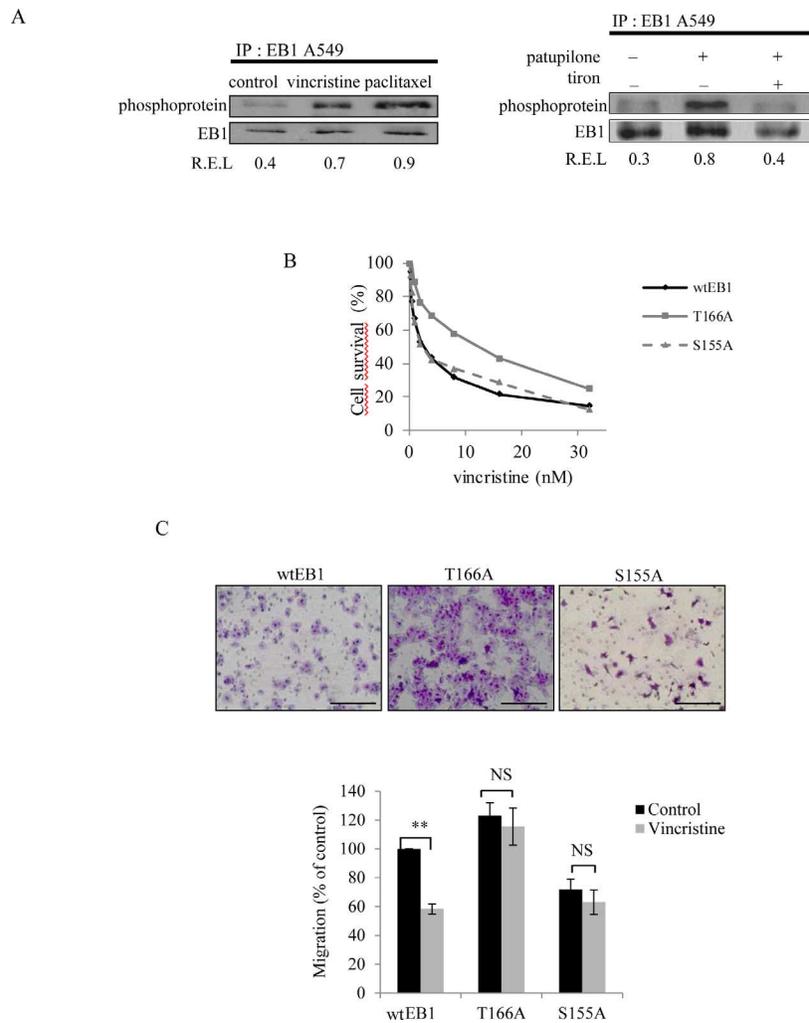


Figure 4: ROS-mediated EB1 phosphorylation is involved in MTA activities. (A) A549 cells were treated for 6 h with 2 nM of vincristine, paclitaxel and patupilone or combined with tiron, and lysed. Immunoprecipitation was performed as described in legend of Figure 3A. (B) Survival of *wtEB1*, EB1 T166A and EB1 S155A transfected U87-MG cells exposed to vincristine, measured by the MTT test. (C) Migration of U87-MG transfected cells (see details in Figures 3D legend) after a 6 h-treatment with vincristine 2 nM. Data are presented as mean \pm S.E.M. Student’s t-test NS, $p > 0.05$; **, $p < 0.05$.

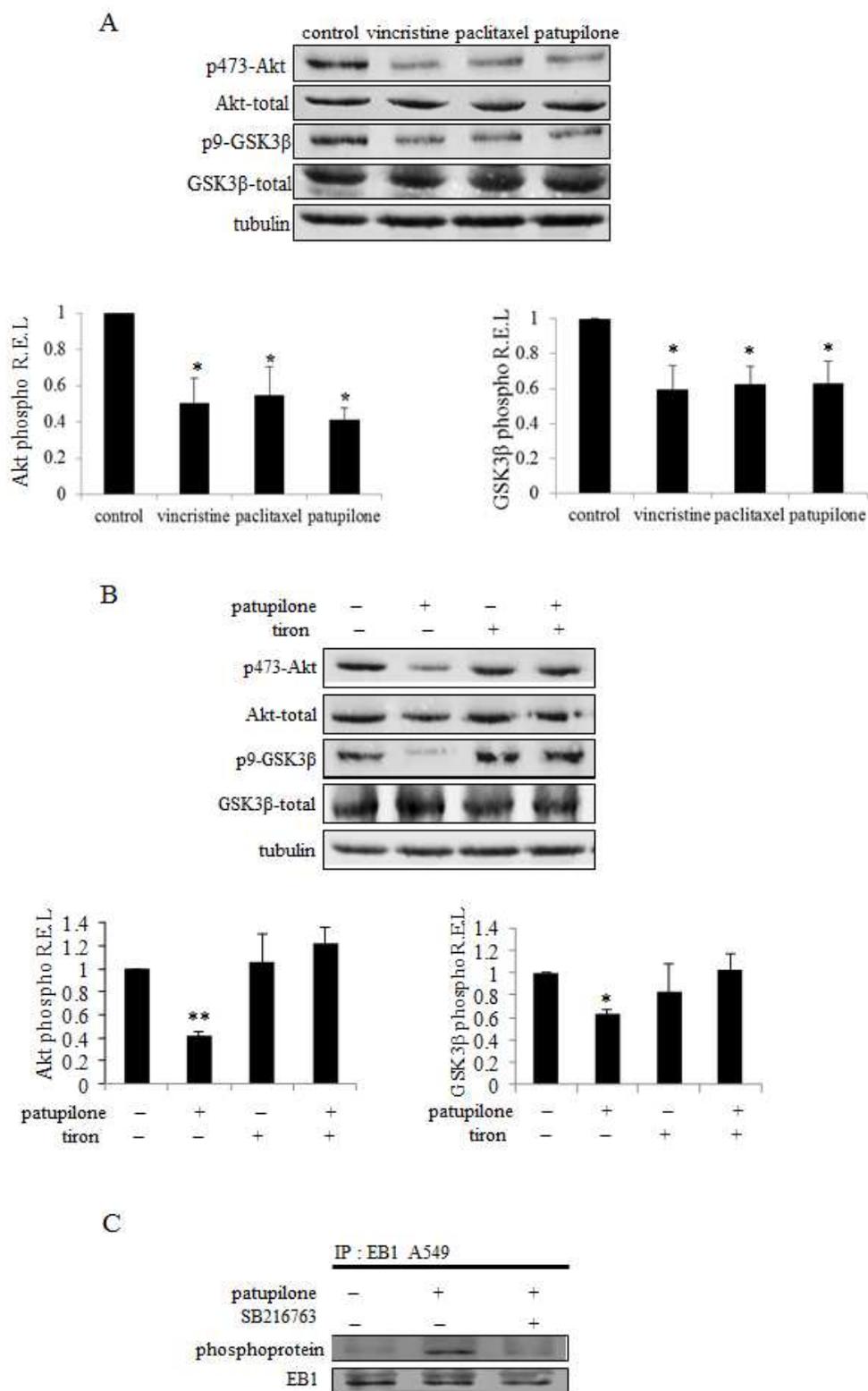


Figure 5: ROS-mediated Akt/GSK3β pathway governs EB1 phosphorylation under MTA treatment. (A) Western blot analysis of expression and activity of Akt and GSK3β under 6 h-treatment with 2 nM of vincristine, paclitaxel or patupilone in A549 cells. Quantification of western blot bands, expressed as phospho/total protein ratio; α -tubulin was used as loading control. (B) Same experiment in cells exposed to patupilone, tiron or their combination. (C) A549 cells were treated for 6 h with 2 nM of vincristine or combined with SB216763. Immunoprecipitation was performed as described in Figure 3A legend. Data are presented as mean \pm S.E.M. Student's t-test *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

(+ 23 ± 7 %; $p < 0.05$) and cell proliferation (up to + 15 % at 96h) as compared to *wt*EB1 cells (Fig.3D and 3E). On the opposite, S155A mutation resulted in the decrease of the U87-MG cells migration (- 28 ± 6 %; $p < 0.05$), as well as cell proliferation (- 11 % at 96h). Thus, depending on the residue targeted, EB1 phosphorylation results in quite opposite effects on microtubule dynamics and microtubule-governed cancer cell functions.

ROS-mediated EB1 phosphorylation is involved in MTA activities.

To investigate whether EB1 phosphorylation play a role in MTA activity, we performed EB1 immunoprecipitation from MTA-treated A549 cells (for 6 h). We showed that 6 h-treatment of vincristine, paclitaxel and patupilone increased EB1 phosphorylation

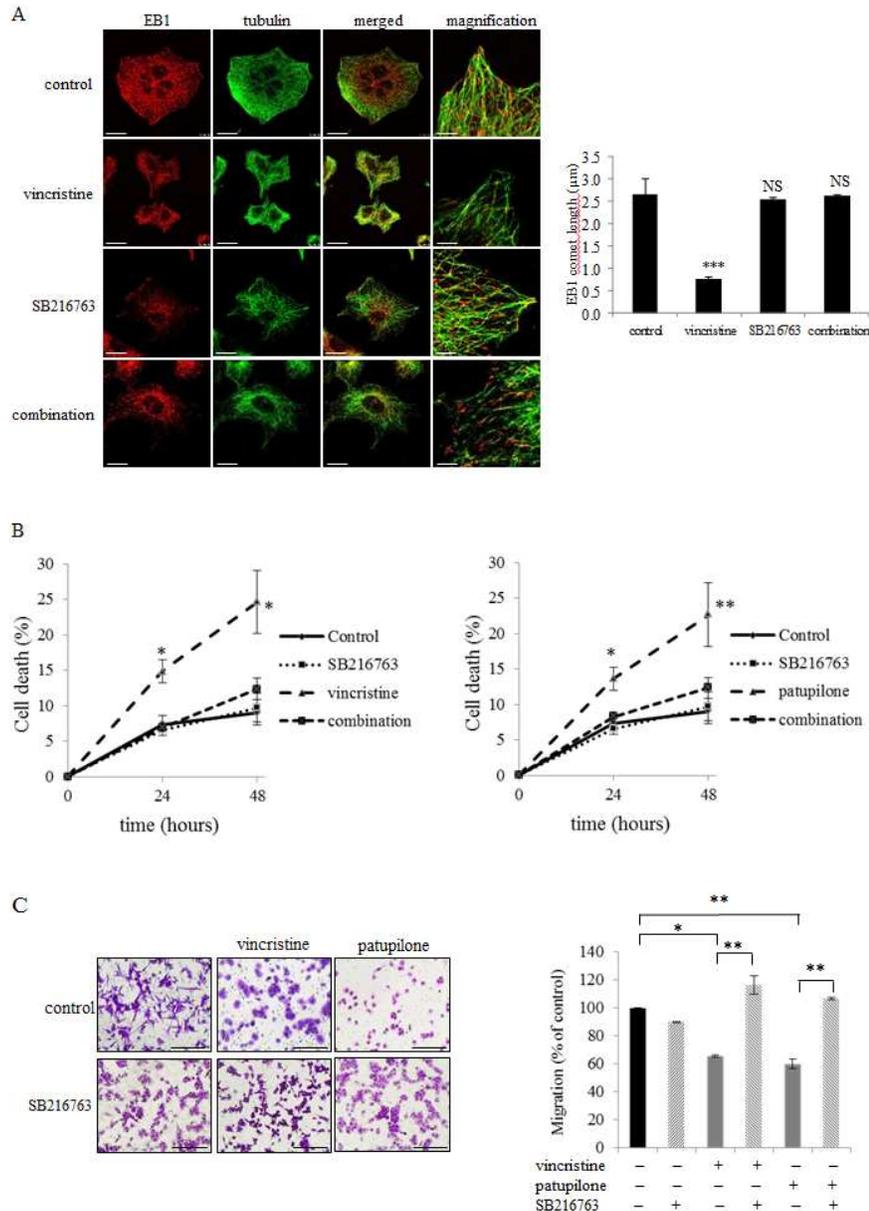


Figure 6: GSK3β activation governs EB1 accumulation at microtubule plus-ends and MTA activities. (A) Double indirect immunofluorescence staining of EB1 (red) and α -tubulin (green) and quantification of EB1 comet length in A549 cells incubated with 2 nM of vincristine, SB216763 or their combination for 6 h. Scale bars, 20µm. Magnified images: Scale bars, 5µm. (B) Detection of apoptosis in A549 cells by flow cytometry analysis of annexin-V and propidium iodide staining under 2 nM of patupilone, SB216763 or their combination for 6 h. (C) Measurement of transwell migration in U87-MG cells under 6 h-treatment of vincristine or patupilone 2 nM, SB216763 or their combination. See Figure 3D legend for details. Data are presented as mean ± S.E.M. Student's t-test *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

1.7, 2.5 and 3.2 times, respectively (Fig.4A, left and right panels). We revealed thus that patupilone-mediated EB1 phosphorylation was governed by ROS, since it was suppressed by a simultaneous combination with tiron (Fig.4A, right panel). These data were validated in U87-MG cells exposed to vincristine (Supplementary Fig.3).

In agreement with results obtained in U87-MG cells, vincristine decreased EB1 comet length by 60 % in *wt*EB1-GFP transfected U87-MG cells (Table 1). Further, treatment also inhibited microtubule dynamics, *via* both a decrease in microtubule growth rate (– 30 %) and a huge increase in catastrophe frequency (+ 65 %) in *wt*EB1 cells (Table 2). Importantly, vincristine became almost completely ineffective in reducing comet length at microtubule plus-ends in EB1 T166A-GFP cells (Table 1). In these mutant cells, the MTA-mediated increase in catastrophe frequency was limited to 26 %, while the decrease in microtubule growth rate was totally prevented by the T166A substitution (Table 2). On the opposite, the S155A mutation did not protect EB1 comet and microtubule dynamics from vincristine-induced damages (Tables 1 and 2).

We then explored if changes in EB1 phosphorylation influence MTA activities. As shown in Fig.4B, T166A cells were significantly less sensitive to cytotoxic effects of vincristine (for 72 h), with an IC_{50} value 4.4 fold-increased as compared to *wt*EB1 cells (9.2 ± 0.2 nM and 2.1 ± 0.4 nM respectively; $p < 0.05$). Moreover, T166A mutation of EB1 inhibited the anti-migratory activity of vincristine (for 6 h) (Fig.4C). In EB1 S155A mutated cells, unlike in T166A cells, vincristine cytotoxicity was maintained (IC_{50} value 2.1 ± 0.2 nM; Fig.4B), and vincristine anti-migratory effects were similar as those measured in *wt*EB1 cells (– 37 % and – 42 % respectively).

Collectively, our results revealed that inhibition of EB1 T166 residue phosphorylation results in cancer cell insensitivity to MTA anti-microtubule activities, as well as resistance to MTA cytotoxic and anti-migratory properties. Conversely, MTAs are still effective in S155A mutant cells.

The Akt/GSK3 β pathway governs EB1 phosphorylation in MTA treated cells.

We next sought to identify the molecular actors responsible for EB1 phosphorylation downstream of mitochondrial ROS generation. It has been reported that Microtubule-Associated Proteins (MAP) can be phosphorylated by GSK3 β [40]. To investigate the involvement of the Akt/GSK3 β signaling pathway in MTA-mediated EB1 phosphorylation, we first assessed the expression of phosphorylated S473 Akt, as well as S9 GSK3 β . As shown in Fig.5A, 6 h-treatment with vincristine, paclitaxel or patupilone similarly led to a decrease by 50 % in the phosphorylated active form of

Akt. Concomitantly, we showed a decrease in GSK3 β phosphorylation (40 %, 37 % and 36 % respectively for the three MTAs), which is correlated with its activation. To determine whether ROS overproduction was involved in Akt inhibition, MTA-treated cells were simultaneously incubated with tiron. Interestingly, the $O_2^{\cdot -}$ scavenger restored initial phospho-Akt and phospho-GSK3 β levels (Fig.5B and Supplementary Fig.4A), indicating that MTA-triggered ROS overproduction was responsible for Akt inactivation and, consequently, GSK3 β activation. Then, to determine the role of GSK3 β in EB1 phosphorylation, A549 cells were treated with MTA combined with the GSK3 β specific inhibitor SB216763 during 6 h. As shown in Fig. 5C, SB216763 suppressed patupilone-mediated phosphorylation of EB1, clearly pointing out that GSK3 β is required to achieve EB1 phosphorylation. Consistently, SB216763 prevented EB1 accumulation at microtubule plus-ends in vincristine-treated A549 cells (0.8 ± 0.1 μ m and 2.6 ± 0.9 μ m for vincristine and the combination respectively; $p > 0.05$) (Fig.6A). Same results were obtained in U87-MG cells (Supplementary Fig.4B). Lastly, we showed that GSK3 β was involved in both pro-apoptotic and anti-migratory activities of MTAs. For instance, SB216763 reduced 2.0 and 1.9 times A549 cell death induced by a 48 h-treatment with vincristine and patupilone respectively ($p < 0.01$; Fig. 6B). Likewise, we showed that combination of MTAs with SB216763 resulted in a total suppression of the anti-migratory effect of vincristine and patupilone (Fig. 6C). Of note, we also analyzed AMPK activity, that appeared not to be involved in MTA activities (data not shown). Altogether, our results highlight a pivotal role for the ROS-modulated Akt/GSK3 β pathway that, *via* EB1 phosphorylation and accumulation to microtubule plus-ends, governs MTA efficacy.

DISCUSSION

Understanding anticancer drug mechanism of action is of prime importance, not only for deciphering resistance processes but also for developing more convenient cancer therapy strategies. Here, we disclosed a novel mechanism by which generation of mitochondrial ROS suppresses microtubule dynamics, through Akt/GSK3 β -mediated phosphorylation of EB1. Importantly, we identified this signaling bridge between mitochondria and microtubules as responsible for a considerable part of cancer cell response to MTA cytotoxic and anti-migratory activities.

EB1 is a conserved and ubiquitous member of the +TIPs family that regulates the growth and the polymerization of microtubules [41-42]. EB1 represents core element of a dynamic network at the growing microtubule plus-ends and regulate microtubule dynamics through recruitment of others +TIPs [24-25]. We previously showed that MTA anti-cancer and anti-angiogenic efficacy correlated with EB1 comet disruption

in human neuroblastoma, glioblastoma and endothelial cells [30-32]. Processes underlying regulation of EB proteins binding to microtubule plus-ends have been the object of intensive investigations, and post-translational modifications such as dephosphorylation /retyrosination or acetylation of the EB1 C-terminal domain have been recently proposed [43-44]. The data currently available also reported phosphorylation of EB3 in endothelial and HeLa cells [33-34]. Phosphorylation of EB1 homologues (Bim1p and Mal3) has been shown in budding and fission yeasts [37-38], but there was still no evidence for such a process in mammalian cells. In the present study, we showed for the first time that EB1 was phosphorylated in human cancer cells of various tissue origins. By using phospho-defective mutants, we further identified Serine 155 and Threonine 166 as the potential residues subjected to phosphorylation. These residues are located in the EB1 linker region, which connects the N-terminal calponin homology domain with the C-terminal domain of EB proteins. The linker region of EB1 tightly contributes to its microtubule binding by promoting the Calponin-Homology domain binding [24 and 45]. Here, we showed that phosphorylation on the S155 residue is required to EB1 accumulation at microtubule plus-ends, and both cancer cell migration and proliferation. Our results are supported by a recent study that linked EB3 stabilization during mitosis to its phosphorylation on S176 by Aurora kinases [46]. Phospho-defective S155 mutant decreased microtubule decoration time by EB1, suggesting that S155 phosphorylation may increase the time of existence or the number of EB1 binding sites at microtubule plus-ends. Further, EB1 is now considered to specifically recognize both the tubulin GTP nucleotide state and the GTP hydrolysis-induced conformational states [22-23]. S155 phosphorylation may thus increase the time of existence of these intermediate forms by inhibiting GTP hydrolysis. The phospho-defective T166A mutant sharply contrasted with the S155A mutant since it promoted EB1 binding in a typical comet-like accumulation and induced microtubule growth through an increase cell proliferation and migration in cancer cells. Interestingly, EB3 phosphorylation on the S162 residue, which is also localized in the linker region, has been similarly identified to be required to destabilize the EB3 dimer and suppress microtubule growth [33]. Lastly, unlike S155 residue, T166 phosphorylation may appear to be required for the decrease of the EB1 decoration time of microtubules by MTAs. We characterized phosphorylation of EB1 on T166 residue as a requisite molecular switch in MTA efficacy, from microtubule dynamics alterations to cytotoxic and anti-migratory consequences.

We identified the serine/threonine kinase GSK3 β as responsible for MTA-triggered EB1 phosphorylation and decrease in EB1 accumulation at microtubule plus-ends. EB1 can thus now be included to the class list of +TIP proteins that are substrates of GSK3 β and associate

with microtubules in a phosphorylation dependent manner [40]. Interestingly, we showed that GSK3 β activation was essential for anti-migratory properties of MTA chemotherapy. Besides the well-known role of GSK3 β in cell migration *via* APC [47], GSK3 β -mediated phosphorylation of EB1 is a likely determining step in the migratory process. In support to this, previous works reported the importance of EB1 to stabilize microtubule plus-ends at cell cortex and target adhesion sites during migration [26, 30]. In the present study, we also showed that GSK3 β participated to cancer cell death induced by MTAs. This may be related to the pro-apoptotic properties of GSK3 β , through phosphorylation of apoptotic regulators (such as Bax or Mcl-1) [48-49]. GSK3 β activation resulted from Akt inactivation in MTA-treated cancer cells. Since the GSK3 β selective inhibitor SB216763 only partially protected cells from MTA-induced cytotoxicity, we can easily hypothesize that inactivation of the pro-survival kinase Akt is also involved in the cell death process, by modulating either apoptotic actors or transcription factor activity [50]. Aberrantly high activation of Akt is a characteristic feature of resistance to multiple chemotherapies in a large variety of human cancers [51]. Akt inhibitors are currently evaluated in clinical trials, in combination with conventional cytotoxic drugs [52]. Especially, combination of perifosine or MK-2206 with paclitaxel in ovarian, gastric and melanoma cancers has been recently shown to be a very promising approach [53-55]. In support to this, inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway by NVP-BEZ235 potentiates effects of vincristine and reduces chemoresistance in *in vitro* and *in vivo* leukemia and sarcoma models [56-57]. By highlighting the key role of the Akt/GSK3 β pathway in MTA mechanism of action, our results (i) support the interest for such therapeutic combinations to emphasize response to chemotherapy and overcome drug resistance, and (ii) give for the first time an explanation to their molecular mechanism.

It has become clear that ROS can influence activity of numerous kinases and thereby control cell behavior [58]. Here, we showed that GSK3 β activation in MTA-treated cells relies on mitochondrial ROS-mediated inhibition of upstream Akt. Molecular and chemical blockade of ROS overproduction ultimately led to cell insensitivity to both MTA cytotoxic and anti-migratory activities. Furthermore, very preliminary results have shown a deficit in ROS generation induction from mitochondria in multi-drug resistant cells (personal data). A more complex approach than only targeting of microtubules is thus warranted. Accordingly, a direct targeting of mitochondria by MTAs incorporated in novel mitochondriotropic nanocarriers has shown a gain in efficacy [59-61]. While mitochondria silencing has long been accepted as general consensus in cancer cells (Warburg effect), recent studies revealed that this intracellular network is still functional, even in cells that shifted cellular energy metabolism to glycolysis

[62]. Hence, a potential therapeutic strategy may consist in the re-activation of mitochondrial oxidative metabolism, including by inhibiting glycolysis [63-64]. Interestingly, the glycolytic phenotype of cancer cells has been reported to be induced by Akt upregulation [65]. A very recent study supports this link between energetic metabolism and Akt pathway, since GSK3 β has been reported to potentiate mitochondria biosynthesis stimulation induced by a 2-Desoxy-Glucose-mediated inhibition of glycolysis [66]. Thus, combining MTAs to anti-Akt targeted therapies (as discussed above) might also be efficient through induction of a switch from a glycolytic to an oxidative phenotype in cancer cells.

To conclude, by characterizing a novel phosphorylation-mediated regulation of EB1, the present study improves our fundamental knowledge about this oncogenic protein, which influences processes involved in cancer progression. We also showed the role played by mitochondrial ROS to initiate such a regulatory process of EB1 that leads to MTA efficacy, pointing out the need to reexamine the current dogma of microtubule targeting by MTAs. Lastly, our work provides a strong mechanistic rationale to the promising therapeutic strategies that combine MTA-based conventional chemotherapy with anti-Akt targeted therapies.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture

Human non-small lung carcinoma (A549), neuroblastoma (SK-N-SH) and glioblastoma (U87-MG) cells were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA). They were grown in RPMI-1640 medium or in MEM medium supplemented with 1% L-glutamine (Lonza, Levallois-Perret, France), 10 % fetal calf serum (Lonza), 1 % penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Rho-negative ($\rho^{(-)}$) SK-N-SH cells were obtained by incubating parental (*wt*) SK-N-SH cells for 8 weeks with ethidium bromide as previously described [4]. All cell lines were routinely maintained in culture at 37°C and 5 % CO₂ and regularly screened to ensure the absence of mycoplasma contamination. Cells were seeded (1.9 x 10⁴ cells/cm² for A549, 3.3 x 10⁴ cells/cm² for SK-N-SH and 1.3 x 10⁴ cells/cm² for U87-MG) 24 hours before treatment.

Drugs and reagents

Stock solution of paclitaxel (Novasep synthesis) was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich) while vincristine (Lilly, Strasbourg, France) and patupilone (Sigma-Aldrich) were prepared in sterile distilled water. Stock solutions of tiron and potassium

cyanide (KCN) were prepared in sterile distilled water, while rotenone was prepared in DMSO. SB216763 was purchased from Sigma-Aldrich. All these solutions were freshly diluted in the culture medium for experiments.

Cytotoxicity test

Cells were seeded in 96-well plates to be treated during 72 hours with MTAs. Cell survival was measured by using the colorimetric MTT assay (Sigma-Aldrich) as we previously performed [14, 32].

Measurement of Reactive Oxygen Species

Cells were treated with MTAs, antioxidants, or their simultaneous combination for 6 hours. KCN and rotenone, specific inhibitors of complex I and IV of the mitochondrial respiratory chain were used at 100 μ M and 100nM respectively, and the O₂⁻ scavenger tiron at 2mM. Hydrogen peroxide production was evaluated by H₂-DCF-DA fluorescence (Life Technologies, Carlsbad, USA) in 96-well black plates. Formation of DCF fluorescent product was measured in a Fluoroskan Ascen FL plate reader as previously described [4]. Superoxide ion generation was measured by WST-1 colorimetric test (Roche, Mannheim, Germany). After 30min of WST-1 incubation (500 μ M), absorbance was measured at 450nm with a Multiskan plate reader (Ascent). For each assay, the reading was corrected for the estimated cell number: cells were fixed with 1 % glutaraldehyde (Sigma-Aldrich) and stained with 1 % Crystal-violet (Sigma-Aldrich) solution in 20 % Methanol (Sigma-Aldrich).

Indirect immunofluorescence analysis

Cells were grown on 8-well chamber slides (Labtek, Thermo Scientific, Roskilde, Denmark), precoated for 1 hour with fibronectin (10 μ g/ml) for U87-MG or with type I collagen (30 μ g/ml) for SK-N-SH (Sigma Aldrich), to be treated for 6 hours with MTAs and inhibitors. As previously described [32], cells were incubated with the anti-EB1 (clone 5; BD Biosciences, San Jose, CA) and α -tubulin (clone DM1A; Sigma Aldrich) primary antibodies, and then with Alexa488 or 568-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes). Staining was observed using either a Leica DM-IRBE microscope or a Leica TCS SP5 confocal laser-scanning microscope (Leica, Heidelberg, Germany). Images were acquired using Metamorph software or the Leica Confocal software, and were processed using Image J software. For each experimental condition, at least 400 EB1 comets (in 40 cells) were examined to measure their length.

Western blot analysis

Cells were lysed after 6 hours treatment in RIPA buffer (Tris-HCl 50mM pH 8.0, NaCl 250mM, Triton-X100 0.1 %) with a cocktail of proteases and phosphatases inhibitors (Sigma-Aldrich) added freshly. Protein concentrations were determined using the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad laboratories, France). Proteins were separated by SDS-PAGE and electrotransferred onto a nitrocellulose membrane. Primary antibodies used were directed against EB1 (clone 5; BD Biosciences), α -tubulin (clone DM1A, Sigma Aldrich), Ser 473 phospho-Akt, total Akt, Ser 9 phospho-GSK3 β (Cell Signaling, Boston, USA), total GSK3 β (Life Technologies). Peroxydase-conjugated secondary antibodies (Jackson Immunoresearch, Baltimore, USA) and chemiluminescence detection kit (Millipore) were used for visualization, and signal quantification was done with Image J software.

EB1 immunoprecipitation

Cells were lysed in modified RIPA buffer (Tris-HCl 50mM pH 7.5, NaCl 150mM, 1mM EDTA, 2.5mM MgCl₂) with a cocktail of proteases and phosphatases inhibitors added freshly. Prior to immunoprecipitation, 5 μ g of anti-EB1 antibody (clone 5; BD Biosciences) was added to 50 μ l of protein G-Sepharose beads (Sigma-Aldrich) for 1 hour. Then, an equal amount of each protein lysate was incubated with the previous mixture and rotated overnight at 4°C. After centrifugation, the supernatant was removed and the immune complex was analyzed by Western blot with primary antibodies against EB1 (clone 5; BD Biosciences) and serine, threonine and tyrosine phosphorylated proteins (clone SPM101; Abcam).

Proliferation test

Cells were grown in 96-well plates, and were fixed at different times with 1 % glutaraldehyde and stained with a 1 % Crystal-violet solution in 20 % Methanol. The stain was eluted with DMSO and absorbance was measured at 600nm with a Multiskan Ascent plate reader.

Annexin V-FITC/PI staining assay

Following a 24 and 48 hours treatment, cells were exposed to Apoptosis/Necrosis Detection Kit (BD Biosciences) used according to the manufacturer's instructions. The fluorescence was analyzed by flow cytometry analysis (FacSort of Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Inc., San Jose, CA) as previously described [67].

Transwell migration assay

Cells were allowed to migrate for 6 hours in a transwell migration chamber (0.8 μ m filter, BD Bioscience); for details see our previous work [32]. Pictures of the lower sides of filters were taken with an Olympus microscope. Six fields per condition were imaged and transmigrated cells were counted. Results were expressed as a percentage of transmigrated cells compared with no treatment condition.

Plasmid constructs and transfection

pEB1-T166 and S155 were derived from pEB1-GFP (human EB1 in pEGFP N1 to express EB1-GFP) by mutation of the T166 or/and S155 of EB1 using the Quickchange II site directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Les Ulis, France) according to the manufacturer's protocol. The T166 and S155 were both replaced by an A by mutation. The primers (mutations are underlined) used were:

T166 site (561 bp from origin):
MuEB1T166 F 5'
GAGGCCCATCTCAGCACAGAGAACC 3'
MuEB1T166 R 5'
GGTTCTCTGTGCTGAGATGGGCCTC 3'
S155 site (527 bp from origin):
MuEB1S155 F
5'CCTCTCACTGCTAGCAGTGCAGCTC 3'
MuEB1S155 R 5'
GAGCTGCACTGCTAGCAGTGAGAGG 3'

The resulting mutant cDNA (pEB1-T166A and pEB1-S155A) constructs were sequenced to confirm their integrity before use (Beckman Coulter Genomics). U87-MG cells were then transiently transfected with 3 μ g pEB1, pEB1-T166A or pEB1-S155A using Lipofectamine 2000 reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. To establish stable clones, cells were selected with 0.8 μ g/ml geneticin (Life Technologies).

Fluorescent time-lapse video microscopy

Time-lapse acquisitions for microtubule dynamics experiments (*wt*EB1-GFP, T166A-GFP and S155A-GFP U87-MG cells) were performed with a Leica DM-IRBE equipped with a 60X / NA 1.49 objective lens. Thirty-one images per cell were acquired at 2-s intervals using a digital camera (CCD camera Coolsnap FX; Princeton Instruments). Analysis of microtubule dynamics was performed using the manual tracking personalized plug-in for Image J software. Position of EB1 comets was detected by thresholding a filtered image and the centroids of individual comets were followed over time.

Changes in length exceeding 0.067 μm were considered as growth events. Catastrophe frequency was calculated for each individual comet tracked, and corresponds to the inverse of the total length of growth. Decoration time was calculated by dividing EB1 comet length by microtubule growth rate. At least 30 microtubules were analyzed for each experimental condition.

Statistical analysis

Each experiment was performed at least in triplicate. Data are presented as mean \pm S.E.M. Statistical significance was tested using Student's t test. A significant difference between two conditions was recorded for *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been carried out thanks to the support of INCa-DGOS-Inserm 6038 (siric label), and A*MIDEX project (n°ANR-11-IDEX-0001-02) funded by the "Investissements d'Avenir" French Government program, managed by the ANR. Amandine Rovini received an ARC foundation (Association pour la Recherche contre le Cancer) fellowship. The authors wish to thank Charles Prevot for flow cytometry analysis.

REFERENCES

1. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Andres Melendez J, Rodriguez AM, Schumacker PT. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem.* 2000; 275: 25130-25138.
2. Tormos KV, Anso H, Hamanaka RB, Eisenbart J, Joseph J, Kalyanaraman B, Chandel NS. Mitochondria complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metabolism.* 2011; 14: 537-544.
3. Wang Y, Zang QS, Liu Z, Wu Q, Maass D, Dulani G, Shaul PW, Melito L, Frantz DE, Kilgore JA, Williams NS, Terada LS, Nwariaku FE. Regulation of VEGF induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011; 301(3): C695-704.
4. Khawaja NR, Carré M, Kovacic H, Estève MA, Braguer D. Patupilone-induced apoptosis is mediated by mitochondrial reactive oxygen species through Bim relocalization to mitochondria. *Mol Pharmacol.* 2008; 74: 1072-1083.
5. Franklin JL. Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 14(8):1437-1448.
6. Wu S, Zhou F, Zhang Z, Xing D. Mitochondrial oxidative stress cause mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission-fusion proteins. *FEBS*

- J. 2011; 278: 941-954.
7. Lefevre S, Sliwa D, Rustin P, Camadro JM, Santos R. Oxidative stress induces mitochondrial fragmentation in frataxin-deficient cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 418: 336-341.
8. Ralph SJ, Rodriguez-Enriquez S, Neuzil J, Moreno-Sanchez R. Bioenergetic pathways in tumor mitochondria as targets for cancer therapy and the importance of the ROS-induced apoptotic trigger. *Mol Aspects Med.* 2010; 31: 29-59.
9. Gogvadze V. Targeting mitochondria in fighting cancer. *Curr Pharm Des.* 2011; 17(36): 4034-4046.
10. Esteve MA, Carré M, Braguer D. Microtubules in apoptosis induction: are they necessary? *Curr Cancer Drug Targets.* 2007; 7(8) :713-729.
11. Rovini A, Savry A, Braguer D, Carré M. Microtubule-targeted agents: when mitochondria become essential to chemotherapy. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1807: 679-688.
12. Del Bufalo D, Biroccio A, Trisciuglio D, Bruno T, Floridi A, Aquino A, Zupi G. Bcl-2 has differing effects on the sensitivity of breast cancer cells depending on the antineoplastic drug used. *Eur J Cancer.* 2002; 38: 2455-2462.
13. Estève MA, Carré M, Bourgarel-Rey V, Kruczynski A, Raspaglio G, Ferlini C, Braguer D. Bcl-2 down-regulation and tubulin subtype composition are involved in resistance of ovarian cancer cells to vinflunine. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5(11): 2824-2833.
14. Savry A, Carré M, Bergès R, Rovini A, Pobel I, Chacon C, Braguer D, Bourgarel-Rey V. Bcl-2-enhanced efficacy of microtubule-targeting chemotherapy through Bim overexpression: implication for cancer treatment. *Neoplasia.* 2013; 15(1): 49-60.
15. André N, Braguer D, Brasseur G, Gonçalves A, Lemesle-Meunier D, Guise S, Jordan MA, Briand C. Paclitaxel induces release of cytochrome c from mitochondria isolated from human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 2000; 60(19): 5349-5353.
16. Varbiro G, Veres B, Gallyas F, Sumegi B. Direct effect of taxol on free radical formation and mitochondrial permeability transition. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31(4): 548-558.
17. Honoré S, Pasquier E, Braguer D. Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62: 3039-3056.
18. Dumontet C, Jordan MA. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9(10): 790-803.
19. Balzer EM, Tong Z, Paul CD, Hung WC, Stroka KM, Boggs AE, Martin SS, Konstantopoulos K. Physical confinement alters tumor cell adhesion and migration phenotypes. *FASEB J.* 2012; 26(10): 4045-4056.
20. Sun X, Li D, Yang Y, Ren Y, Li J, Wang Z, Dong B, Liu M, Zhou J. Microtubule-binding protein CLIP-170 is a

- mediator of paclitaxel sensitivity. *J Pathol.* 2012; 226: 666-673.
21. Mohan R, Katrukha EA, Doodhi H, Smal I, Meijering E, Kapitein LC, Steinmetz MO, Akhmanova A. End-binding proteins sensitize microtubules to the action of microtubule-targeting agents. *PNAS.* 2013; 110(22): 8900-8905.
 22. Maurer SP, Fourniol FJ, Bohner G, Moores CA, Surrey T. EBs recognize a nucleotide-dependent structural cap at growing microtubule ends. *Cell.* 2012; 149(2): 371-382.
 23. Maurer SP, Cade NI, Bohner G, Gustafsson N, Boutant E, Surrey T. EB1 accelerates two conformational transitions important for microtubule maturation and dynamics. *Curr Biol.* 2014; 24: 372-384.
 24. Akhmanova A, Steinmetz MO. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(4): 309-322.
 25. Jiang K, Akhmanova A. Microtubule tip-interacting proteins: a view from both ends. *Curr Opin Cell Biol.* 2011; 23(1): 94-101.
 26. Schober JM, Cain JM, Komarova YA, Borisy GG. Migration and actin protrusion in melanoma cells are regulated by EB1 protein. *Cancer Lett.* 2009; 284: 30-36.
 27. Brüning-Richardson A, Langford KJ, Ruane P, Lee T, Askham JM, Morrison EE. EB1 is required for spindle symmetry in mammalian mitosis. *PLoS One.* 2011; 6(12): e28884.
 28. Wang J, Zhou X, Zhu H, Liu S, Zhou C, Zhang G, Xue L, Lu N, Quan L, Bai J, Zhan Q, Xu N. Overexpression of EB1 in human oesophageal squamous cell carcinoma (ESCC) may promote cellular growth by activating beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene.* 2005; 24(44): 6637-6645.
 29. Dong X, Liu F, Sun L, Liu M, Li D, Su D, Zhu Z, Dong JT, Fu L, Zhou J. Oncogenic function of microtubule end-binding protein 1 in breast cancer. *J Pathol.* 2010; 220(3): 361-369.
 30. Honoré S, Pagano A, Gauthier G, Bourgarel-Rey V, Verdier-Pinard P, Civiletti K, Kruczynski A, Braguer D. Antiangiogenic vinflunine affects EB1 localization and microtubule targeting to adhesion sites. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7(7): 2080-2089.
 31. Rovini A, Carré M, Bordet T, Pruss RM, Braguer D. Olesoxime prevents microtubule-targeting drug neurotoxicity: selective preservation of EB comets in differentiated neuronal cells. *Biochem Pharmacol.* 2010; 80(6): 884-894.
 32. Pagano A, Honoré S, Mohan R, Bergès R, Akhmanova A, Braguer D. Epothilone B inhibits migration of glioblastoma cells by inducing microtubule catastrophes and affecting EB1 accumulation at microtubule plus ends. *Biochem Pharmacol.* 2012; 84(4): 432-443.
 33. Komarova YA, Huang F, Geyer M, Daneshjou N, Garcia A, Idalino L, Kreutz B, Mehta D, Malik AB. VE-cadherin signaling induces EB3 phosphorylation to suppress microtubule growth and assemble adherens junctions. *Mol Cell.* 2013; 48(6): 914-925.
 34. Ferreira JG, Pereira AJ, Akhmanova A, Maiato H. Aurora B spatially regulates EB3 phosphorylation to coordinate daughter cell adhesion with cytokinesis. *J Cell Biol.* 2013; 201(5): 709-724.
 35. Zumbunn J, Kinoshita K, Hyman AA, Näthke IS. Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Curr Biol.* 2001; 11(1): 44-49.
 36. Nakano A, Kato H, Watanabe T, Min KD, Yamazaki S, Asano Y, Seguchi O, Higo S, Shintani Y, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Kaibuchi K et al. AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation. *Nat Cell Biol.* 2010; 12(6): 583-590.
 37. Zimniak T, Stengl K, Mechtler K, Westermann S. Phosphoregulation of the budding yeast EB1 homologue Bim1p by Aurora/Ipl1p. *J Cell Biol.* 2009; 186(3): 379-391.
 38. Limori M, Ozaki K, Chikashige Y, Habu T, Hiraoka Y, Maki T, Hayashi I, Obuse C, Matsumoto T. A mutation of the fission yeast EB1 overcomes negative regulation by phosphorylation and stabilizes microtubules. *Exp Cell Res.* 2012; 318(3): 262-275.
 39. Smith JW, Hong TT, Gao D, Vogan JM, Jensen BC, Fong TS, Simpson PC, Stainier DY, Chi NC, Shaw RM. Limited forward trafficking of connexin 43 reduces cell-cell coupling in stressed human and mouse myocardium. *J Clin Inves.* 2010; 120(1): 266-279.
 40. Tamura N, Draviam VM. Microtubule plus-ends within a mitotic cell are 'moving platforms' with anchoring, signalling and force-coupling roles. *Open Biol.* 2012; 2(11): 120132.
 41. Tirnauer JS, Grego S, Salmon ED, Mitchison TJ. EB1-microtubule interactions in *Xenopus* egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules. *Mol Biol Cell.* 2002; 13(10): 3614-3626.
 42. Busch KE, Brunner D. The microtubule plus end-tracking proteins mal3p and tip1p cooperate for cell-end targeting of interphase microtubules. *Curr Biol.* 2004; 14(7): 548-559.
 43. Xia P, Wang Z, Liu X, Wu B, Wang J, Ward T, Zhang L, Ding X, Gibbons G, Shi Y, Yao X. EB1 acetylation by P300/CBP-associated factor (PCAF) ensures accurate kinetochore-microtubule interactions in mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(41): 16564-16569.
 44. Rovini A, Gauthier G, Berges R, Kruczynski A, Braguer D, Honoré S. Anti-migratory effect of vinflunine in endothelial and glioblastoma cells is associated with changes in EB1 C-terminal detyrosinated/tyrosinated status. *PLoS One.* 2013; 8(6): e65694.
 45. Komarova Y, De Groot CO, Grigoriev I, Gouveia SM, Munteanu EL, Schober JM, Honnappa S, Buey RM, Hoogenraad CC, Dogterom M, Borisy GG, Steinmetz MO, Akhmanova A. Mammalian end binding proteins control

- persistent microtubule growth. *J Cell Biol.* 2009; 184(5): 691-706.
46. Ban R, Matsuzaki H, Akashi T, Sakashita G, Tanigushi H, Park SY, Tanaka H, Furukawa K, Urano T. Mitotic regulation of the stability of microtubule plus-end tracking protein EB3 by ubiquitin ligase SIAH-1 and aurora mitotic kinases. *J Biol Chem.* 2009; 284(41): 28367-28381.
 47. Etienne-Manneville S. APC in cell migration. *Adv Exp Med Biol.* 2009; 656: 30-40.
 48. Linseman DA, Butts BD, Precht TA, Phelps RA, Le SS, Laessig TA, Bouchard RJ, Florez-McClure ML, Heidenreich KA. Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 2004; 24(44): 9993-10002.
 49. Maurer U, Charvet C, Wagman AS, Dejardin E, Green DR. Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of Mcl-1. *Mol Cell.* 2006; 21(6): 749-760.
 50. Stiles BL. PI-3-K and AKT: onto the mitochondria. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009; 61(14): 1276-1282.
 51. Engelman JA. Targeting PI3K signaling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(8): 550-562.
 52. Alexander W. Inhibiting the akt pathway in cancer treatment: three leading candidates. *P T.* 2011; 36(4): 225-227.
 53. Sun H, Yu T, Li J. Co-administration of perifosine with paclitaxel synergistically induces apoptosis in ovarian cancer cells: more than just AKT inhibition. *Cancer Lett.* 2011; 310(1): 118-128.
 54. Almahanna K, Cubitt CL, Zhang S, Kazim S, Husain K, Sullivan D, Sebti S, Malafa M. MK-2206, an Akt inhibitor, enhances carboplatinum/paclitaxel efficacy in gastric cancer cell lines. *Cancer Biol Ther.* 2013; 14(10): 932-936.
 55. Rebecca VW, Massaro RR, Fedorenko IV, Sondak VK, Anderson AR, Kim E, Amavaradi RK, Maria-Engler SS, Messina JL, Gibney GT, Kudchadkar RR, Smalley KS. Inhibition of autophagy enhances the effects of the Akt inhibitor MK-2206 when combined with paclitaxel and carboplatin in BRAF wild-type melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 184(5): 691-706.
 56. Chiarini F, Grimaldi C, Ricci F, Tazzari PL, Evangelisti C, Ognibene A, Battistelli M, Falcieri E, Melchionda F, Pession A, Pagliaro P, McCubrey JA, Martelli AM. Activity of the novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 against T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 2010; 70(20): 8097-8107.
 57. Manara MC, Nicoletti G, Zambelli D, Ventura S, Guerzoni C, Landuzzi L, Lollini PL, Maira SM, Garcia-Echeverria C, Mercuri M, Picci P, Scotlandi K. NVP-BEZ235 as a new therapeutic option for sarcomas. *Clin Cancer Res.* 2010; 16(2): 530-540.
 58. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002; 192(1): 1-15.
 59. Weissig V. Mitochondria-specific nanocarriers for improving the proapoptotic activity of small molecules. *Methods Enzymol.* 2012; 508: 131-155.
 60. Biswas S, Dodwadkar NS, Deshpande PP, Torchilin VP. Liposomes loaded with paclitaxel and modified with novel triphenylphosphonium-PEG-PE conjugate possess low toxicity, target mitochondria and demonstrate enhanced antitumor effects in vitro and in vivo. *J Control Rel.* 2012; 159: 393-402.
 61. Zhou J, Zhao WY, Ma X, Ju RJ, Li XY, Li N, Sun MG, Shi JF, Zhang CX, Lu WL. The anticancer efficacy of paclitaxel liposomes modified with mitochondrial targeting conjugate in resistant lung cancer. *Biomaterials.* 2013; 34: 3626-3638.
 62. Jose C, Rossignol R. Rationale for mitochondria-targeting strategies in cancer bioenergetic therapies. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013; 45(1): 123-129.
 63. Jose C, Hebert-Chatelain E, Bellance N, Larendra A, Su M, Nouette-Gaulain K, Rossignol R. AICAR inhibits cancer cell growth and triggers cell-type distinct effects on OXPHOS biogenesis, oxidative stress and Akt activation. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1807(6): 707-718.
 64. Liu Z, Zhang YY, Zhang QW, Zhao SR, Wu CZ, Cheng X, Jiang CC, Jiang ZW, Liu H. 3-bromopyruvate induces apoptosis in breast cancer cells by downregulating Mcl-1 through the PI3K/Akt signaling pathway. *Anticancer Drugs.* 2014; 25(4): 447-455.
 65. Hagland H, Nikolaisen J, Hodneland LI, Gjertsen BT, Bruserud O, Tronstad KJ. Targeting mitochondria in the treatment of human cancer: a coordinated attack against cancer cell energy metabolism and signaling. *Expert Opin Ther Targets.* 2007; 11(8): 1055-1069.
 66. Ngamsiri P, Watcharasit P, Satayavivad J. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) controls desoxyglucose-induced mitochondrial biogenesis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mitochondrion.* 2014; 14(1):54-63.
 67. Pasquier E, Carre M, Pourroy B, Camoin L, Rebaï O, Briand C, Braguer D. Antiangiogenic activity of paclitaxel is associated with its cytostatic effects, mediated by the initiation but not completion of a mitochondrial apoptotic signaling pathway. *Cancer Ther.* 2004; 3(10): 1301-1310.

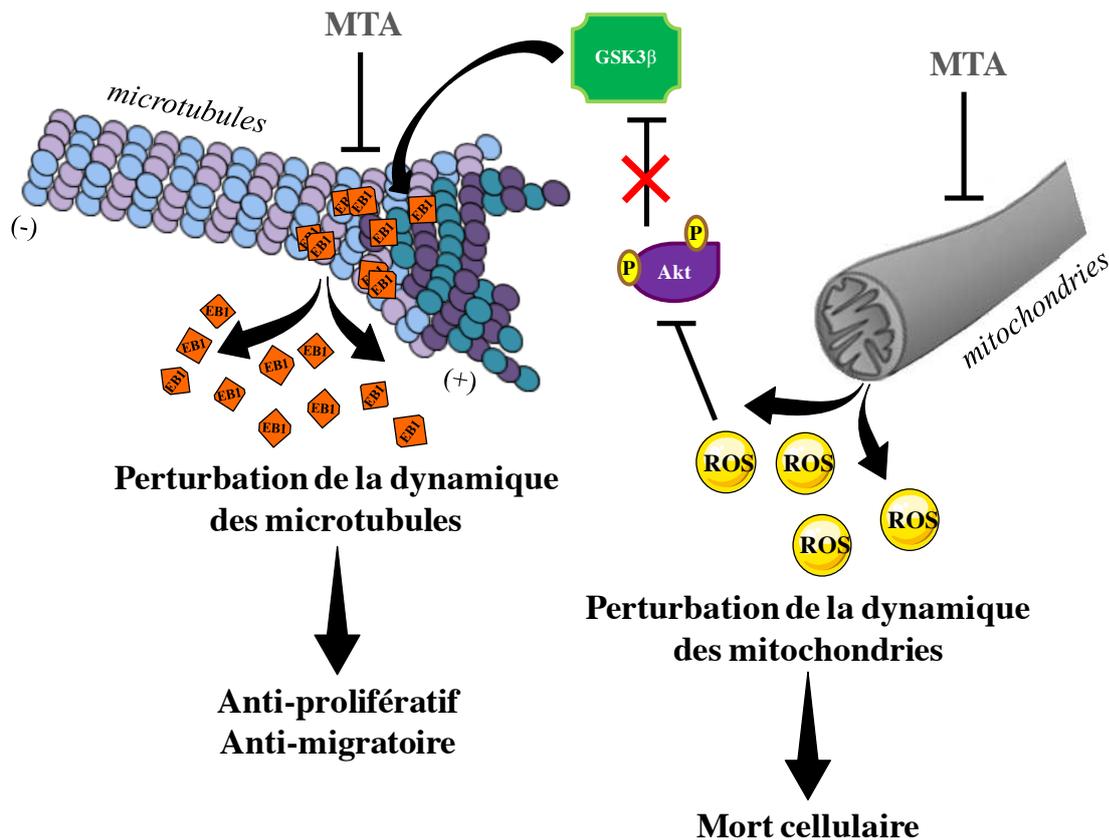


Figure 3 : Voie de signalisation entre les mitochondries et les microtubules concourant à l'efficacité des MTA.

Au cours de la première partie de mes travaux de thèse, nous avons pu mettre en évidence une voie de signalisation intracellulaire à l'origine de l'efficacité des MTA. Ainsi, nous avons démontré le rôle primordial de la mitochondrie en amont du mécanisme d'action de ces anticancéreux en générant une surproduction de ROS. Ces derniers vont alors inactiver la kinase Akt. Un des substrats de cette kinase Akt, la protéine GSK3β est alors trouvée dans le cytoplasme sous forme active et va inhiber l'accumulation de la protéine EB1 aux extrémités (+) des microtubules *via* un phénomène de phosphorégulation. Cette délocalisation d'EB1 va provoquer une perturbation de la dynamique des microtubules à l'origine des effets anti-prolifératifs et anti-migratoires des MTA.

3. Discussion

La présente publication (Oncotarget 2014) met en évidence que, dans différentes lignées cancéreuses humaines, les MTA entraînent une surproduction des ROS mitochondriaux à l'origine de l'efficacité de ces agents. Quel que soit le procédé employé (modèles rho⁽⁻⁾, scavengers ou inhibiteurs pharmacologiques), la restauration d'un niveau basal de ROS supprime en effet toute activité cytotoxique et anti-migratoire de ces anticancéreux. Nous avons ensuite mis en lumière, pour la première fois, que les ROS générés sous l'effet du traitement régulaient la fixation de la protéine EB1 aux extrémités (+) des microtubules *via* un **phénomène de phosphorylation**. Le développement de deux mutants phospho-défectifs sur les résidus serine 155 et thréonine 166 nous ont alors permis de constater que, en fonction du résidu phosphorylé, la dynamique et les fonctions des microtubules ainsi que la réponse aux MTA étaient différentes. Ainsi, la phosphorylation du résidu S155 semble plutôt influencer EB1 au cours de processus physiologiques tels que la migration ou la prolifération, tandis que la phosphorylation du résidu T166 participe aux propriétés d'inhibiteur de la dynamique microtubulaire des MTA. Enfin, nos travaux ont révélé le rôle crucial de la voie Akt/GSK3β dans la phosphorylation d'EB1 et ses conséquences fonctionnelles, plaçant ainsi la **kinase Akt au cœur de l'efficacité des MTA**. Ces données révèlent donc l'existence d'une voie de signalisation intracellulaire entre mitochondries et microtubules à l'origine des activités anticancéreuses des MTA (**Figure 3**).

• La protéine EB1 : futur biomarqueur pronostique/prédictif ?

Ces dernières années, la protéine EB1 s'est révélée être un élément crucial dans la régulation de la dynamique du réseau microtubulaire, en servant de plateforme de recrutement des autres +TIP aux extrémités (+) des microtubules (Akhmanova and Steinmetz, 2008). Mes travaux de thèse, ainsi que des études précédentes effectuées au sein du laboratoire, ont mis en évidence son rôle pivot dans le mécanisme d'action des MTA. Les effets anti-migratoires et anti-prolifératifs des Taxanes comme des *Vinca*-alcaloïdes reposent ainsi sur l'inhibition de l'accumulation d'EB1 aux extrémités (+) des microtubules. Comme pour de nombreuses autres protéines associées aux microtubules, cette « délocalisation » d'EB1 mettrait en jeu des modifications post-traductionnelles. Dans notre étude, nous avons pu mettre en évidence la phosphorégulation d'EB1, qui s'ajoute donc au cycle de détyrosination/(re)tyrosination décrit dans une étude précédente démontrant également l'impact de la vincristine (Rovini et al., 2013). En effet, il a été démontré qu'elle engendrait une diminution de la forme détyrosinée

d'EB1 dans des cellules cancéreuses et endothéliales. De plus, au cours de ces travaux, il a été mis en évidence l'existence d'une forme nitrotyrosinée d'EB1 laissant alors penser un rôle important des ROS dans cette MPT, tout comme observé pour la phosphorégulation d'EB1. Par la suite, il serait alors intéressant de continuer à caractériser les modes de régulation d'EB1, en précisant la nature des différentes modifications post-traductionnelles dont elle fait l'objet mais également leurs conséquences fonctionnelles. Notre étude montre, par mutagenèse dirigée, que la dérégulation de la phosphorylation du résidu serine 155 est associée au caractère invasif et prolifératif des cellules tumorales, suggérant que la protéine EB1-S155 puisse être un **marqueur pronostique** des tumeurs. Cette notion affine les données de la littérature qui démontrent qu'EB1 joue un rôle important dans la tumorigénèse. Sa sur-expression est en effet facteur de mauvais pronostic dans de nombreux cancers tels que les cancers colorectaux, les hépatocarcinomes, les cancers œsophagiens, les glioblastomes ou encore les cancers du sein (Berges et al., 2014; Dong et al., 2010; Orimo et al., 2008; Stypula-Cyrus et al., 2014; Sugihara et al., 2012). Au-delà d'une sur-expression de la protéine EB1, il serait alors peut-être plus judicieux aux vues de nos résultats d'évaluer l'expression de la forme phosphorylée du résidu S155 d'EB1. De plus, de récentes études tendent à démontrer un **rôle prédictif** pour EB1 dans la réponse au traitement et, en particulier, aux MTA. *In vitro*, l'équipe de R. Mohan a ainsi montré que la présence d'EB1 sensibilisait les microtubules à l'action de ces agents anticancéreux (Mohan et al., 2013). Par la suite, la sur-expression d'EB1 a été associée à une meilleure réponse aux *Vinca*-alcaloïdes dans les glioblastomes (Berges et al., 2014). Cependant, il est à noter que peu d'études ont à ce jour été réalisées et que leurs conclusions ne s'accordent pas toujours. C'est le cas dans le cancer du sein, où une forte expression d'EB1 a, à la fois, été reliée à une efficacité accrue et réduite du paclitaxel (Luo et al., 2014; Thomas et al., 2015). Cette divergence dans les résultats pourrait s'expliquer par le fait que seul le niveau d'expression d'EB1 a été évalué jusqu'à maintenant, ignorant toute modification post-traductionnelle telle que la phosphorylation du résidu thréonine 166 dont notre étude a relevé l'intérêt dans la réponse aux MTA.

- **Les mitochondries : pièce centrale dans le mécanisme d'action des MTA**

Depuis quelques années, les mitochondries bénéficient d'un nouveau regain d'intérêt de la part de la communauté scientifique, notamment depuis la reconnaissance de la modulation du métabolisme énergétique en tant que nouvelle approche thérapeutique prometteuse. Les travaux présentés dans notre article démontrent clairement leur rôle primordial dans le

mécanisme d'action des MTA. En effet, nous montrons que la surproduction des ROS mitochondriaux constitue un maillon précoce et indispensable à l'efficacité de ces agents. Même si, en accord avec leur appellation, il n'y a aucun doute sur le fait que les agents anti-microtubules affectent la dynamique et les fonctions du réseau microtubulaire, nos travaux laissent clairement entendre que leur **cible première pourrait être le réseau mitochondrial** voisin. Des données récentes de la littérature appuient cette hypothèse puisque le développement de nouvelles formulations galéniques du paclitaxel permettant l'adressage du principe actif aux mitochondries a mis en lumière un gain d'efficacité significatif par rapport à la molécule mère (Biswas et al., 2012; Zhou et al., 2013). Ces formulations dénommées « **nanovecteurs mitochondriotropiques** » sont basées sur l'utilisation de liposomes couplés à des molécules possédant une affinité pour les mitochondries. Ils sont généralement amphiphiles, possèdent une charge cationique localisée en leur centre, et leur accumulation est due au fort potentiel membranaire des mitochondries. Leur principal représentant est le STTP pour stéaryl triphénylphosphonium (Boddapati et al., 2005). A ce jour, peu d'études ont été réalisées avec ces nanovecteurs mais les premiers résultats obtenus semblent prometteurs, notamment pour contourner les phénomènes de résistance au traitement comme démontré récemment dans des cellules de carcinomes ovariens résistantes au paclitaxel (Solomon et al., 2013).

- **Les maladies liées aux dysfonctionnements mitochondriaux : un enjeu en santé publique?**

Outre son implication dans la biologie des tumeurs et leur réponse au traitement, il est admis depuis longtemps que la dérégulation des mitochondries joue un rôle crucial dans de nombreuses pathologies. Les maladies mitochondriales regroupent une grande variété de pathologies dont le dénominateur commun est un déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les pathologies neurodégénératives en sont un bon exemple ; les neurones étant des cellules à forts besoins énergétiques et donc particulièrement sensibles à tout défaut dans la fonctionnalité du réseau mitochondrial. Ces dernières années, plusieurs études ont caractérisé des altérations qualitatives ou quantitatives des protéines régulant la dynamique des mitochondries telles que Drp1, OPA-1 ou encore Mfn2 (Cho et al., 2009; Shirendeb et al., 2011; Wang et al., 2009) ainsi que des altérations métaboliques telles qu'une activité accrue de la chaîne respiratoire ou des modifications du complexe I entraînant ainsi la dégénérescence neuronale (Demetrius and Driver, 2013; Simcox et al., 2013). Parmi ces maladies, nous pouvons citer la maladie de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique

(SLA), la maladie de Parkinson ou encore la maladie d'Alzheimer ; ces deux dernières représentant un véritable enjeu de santé publique en France (Burté et al., 2014; Correia et al., 2012). De façon intéressante, de récents travaux ont mis en évidence l'intérêt de restaurer les fonctions mitochondriales dans ce type de pathologies. Par exemple, dans la maladie de Parkinson, il a été démontré que le rétablissement du trafic intracellulaire, par stimulation de la polymérisation microtubulaire, permettait de rendre le réseau mitochondrial à nouveau fonctionnel et donc de rétablir l'homéostasie cellulaire (Esteves et al., 2014). Un autre exemple marquant est celui du petit peptide viral (BDV X protein) dont le ciblage des mitochondries entraîne une inhibition de la fission mitochondriale ainsi qu'une réduction de la production de ROS mitochondriaux permettant ainsi de protéger les neurones de la dégénérescence (Szelechowski et al., 2014). De nombreuses études sont actuellement réalisées dans la maladie d'Alzheimer afin de mieux comprendre le phénomène physiopathologique à l'origine de cette maladie et ainsi, de pouvoir développer par la suite de nouvelles stratégies thérapeutiques. Par exemple, les travaux de J. Yan ont mis en évidence que l'inhibition de la phosphorylation de Drp1 par GSK3 β réduisait la dégénérescence neuronale soulevant ainsi la piste d'inhibiteurs de GSK3 β comme solution thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer (Yan et al., 2015). De façon assez contre-intuitive, des études réalisées sur la maladie d'Alzheimer ont révélé un rôle intéressant à jouer pour les MTA dans la prise en charge de ces patients. Le paclitaxel pourrait ainsi avoir un rôle protecteur des neurones lorsqu'il est utilisé uniquement à de **très faibles doses** notamment en restaurant le trafic mitochondrial (Shemesh and Spira, 2011). De même, les épothilones, MTA de dernière génération, semblent posséder également des propriétés neuroprotectrices (Zhang et al., 2012). Une revue parue il y a trois ans répertoriait déjà les propriétés thérapeutiques potentielles des différentes classes de MTA dans les tauopathies et, en particulier, dans la maladie d'Alzheimer (Ballatore, 2012). Par ailleurs, nos propres travaux, réalisés en *collaboration avec l'équipe de Pascale Durbec (IBDML – UMR6216, Marseille)*, montrent que le paclitaxel est capable de favoriser la différenciation des cellules de précurseurs d'oligodendrocyte (OPC) en oligodendrocytes myélinisants, étape indispensable au bon fonctionnement des axones des neurones du système nerveux central (*données confidentielles ; manuscrit en cours de préparation*). La caractérisation du mécanisme d'action, *via* les réseaux microtubulaire et mitochondrial notamment, est en cours dans ce modèle et aux vues des résultats semblerait passer par un effet antioxydant protecteur des axones exercé par le paclitaxel.

Enfin, il n'est pas possible de parler de maladies mitochondriales sans évoquer les diverses myopathies (Katsetos et al., 2013), dont font partie certaines pathologies cardio-vasculaires marquées notamment par une sur-production des ROS à l'origine des dommages endothéliaux (Gao et al., 2008; Verdejo et al., 2012). Plus de 300 pathologies (MID pour *mitochondrial disorders*), de tableau clinique très variable, ont maintenant été reliées à des mutations dans l'ADN mitochondrial. L'incidence globale de ces maladies est estimée à 200 nouveaux cas par an en France (Orphanet) et aucune d'entre elles ne bénéficie actuellement de traitement spécifique.

PARTIE 2

ASSOCIATION MTA/ANTI-AKT : NOUVELLE STRATEGIE THERAPEUTIQUE PROMETTEUSE

Cette deuxième partie de mes travaux de thèse avait pour objectif d'évaluer l'intérêt thérapeutique de nouvelles associations entre agents de chimiothérapie conventionnelle – que sont ici les MTA – et des thérapies ciblées anti-Akt de dernière génération. En identifiant une nouvelle voie de signalisation entre mitochondries et microtubules, nos précédents travaux ont en effet révélé un rôle crucial et inattendu de la kinase Akt au cœur de l'efficacité des MTA. Ces résultats fournissent ainsi un rationnel mécanistique fort aux stratégies thérapeutiques associant les MTA et anti-Akt. *Ce travail s'inscrit dans le domaine de l'oncopharmacologie, avec le développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique visant notamment à améliorer la prise en charge des cancers du poumon.*

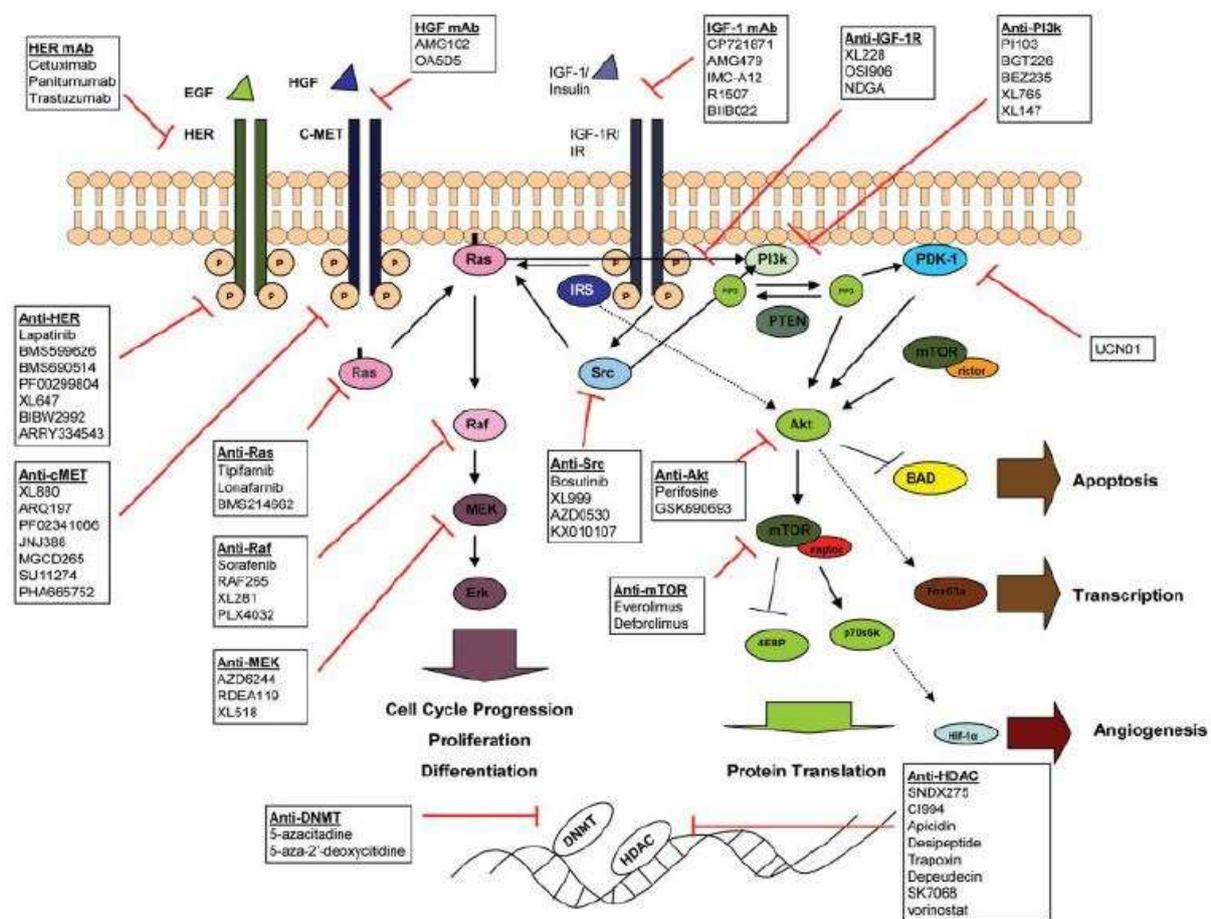


Figure 4 : Représentation non-exhaustive des différents composés appartenant à la grande famille des thérapies ciblées en fonction de leur cible cellulaire.

Les avancées en oncologie ces dernières années ont permis de mettre en évidence un grand nombre de biomarqueurs intracellulaires ou membranaires à l'origine du développement d'inhibiteurs thérapeutiques faisant partie des thérapies ciblées. Sur ce schéma, nous pouvons ainsi voir apparaître la périfosine ciblant Akt mais également les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs pharmacologiques ciblant le récepteur à l'EGF (Ma and Adjei, 2009).

1. Contexte de l'étude

Au cours de ces vingt dernières années, alors que l'incidence des pathologies cancéreuses est en constante augmentation sur la population mondiale – due au vieillissement de la population ainsi qu'à l'amélioration des outils de diagnostic – il est à noter que la mortalité est, quant à elle, en décroissance continue grâce à un arsenal thérapeutique efficace. Le cancer du poumon, et en particulier le cancer du poumon non-à-petites cellules (NSCLC – *non small cell lung cancer*) représentant 85 % des cancers du poumon, reste cependant la première cause de décès dus aux pathologies cancéreuses dans le monde (Torre et al., 2015). En France, il représente 40 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année, et est en progression constante chez la femme avec une incidence multipliée par sept ces trente dernières années (*source INCa*). Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode clairement validée pour le dépistage du cancer bronchique, expliquant en grande partie que le diagnostic se fasse à des stades avancés (métastasés) souvent incompatibles avec la chirurgie. De plus, nombreux sont les cas de chimiorésistance, alors associés à un taux de survie à cinq ans de seulement 15 % (Cufer and O'Brien, 2013).

Parmi les progrès techniques les plus marquants ces dernières années, se situent les avancées en génomique et protéomique, permettant la caractérisation moléculaire des tumeurs (Sawyers, 2008). Les conséquences cliniques de ces découvertes donnent accès à une meilleure connaissance de la biologie des cancers, et ont permis la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques aboutissant au développement des **thérapies ciblées (Figure 4)**.

C'est ainsi que les récepteurs à tyrosine kinase EGFR (*epidermal growth factor receptor*), sur-exprimés ou présentant des mutations activatrices dans de nombreux types tumoraux, sont maintenant sélectivement inhibés par des anticorps monoclonaux et des inhibiteurs de tyrosine kinase qui disposent d'une AMM dans le cancer du poumon (Erlotinib, Tarceva[®] et Géfitinib, Iressa[®]; Peters et al., 2012). Cependant, ils ne peuvent être administrés qu'à une faible proportion de patients – identifiés par leur profil mutationnel – et font eux aussi fréquemment l'objet de résistance de la part des cellules cancéreuses ciblées (Steuer and Ramalingam, 2015). Le contrôle des voies de signalisation en aval de ces récepteurs, telle que la voie PI3K/AKT/mTOR demeure donc actuellement un challenge important. C'est dans ce contexte que les thérapies ciblées anti-Akt ont été développées. Si les attentes escomptées avec ces molécules ont été limitées par une efficacité transitoire lorsqu'elles sont utilisées seules (Argiris et al., 2006; Ernst et al., 2005; Knowling et al., 2006; Leighl et al., 2008), leurs

associations avec certains agents de chimiothérapie ont montré une efficacité clinique très prometteuse (Bendell et al., 2011; Richardson et al., 2011). L'utilisation des MTA tels que le paclitaxel et le docétaxel se voit ainsi optimisée *in vitro* et *in vivo* par les anti-Akt (périfosine et MK-2206), qui augmentent l'activité anticancéreuse des MTA (effets cytotoxiques et pro-apoptotiques) dans les mélanomes et cancers gastriques (Almhanna et al., 2013; Rebecca et al., 2014) et permettent le contournement des phénomènes de résistance notamment dans les cancers ovariens (Fu et al., 2012). Cependant, à l'exception de ces cancers (Sun et al., 2011) [NCT00431054] et très récemment dans le cancer du sein (Gonzalez-Angulo et al., 2015), les associations MTA/anti-Akt n'ont pas encore été évaluées dans les cancers du poumon en accord avec les indications cliniques des MTA. Parmi les anti-Akt en cours de développement, la périfosine, composé de dernière génération, est l'inhibiteur le mieux caractérisé dans le développement préclinique et fait l'objet de deux études de phase III [NCT01002248 et NCT01097018]. Dans les travaux qui suivent, l'efficacité de la périfosine sera évaluée dans différents modèles cellulaires de cancers du poumon non-à-petites cellules en association avec le paclitaxel, MTA de première ligne pour la prise en charge thérapeutique de ces pathologies.

2. Matériels et méthodes

Culture cellulaire

Les lignées cellulaires de carcinome pulmonaire non-à-petites cellules A549 (EGFR^{wt}), H1650 (avec délétion sur l'exon 19 du gène EGFR, *i.e.* DE746-A750), H1975 (EGFR L858R sur l'exon 21 et T790M sur l'exon 20) et HCC827 (DE746-A750 sur l'exon 19); de neuroblastome SK-N-SH (N-myc^{wt}), BE(2)C, BE(2)C/VCR10 et BE(2)C/ADR20 (N-myc amplifié), de carcinome mammaire MDA-MB231 (triple négatif) et de glioblastome U87-MG sont obtenues à partir de l'ATCC (Manassas, VA, USA). Elles sont cultivées dans du milieu RPMI-1640 (A549, H1650, H1975, HCC827, SK-N-SH et MDA-MB231; Invitrogen) ou dans du milieu MEM (U87-MG ; Invitrogen) avec 2 mM de L-glutamine (Lonza, Levallois-Perret, France), 10 % de sérum de veau fœtal (FBS, Lonza), 1 % de pénicilline/streptomycine (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Les cellules A549 EpoB40 sont des cellules résistantes à la patupilone et sont cultivées dans du milieu RPMI-1640 supplémenté avec 40 nM de patupilone (Sigma-Aldrich). Trois lignées cellulaires non cancéreuses sont également utilisées : des kératinocytes (HaCat), des cellules embryonnaires épithéliales de rein (HEK293T) et des fibroblastes (NHDF). Les deux premières lignées sont maintenues dans du milieu DMEM (Invitrogen) avec 10 % FBS, 2 mM de L-glutamine, 1 % de pénicilline/streptomycine et 1 % d'acides aminés non essentiels pour les HEK293T. Les NHDF sont cultivées dans du milieu FBM (Lonza). L'ensemble de ces lignées sont maintenues en routine à 37°C sous 5 % de CO₂.

Réactifs utilisés

La solution de paclitaxel (Novasep synthesis) est préparée dans du dimethyl sulfoxyde (DMSO) tandis que la vincristine (Lilly, Strasbourg, France) est préparée dans de l'eau distillée stérile. Le LY294002, anti-Akt (Life Technologies) est préparé dans le DMSO. La périfosine (octadecyl-(1,1-dimethyl-piperidinio-4-yl)-phosphate) provient de chez Abcam (Cambridge, United-Kingdom) pour les études *in vitro* et de chez Selleckchem (Houston, USA) pour les études *in vivo*. L'inhibiteur de caspases Z-VAD-FMK (Invitrogen) est préparé dans du DMSO et sera utilisé à la concentration de 10 µM en pré-traitement pendant 3h. Chacune de ces préparations sont conservées à -20 °C et fraîchement diluées dans le milieu de culture pour les expérimentations.

Test de cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité reposent sur l'utilisation du MTT comme décrit dans l'article 1. Par la suite, les indices de combinaison (CI) ont été calculés *via* le logiciel Calculusyn software[®] basé sur la méthode de Chou and Talalay comme préalablement décrit dans (Pasquier et al., 2011).

Western Blot et kit pathScan[®]

Les westerns blots ont été réalisés comme décrit dans l'article 1. Les anticorps utilisés ici sont l'α-tubulin (clone DM1A, Sigma Aldrich, 1/1000), phospho-Akt (Ser 473), Akt-total (Cell Signaling, Boston, USA). Le kit pathScan (#7323, Cell Signaling) a été utilisé selon les

recommandations du fournisseur. La révélation s'est faite à l'aide d'un phosphorimager (G-Box, Ozyme).

Immunofluorescence indirecte

Les immunofluorescences ont été réalisées comme décrit dans l'article 1.

Modèle de sphéroïdes 3D

Les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits à fond en U (1000 cellules pour les U97-MG ou 1800 cellules pour les A549) avec du milieu contenant 20 % de méthylcellulose (Invitrogen). Après 48h d'incubation, les cellules ont formé des sphéroïdes de taille uniforme et sont incubées avec les différents traitements (MTA seul, anti-Akt seul ou leur association). Chaque traitement est répété trois fois par semaine pendant 15 jours. Les images sont prises chaque jour avec un microscope Olympus, équipé avec un 10×/N.A. 0,45 objective lens. Par la suite, l'analyse de la croissance des sphéroïdes repose sur l'utilisation d'Alamar blue : 10 µl par puits est incubé pendant 24h. L'absorbance est mesurée à 510-580 nm avec un lecteur de plaques PolarStar (BMG Labtech).

Mesure des espèces réactives de l'oxygène

Les tests de mesure de ROS reposent sur l'utilisation de la sonde WST-1 comme décrit dans l'article 1.

Analyse du cycle cellulaire et détection de l'apoptose

Les tests sur le cycle cellulaire et sur le déclenchement de l'apoptose ont été réalisés comme précédemment décrits dans (Pasquier et al., 2013). Les résultats ont ensuite été analysés *via* le logiciel Flowjo software[®].

Test de migration Transwell[®]

Les tests de migration reposent sur l'utilisation de Transwell[®] (BD Falcon, BD Biosciences, France) comme précédemment décrit dans l'article 1. Les cellules A549 sont incubées avec le traitement pendant 24h tandis que les U87-MG pendant 6h. Au préalable, pour les cellules A549, les Transwells[®] seront coatés avec du milieu RPMI contenant du sérum de veau fœtal pendant 1h à 37°C.

Analyse du métabolisme cellulaire en temps réel

L'analyse simultanée des paramètres métaboliques d'une population cellulaire en culture a été réalisée *via* le Seahorse XF24[®] extracellular flux analyser (Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA). Les cellules A549 sontensemencées dans des plaques XF24 V7 (15 000 cellules par puits). Cinq heures après ensemencement, les cellules sont traitées avec le paclitaxel et/ou la péfifosine et est pré-incubée toute la nuit à 37 °C sous 5 % de CO₂. Le jour suivant, le milieu de culture est remplacé par du milieu spécifique (DMEM sans rouge de phénol, NaCl, 200 mM de glutamine, 100 mM de pyruvate de sodium et 2,5 M de glucose pour le test OXPHOS, pH 7,4 et sans glucose pour le test glycolytique). Puis, la plaque est incubée à 37°C pendant 1h avant de commencer les mesures. OCR (oxygen consumption rate) et ECAR (extracellular acidification rate) sont mesurés avant les injections séquentielles des différents

inhibiteurs : oligomycine 1 μM , FCCP 0,5 μM et roténone/antimycine 0,5 μM pour le test OXPHOS et glucose 10 mM, oligomycine 1 μM et 2-DG 100 mM pour le test glycolytique. Les taux d'OCR et d'ECAR sont ensuite normalisés en fonction du nombre de cellules quantifié par crystal violet après fixation au glutaraldéhyde.

Test de consommation de glucose et de production de lactate

YSI 2900[®] (Life Sciences, Yellow Springs, Ohio, USA) est utilisé pour mesurer les concentrations de glucose et de lactate dans les surnageants. Les cellules A549 sontensemencées dans une plaque 12 puits et 24h après ensemencement, les cellules sont traitées avec du paclitaxel seul, de la périfosine seule ou leur association. De faibles volumes de milieu (500 μl /puits) sont utilisés pour concentrer les surnageants. Aux différents temps étudiés, le milieu de chaque puits est collecté, centrifugé 5 min à 1200 rpm et conservé à -20°C. Pour les mesures, 120 μl de surnageant sont utilisés dans une plaque 96 puits à fond en U. Les concentrations de glucose et de lactate sont ensuite normalisées en fonction du nombre de cellules quantifié par crystal violet après fixation au glutaraldéhyde.

Etude in vivo

Les expériences ont été réalisées sur des souris nude femelle BALB/c âgées de 6 à 8 semaines et obtenues de chez Charles Rivers Laboratories (L'Arbresle, France). Les souris ont accès librement à la nourriture et l'eau et les cages sont conservées dans un lieu dont la température et l'humidité de l'air sont contrôlées selon les recommandations éthiques. Les cellules A549 ont été inoculées en sous-cutané et, par la suite, les différents traitements ont débuté quand le volume tumoral avait atteint 50 mm^3 (jour 0). Deux schémas d'administration ont été testés. Dans le premier, le paclitaxel va être administré en *i.v.* pendant 5 jours consécutifs tandis que dans le second, il sera administré deux fois par semaine. La périfosine, quant à elle, est administrée cinq fois/semaine oralement par gavage. Les doses utilisées correspondent pour chaque molécule au 1/3 et au 2/3 de la dose maximale tolérée soit 10 et 20 mg/kg. L'administration du paclitaxel a été réalisée comme précédemment décrit dans (Savry et al., 2013). La périfosine est dissoute dans du PBS stérile et la solution est conservée à -20°C. Le poids des souris, le volume tumoral et la survie des souris ont été analysés comme précédemment décrits dans (Savry et al., 2013). Dans l'étude pilote, chaque groupe est composé de 5 souris tandis que dans l'étude de survie, 10 souris seront étudiées par lot.

Analyses statistiques

Chaque expérimentation est réalisée au minimum trois fois de façon indépendante. Les résultats sont exprimés avec les moyennes \pm S.E.M. La significativité est testée en utilisant le test de Student ou le test ANOVA. Une différence significative entre deux conditions est acceptée pour * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

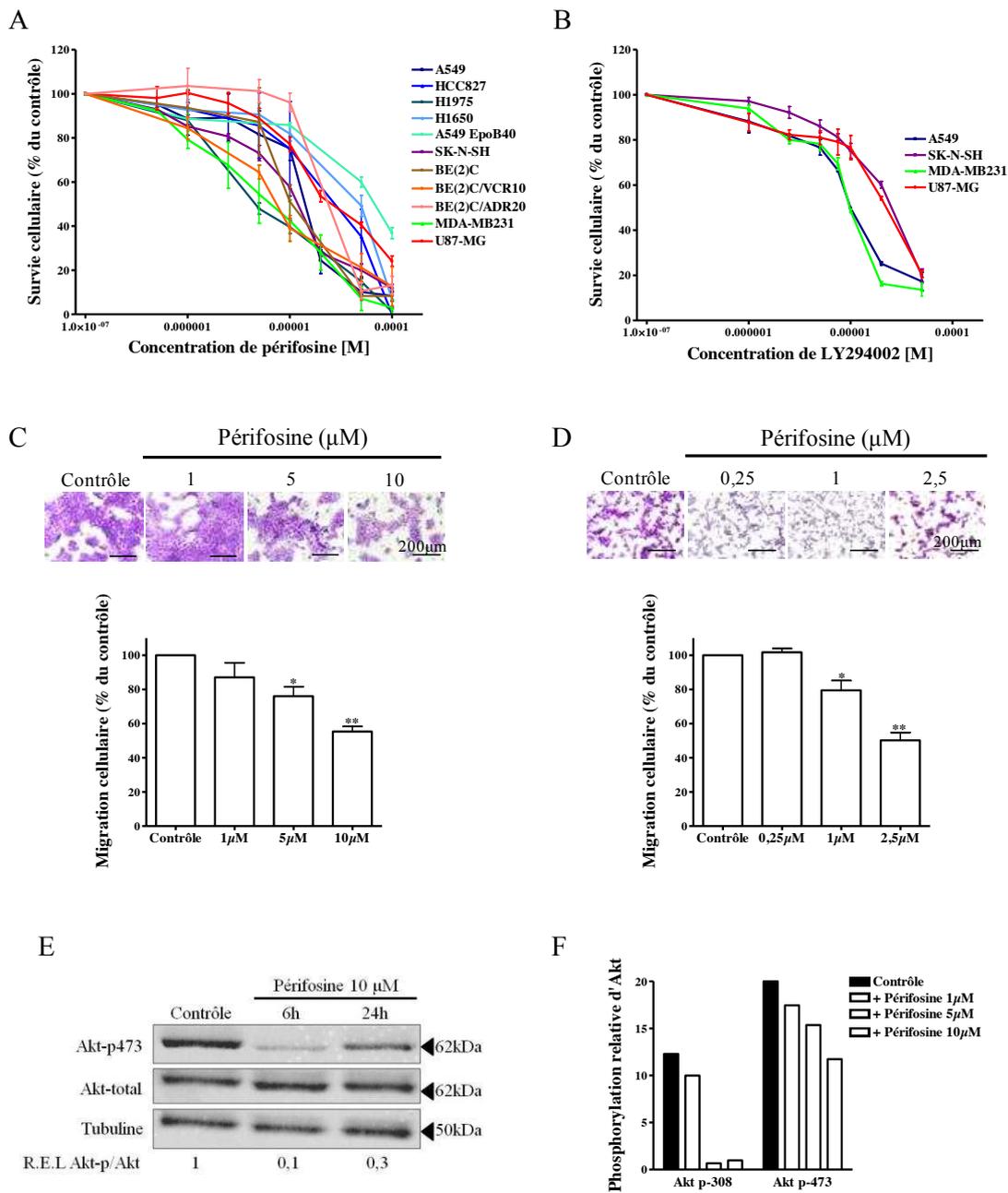


Figure 5 : Propriétés cytotoxique et anti-migratoire des anti-Akt sur différents modèles cellulaires de tumeurs solides. Tests de survie cellulaire mesurée par MTT après traitement pendant 72h d'une gamme de concentrations de perifosine (A) ou de LY294002 (B) dans différentes lignées cellulaires cancéreuses. Images représentatives de la migration des cellules A549 (C) et U87-MG (D) par test Transwell[®]. Quantification de la migration cellulaire en présence de différentes concentrations de perifosine pendant 24h (A549) ou 6h (U87-MG). Analyse par western blot de la phosphorylation d'Akt serine 473 dans les cellules A549 après 6 et 24h de traitement par la perifosine 10 μM (E). Représentation relative de la phosphorylation d'Akt sur les résidus thréonine 308 et serine 473 après 24h de traitement par de la perifosine 1, 5 ou 10 μM . Révélation par pathScan[®] (Cell signaling) (F). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3. Résultats

3.1. Les anti-Akt possèdent des propriétés cytotoxique et anti-migratoire *in vitro* sur différents modèles cellulaires de tumeurs solides

Dans un premier temps, les capacités cytotoxiques de la périfosine et du LY294002 (inhibiteur d'Akt de référence *in vitro*) ont été déterminées sur un panel de 11 lignées cellulaires humaines, comprenant des cellules issues de carcinome pulmonaire non-à-petites cellules (A549, A549 EpoB40, H1650, H1975 et HCC827), de neuroblastome (SK-N-SH, BE(2)C, BE(2)C/VCR10 et BE(2)C/ADR20), de carcinome mammaire (MDA-MB231) et de glioblastome (U87-MG). Nous avons alors observé que la périfosine exerçait un effet dose-dépendant sur la survie cellulaire de l'ensemble des lignées cellulaires testées. En effet, la sensibilité à la périfosine sur les différentes lignées cellulaires varie dans une même gamme de concentrations avec des IC₅₀ allant de $4,8 \pm 0,5$ pour les H1975 à 68 ± 5 μM pour les A549 EpoB40 (**Fig. 5A**). De même, dans des lignées cellulaires représentatives de chaque origine tissulaire des tumeurs testées, le LY294002 possède également des effets cytotoxiques dose-dépendants avec des IC₅₀ similaires à la périfosine allant de $10,7 \pm 2,6$ pour les MDA-MB231 à $40 \pm 3,4$ μM pour les SK-N-SH (**Fig. 5B**). Dans les résultats qui suivront, trois concentrations de périfosine (1, 5 ou 10 μM correspondant à un IC₁₀ jusqu'à un IC₅₀ selon les lignées cellulaires) seront principalement utilisées en association avec le paclitaxel ou la vincristine en accord avec les indications cliniques et/ou les données de la littérature. Par la suite, le potentiel anti-migratoire des anti-Akt a été évalué. Pour cela, différentes concentrations de périfosine ont été testées sur les A549 par test Transwell[®] après 24h de traitement. Comme nous pouvons le voir sur la **figure 5C**, la périfosine engendre un effet anti-migratoire significatif dose-dépendant. La migration cellulaire diminue de 24 ± 6 et de 45 ± 3 % respectivement avec 5 et 10 μM de périfosine. Afin de conforter ces résultats, la même expérience a été réalisée sur cellules U87-MG, le glioblastome étant un type tumoral particulièrement invasif. De façon très intéressante, nous avons pu mettre en évidence un fort potentiel anti-migratoire dose-dépendant de la périfosine et ceci même pour de faibles doses. En effet, 1 et 2,5 μM de périfosine, n'ayant aucun impact cytotoxique, diminuent respectivement de 21 ± 5 et de $50 \pm 4,5$ % la migration cellulaire après 6h de traitement ($p < 0,05$ et $< 0,01$; **Fig. 5D**). Les mêmes résultats ont été obtenus avec le LY294002 (données personnelles). Enfin, nous nous sommes assuré que les anti-Akt inhibaient l'activité de la protéine Akt. Pour cela, par western blot et kit pathScan[®], nous avons pu mettre en évidence la diminution de la phosphorylation d'Akt (reflet de son activité) dès 6h de traitement et de

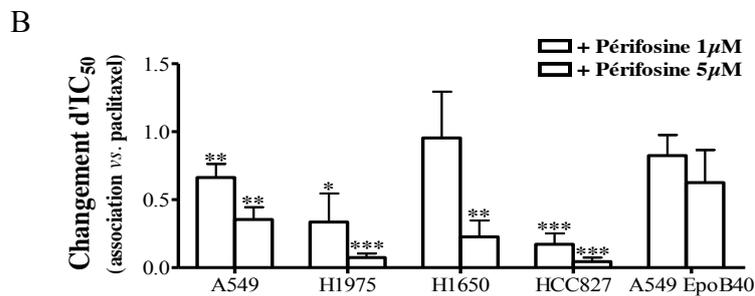
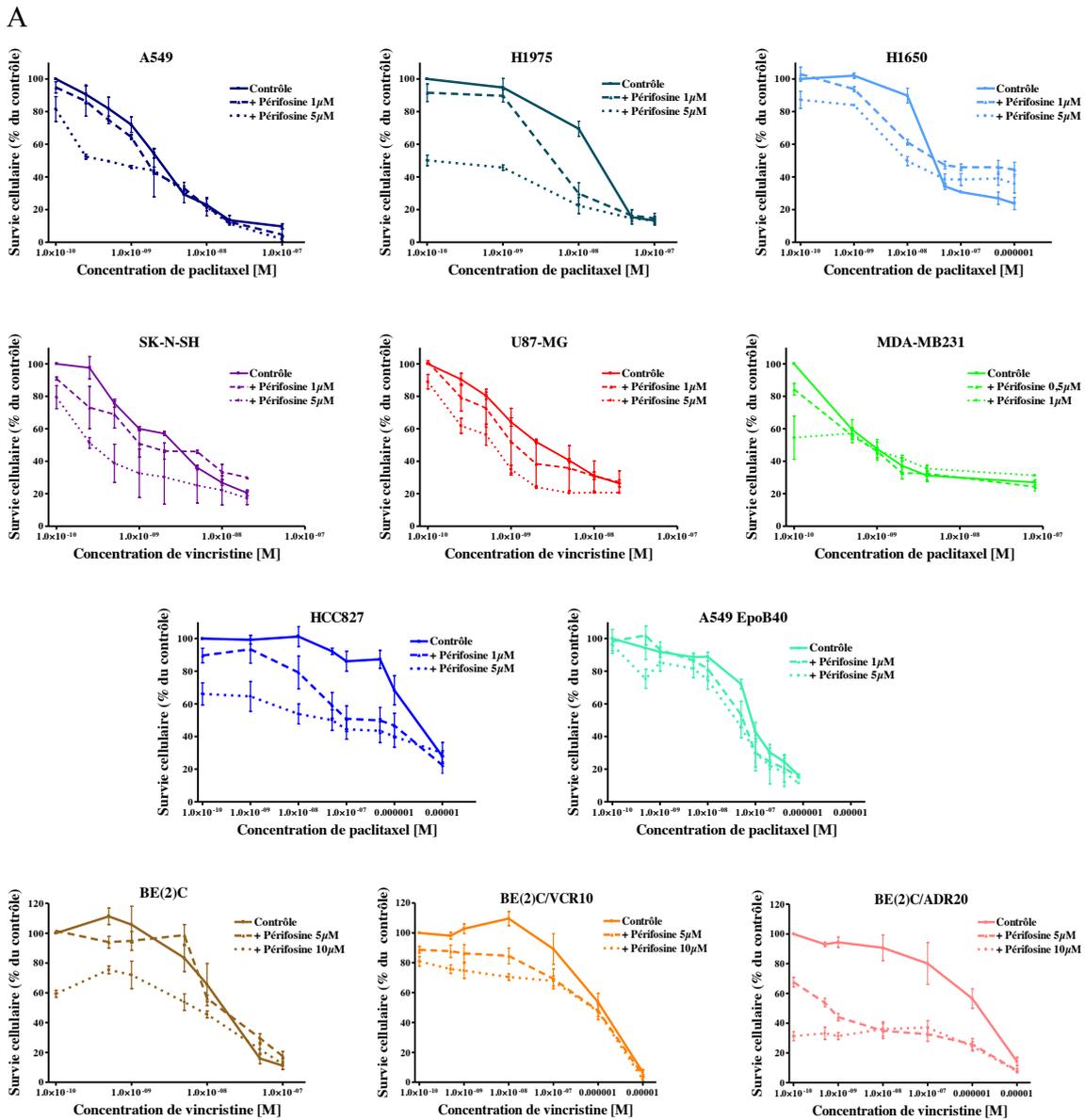


Figure 6 : Augmentation de l'efficacité cytotoxique des MTA par la périfosine dans différents modèles cellulaires de tumeur solide. Tests de survie cellulaire mesurée par MTT après traitement pendant 72h d'une gamme de concentrations de paclitaxel ou vincristine associée à 0,5, 1, 5 ou 10 µM de périfosine dans différentes lignées cellulaires cancéreuses (A). Représentation des changements d' IC_{50} des associations périfosine/paclitaxel par rapport au paclitaxel seul sur les 5 lignées de NSCLC (B). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

façon dose-dépendante avec la périfosine (**Fig. 5E** et **5F**). Les mêmes tendances ont été observées avec le LY294002 et sur la lignée cellulaire U87-MG (données personnelles).

Ainsi en conclusion de ces premiers travaux, nous avons pu mettre en lumière le caractère cytotoxique des anti-Akt dans un large panel de lignées cellulaires cancéreuses humaines et, de façon plus inattendue, leur fort potentiel anti-migratoire.

3.2. Les anti-Akt augmentent l'activité cytotoxique des MTA sélectivement dans les cellules cancéreuses et contournent la résistance *in vitro*

Pour valider l'intérêt des associations thérapeutiques, nous avons évalué dans des cellules A549, préalablement transfectées par un *shRNA*-Akt, l'efficacité du paclitaxel qui se voit alors améliorée d'un facteur 10 nous permettant donc de valider l'ensemble des inhibiteurs d'Akt comme des composés potentialisant les effets des MTA (données personnelles). Par la suite, pour déterminer les capacités des anti-Akt à augmenter les effets cytotoxiques des MTA sur le même panel de cellules cancéreuses, des tests de cytotoxicité MTT ont été réalisés. Nos résultats démontrent que la périfosine accroît les effets cytotoxiques des MTA dans toutes les lignées cellulaires cancéreuses testées (**Fig. 6A**). Cet effet se traduit par une diminution des IC_{50} lorsque les cellules sont traitées avec les associations par rapport à un traitement avec le MTA seul. Par exemple, respectivement dans les A549, H1975 et H1650, le paclitaxel voit ainsi son efficacité augmentée d'un facteur $1,9 \pm 0,2$, $13,4 \pm 0,1$ et $4,4 \pm 0,2$ avec 5 μ M de périfosine ($p < 0,01$ et $p < 0,001$; **Fig. 6B**). Dans le but de caractériser les associations MTA/anti-Akt, les indices de combinaison (CI) ont été calculés pour toutes les concentrations testées *via* le logiciel Calcsyn software[®] basé sur la méthode de Chou et Talalay. De façon intéressante, l'association de 5 μ M de périfosine avec 10 nM de paclitaxel entraîne une synergie dans ces trois lignées d'adénocarcinome pulmonaire (**Tableau 1**). Des résultats similaires ont été obtenus sur les cellules SK-N-SH et U87-MG (**Fig. 6A**) avec des CI démontrant une forte synergie dès l'association de 0,5 nM de vincristine avec 1 ou 5 μ M de périfosine (**Tableau 1** et données personnelles). L'association paclitaxel/périfosine semble plus atténuée pour augmenter les effets cytotoxiques sur les MDA-MB231 mais le calcul des CI révèle tout de même une synergie lors de l'association avec 0,5 μ M de périfosine (**Fig. 6A** et **Tableau 1**). Les mêmes tendances ont pu être observées avec le LY294002 (données personnelles). De façon intéressante, nous avons par la suite mis en évidence l'intérêt d'associer la périfosine aux MTA pour contourner les phénomènes de résistance. En effet, l'association de la périfosine à la vincristine dans des cellules de neuroblastome BE(2)C et ses deux variants résistants à la vincristine montre une augmentation des effets cytotoxiques de la

	MTA			
	0,5 nM	10 nM		
A549	0,189	0,816	5 μ M	Périmfosine
H1975	0,914	0,400		
H1650	3,378	0,100		
HCC827	0,820	0,670		
A549 EpoB40	ND	1,908		
SK-N-SH	0,169	0,677		
BE(2)C	ND	0,546		
BE(2)C/VCR10	0,006	0,040		
BE(2)C/ADR20	ND	0,041		
U87-MG	0,168	0,545		
MDA-MB231	0,258	0,757	0,5 μ M	

Tableau 1 : Représentation des indices de combinaison (CI) de la périmfosine avec les MTA *in vitro* dans différentes lignées cellulaires cancéreuses. Un code couleur est utilisé pour illustrer les différentes interactions : synergique (vert), additif (gris) et antagoniste (rouge). ND : non déterminé car cytotoxicité non significative à ces concentrations.

	Paclitaxel				
	10 nM	50 nM	100 nM		
A549 EpoB40	3,056	0,333	0,313	1 μ M	Périmfosine
	1,908	1,002	0,723	5 μ M	
	1,940	0,738	0,297	10 μ M	

Tableau 2 : Représentation des indices de combinaison (CI) de la périmfosine avec le paclitaxel *in vitro* dans les cellules A549 EpoB40. Un code couleur est utilisé pour illustrer les différentes interactions : synergique (vert), additif (gris) et antagoniste (rouge).

	Paclitaxel			
	0,5 nM	10 nM	50 nM	
NHDF	4,320	1,215	5,041	Périmfosine 5 μ M
HaCat	1,179	0,169	0,927	
HEK293T	11,767	1,199	2,928	

Tableau 3 : Représentation des indices de combinaison (CI) de la périmfosine avec le paclitaxel *in vitro* dans différentes lignées cellulaires non cancéreuses. Un code couleur est utilisé pour illustrer les différentes interactions : synergique (vert), additif (gris) et antagoniste (rouge).

vincristine (**Fig. 6A**). Le calcul des CI indique un fort potentiel synergique dans les cellules BE(2)C/VCR10 et la vincristine voit son efficacité augmentée d'un facteur $5 \pm 0,1$ en association avec $5 \mu\text{M}$ de périfosine (**Tableau 1** et données personnelles). De plus, au cours de ces travaux, nous avons mis en évidence que les cellules HCC827 étaient hautement résistantes au paclitaxel avec un IC_{50} de $2,3 \pm 0,5 \mu\text{M}$ (**Fig. 6A**). En association avec 1 ou $5 \mu\text{M}$ de périfosine, le paclitaxel voit alors ses effets augmentés d'un facteur $5,8 \pm 0,2$ ou $22,5 \pm 0,1$ respectivement ($p < 0,001$; **Fig. 6A** et **6B**). Les mêmes tendances, non significatives, à augmenter l'efficacité du paclitaxel ont été observées dans la lignée cellulaire A549 EpoB40, possédant une résistance croisée au paclitaxel (**Fig. 6A** et **6B**). En effet, si l'association de la périfosine n'induit pas de synergie aux faibles doses de paclitaxel, ces associations deviennent synergiques lorsque les doses de paclitaxel sont augmentées et ceci pour toutes les concentrations de périfosine testées (**Tableau 2**). Enfin, pour évaluer si les effets de ces associations sont spécifiques des cellules cancéreuses, nous avons réalisé le même travail dans trois lignées cellulaires non-cancéreuses d'origine humaine que sont les kératinocytes (HaCat), les cellules embryonnaires épithéliales de rein (HEK293T) ainsi que des cellules de fibroblastes (NHDF). Les valeurs de CI ont été calculées pour l'association de $5 \mu\text{M}$ de périfosine et de façon intéressante, dans la majorité des lignées cellulaires non-cancéreuses testées pour différentes concentrations de paclitaxel, les associations sont définies comme antagonistes (**Tableau 3**). Les mêmes tendances ont été trouvées avec la vincristine (données personnelles).

En conclusion, nos résultats révèlent ici que les anti-Akt entraînent un effet synergique sur la cytotoxicité des MTA de façon sélective sur les lignées cellulaires cancéreuses. De plus, la périfosine semble être en mesure de resensibiliser *in vitro* des cellules résistantes au paclitaxel ou à la vincristine.

3.3. Les anti-Akt potentialisent les effets des MTA dans les sphéroïdes

Afin de valider les effets des associations MTA/anti-Akt observés sur cellules adhérentes, nous avons développé des sphéroïdes, modèle préclinique devenu incontournable. Les sphéroïdes sont non seulement plus représentatifs de l'organisation 3D d'une microtumeur, en prenant en compte les interactions cellules-cellules particulièrement présentes dans les carcinomes, mais permettent également de mieux prédire l'efficacité des traitements *in vivo* puisque les cellules tumorales organisées sous forme de micromasses sont souvent plus résistantes à la chimiothérapie que celles en monocouches.

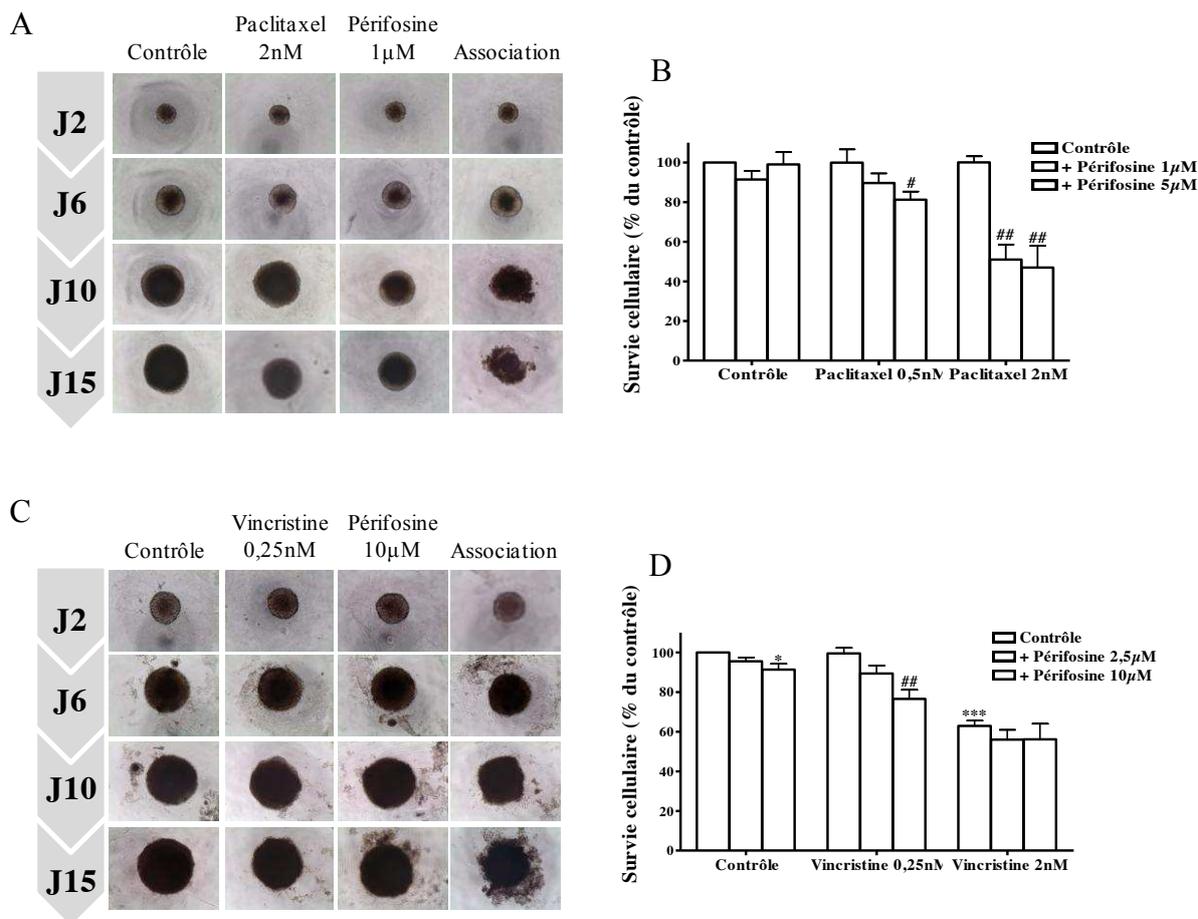


Figure 7 : Potentialisation des effets des MTA par la pérfosine sur des modèles sphéroïdes 3D. Images représentatives des sphéroïdes A549 prises au cours du temps sous l'effet du paclitaxel 2 nM, de la pérfosine 1 μ M ou de leur association (A). Quantification de la survie cellulaire des sphéroïdes par test à l'alar blue réalisé après 15 jours de traitement par le paclitaxel seul, la pérfosine seule ou leur association administré 3 fois/semaine (B). Images représentatives des sphéroïdes U87-MG prises au cours du temps sous l'effet de la vincristine 0,25 nM, de la pérfosine 10 μ M ou de leur association (C). Quantification de la survie cellulaire des sphéroïdes par test à l'alar blue réalisé après 15 jours de traitement par la vincristine seule, la pérfosine seule ou leur association administré 3 fois/semaine (D). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. * vs. contrôle et # vs. MTA seul.

Comme nous pouvons le voir sur la **Figure 7A**, les cellules A549 forment des sphéroïdes après 48h d'ensemencement (J2), qui seront traités trois fois par semaine pendant deux semaines. Pour l'analyse des résultats, nous avons pris le parti de ne pas mesurer le diamètre des sphéroïdes car les traitements altèrent fortement l'organisation 3D des micromasses tumorales. L'impact des molécules seules ou en association a donc été analysé *via* le test d'inhibition de la survie cellulaire utilisant l'Alamar Blue[®]. Dans un premier temps, nous avons pu constater que le paclitaxel utilisé à 0,5 et 2 nM (correspondant à l'IC₁₀ et IC₅₀ sur cellules A549 adhérentes) ne possédait pas d'effet significatif sur la survie cellulaire dans les modèles 3D ($p > 0,05$; **Fig. 7A** et **7B**). De façon intéressante, son association avec la périfosine, à la dose de 5 μ M, également sans effet en tant que telle, diminue le nombre de cellules vivantes dans les sphéroïdes de 19 ± 4 et 53 ± 11 % respectivement ($p < 0,05$ et $0,01$; **Fig. 7B**). De façon encore plus marquée, l'association de la périfosine 1 μ M au paclitaxel 2 nM est apte à réduire de moitié (49 ± 8 %) la survie cellulaire au sein des sphéroïdes ($p < 0,01$; **Fig. 7A** et **7B**). Des résultats similaires ont été observés sur les sphéroïdes formés à partir des cellules de glioblastome U87-MG. La périfosine à la concentration de 10 μ M est capable de potentialiser les effets de la vincristine 0,25 nM en diminuant la survie cellulaire de 23 ± 5 % ($p < 0,01$; **Fig. 7C** et **7D**). Les mêmes tendances ont été observées avec le LY294002 (données personnelles).

L'ensemble de ces résultats obtenus sur sphéroïdes 3D montre donc l'effet potentialisateur des anti-Akt sur l'efficacité des MTA et conforte ceux obtenus sur modèles 2D dans leur capacité à augmenter significativement les effets cytotoxiques des MTA.

3.4. La périfosine, à faible dose, améliore l'efficacité du paclitaxel *in vivo* dans le cancer du poumon

Afin de confirmer le caractère prometteur des stratégies thérapeutiques associant MTA et anti-Akt, nous avons évalué leur efficacité *in vivo*. Des souris femelles BALB/c nude ont ainsi subi des xéno greffes sous-cutanées des cellules cancéreuses humaines A549. Cette étude chez l'animal a pour avantage notable de mettre en jeu des molécules déjà validées par les agences sanitaires (paclitaxel) ou en cours d'essais cliniques de phase III (périfosine), dont les voies d'administration chez l'homme sont déjà connues. Ainsi, le paclitaxel sera administré en intraveineux (*i.v.*) tandis que la périfosine sera administrée oralement (*per os* ; PO), en accord avec leurs indications cliniques, aux doses de 10 mg/kg et 20 mg/kg correspondant au 1/3 et aux 2/3 de la dose maximale tolérée pour ces deux molécules.

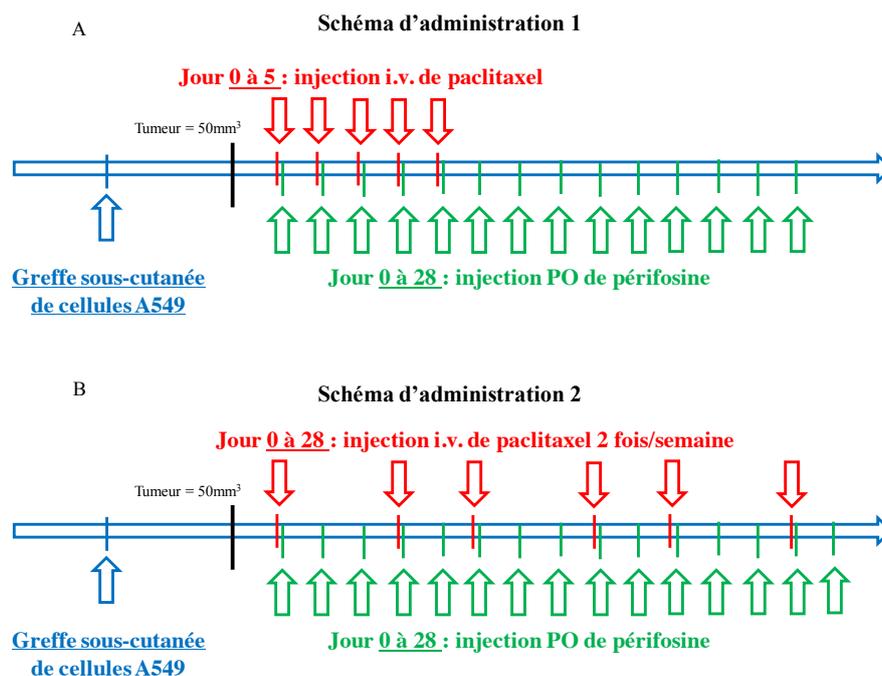


Figure 8 : Représentation des schémas d'administration de l'étude pilote. Dans le schéma d'administration 1, le paclitaxel est administré tous les jours pendant 5 jours consécutifs (A). Dans le schéma d'administration 2, le paclitaxel est délivré 2 fois par semaine pendant toute la durée de l'étude (B). La périfosine est administrée par gavage orale 5 jours/semaine pendant toute la durée de l'étude dans les deux schémas d'administration.

		Inhibition du volume tumoral (% du contrôle)	<i>p</i> value	
Schéma 2	Schéma 1	Paclitaxel 20mg/kg	33 ± 6	*
		Paclitaxel 10 mg/kg	4 ± 1,5	NS
		Périfosine 20 mg/kg	31 ± 7	*
		Périfosine 10 mg/kg	9 ± 1	NS
		Paclitaxel 10 mg/kg	2 ± 1	NS

Tableau 4 : Représentation de l'inhibition du volume tumoral après 32 jours de traitement par du paclitaxel seul ou de la périfosine seule à 10 ou 20 mg/kg dans un modèle de souris nude xéno greffées de cellules A549. NS $p > 0,05$; * $p < 0,05$.

Une étude pilote a tout d'abord été menée afin de déterminer les doses et le schéma d'administration optimaux. Les souris ont reçu le paclitaxel pendant les cinq premiers jours consécutifs (10 ou 20 mg/kg) et/ou la périfosine (10 ou 20 mg/kg) cinq jours/semaine (*cf. schéma A Fig. 8*). En ligne avec l'expertise « chimiothérapie métronomique » (*i.e.* administration répétée de faibles doses) développée dans l'équipe, nous avons également étudié l'administration chronique de paclitaxel (10 mg/kg) à raison de deux fois/semaine sur toute la période d'étude (*cf. schéma B Fig. 8*). Comme le résume le **tableau 4**, le paclitaxel seul ou la périfosine seule à 10 mg/kg ne freinent pas la croissance tumorale ($p > 0,05$), mais la dose de 20 mg/kg témoigne malgré tout de l'efficacité de ces molécules qui réduisent chacune de plus de 30 % la taille de la tumeur ($p < 0,05$). Les faibles doses de paclitaxel et de périfosine révèlent en revanche tout leur potentiel anti-cancéreux lorsque les agents sont associés, puisqu'ils concourent à une diminution du volume tumoral de 64 ± 3 % selon le schéma d'administration 1 et de 65 ± 1 % selon le schéma d'administration 2 après 32 jours de traitement (**Fig. 9A et 9B**). Les trois autres conditions de traitements évaluées, incluant l'une des molécules ou les deux à 20 mg/kg, confirment l'intérêt thérapeutique de telles associations mais révèlent de façon inattendue leur moindre efficacité par rapport aux faibles doses (**Fig. 9C-E**). De plus, le suivi du poids des souris indique que le panel de traitements a été bien toléré, exception faite du paclitaxel à 20 mg/kg qui, en association avec la périfosine (10 ou 20 mg/kg) dans le schéma 1, a provoqué une perte importante de poids dans les premiers jours de traitement (**Fig. 9C et 9D**). Cette étude pilote permet donc de guider la suite des expérimentations *in vivo* vers l'utilisation du paclitaxel et de la périfosine à 10 mg/kg, pour gagner à la fois en efficacité et en tolérance. Par ailleurs, ces agents à faibles doses ayant fait preuve de la même activité anticancéreuse élevée qu'ils aient suivi le schéma de traitement 1 ou 2, nous avons sélectionné le 2^{ème} rythme d'administration sur la base du nombre croissant de données témoignant ces derniers temps d'un meilleur rapport bénéfices/risques sur le long terme des schémas d'administration métronomique. Nous avons alors réalisé une étude de survie, sur un plus grand nombre de souris par lot ($n=10$), afin de définitivement confirmer l'intérêt de l'association de ces faibles doses de paclitaxel et de périfosine dans la prise en charge du cancer du poumon non-à-petites cellules. En accord avec les mesures des volumes tumoraux, le paclitaxel et la périfosine administrés seuls (10 mg/kg) n'entraînent aucun bénéfice en terme de survie par rapport au groupe témoin, la médiane de survie restant entre 40 et 42 jours (**Fig. 10A**; $p > 0,05$). De façon remarquable, les souris ayant reçu l'association paclitaxel/périfosine voient leur survie fortement augmentée, avec une médiane à 63,5 jours ($p > 0,0001$) et une souris restant vivante jusqu'au 82^{ème} jour alors que

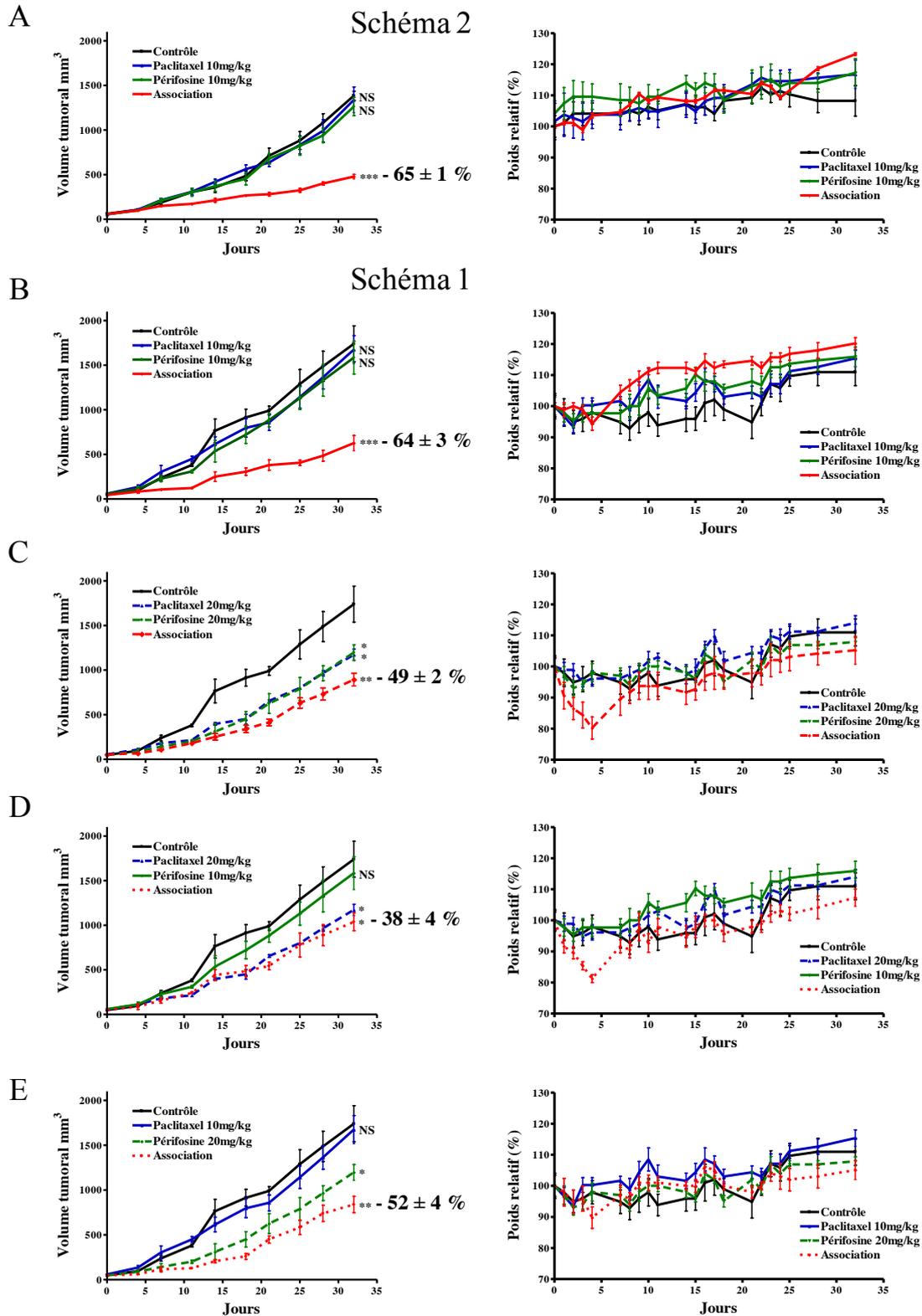


Figure 9 : Etude des différentes associations paclitaxel/pérfosine sur souris nude xéngreffées avec des cellules A549. Représentation des volumes tumoraux et du poids des souris au cours du temps après traitement par : 10 mg/kg de paclitaxel et de pérfosine selon le schéma 2 (A), 10 mg/kg de paclitaxel et de pérfosine selon le schéma 1 (B), 20 mg/kg de paclitaxel et de pérfosine selon le schéma 1 (C), 20 mg/kg de paclitaxel et 10 mg/kg de pérfosine selon le schéma 1 (D) et 10 mg/kg de paclitaxel et 20 mg/kg de pérfosine selon le schéma 1 (E). NS $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

toutes sont mortes avant le 50^{ème} jour dans les conditions contrôle et monothérapies (**Fig. 10A**). Enfin, au terme de l'expérience, l'exérèse des masses tumorales a montré une forte diminution de leur taille, confortant les données issues de l'étude pilote (**Fig. 10B**).

Ainsi, l'ensemble de nos résultats *in vitro* (2D et 3D) et *in vivo* s'accordent pour mettre en avant la forte activité cytotoxique du paclitaxel associé à la périfosine, sélectivement dans les cellules cancéreuses, et notamment dans des cas de cancers du poumon non-à-petites cellules. La suite de nos travaux s'attachera à décortiquer le mécanisme d'action d'une telle association à visée thérapeutique, pour mieux comprendre les bases moléculaires sous-jacentes à la potentialisation (voire à la synergie).

3.5. La périfosine augmente les effets pro-apoptotiques des MTA

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action mis en jeu par les associations MTA/anti-Akt lors de l'inhibition de la croissance des populations de cellules tumorales, nous avons d'abord quantifié les cellules d'adénocarcinome pulmonaire A549 mortes par marquage à l'annexine V-FITC/PI en cytométrie en flux. Comme nous pouvons le voir sur la **Figure 11A**, après 48h de traitement, les concentrations de périfosine seule à 1 et 5 μM n'entraînent pas d'augmentation significative de la mort cellulaire ($p > 0,05$). En revanche, leur association avec le paclitaxel 0,5 nM confère à ce dernier une activité pro-apoptotique ($p < 0,05$; **Fig. 11A**). Ces mêmes concentrations de périfosine montrent par ailleurs leur capacité à potentialiser l'induction de mort cellulaire par le paclitaxel 2 nM, comme en témoigne l'augmentation du nombre de cellules marquées A+, PI+ et A+/PI+ de 21 ± 2 % pour le paclitaxel seul à 40 ± 2 % pour les associations. Par la suite, pour définitivement impliquer le processus apoptotique dans le mécanisme de mort cellulaire induite par les associations MTA/anti-Akt, nous avons déterminé l'implication des caspases dans l'efficacité du traitement. Les cellules A549 ont ainsi été pré-traitées avec un pan-inhibiteur de caspases (Z-VAD-FMK à 10 μM) 3h avant le traitement par le paclitaxel, la périfosine ou leur association. Tout d'abord, nous avons observé que le Z-VAD-FMK prévient la mort cellulaire engendrée par les concentrations cytotoxiques de paclitaxel (2 nM) et de périfosine (10 μM), indiquant que ces deux agents déclenchent le programme de mort apoptotique ($p < 0,001$ et $p < 0,05$; **Fig. 11B**). De la même façon, l'inhibition des caspases protège les cellules des effets cytotoxiques des associations paclitaxel/périfosine, quelles que soient les concentrations testées. Par exemple, le pré-traitement au Z-VAD-FMK réduit les effets de l'association périfosine 1 μM /paclitaxel 2 nM sur la survie cellulaire de 56 ± 2 à 14 ± 2 % ($p < 0,001$; **Fig. 11B**). L'analyse PathScan[®] a

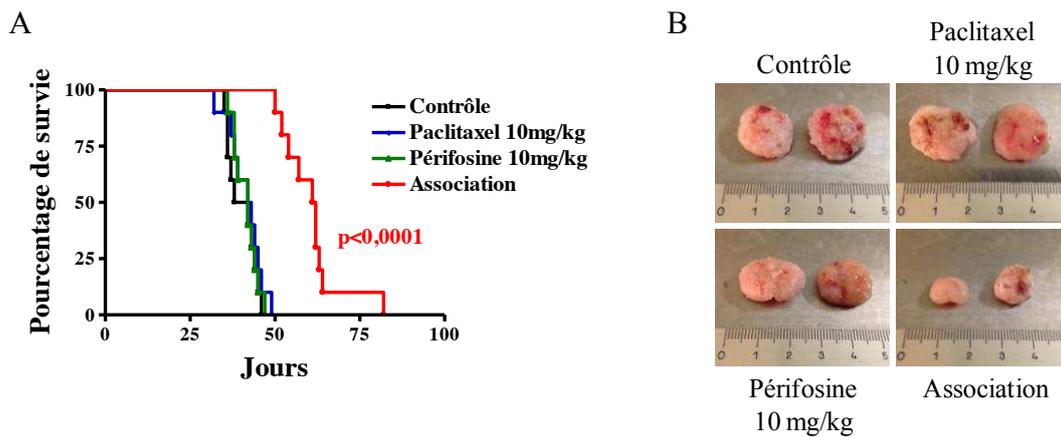


Figure 10 : Etude de survie sur souris nude xéno greffées avec des cellules A549. Courbe de survie selon la représentation de Kaplan-Meier ; J0 correspondant au premier jour de traitement (A). Photos représentatives des volumes tumoraux sans traitement ou après administration de 10 mg/kg de paclitaxel, 10 mg/kg de pèrifosine ou de leur association (B).

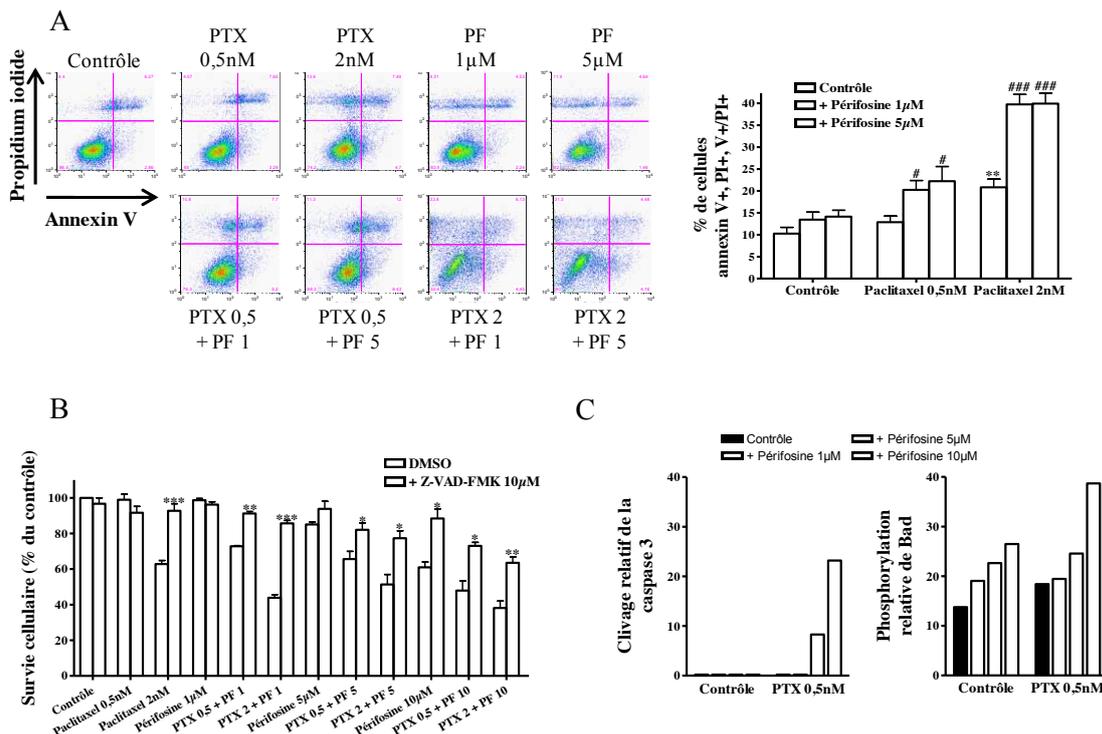


Figure 11 : Augmentation des effets pro-apoptotiques du paclitaxel par la pèrifosine sur cellules A549. Cytogrammes représentatifs du marquage cellulaire annexin V/PI après 48h de traitement par du paclitaxel seul, de la pèrifosine seule ou de leur association. Quantification des cellules marquées annexin V+ et/ou PI+ après 48h de traitement (A). Tests de survie cellulaire mesurée par MTT après traitement par du paclitaxel seul, de la pèrifosine seule ou de leur association pendant 72h plus ou moins précédé par 3h de pré-traitement par 10 μ M de Z-VAD-FMK (B). Représentation relative du clivage de la caspase 3 et de la phosphorylation de Bad après 24h de traitement par du paclitaxel 0,5 nM et/ou de la pèrifosine à 1, 5 ou 10 μ M. Révélation par pathScan® (Cell signaling) (C). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. * vs. contrôle et # vs. paclitaxel seul.

permis de confirmer l'implication de l'apoptose *via* les caspases dans l'efficacité des associations comme le reflète le clivage de la caspase 3 uniquement présente dans les associations entre le paclitaxel 0,5 nM et la périfosine 5 ou 10 μ M après 24h de traitement (**Fig. 11C**, graphique de gauche) ainsi que l'augmentation de la phosphorylation activatrice de Bad sous l'effet du paclitaxel 0,5nM avec la périfosine 10 μ M (**Fig. 11C**, graphique de droite). Ces résultats indiquent donc que l'association paclitaxel/périfosine induit la mort cellulaire dans les cellules A549 *via* la voie apoptotique dépendante des caspases.

3.6. La périfosine n'accentue pas les propriétés anti-mitotiques des MTA

Etant donné le pouvoir anti-mitotique bien connu des MTA, nous avons réalisé un suivi du cycle cellulaire des A549 par cytométrie en flux après 24h de traitement. Comme nous pouvons le constater dans la **Figure 12**, seule l'IC₅₀ du paclitaxel (2 nM) et la forte dose de 20 nM induisent un blocage en G2/M ($p < 0,01$), tandis que la périfosine ne modifie aucune des phases du cycle cellulaire même à forte concentration (20 μ M). L'analyse des associations paclitaxel/périfosine sur les phases du cycle cellulaire indique par ailleurs que l'anti-Akt ne module en rien les effets médiés par le MTA, et ce quelles que soient les associations testées ($p > 0,05$; **Fig. 12**). Les mêmes résultats ont été observés après 16h de traitement (données personnelles). Ces données nous permettent donc de conclure que l'efficacité du paclitaxel, lorsqu'il est associé à la périfosine, ne dépend pas d'une perturbation accrue de la progression du cycle cellulaire.

3.7. Les associations MTA/anti-Akt présentent un haut potentiel anti-migratoire

Forts de nos premiers résultats montrant les capacités des anti-Akt à inhiber la migration cellulaire en Transwell® (*cf. Fig. 5*), nous avons également mesuré le potentiel anti-migratoire des associations MTA/périfosine. En concordance avec les précédents travaux réalisés au sein du laboratoire, 24h d'exposition au paclitaxel 0,5 et 2 nM réduisent respectivement de 22 ± 1 % ($p < 0,01$) et 53 ± 2 % ($p < 0,001$) le nombre de cellules A549 ayant migré (**Fig. 13A et 13B**). Associé à la périfosine 1 μ M – dépourvue de toute activité anti-migratoire à cette concentration – les propriétés anti-migratoires du paclitaxel 0,5 nM sont doublées ; l'association supprime alors la migration cellulaire de 47 ± 6 % ($p < 0,05$; **Fig. 13B**). Les autres concentrations testées confortent la plus grande suppression du potentiel migratoire cellulaire lorsque les agents sont utilisés en association *versus* seuls. De la même façon, nous avons pu quantifier une augmentation significative des effets anti-migratoires de la vincristine par

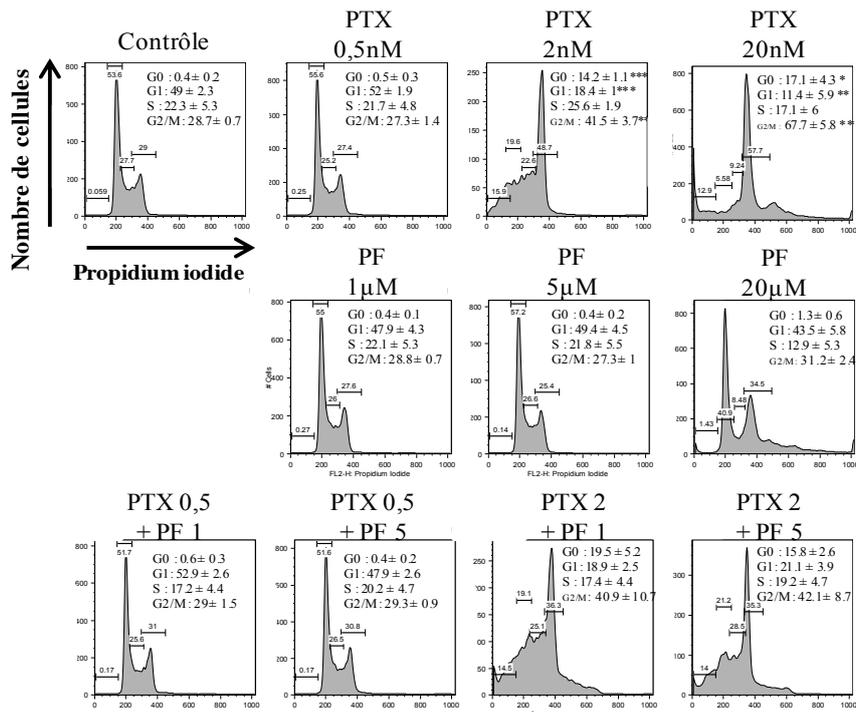


Figure 12 : Absence de modulation de la périfosine sur le blocage en G2/M médié par le paclitaxel sur cellules A549. Cytogrammes représentatifs des profils du cycle cellulaire après 24h de traitement par du paclitaxel seul, de la périfosine seule ou de leur association.

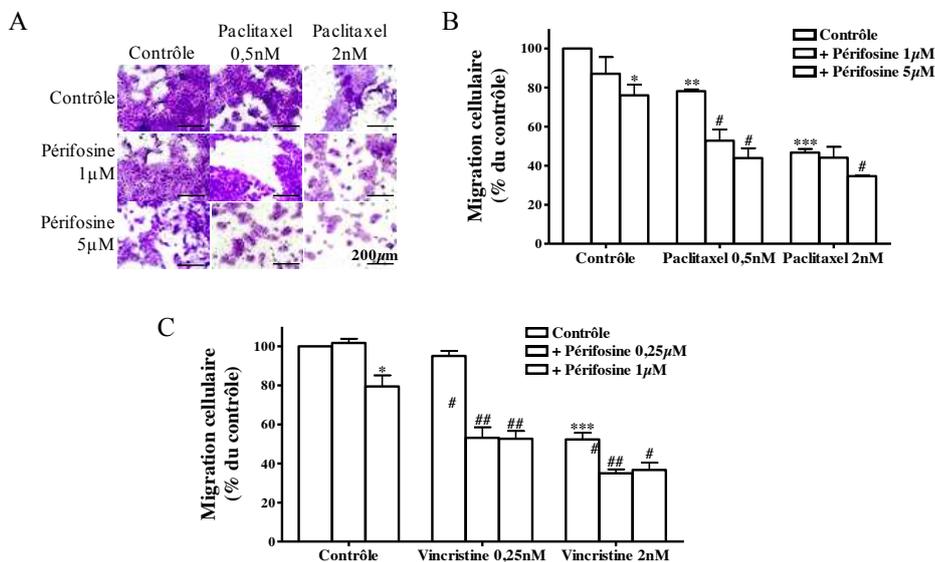


Figure 13 : Potentialisation des effets anti-migratoires des MTA par la périfosine. Images représentatives de la migration cellulaire par test Transwell® sur cellules A549 (A). Quantification de la migration cellulaire en présence de paclitaxel seul, de périfosine seule ou de leur association pendant 24h sur cellules A549 (B). Quantification de la migration cellulaire en présence de vincristine seule, de périfosine seule ou de leur association pendant 6h sur cellules U87-MG (C). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. * vs. contrôle et # vs. MTA seul.

association avec la périfosine sur les cellules U87-MG (**Fig. 13C**). Les mêmes tendances ont été observées avec le LY294002 (données personnelles).

Ainsi, notre étude révèle que les associations MTA/anti-Akt ont une efficacité anticancéreuse qui repose à la fois sur des activités pro-apoptotique et anti-migratoire accrue.

3.8. L'association paclitaxel/périfosine inhibe le métabolisme énergétique en altérant le processus glycolytique et la phosphorylation oxydative

Ces dernières années, la kinase Akt s'est vue attribuée une nouvelle fonction : celle d'inducteur de la glycolyse. Dans ce contexte, pour mieux déchiffrer le mécanisme d'action des associations MTA/anti-Akt, nous avons étudié l'impact des différents traitements sur le métabolisme énergétique des A549. La cellule puise l'essentiel de son apport énergétique dans la dégradation du glucose, substrat dont nous avons d'abord mesuré la consommation au cours du temps à l'aide de l'appareil YSI 2900[®]. Cette analyse cinétique a mis en évidence que le paclitaxel à forte concentration (20 nM) entraînait un ralentissement de la consommation de glucose, comme en témoigne l'augmentation de sa concentration dans le milieu de culture de 28 ± 3 % après 12h de traitement ($p < 0,05$) à plus d'un facteur 7 après 48h ($p < 0,01$; **Figure 14A**). La même tendance est observée aux plus faibles concentrations de paclitaxel (0,5 et 2 nM), sans toutefois être significativement différente du contrôle. La périfosine 10 μ M montre elle aussi des capacités à diminuer la consommation de glucose (-30 ± 7 % à 24h). Le résultat le plus notable reste néanmoins celui obtenu pour les associations paclitaxel/périfosine, dont l'effet réducteur de la consommation du glucose au cours du temps est significatif dès 12h quelle que soit la dose considérée (**Figure 14A**, histogramme de droite) De façon intéressante, et en accord avec l'ensemble des résultats de cette étude, l'association de ces agents à des concentrations n'ayant aucun effet en tant que telles s'avère être une stratégie hautement efficace pour diminuer durablement la consommation de glucose. Elle baisse ainsi de 27 ± 6 % dès 12h ($p < 0,01$) et atteint -78 ± 2 % à 48h ($p < 0,001$) sous l'effet du traitement associant 0,5 nM de paclitaxel à 1 μ M de périfosine.

Afin de déterminer si ces modulations dans la vitesse de consommation du glucose sont liées à un impact des composés sur la glycolyse cellulaire, nous avons ensuite étudié leurs effets sur la production du lactate. Si le paclitaxel ne provoque pas de diminution significative de la concentration de ce produit final glycolytique, les différentes concentrations de périfosine évaluées inhibent la production du lactate à 36h et 48h de traitement ($p < 0,05$; **Fig. 14B**). Ces résultats suggèrent fortement que l'anti-Akt ait des propriétés anti-glycolytiques dans les cellules de carcinome pulmonaire. Les associations se voient quant à elles capables d'inhiber

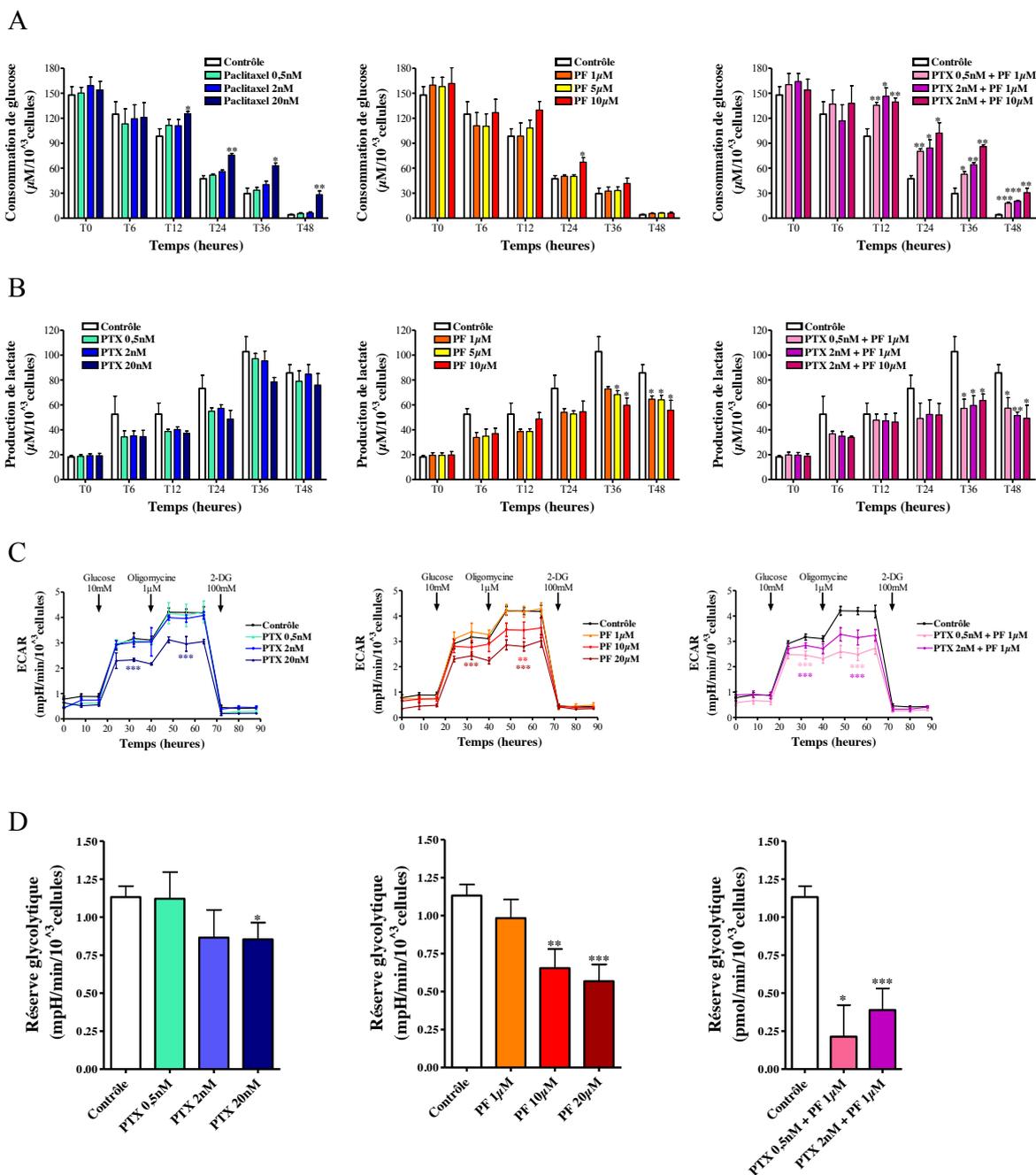


Figure 14 : Potentialisation des effets anti-glycolytiques de la pèrifosine par le paclitaxel dans les cellules A549. Cinétique de la consommation de glucose mesurée au YSI 2900® après traitement par du paclitaxel seul, de la pèrifosine seule ou de leur association (A). Cinétique de la production de lactate mesurée au YSI 2900® après traitement par du paclitaxel seul, de la pèrifosine seule ou de leur association (B). Analyses en temps réel au Seahorse® du niveau d'acidification extracellulaire (ECAR) après 24h de traitement par du paclitaxel seul, de la pèrifosine seule ou de leur association (C). Quantification de la réserve glycolytique (*Soustraction entre la valeur de l'ECAR après ajout de l'oligomycine et celle après ajout de glucose*) après 24h de traitement par du paclitaxel seul, de la pèrifosine seule ou de leur association (D). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

significativement la production de lactate dans la même période de temps, y compris pour des concentrations de paclitaxel (0,5 nM) et de périfosine (1 μ M) inactives sur le processus glycolytique lorsque utilisées seules (**Fig. 14B**, histogramme de droite).

Pour approfondir cette étude du métabolisme énergétique, nous avons réalisé une analyse en temps réel de la production de protons par la technologie Seahorse XF[®]. Après 24h de traitement, les mesures de l'ECAR (*extracellular acidification rate*) montrent que seule la forte concentration de paclitaxel (20 nM) entraîne une diminution significative du processus glycolytique (**Fig. 14C** et **14D**). La périfosine réduit l'excrétion extracellulaire des protons de façon dose-dépendante, comme en témoignent à la fois la diminution de l'ECAR de base (après ajout du glucose ; **Fig. 14C**) et la diminution de la réserve glycolytique de 43 ± 11 % ($p < 0,01$) et 51 ± 10 % ($p < 0,001$) pour 10 et 20 μ M respectivement (**Fig. 14D**). Ces résultats confortent ainsi les propriétés d'inhibiteur de la glycolyse de la périfosine, révélées précédemment par le suivi du lactate. En accord également avec les données issues de l'YSI 2900[®], les mesures des variations de l'ECAR sous l'effet des associations paclitaxel/périfosine mettent clairement en évidence leur fort potentiel à inhiber la glycolyse (**Fig. 14C**, courbes de droite). L'association des plus faibles doses (paclitaxel 0,5 nM + périfosine 1 μ M), inactives en tant que telles, réduit ainsi de 40 ± 5 % le fonctionnement glycolytique de base ($p < 0,001$; **Fig. 14C**) et de 81 ± 19 % la réserve glycolytique des cellules A549 ($p < 0,05$; **Fig. 14D**). Il est important de noter ici que l'association de ces très faibles concentrations semble la meilleure stratégie en terme d'efficacité anti-glycolytique, puisque l'augmentation de la dose de paclitaxel à 2 nM (**Fig. 14C** et **14D**) ou de périfosine à 10 μ M (données personnelles) ne procure aucun bénéfice.

Les mêmes conditions de traitement ont ensuite été évaluées sur l'OCR (*oxygen consumption rate*), reflet de la respiration cellulaire mitochondriale. De façon intéressante, le paclitaxel affecte de façon dose-dépendante l'ensemble des fonctions mitochondriales évaluées ; la forte concentration (20 nM) réduisant de plus de moitié la respiration basale, la production d'ATP et la capacité respiratoire ($p < 0,001$; **Fig. 15A** et **15B**). Si la périfosine ne module pas l'OCR de base (**Fig. 15A**), elle semble apte à augmenter la production d'ATP à forte concentration (20 μ M) et la capacité respiratoire des cellules d'un facteur $1,4 \pm 0,4$ et $2,1 \pm 0,6$ aux plus faibles concentrations (1 et 10 μ M) (**Fig. 15B**). Cet effet inattendu pourrait être une conséquence rapide de l'inhibition de la glycolyse par l'anti-Akt, redirigeant l'énergétique cellulaire vers la phosphorylation oxydative. Son association avec le paclitaxel, aux propriétés anti-mitochondriales, est donc d'autant plus justifiée et montre d'ailleurs tout son intérêt par mesure de l'OCR (**Fig. 15A**, courbes de droite). En effet, les associations de 0,5 nM et 2 nM

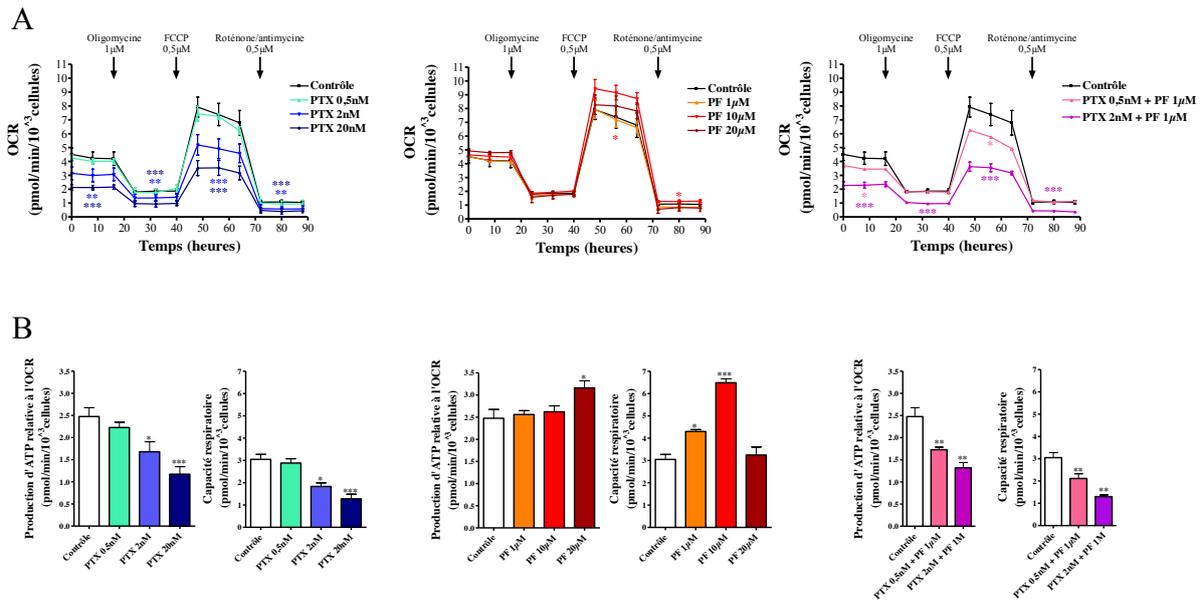


Figure 15 : Potentialisation des effets anti-mitochondriaux du paclitaxel par la périfosine dans les cellules A549. Analyses en temps réel au Seahorse® du niveau de consommation d'oxygène (OCR) après 24h de traitement par du paclitaxel seul, de la périfosine seule ou de leur association (A). Quantification de la production relative d'ATP (*Soustraction entre la valeur de l'OCR basal et celle après ajout d'oligomycine*) et de la capacité respiratoire cellulaire (*Soustraction entre la valeur de l'OCR après ajout de FCCP et celle du niveau basal*) après 24h de traitement par du paclitaxel seul, de la périfosine seule ou de leur association (B). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

de paclitaxel avec 1 μ M de périfosine réduisent significativement de $28 \pm 3 \%$ et de $50 \pm 2 \%$ la respiration cellulaire de base, de $30 \pm 2 \%$ et $47 \pm 5 \%$ la production d'ATP et de $30 \pm 5 \%$ et $57 \pm 2 \%$ la capacité respiratoire (**Fig. 15A** et **15B**).

En conclusion, l'ensemble de nos données révèle, d'une part, le pouvoir inhibiteur des fonctions mitochondriales du paclitaxel et, d'autre part, le potentiel anti-glycolytique de la périfosine. Ces travaux mettent également en lumière les effets potentialisateurs des associations paclitaxel/périfosine sur l'ensemble des paramètres métaboliques énergétiques testés ici. Comme discuté dans la partie qui suit, ce fort impact des associations sur le métabolisme énergétique pourrait être, au moins en partie, à l'origine de leurs effets pro-apoptotique et anti-migratoire, et ainsi concourir à l'efficacité notable du traitement.

4. Discussion

La présente étude fournit les bases d'un rationnel thérapeutique à l'utilisation des associations MTA/anti-Akt dans le cancer du poumon non-à-petites cellules. Nous avons notamment démontré que la périfosine augmentait l'efficacité du paclitaxel de façon synergique et sélective des cellules tumorales. Ces résultats ont également été confortés sur sphéroïdes, modèles plus proches de la réelle architecture tumorale, ainsi que sur xénogreffes *in vivo*. D'un point de vue mécanistique, nos résultats montrent que l'association MTA/anti-Akt possède une activité pro-apoptotique et anti-migratoire significative. Enfin, nos travaux révèlent l'impact du traitement sur le métabolisme énergétique, la périfosine potentialisant les effets anti-mitochondriaux du paclitaxel et le paclitaxel potentialisant les effets anti-glycolytiques de la périfosine.

• Anti-Akt et associations thérapeutiques : où en sommes-nous ?

Les anti-Akt ont vu leur développement exploser ces dernières années. Les premières études réalisées avec les anti-Akt utilisés seuls n'ont pas été à la hauteur des espoirs fondés, en raison de leur manque d'efficacité et de leur toxicité principalement (Argiris et al., 2006; Ernst et al., 2005; Knowling et al., 2006; Leighl et al., 2008). La périfosine, composé de troisième génération, administrée oralement, représente la molécule la plus avancée en clinique. Après avoir démontré son potentiel cytotoxique dans des lignées cellulaires issues de cancers solides d'origines tissulaires différentes (poumon, neuroblastome, sein, glioblastome), notre étude sur souris nude porteuses de xénogreffes de cellules d'adénocarcinome pulmonaire a montré que la périfosine inhibait la croissance tumorale. De façon similaire, l'activité anti-tumorale de la périfosine avait précédemment été montrée *in vivo* dans les myélomes multiples et le neuroblastome (Hideshima et al., 2006; Li et al., 2010).

La communauté scientifique s'accorde finalement sur le fait que les anti-Akt présentent une efficacité clinique très prometteuse lorsqu'ils sont associés à d'autres protocoles thérapeutiques. Par exemple, l'utilisation de la périfosine en concomitance avec la radiothérapie a montré un gain d'efficacité – par rapport à la radiothérapie seule – dans les cancers de la peau, de la prostate et dans les glioblastomes (Gao et al., 2011; de la Peña et al., 2006; Vink et al., 2006). L'administration d'agents de chimiothérapie conventionnelle se voit également optimisée *in vitro* et *in vivo* par la périfosine et le MK-2206 ; c'est le cas de l'étoposide ou de la cytarabine dans les leucémies (Lu et al., 2015b; Nyåkern et al., 2006) et de la gemcitabine dans les cancers pancréatiques (Xin et al., 2014). La périfosine fait

également l'objet d'études de phase III en association avec le bortezomib et la dexaméthasone dans les myélomes multiples [NCT01002248 ; terminé en attente des résultats] et avec la capécitabine dans les cancers colorectaux avancés [NCT01097018]. Les Taxanes (paclitaxel et docétaxel) ont également été associés *in vitro* avec les anti-Akt, notamment dans les cancers gastriques et les mélanomes (Almhanna et al., 2013; Rebecca et al., 2014), ainsi que dans des phases I d'essais cliniques chez des patients atteints de tumeurs réfractaires [NCT00399087 ; NCT00399126 ; NCT0039912]. De plus, leur efficacité s'est vue améliorée par la périfosine dans les cancers ovariens (Sun et al., 2011) [NCT00431054] et très récemment par le MK-2206 dans les cancers du sein métastatiques (Gonzalez-Angulo et al., 2015). Notre étude a montré la potentialisation des effets du paclitaxel par la périfosine dans des cancers du poumon non-à-petites cellules, allongeant la liste des cancers qui pourraient bénéficier de ces nouvelles associations. Pour la première fois, nos travaux montrent que la périfosine serait également apte à augmenter les effets de la vincristine dans des cancers solides tels que le neuroblastome, en accord avec les indications premières du MTA en clinique, ou le glioblastome, dans lesquels l'utilisation des *Vinca*-alcaloïdes a récemment été proposée *in vitro* et *in vivo* (Berges et al., 2014). Les anti-Akt semblent donc promis à un bel avenir clinique dans différents protocoles thérapeutiques, y compris dans ceux incluant les MTA en première intention.

- **Associations MTA/anti-Akt : quels acteurs mis en jeu ?**

D'un point de vue mécanistique, de précédents travaux avaient rapporté que la périfosine induisait l'**apoptose** par un phénomène caspase-dépendant dans des cellules cancéreuses pulmonaires (Elrod et al., 2007) et *via* un processus caspase-indépendant dans des cellules cancéreuses de l'endomètre ou de la prostate (Engel et al., 2011; Floryk and Thompson, 2008). Ici, nous avons pu mettre en évidence que la périfosine déclenche un programme de mort cellulaire dépendant des caspases, et qu'elle augmente les propriétés pro-apoptotiques des MTA dans les cellules de carcinome pulmonaire. Ces effets ne sont pas surprenants, au regard des activités pro-survie de la kinase Akt capable de moduler de nombreux acteurs de l'apoptose et facteurs de transcription (Stiles, 2009). Pour ne prendre qu'un exemple, les anti-Akt permettent très probablement de lever l'inhibition médiée par Akt sur la caspase 9 (*cf. Rappels bibliographiques* Figure 34), et puisque cette même caspase est largement décrite comme activée sous l'effet des MTA par déclenchement de la voie apoptotique mitochondriale (Estève et al., 2007), l'hypothèse que l'association MTA/anti-Akt concoure à l'activation synergique de la caspase 9 est fortement plausible.

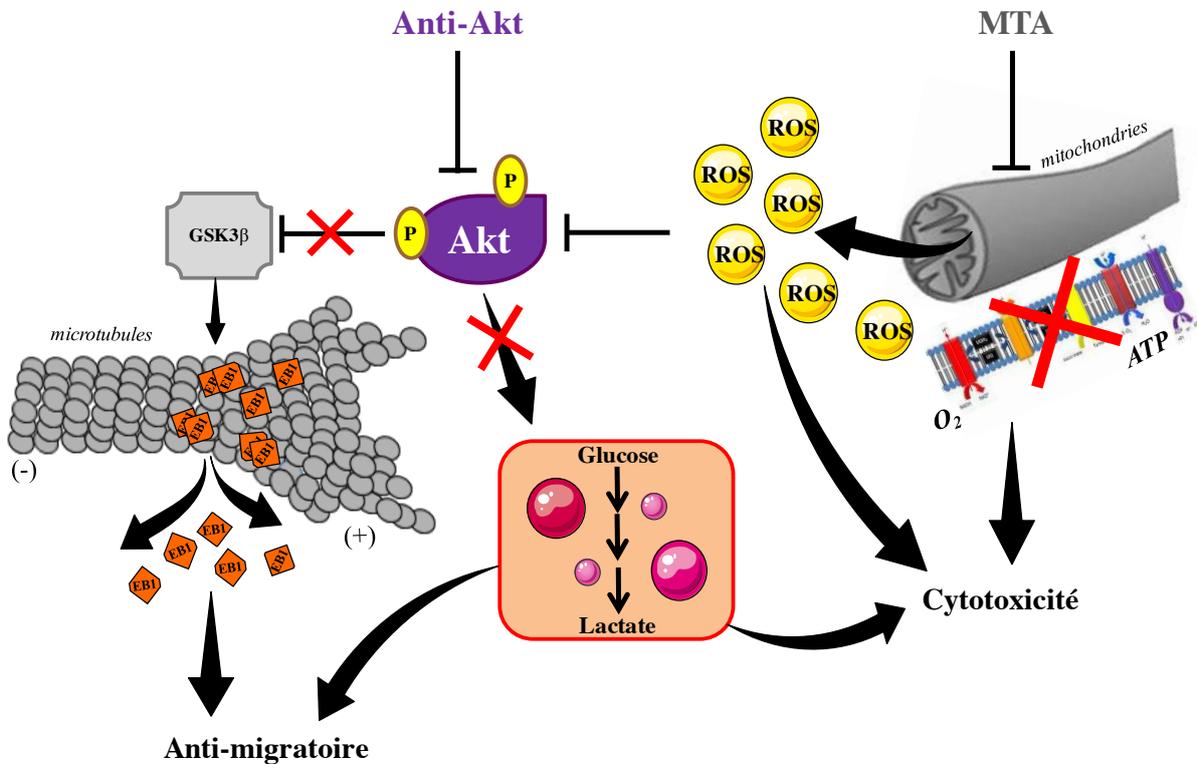


Figure 16 : Voie de signalisation intracellulaire concourant à l'efficacité des associations MTA/anti-Akt.

Au cours de la seconde partie de mes travaux de thèse, nous avons pu mettre en lumière l'efficacité des associations MTA/anti-Akt. Le modèle exposé ci-dessus illustre les mécanismes d'action proposés au cours de leur efficacité. Sur la partie droite du schéma, sont représentés les effets des MTA sur le réseau mitochondrial entraînant une génération de ROS ainsi qu'une perturbation de la phosphorylation oxydative. Ces ROS vont alors inactiver la kinase Akt. L'utilisation d'inhibiteurs d'Akt, tels que la périfosine, va potentialiser l'activation de la protéine GSK3β qui va alors inhiber l'accumulation de la protéine EBI aux extrémités (+) des microtubules *via* un phénomène de phosphorégulation. Cette délocalisation d'EBI va provoquer une perturbation de la dynamique des microtubules à l'origine des effets anti-migratoires des MTA. De plus, au centre du schéma, sont représentés les effets directs des anti-Akt sur la glycolyse intracellulaire qui accentue les effets anti-migratoires et cytotoxiques des associations MTA/anti-Akt.

La kinase Akt est aussi définie comme un régulateur de la **prolifération cellulaire**, notamment *via* p27 ou encore p21 (Medema et al., 2000; Sekimoto et al., 2004). Cependant, et contrairement à de précédents travaux ayant révélé un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par la péricosine (Kumar et al., 2009; Patel et al., 2002), nos travaux montrent l'absence d'effets de l'anti-Akt sur la progression du cycle des cellules de cancer du poumon. Dans ce même modèle d'étude, l'anti-Akt n'a pas modulé le blocage en mitose classiquement induit par le paclitaxel, indiquant que la plus forte efficacité de l'association ne dépend pas d'un impact plus important sur la prolifération cellulaire.

D'autre part, nos travaux rapportent pour la première fois les fortes **capacités anti-migratoires** des anti-Akt sur cellules cancéreuses pulmonaires, mais également dans des cellules de glioblastome caractérisées par leur haut potentiel invasif. Nos précédents travaux avaient mis en évidence le rôle central du couple Akt/GSK3 β dans l'inhibition de la migration cellulaire par les MTA, par phosphorégulation d'EB1 et inhibition de la dynamique microtubulaire (*cf.* Article (Le Grand et al., 2014) et **Fig. 16**). Comme le montre la **figure 17A** (au dos de la page), l'inhibition directe d'Akt par la péricosine induit également la délocalisation de la protéine EB1. Ce résultat a été conforté par l'observation de la perte des comètes EB1 dans les cellules A549 transfectées par le *shRNA*-Akt (**Fig. 17B**). Toute thérapie ciblant Akt aurait donc la capacité d'inhiber la migration cellulaire microtubule-dépendante, et pourrait ainsi améliorer l'efficacité anti-migratoire des MTA.

Comme schématisé dans la **Figure 16**, le **métabolisme énergétique** est un autre acteur dont le rôle majeur dans l'efficacité de l'association paclitaxel/péricosine a été mis en évidence au cours de mes travaux de thèse. Nous avons en effet démontré, pour la première fois, les capacités anti-glycolytiques de la péricosine. Puisqu'un niveau élevé de lactate a été associé ces dernières années à des capacités migratoires cellulaires accrues (Goetze et al., 2011; Marchiq and Pouyssegur, 2015; Seliger et al., 2013), il est aisé de penser que l'inhibition de la glycolyse – et donc de la production de lactate – par les anti-Akt puisse constituer un autre mécanisme à l'origine du potentiel anti-migratoire de ces thérapies ciblées. Enfin, nos travaux effectués sur le métabolisme cellulaire ont également révélé que la péricosine utilisée seule était capable d'augmenter les fonctions respiratoires mitochondriales. Cet effet pourrait être la conséquence de l'impact des anti-Akt sur l'hexokinase II. Cette enzyme, activée par Akt, intervient non seulement dans la première étape irréversible de la transformation du glucose, mais semble aussi avoir le pouvoir de réprimer les capacités respiratoires cellulaires en se fixant aux membranes mitochondriales (Fang et al., 2012; Mathupala et al., 2006). Ainsi, il est probable que l'utilisation d'un anti-Akt inhibe l'hexokinase, résultant en un switch

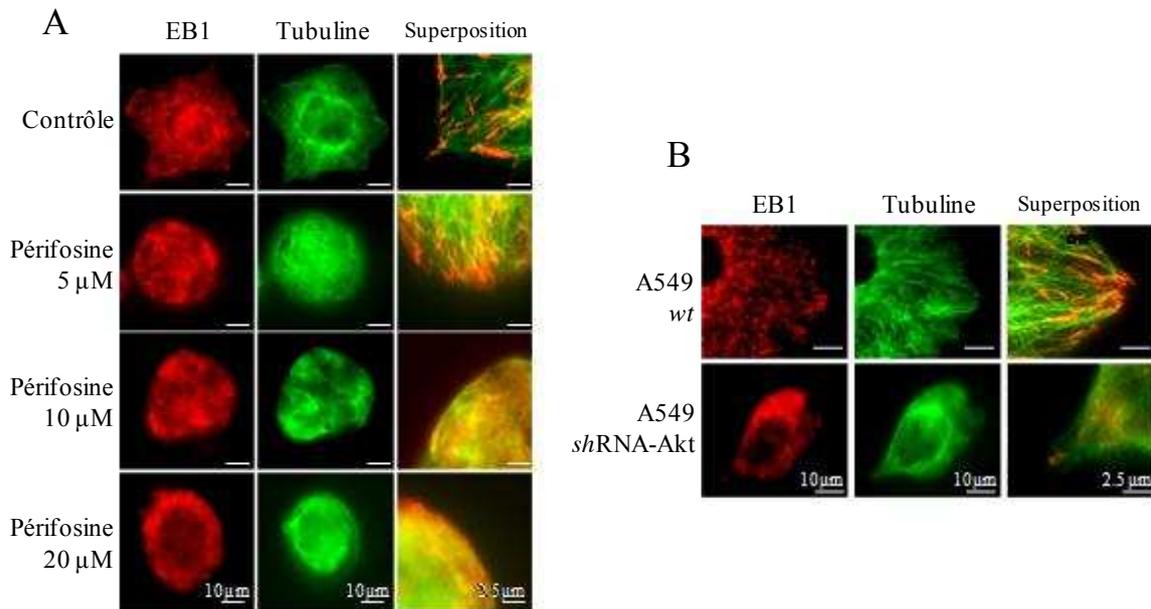


Figure 17 : Impact de l'inhibition d'Akt sur la localisation intracellulaire d'EB1. Photos représentatives du marquage d'EB1 en immunofluorescence indirecte dans des cellules A549 après 6h de traitement par différentes concentrations de périfosine – microscopie à épifluorescence – grossissement 100X (A). Photos représentatives du marquage d'EB1 en immunofluorescence indirecte dans des cellules A549^{wt} et A549 *shRNA-Akt* – microscopie à épifluorescence – grossissement 100X (B).

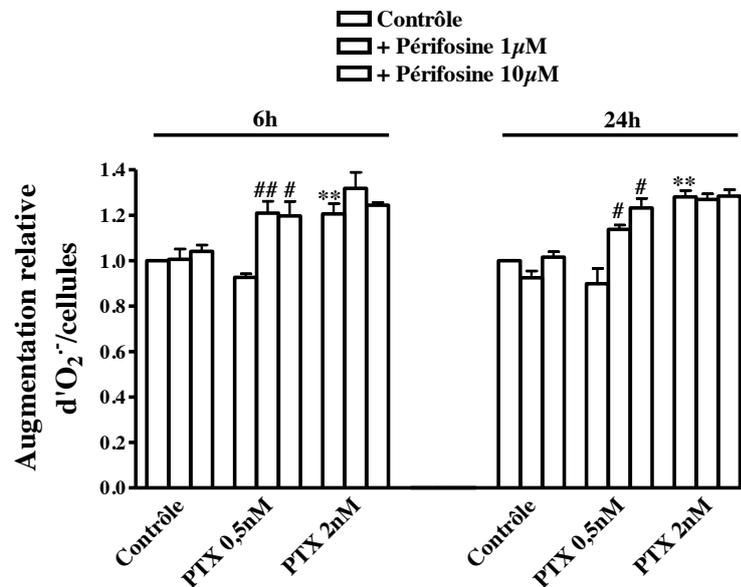


Figure 18 : Potentialisation par la périfosine de la production des ROS médiée par le paclitaxel. Représentation de la production relative de superoxydes détectée par wst-1 dans les cellules A549 après 6h et 24h de traitement par le paclitaxel seul, la périfosine seule ou leur association. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. * vs. contrôle et # vs. paclitaxel seul.

métabolique de la glycolyse vers la phosphorylation oxydative. Cette hypothèse est notamment confortée par une étude parue très récemment qui montre que l'irradiation de cellules cancéreuses de différentes origines (cancer du sein, du colon et glioblastome) entraîne l'inhibition de l'hexokinase à l'origine d'une reprogrammation des cellules vers l'énergétique mitochondriale (Lu et al., 2015a). Tout ceci justifie d'autant plus d'associer les anti-Akt à des anticancéreux présentant des propriétés anti-mitochondriales. C'est le cas du paclitaxel dont les fonctions inhibitrices de la respiration mitochondriale (*cf.* **Fig. 15A**) et activatrices de la sur-production de ROS (**Fig. 18**) se voient potentialisées par la périfosine. Ces observations soulèvent la question du schéma d'administration des associations MTA/anti-Akt ; une administration séquentielle avec un pré-traitement par les anti-Akt pouvant s'avérer judicieuse s'ils redonnent transitoirement aux mitochondries leur place de centrale énergétique cellulaire afin d'optimiser l'efficacité des MTA par la suite.

- **Anti-Akt : une nouvelle arme pour contourner les phénomènes de résistance aux traitements ?**

Peu d'études se sont à ce jour penchées sur les anti-Akt en tant que molécules pouvant aider à reverser les phénomènes de résistance des cellules cancéreuses. Des travaux parus en 2012 ont mis en évidence l'intérêt d'associer la périfosine au docétaxel chez des patientes atteintes de cancers ovariens pourtant résistants aux Taxanes (Fu et al., 2012). Au cours de notre étude, les données obtenues *in vitro* ont mis en évidence que la périfosine permettait de resensibiliser des cellules de carcinome pulmonaire hautement résistantes au paclitaxel (A549 EpoB40 et HCC827). De plus, nous avons également mis en évidence que les cellules de cancer du poumon H1650 et H1975, résistantes aux thérapies ciblées anti-EGFR, voyaient leur sensibilité au paclitaxel augmentée lors de l'association avec la périfosine. Ainsi, l'association MTA/anti-Akt pourrait être une alternative à l'échappement thérapeutique des patients suite à une résistance aux MTA, mais également à une résistance aux anti-EGFR. Ce dernier point est soutenu par une étude de phase II, menée chez des patients atteints de cancer du poumon non-à petites cellules en stade avancé, dont le but est de contourner la résistance à l'anti-EGFR (progression sous erlotinib) en l'associant avec l'anti-Akt MK-2206 [NCT01294306] (Lara et al., 2015).

L'intérêt de ces anti-Akt pour contrecarrer la résistance aux traitements ne s'arrête très probablement pas aux cas des cancers du poumon. Ils pourraient notamment jouer un rôle important dans la prise en charge thérapeutique du neuroblastome, pathologie pédiatrique responsable de trop nombreux décès (Irwin and Park, 2015). Le rôle d'Akt dans la

progression du neuroblastome a été révélé récemment par utilisation du sunitinib (multi-RTK inhibiteur) qui a permis la régression de la masse tumorale *in vivo*, via l'inhibition de la signalisation PI3K/Akt (Calero et al., 2014). Cette étude met ainsi le doigt sur l'intérêt d'évaluer le potentiel thérapeutique des anti-Akt dans ces tumeurs. En accord avec mes travaux de thèse, il a précédemment été montré que la périfosine possède des propriétés cytotoxiques *in vitro* et *in vivo* dans le neuroblastome, et ceci quel que soit le statut génétique des lignées cellulaires étudiées (Li et al., 2010). En plus de l'âge des enfants, le facteur de mauvais pronostic le plus utilisé pour caractériser le neuroblastome reste l'amplification de l'oncogène *N-myc* (Maris et al., 2007). Au cours de nos travaux, nous avons mis en évidence un gain d'efficacité cytotoxique de la vincristine associée à la périfosine dans des lignées cellulaires de neuroblastome ayant un statut non-*N-myc* amplifié (SK-N-SH), mais nous avons surtout montré que la périfosine resensibilisait des cellules de neuroblastome *N-myc* amplifiées hautement résistantes à la vincristine (BE(2)C/VCR10 et BE(2)C/ADR20). Une étude similaire a mis en évidence que l'administration de la périfosine *in vitro* et *in vivo* permettait également de contourner la résistance du neuroblastome à l'étoposide médiée par la surexpression du facteur BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) (Li et al., 2011).

Ainsi le nombre croissant d'études révélant l'intérêt d'utiliser les anti-Akt en association avec d'autres agents de chimiothérapie conventionnelle et/ou d'autres thérapies ciblées, ou voire même avec la radiothérapie, met l'accent sur le rôle prometteur de ces composés. Il reste tout un pan d'investigations à réaliser afin d'identifier des biomarqueurs prédictifs de la réponse à ces traitements, et ainsi non seulement guider la recherche de futures nouvelles associations thérapeutiques incluant les anti-Akt, mais également tendre vers la personnalisation du traitement. Dans ce contexte, et comme proposé dans la conclusion qui suit, l'émergence du métabolisme énergétique dans le paysage oncologique représente une mine de biomarqueurs potentiels.

Conclusion

Malgré la survenue d'effets indésirables et l'émergence de phénomènes de résistance, les agents anti-microtubules (MTA) sont administrés dans de nombreuses pathologies cancéreuses tant chez l'adulte que dans la population pédiatrique, reflétant leur succès clinique important. De nos jours, ils font toujours l'objet de nombreux travaux de recherche, tant dans le domaine fondamental que clinique et translationnel. Pour que les nouvelles formulations galéniques ou les nouveaux schémas de traitement évalués gagnent en efficacité et présentent une moindre toxicité, comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu est une étape primordiale. Ce fut l'objectif de mes travaux de thèse, articulés autour de deux axes principaux : (i) une étude de biologie cellulaire/moléculaire visant à déchiffrer la signalisation intracellulaire entre le réseau mitochondrial et le réseau microtubulaire sous l'effet des MTA, et (ii) une étude oncopharmacologique révélant l'intérêt d'associer les agents de chimiothérapie conventionnelle MTA aux thérapies ciblées anti-Akt de dernière génération notamment dans les cancers du poumon non-à-petites cellules. *Les résultats de ces deux études intimement liées nous amènent à nous interroger, d'une part, sur les grands processus qu'il resterait à examiner au regard de nos connaissances actuelles de la biologie des tumeurs pour que les associations MTA/anti-Akt poursuivent leur développement vers la clinique et, d'autre part, sur la possibilité de caractériser des biomarqueurs qui pourraient présager de la réponse à ces traitements.*

- **Immunomodulation**

Les travaux réalisés *in vivo* au cours de ces travaux de thèse sur les associations paclitaxel/périmfosine dans un modèle de souris nude xénotransplantées de cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain étaient un pré-requis à toute poursuite de l'étude de cette association. Si les résultats obtenus sont très prometteurs pour l'avenir de cette stratégie thérapeutique en clinique, nous restons tout de même conscients des limites de ce modèle murin pour deux raisons principales : (i) la croissance tumorale en sous-cutanée est très rapide, réduisant la fenêtre thérapeutique pour des considérations éthiques évidentes et rendant alors difficile l'évaluation de l'efficacité des stratégies thérapeutiques sur le long terme ; (ii) l'immunodéficiences des souris ne permet pas d'étudier la tumeur dans son microenvironnement complet, alors qu'il ne fait plus de doute que le système immunitaire joue un rôle considérable dans le paysage oncologique (Schreiber et al., 2011). Dans ce contexte, l'immunothérapie connaît un véritable essor, en particulier dans la prise en charge du cancer du poumon. Deux cibles thérapeutiques ont en effet été identifiées: **CTLA-4** (*Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*) et le **duo PD-1/PD-L1** (*Programmed cell death 1 et son*

ligand) responsables de l'inhibition des lymphocytes T CD8⁺ (Massarelli et al., 2014). A ce jour, de nombreux essais cliniques avec leurs inhibiteurs sont en cours, parmi lesquels nous pouvons citer l'étude de phase III de l'ipilimumab (anti-CTLA-4) en association avec le paclitaxel et le carboplatine [NCT01285609], et l'étude de phase III du nivolumab (anti-PD-1) en association avec le docétaxel [NCT01673867]. *A quel effet sur le système immunitaire pouvons-nous alors nous attendre pour l'association MTA/anti-Akt ?* Il a été démontré une corrélation entre l'activation de la voie PI3K/Akt et l'expression de PD-L1, notamment *via* une régulation transcriptionnelle (Ota et al., 2015; Parsa et al., 2007), concourant à l'échappement de la tumeur à l'immunosurveillance. Ainsi, il pourrait être prometteur de coupler l'association MTA/anti-Akt à un anti-PD-1, traitement qui n'a pas encore fait l'objet d'étude. La question du schéma d'administration reste ouverte. Il semblerait intéressant d'administrer l'immunothérapie après induction par chimiothérapie/thérapie ciblée au vu des résultats d'une étude qui indiquent un rôle primordial des lymphocytes T CD8⁺ dans la pérennité de la réponse au traitement (Maeda et al., 2011). Une administration séquentielle aurait, de plus, comme principal avantage de limiter la survenue d'effets indésirables dont la probabilité est augmentée avec les associations thérapeutiques.

- **Fonctions anti-angiogéniques**

Judah Folkman fut le premier à introduire le concept de thérapie ciblée dans le cancer et, en particulier, la notion de traitement **anti-angiogénique**. Aujourd'hui, ces molécules font partie de l'arsenal thérapeutique en oncologie avec comme chef de file l'Avastin[®] (bevacizumab, anti-VEGF) utilisé notamment en association avec le paclitaxel et le carboplatine dans les cancers du poumon non-à-petites cellules (Dempke, 2015). Développés initialement dans le but de réduire la masse tumorale par inhibition de la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins, les anti-angiogéniques connaissent depuis peu un nouveau souffle. En effet, il a été démontré que ces molécules pouvaient entraîner une **normalisation vasculaire** à l'origine d'une diminution de l'hypoxie intratumorale, de l'augmentation de l'efficacité de certains traitements anticancéreux, ainsi que d'une meilleure réponse immunitaire anti-tumorale (Goel et al., 2011; Huang et al., 2013; Jain, 2013). Dans ce nouveau contexte, de nombreux essais cliniques ont récemment vu le jour, mettant notamment en évidence l'intérêt thérapeutique d'associer le paclitaxel avec le bevacizumab (Enomoto et al., 2015; Kim et al., 2013b; Shimizu et al., 2014). Par ailleurs, de nombreux travaux – issus notamment de notre laboratoire – ont démontré le rôle anti-angiogénique des MTA en tant que tels lorsqu'ils sont administrés à faibles doses et de façon répétée, c'est à dire selon un schéma de traitement de

type « métronomique » (Pasquier et al., 2004, 2013; Pourroy et al., 2006). *Se pose alors la question d'un éventuel potentiel anti-angiogénique des associations MTA/anti-Akt.* A ce jour, une seule étude *in vitro* a démontré le potentiel anti-angiogénique de la périfosine sur cellules HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) (Wang et al., 2012a). Cependant, il est aisé de penser, au vu de l'action activatrice de la kinase Akt sur le facteur HIF-1 α et sur le VEGF, que les inhibiteurs d'Akt puissent avoir des effets anti-angiogéniques marqués (Agani and Jiang, 2013; Claesson-Welsh and Welsh, 2013). En soutien à cette hypothèse, des résultats préliminaires issus de tests sur cellules endothéliales nous suggèrent que les associations MTA/anti-Akt pourraient être hautement synergiques dans l'inhibition de la néoangiogenèse (données personnelles). Une étude approfondie de ce processus reste évidemment à réaliser, afin de déterminer si l'association MTA/anti-Akt se suffit à elle même pour exercer des fonctions anti-angiogénique et/ou anti-vasculaire, ou si l'addition d'un anti-angiogénique « vrai » serait nécessaire pour améliorer davantage l'efficacité du traitement, sans en augmenter les effets indésirables.

- **Inhibition du métabolisme énergétique**

En 2011, les processus caractéristiques de l'évolution tumorale proposés par D. Hanahan ont vu leur liste s'étendre et inclure notamment le remodelage métabolique (Hanahan and Weinberg, 2011). La protéine Akt, également dénommée « kinase Warburg », représente un élément clef dans la mise en place du statut glycolytique des cellules cancéreuses. Par exemple, elle augmente la translocation membranaire des transporteurs du glucose (Sakamoto and Holman, 2008), active certaines enzymes de la glycolyse telles que l'hexokinase ou la phosphofructokinase (Roberts and Miyamoto, 2014; Sen et al., 2003) et peut agir de façon indirecte sur les facteurs HIF-1 α et C-myc régulant à leur tour différentes enzymes de l'énergétique cellulaire (Kim et al., 2013a; Semenza, 2010). Pour tous ces arguments, les inhibiteurs d'Akt semblent être des composés prometteurs pour cibler le métabolisme énergétique tumoral, considéré ces dernières années comme le talon d'Achille des tumeurs. Nos travaux ont montré que l'association paclitaxel/périfosine ciblait les 2 grandes voies métaboliques énergétiques de la cellule : la glycolyse et la phosphorylation oxydative. Plus qu'une simple inhibition parallèle de ces sources énergétiques, le MTA s'est montré apte à augmenter les effets anti-glycolytiques de l'anti-Akt, tandis qu'il s'est lui même révélé apte à potentialiser les effets anti-mitochondriaux du MTA.

La dérégulation du métabolisme énergétique est incontestable dans l'initiation et l'expansion des cellules cancéreuses, mais elle n'en est pas pour autant similaire dans toutes les pathologies tumorales (Cantor and Sabatini, 2012; Jose and Rossignol, 2013). En effet, la notion d'hétérogénéité métabolique est apparue, laissant supposer que les dérégulations seraient différentes en fonction des tissus atteints, voire même à l'intérieur d'une population tumorale donnée. Une quantité importante d'enzymes et de métabolites, ainsi que les oncogènes les (dé)régulant, n'a à ce jour pas encore été investiguée et pourrait représenter pour l'avenir des cibles thérapeutiques potentielles ou des marqueurs prédictifs de la réponse aux traitements (Muñoz-Pinedo et al., 2012). Tout ceci mène à penser que le statut métabolique des cellules cancéreuses est loin d'avoir dévoilé tous ses secrets et que de nombreuses découvertes primordiales dans la mise en place de cette dérégulation métabolique sont certainement attendues dans un futur proche. Une étude *in vivo* sur adénocarcinome pancréatique a ainsi déchiffré le rôle de la mutation Kras dans le métabolisme cellulaire par utilisation complémentaire de techniques « omics » (Ying et al., 2012). L'étude de la dérégulation du métabolisme des cellules cancéreuses devra intégrer ces nouvelles technologies, afin de mieux caractériser chaque type tumoral et ainsi voir émerger des biomarqueurs d'efficacité des traitements (prédictifs et suivi de la réponse).

La vision actuelle de la communauté scientifique s'accorde à définir le cancer non plus comme UNE maladie mais comme un ensemble de pathologies hétérogènes. Dans ce contexte, il est clair que les MTA, agents de chimiothérapie conventionnelle utilisés maintenant depuis plusieurs décennies, auront toujours leur place dans l'arsenal thérapeutique anticancéreux en association avec diverses thérapies ciblées (anticancéreuses, immunomodulatrices, anti-angiogéniques). Si les années 2000 ont connu le boom des thérapies ciblées, les années 2010 pourraient être celles des marqueurs prédictifs de réponse aux traitements. En ce sens, définir un profil métabolique spécifique pour chaque tumeur pourrait aider à guider l'administration d'un traitement personnalisé chez le patient (Cantor and Sabatini, 2012). Le challenge risque d'être cependant encore plus difficile à relever lorsqu'il s'agit de définir un panel de biomarqueurs pour des associations thérapeutiques, et de ne pas se contenter de la juxtaposition des biomarqueurs de réponse à chacune des molécules prises individuellement.

***Références
Bibliographiques***

A

- Accili, D., and Arden, K.C. (2004). FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* *117*, 421–426.
- Agani, F., and Jiang, B.-H. (2013). Oxygen-independent regulation of HIF-1: novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* *13*, 245–251.
- Akhmanova, A., and Hoogenraad, C.C. (2015). Microtubule minus-end-targeting proteins. *Curr. Biol.* CB *25*, R162–R171.
- Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O. (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 309–322.
- Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O. (2010). Microtubule +TIPs at a glance. *J. Cell Sci.* *123*, 3415–3419.
- Akhmanova, A., Hoogenraad, C.C., Drabek, K., Stepanova, T., Dortland, B., Verkerk, T., Vermeulen, W., Burgering, B.M., De Zeeuw, C.I., Grosveld, F., et al. (2001). Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell* *104*, 923–935.
- Alessi, D.R., Caudwell, F.B., Andjelkovic, M., Hemmings, B.A., and Cohen, P. (1996). Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* *399*, 333–338.
- Alexander, W. (2011). Inhibiting the akt pathway in cancer treatment: three leading candidates. *P T Peer-Rev. J. Formul. Manag.* *36*, 225–227.
- Alexeyev, M., Shokolenko, I., Wilson, G., and LeDoux, S. (2013). The maintenance of mitochondrial DNA integrity--critical analysis and update. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a012641.
- Alfadda, A.A., and Sallam, R.M. (2012). Reactive oxygen species in health and disease. *J. Biomed. Biotechnol.* *2012*, 936486.
- Allan, L.A., Morrice, N., Brady, S., Magee, G., Pathak, S., and Clarke, P.R. (2003). Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat. Cell Biol.* *5*, 647–654.
- Allen, R.T., Hunter, W.J., and Agrawal, D.K. (1997). Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* *37*, 215–228.
- Almhanna, K., Cubitt, C.L., Zhang, S., Kazim, S., Husain, K., Sullivan, D., Sebti, S., and Malafa, M. (2013). MK-2206, an Akt inhibitor, enhances carboplatinum/paclitaxel efficacy in gastric cancer cell lines. *Cancer Biol. Ther.* *14*, 932–936.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* *87*, 171.

Altomare, D.A., Tanno, S., De Rienzo, A., Klein-Szanto, A.J., Tanno, S., Skele, K.L., Hoffman, J.P., and Testa, J.R. (2002). Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas. *J. Cell. Biochem.* *87*, 470–476.

Anand, R., Wai, T., Baker, M.J., Kladt, N., Schauss, A.C., Rugarli, E., and Langer, T. (2014). The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J. Cell Biol.* *204*, 919–929.

André, N., Braguer, D., Brasseur, G., Gonçalves, A., Lemesle-Meunier, D., Guise, S., Jordan, M.A., and Briand, C. (2000). Paclitaxel induces release of cytochrome c from mitochondria isolated from human neuroblastoma cells'. *Cancer Res.* *60*, 5349–5353.

André, N., Rome, A., Carré, M., and Société Francophone de Recherche en Pédiatrie (SFRP) (2006). [Antimitochondrial agents: a new class of anticancer agents]. *Arch. Pédiatrie Organe Off. Société Fr. Pédiatrie* *13*, 69–75.

André, N., Carré, M., and Pasquier, E. (2014). Metronomics: towards personalized chemotherapy? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *11*, 413–431.

Annabi, B., Rojas-Sutterlin, S., Laflamme, C., Lachambre, M.-P., Rolland, Y., Sartelet, H., and Béliveau, R. (2008). Tumor environment dictates medulloblastoma cancer stem cell expression and invasive phenotype. *Mol. Cancer Res. MCR* *6*, 907–916.

Applegate, K.T., Besson, S., Matov, A., Bagonis, M.H., Jaqaman, K., and Danuser, G. (2011). plusTipTracker: Quantitative image analysis software for the measurement of microtubule dynamics. *J. Struct. Biol.* *176*, 168–184.

Arboleda, M.J., Lyons, J.F., Kabbinnar, F.F., Bray, M.R., Snow, B.E., Ayala, R., Danino, M., Karlan, B.Y., and Slamon, D.J. (2003). Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res.* *63*, 196–206.

Arce, C.A., Rodriguez, J.A., Barra, H.S., and Caputo, R. (1975). Incorporation of L-tyrosine, L-phenylalanine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine as single units into rat brain tubulin. *Eur. J. Biochem. FEBS* *59*, 145–149.

Argiris, A., Cohen, E., Karrison, T., Esparaz, B., Mauer, A., Ansari, R., Wong, S., Lu, Y., Pins, M., Dancey, J., et al. (2006). A phase II trial of perifosine, an oral alkylphospholipid, in recurrent or metastatic head and neck cancer. *Cancer Biol. Ther.* *5*, 766–770.

Argyriou, A.A., Koltzenburg, M., Polychronopoulos, P., Papapetropoulos, S., and Kalofonos, H.P. (2008). Peripheral nerve damage associated with administration of taxanes in patients with cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *66*, 218–228.

Arranz, E., Robledo, M., Martínez, B., Gallego, J., Román, A., Rivas, C., and Benítez, J. (1996). Incidence of homogeneously staining regions in non-Hodgkin lymphomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* *87*, 1–3.

B

Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Dagaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., et al. (2003). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* 278, 17190–17197.

Balsara, B.R., Pei, J., Mitsuuchi, Y., Page, R., Klein-Szanto, A., Wang, H., Unger, M., and Testa, J.R. (2004). Frequent activation of AKT in non-small cell lung carcinomas and preneoplastic bronchial lesions. *Carcinogenesis* 25, 2053–2059.

Ban, R., Matsuzaki, H., Akashi, T., Sakashita, G., Taniguchi, H., Park, S.-Y., Tanaka, H., Furukawa, K., and Urano, T. (2009). Mitotic regulation of the stability of microtubule plus-end tracking protein EB3 by ubiquitin ligase SIAH-1 and Aurora mitotic kinases. *J. Biol. Chem.* 284, 28367–28381.

Baqri, R.M., Turner, B.A., Rheuben, M.B., Hammond, B.D., Kaguni, L.S., and Miller, K.E. (2009). Disruption of mitochondrial DNA replication in *Drosophila* increases mitochondrial fast axonal transport in vivo. *PloS One* 4, e7874.

Barisic, M., Silva e Sousa, R., Tripathy, S.K., Magiera, M.M., Zaytsev, A.V., Pereira, A.L., Janke, C., Grishchuk, E.L., and Maiato, H. (2015). Mitosis. Microtubule detyrosination guides chromosomes during mitosis. *Science* 348, 799–803.

Barra, H.S., Arce, C.A., and Argaraña, C.E. (1988). Posttranslational tyrosination/detyrosination of tubulin. *Mol. Neurobiol.* 2, 133–153.

Bedikian, A.Y., Millward, M., Pehamberger, H., Conry, R., Gore, M., Trefzer, U., Pavlick, A.C., DeConti, R., Hersh, E.M., Hersey, P., et al. (2006). Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 4738–4745.

Beinhauer, J.D., Hagan, I.M., Hegemann, J.H., and Fleig, U. (1997). Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form. *J. Cell Biol.* 139, 717–728.

Bellacosa, A., Testa, J.R., Staal, S.P., and Tsichlis, P.N. (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254, 274–277.

Bellacosa, A., de Feo, D., Godwin, A.K., Bell, D.W., Cheng, J.Q., Altomare, D.A., Wan, M., Dubeau, L., Scambia, G., Masciullo, V., et al. (1995). Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 64, 280–285.

Bellacosa, A., Kumar, C.C., Di Cristofano, A., and Testa, J.R. (2005). Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv. Cancer Res.* 94, 29–86.

Bellance, N., Lestienne, P., and Rossignol, R. (2009). Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 4015–4034.

Benard, G., and Rossignol, R. (2008). Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1313–1342.

- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., and Rossignol, R. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J. Cell Sci.* *120*, 838–848.
- Bendell, J.C., Nemunaitis, J., Vukelja, S.J., Hagenstad, C., Campos, L.T., Hermann, R.C., Sportelli, P., Gardner, L., and Richards, D.A. (2011). Randomized placebo-controlled phase II trial of perifosine plus capecitabine as second- or third-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 4394–4400.
- Benhar, M., Dalyot, I., Engelberg, D., and Levitzki, A. (2001). Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 6913–6926.
- Berges, R., Baeza-Kallee, N., Tabouret, E., Chinot, O., Petit, M., Kruczynski, A., Figarella-Branger, D., Honore, S., and Braguer, D. (2014). End-binding 1 protein overexpression correlates with glioblastoma progression and sensitizes to Vinca-alkaloids in vitro and in vivo. *Oncotarget* *5*, 12769–12787.
- Beurel, E., Grieco, S.F., and Jope, R.S. (2014). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. *Pharmacol. Ther.*
- Bhalla, K.N. (2003). Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene* *22*, 9075–9086.
- Bieling, P., Laan, L., Schek, H., Munteanu, E.L., Sandblad, L., Dogterom, M., Brunner, D., and Surrey, T. (2007). Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature* *450*, 1100–1105.
- Bieling, P., Kandels-Lewis, S., Tolley, I.A., van Dijk, J., Janke, C., and Surrey, T. (2008). CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. *J. Cell Biol.* *183*, 1223–1233.
- Bijur, G.N., and Jope, R.S. (2001). Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J. Biol. Chem.* *276*, 37436–37442.
- Bijur, G.N., and Jope, R.S. (2003). Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* *14*, 2415–2419.
- Biswas, S., Dodwadkar, N.S., Deshpande, P.P., and Torchilin, V.P. (2012). Liposomes loaded with paclitaxel and modified with novel triphenylphosphonium-PEG-PE conjugate possess low toxicity, target mitochondria and demonstrate enhanced antitumor effects in vitro and in vivo. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *159*, 393–402.
- Boddapati, S.V., Tongcharoensirikul, P., Hanson, R.N., D'Souza, G.G.M., Torchilin, V.P., and Weissig, V. (2005). Mitochondriotropic liposomes. *J. Liposome Res.* *15*, 49–58.
- Boland, M.L., Chourasia, A.H., and Macleod, K.F. (2013). Mitochondrial dysfunction in cancer. *Front. Oncol.* *3*, 292.
- Boldogh, I.R., and Pon, L.A. (2007). Mitochondria on the move. *Trends Cell Biol.* *17*, 502–510.

Bonora, M., and Pinton, P. (2014). The Mitochondrial Permeability Transition Pore and Cancer: Molecular Mechanisms Involved in Cell Death. *Front. Oncol.* 4.

Bordet, T., Buisson, B., Michaud, M., Abitbol, J.-L., Marchand, F., Grist, J., Andriambeloson, E., Malcangio, M., and Pruss, R.M. (2008). Specific antinociceptive activity of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622) in experimental models of painful diabetic and chemotherapy-induced neuropathy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326, 623–632.

Borisy, G.G., and Svitkina, T.M. (2000). Actin machinery: pushing the envelope. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 104–112.

Bourgarel-Rey, V., Savry, A., Hua, G., Carré, M., Bressin, C., Chacon, C., Imbert, J., Braguer, D., and Barra, Y. (2009). Transcriptional down-regulation of Bcl-2 by vinorelbine: identification of a novel binding site of p53 on Bcl-2 promoter. *Biochem. Pharmacol.* 78, 1148–1156.

Bratman, S.V., and Chang, F. (2007). Stabilization of overlapping microtubules by fission yeast CLASP. *Dev. Cell* 13, 812–827.

Brognaard, J., Sierecki, E., Gao, T., and Newton, A.C. (2007). PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol. Cell* 25, 917–931.

Brouhard, G.J., Stear, J.H., Noetzel, T.L., Al-Bassam, J., Kinoshita, K., Harrison, S.C., Howard, J., and Hyman, A.A. (2008). XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell* 132, 79–88.

Brunner, D., and Nurse, P. (2000). CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* 102, 695–704.

Bulinski, J.C. (2007). Microtubule modification: acetylation speeds anterograde traffic flow. *Curr. Biol. CB* 17, R18–R20.

Burté, F., Carelli, V., Chinnery, P.F., and Yu-Wai-Man, P. (2014). Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurol.*

Buttrick, G.J., and Wakefield, J.G. (2008). PI3-K and GSK-3: Akt-ing together with microtubules. *Cell Cycle Georget. Tex* 7, 2621–2625.

C

Calero, R., Morchon, E., Johnsen, J.I., and Serrano, R. (2014). Sunitinib suppress neuroblastoma growth through degradation of MYCN and inhibition of angiogenesis. *PloS One* 9, e95628.

Calligaris, D., Villard, C., Terras, L., Braguer, D., Verdier-Pinard, P., and Lafitte, D. (2010). MALDI in-source decay of high mass protein isoforms: application to alpha- and beta-tubulin variants. *Anal. Chem.* 82, 6176–6184.

Cantor, J.R., and Sabatini, D.M. (2012). Cancer Cell Metabolism: One Hallmark, Many Faces. *Cancer Discov.* 2, 881–898.

- Capparelli, C., Guido, C., Whitaker-Menezes, D., Bonuccelli, G., Balliet, R., Pestell, T.G., Goldberg, A.F., Pestell, R.G., Howell, A., Sneddon, S., et al. (2012). Autophagy and senescence in cancer-associated fibroblasts metabolically supports tumor growth and metastasis via glycolysis and ketone production. *Cell Cycle Georget. Tex* *11*, 2285–2302.
- Carbonaro, M., Escuin, D., O’Brate, A., Thadani-Mulero, M., and Giannakakou, P. (2012). Microtubules regulate hypoxia-inducible factor-1 α protein trafficking and activity: implications for taxane therapy. *J. Biol. Chem.* *287*, 11859–11869.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* *282*, 1318–1321.
- Carlier, M.F., Didry, D., Simon, C., and Pantaloni, D. (1989). Mechanism of GTP hydrolysis in tubulin polymerization: characterization of the kinetic intermediate microtubule-GDP-Pi using phosphate analogues. *Biochemistry (Mosc.)* *28*, 1783–1791.
- Carpten, J.D., Faber, A.L., Horn, C., Donoho, G.P., Briggs, S.L., Robbins, C.M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T.Y., Savage, S., et al. (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* *448*, 439–444.
- Carré, M., André, N., Carles, G., Borghi, H., Bricchese, L., Briand, C., and Braguer, D. (2002). Tubulin is an inherent component of mitochondrial membranes that interacts with the voltage-dependent anion channel. *J. Biol. Chem.* *277*, 33664–33669.
- Carter, A.P., Cho, C., Jin, L., and Vale, R.D. (2011). Crystal structure of the dynein motor domain. *Science* *331*, 1159–1165.
- Cassimeris, L. (1999). Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* *11*, 134–141.
- Cassimeris, L., and Spittle, C. (2001). Regulation of microtubule-associated proteins. *Int. Rev. Cytol.* *210*, 163–226.
- Castillo, S.S., Brognard, J., Petukhov, P.A., Zhang, C., Tsurutani, J., Granville, C.A., Li, M., Jung, M., West, K.A., Gills, J.G., et al. (2004). Preferential inhibition of Akt and killing of Akt-dependent cancer cells by rationally designed phosphatidylinositol ether lipid analogues. *Cancer Res.* *64*, 2782–2792.
- Chan, D.C. (2006). Dissecting mitochondrial fusion. *Dev. Cell* *11*, 592–594.
- Chan, D.C. (2012). Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu. Rev. Genet.* *46*, 265–287.
- Chan, C.-H., Jo, U., Kohrman, A., Rezaeian, A.H., Chou, P.-C., Logothetis, C., and Lin, H.-K. (2014). Posttranslational regulation of Akt in human cancer. *Cell Biosci.* *4*, 59.
- Chanan-Khan, A.A., Niesvizky, R., Hohl, R.J., Zimmerman, T.M., Christiansen, N.P., Schiller, G.J., Callander, N., Lister, J., Oken, M., and Jagannath, S. (2009). Phase III randomised study of dexamethasone with or without oblimersen sodium for patients with advanced multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma* *50*, 559–565.

- Chen, H., and Chan, D.C. (2010). Physiological functions of mitochondrial fusion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1201, 21–25.
- Chen, L., Han, L., Shi, Z., Zhang, K., Liu, Y., Zheng, Y., Jiang, T., Pu, P., Jiang, C., and Kang, C. (2012). LY294002 enhances cytotoxicity of temozolomide in glioma by down-regulation of the PI3K/Akt pathway. *Mol. Med. Rep.* 5, 575–579.
- Cheng, J.Q., Godwin, A.K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T.F., Hamilton, T.C., Tsichlis, P.N., and Testa, J.R. (1992). AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9267–9271.
- Cheng, J.Q., Ruggeri, B., Klein, W.M., Sonoda, G., Altomare, D.A., Watson, D.K., and Testa, J.R. (1996). Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 3636–3641.
- Chiappori, A., Williams, C., Northfelt, D.W., Adams, J.W., Malik, S., Edelman, M.J., Rosen, P., Van Echo, D.A., Berger, M.S., and Haura, E.B. (2014). Obatoclax mesylate, a pan-bcl-2 inhibitor, in combination with docetaxel in a phase 1/2 trial in relapsed non-small-cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 9, 121–125.
- Chiu, W.-H., Luo, S.-J., Chen, C.-L., Cheng, J.-H., Hsieh, C.-Y., Wang, C.-Y., Huang, W.-C., Su, W.-C., and Lin, C.-F. (2012). Vinca alkaloids cause aberrant ROS-mediated JNK activation, Mcl-1 downregulation, DNA damage, mitochondrial dysfunction, and apoptosis in lung adenocarcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1159–1171.
- Cho, D.-H., Nakamura, T., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., Gu, Z., and Lipton, S.A. (2009). S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* 324, 102–105.
- Chrétien, D., Fuller, S.D., and Karsenti, E. (1995). Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J. Cell Biol.* 129, 1311–1328.
- Claesson-Welsh, L., and Welsh, M. (2013). VEGFA and tumour angiogenesis. *J. Intern. Med.* 273, 114–127.
- Coffer, P.J., and Woodgett, J.R. (1991). Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur. J. Biochem. FEBS* 201, 475–481.
- Cole, A., Frame, S., and Cohen, P. (2004). Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *Biochem. J.* 377, 249–255.
- Cordo Russo, R.I., García, M.G., Alaniz, L., Blanco, G., Alvarez, E., and Hajos, S.E. (2008). Hyaluronan oligosaccharides sensitize lymphoma resistant cell lines to vincristine by modulating P-glycoprotein activity and PI3K/Akt pathway. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 122, 1012–1018.

Correia, S.C., Santos, R.X., Perry, G., Zhu, X., Moreira, P.I., and Smith, M.A. (2012). Mitochondrial importance in Alzheimer's, Huntington's and Parkinson's diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 724, 205–221.

Cortes, J., Montero, A.J., and Glück, S. (2012). Eribulin mesylate, a novel microtubule inhibitor in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* 38, 143–151.

Cory, S., and Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2, 647–656.

Coue, M., Lombillo, V.A., and McIntosh, J.R. (1991). Microtubule depolymerization promotes particle and chromosome movement in vitro. *J. Cell Biol.* 112, 1165–1175.

Cribbs, J.T., and Strack, S. (2007). Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep.* 8, 939–944.

Cueva, J.G., Hsin, J., Huang, K.C., and Goodman, M.B. (2012). Posttranslational acetylation of α -tubulin constrains protofilament number in native microtubules. *Curr. Biol. CB* 22, 1066–1074.

Cufer, T., and O'Brien, M.E.R. (2013). The PARAMOUNT study and the re-challenge chemotherapy issue in advanced non-small cell lung cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 49, 2269–2270.

D

Daire, V., and Poüs, C. (2011). Kinesins and protein kinases: key players in the regulation of microtubule dynamics and organization. *Arch. Biochem. Biophys.* 510, 83–92.

Daire, V., Giustiniani, J., Leroy-Gori, I., Quesnoit, M., Drevensek, S., Dimitrov, A., Perez, F., and Poüs, C. (2009). Kinesin-1 regulates microtubule dynamics via a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 284, 31992–32001.

Das, S., Gerwin, C., and Sheng, Z.-H. (2003). Syntaphilin binds to dynamin-1 and inhibits dynamin-dependent endocytosis. *J. Biol. Chem.* 278, 41221–41226.

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231–241.

Datta, S.R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S.W., Yaffe, M.B., and Greenberg, M.E. (2000). 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol. Cell* 6, 41–51.

Daugas, E., Susin, S.A., Zamzami, N., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prévost, M.C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J., et al. (2000). Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 14, 729–739.

- Davies, M.A., Stenke-Hale, K., Tellez, C., Calderone, T.L., Deng, W., Prieto, V.G., Lazar, A.J.F., Gershenwald, J.E., and Mills, G.B. (2008). A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *Br. J. Cancer* *99*, 1265–1268.
- Dean, N.M., and Bennett, C.F. (2003). Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer. *Oncogene* *22*, 9087–9096.
- De Groot, C.O., Jelesarov, I., Damberger, F.F., Bjelić, S., Schärer, M.A., Bhavesh, N.S., Grigoriev, I., Buey, R.M., Wüthrich, K., Capitani, G., et al. (2010). Molecular insights into mammalian end-binding protein heterodimerization. *J. Biol. Chem.* *285*, 5802–5814.
- de la Peña, L., Burgan, W.E., Carter, D.J., Hollingshead, M.G., Satymitra, M., Camphausen, K., and Tofilon, P.J. (2006). Inhibition of Akt by the alkylphospholipid perifosine does not enhance the radiosensitivity of human glioma cells. *Mol. Cancer Ther.* *5*, 1504–1510.
- Demetrius, L.A., and Driver, J. (2013). Alzheimer's as a metabolic disease. *Biogerontology* *14*, 641–649.
- Dempke, W.C.M. (2015). Targeted Therapy for NSCLC-A Double-edged Sword? *Anticancer Res.* *35*, 2503–2512.
- Denoulet, P., Eddé, B., and Gros, F. (1986). Differential expression of several neurospecific beta-tubulin mRNAs in the mouse brain during development. *Gene* *50*, 289–297.
- Desai, A., and Mitchison, T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *13*, 83–117.
- Devaux, S., Poulain, F.E., Devignot, V., Lachkar, S., Irinopoulou, T., and Sobel, A. (2012). Specific serine-proline phosphorylation and glycogen synthase kinase 3 β -directed subcellular targeting of stathmin 3/Sclip in neurons. *J. Biol. Chem.* *287*, 22341–22353.
- De Vos, K.J., Allan, V.J., Grierson, A.J., and Sheetz, M.P. (2005). Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. *Curr. Biol. CB* *15*, 678–683.
- Di Cristofano, A., and Pandolfi, P.P. (2000). The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* *100*, 387–390.
- Dillon, R.L., Marcotte, R., Hennessy, B.T., Woodgett, J.R., Mills, G.B., and Muller, W.J. (2009). Akt1 and akt2 play distinct roles in the initiation and metastatic phases of mammary tumor progression. *Cancer Res.* *69*, 5057–5064.
- Dimitrov, A., Quesnoit, M., Moutel, S., Cantaloube, I., Poüs, C., and Perez, F. (2008). Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science* *322*, 1353–1356.
- Dixit, R., Barnett, B., Lazarus, J.E., Tokito, M., Goldman, Y.E., and Holzbaur, E.L.F. (2009). Microtubule plus-end tracking by CLIP-170 requires EB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 492–497.

Dobashi, Y., Kimura, M., Matsubara, H., Endo, S., Inazawa, J., and Ooi, A. (2012). Molecular alterations in AKT and its protein activation in human lung carcinomas. *Hum. Pathol.* *43*, 2229–2240.

Doble, B.W., and Woodgett, J.R. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* *116*, 1175–1186.

Doble, B.W., Patel, S., Wood, G.A., Kockeritz, L.K., and Woodgett, J.R. (2007). Functional redundancy of GSK-3 α and GSK-3 β in Wnt/ β -catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines. *Dev. Cell* *12*, 957–971.

Dong, X., Liu, F., Sun, L., Liu, M., Li, D., Su, D., Zhu, Z., Dong, J.-T., Fu, L., and Zhou, J. (2010). Oncogenic function of microtubule end-binding protein 1 in breast cancer. *J. Pathol.* *220*, 361–369.

Dubrovskaya, A., Kim, S., Salamone, R.J., Walker, J.R., Maira, S.-M., García-Echeverría, C., Schultz, P.G., and Reddy, V.A. (2009). The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 268–273.

Dudkina, N.V., Sunderhaus, S., Boekema, E.J., and Braun, H.-P. (2008). The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes. *J. Bioenerg. Biomembr.* *40*, 419–424.

Dybdal-Hargreaves, N.F., Risinger, A.L., and Mooberry, S.L. (2015). Eribulin Mesylate: Mechanism of Action of a Unique Microtubule-Targeting Agent. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *21*, 2445–2452.

E

Elrod, H.A., Lin, Y.-D., Yue, P., Wang, X., Lonial, S., Khuri, F.R., and Sun, S.-Y. (2007). The alkylphospholipid perifosine induces apoptosis of human lung cancer cells requiring inhibition of Akt and activation of the extrinsic apoptotic pathway. *Mol. Cancer Ther.* *6*, 2029–2038.

Embi, N., Rylatt, D.B., and Cohen, P. (1980). Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur. J. Biochem. FEBS* *107*, 519–527.

Engel, J.B., Schönhals, T., Häusler, S., Krockenberger, M., Schmidt, M., Horn, E., Köster, F., Dietl, J., Wischhusen, J., and Honig, A. (2011). Induction of programmed cell death by inhibition of AKT with the alkylphosphocholine perifosine in in vitro models of platinum sensitive and resistant ovarian cancers. *Arch. Gynecol. Obstet.* *283*, 603–610.

Enomoto, Y., Kenmotsu, H., Watanabe, N., Baba, T., Murakami, H., Yoh, K., Ogura, T., Takahashi, T., Goto, K., and Kato, T. (2015). Efficacy and Safety of Combined Carboplatin, Paclitaxel, and Bevacizumab for Patients with Advanced Non-squamous Non-small Cell Lung Cancer with Pre-existing Interstitial Lung Disease: A Retrospective Multi-institutional Study. *Anticancer Res.* *35*, 4259–4263.

Erickson, H.P., and O'Brien, E.T. (1992). Microtubule dynamic instability and GTP hydrolysis. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *21*, 145–166.

Ernst, D.S., Eisenhauer, E., Wainman, N., Davis, M., Lohmann, R., Baetz, T., Belanger, K., and Smylie, M. (2005). Phase II study of perifosine in previously untreated patients with metastatic melanoma. *Invest. New Drugs* *23*, 569–575.

Esposti, M. Degli, and Dive, C. (2003). Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *304*, 455–461.

Estève, M.-A., Carré, M., Bourgarel-Rey, V., Kruczynski, A., Raspaglio, G., Ferlini, C., and Braguer, D. (2006). Bcl-2 down-regulation and tubulin subtype composition are involved in resistance of ovarian cancer cells to vinflunine. *Mol. Cancer Ther.* *5*, 2824–2833.

Estève, M.-A., Carré, M., and Braguer, D. (2007). Microtubules in apoptosis induction: are they necessary? *Curr. Cancer Drug Targets* *7*, 713–729.

Esteves, A.R., Gozes, I., and Cardoso, S.M. (2014). The rescue of microtubule-dependent traffic recovers mitochondrial function in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1842*, 7–21.

F

Fan, D.-P., Zhang, Y.-M., Hu, X.-C., Li, J.-J., and Zhang, W. (2014). Activation of AKT/ERK confers non-small cell lung cancer cells resistance to vinorelbine. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *7*, 134–143.

Fang, J., Seki, T., and Maeda, H. (2009). Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *61*, 290–302.

Fang, R., Xiao, T., Fang, Z., Sun, Y., Li, F., Gao, Y., Feng, Y., Li, L., Wang, Y., Liu, X., et al. (2012). MicroRNA-143 (miR-143) Regulates Cancer Glycolysis via Targeting Hexokinase 2 Gene. *J. Biol. Chem.* *287*, 23227–23235.

Feijs, K.L., Kleine, H., Braczynski, A., Forst, A.H., Herzog, N., Verheugd, P., Linzen, U., Kremmer, E., and Lüscher, B. (2013). ARTD10 substrate identification on protein microarrays: regulation of GSK3 β by mono-ADP-ribosylation. *Cell Commun. Signal. CCS* *11*, 5.

Feng, Y., Xia, Y., Yu, G., Shu, X., Ge, H., Zeng, K., Wang, J., and Wang, X. (2013). Cleavage of GSK-3 β by calpain counteracts the inhibitory effect of Ser9 phosphorylation on GSK-3 β activity induced by H₂O₂. *J. Neurochem.* *126*, 234–242.

Ferlini, C., Cicchillitti, L., Raspaglio, G., Bartollino, S., Cimitan, S., Bertucci, C., Mozzetti, S., Gallo, D., Persico, M., Fattorusso, C., et al. (2009). Paclitaxel directly binds to Bcl-2 and functionally mimics activity of Nur77. *Cancer Res.* *69*, 6906–6914.

Fernández-Moriano, C., González-Burgos, E., and Gómez-Serranillos, M.P. (2015). Mitochondria-Targeted Protective Compounds in Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2015*, 408927.

- Ferreira, J.G., Pereira, A.J., Akhmanova, A., and Maiato, H. (2013). Aurora B spatially regulates EB3 phosphorylation to coordinate daughter cell adhesion with cytokinesis. *J. Cell Biol.* *201*, 709–724.
- Ferreira, J.G., Pereira, A.L., and Maiato, H. (2014). Microtubule plus-end tracking proteins and their roles in cell division. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *309*, 59–140.
- Ferrer, P.E., Frederick, P., Gulbis, J.M., Dewson, G., and Kluck, R.M. (2012). Translocation of a Bak C-terminus mutant from cytosol to mitochondria to mediate cytochrome C release: implications for Bak and Bax apoptotic function. *PLoS One* *7*, e31510.
- Fiaschi, T., and Chiarugi, P. (2012). Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *Int. J. Cell Biol.* *2012*, 762825.
- Field, J.J., Kanakkanthara, A., and Miller, J.H. (2014). Microtubule-targeting agents are clinically successful due to both mitotic and interphase impairment of microtubule function. *Bioorg. Med. Chem.*
- Floryk, D., and Thompson, T.C. (2008). Perifosine induces differentiation and cell death in prostate cancer cells. *Cancer Lett.* *266*, 216–226.
- Fojo, A.T., and Menefee, M. (2005). Microtubule targeting agents: basic mechanisms of multidrug resistance (MDR). *Semin. Oncol.* *32*, S3–S8.
- Fokin, A.I., Brodsky, I.B., Burakov, A.V., and Nadezhdina, E.S. (2014). Interaction of early secretory pathway and Golgi membranes with microtubules and microtubule motors. *Biochem. Biokhimiia* *79*, 879–893.
- Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin. Oncol.* *29*, 15–18.
- Forte, M., and Bernardi, P. (2006). The permeability transition and BCL-2 family proteins in apoptosis: co-conspirators or independent agents? *Cell Death Differ.* *13*, 1287–1290.
- Fouladi, M., Perentesis, J.P., Phillips, C.L., Leary, S., Reid, J.M., McGovern, R.M., Ingle, A.M., Ahern, C.H., Ames, M.M., Houghton, P., et al. (2014). A phase I trial of MK-2206 in children with refractory malignancies: a Children's Oncology Group study. *Pediatr. Blood Cancer* *61*, 1246–1251.
- Frame, S., Cohen, P., and Biondi, R.M. (2001). A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol. Cell* *7*, 1321–1327.
- Franklin, J.L. (2011). Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 1437–1448.
- Frey, T.G., and Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 319–324.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* *64*, 97–112.

Friedman, J.R., and Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature* 505, 335–343.

Fu, S., Hennessy, B.T., Ng, C.S., Ju, Z., Coombes, K.R., Wolf, J.K., Sood, A.K., Levenback, C.F., Coleman, R.L., Kavanagh, J.J., et al. (2012). Perifosine plus docetaxel in patients with platinum and taxane resistant or refractory high-grade epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 126, 47–53.

Fulda, S., and Debatin, K.-M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25, 4798–4811.

Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., and Sessa, W.C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597–601.

G

Gamaley, I.A., and Klyubin, I.V. (1999). Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *Int. Rev. Cytol.* 188, 203–255.

Gao, L., Laude, K., and Cai, H. (2008). Mitochondrial pathophysiology, reactive oxygen species, and cardiovascular diseases. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 38, 137–155, vi.

Gao, L., Liu, G., Ma, J., Wang, X., Wang, F., Wang, H., and Sun, J. (2014). Paclitaxel nanosuspension coated with P-gp inhibitory surfactants: II. Ability to reverse the drug-resistance of H460 human lung cancer cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 117, 122–127.

Gao, Y., Ishiyama, H., Sun, M., Brinkman, K.L., Wang, X., Zhu, J., Mai, W., Huang, Y., Floryk, D., Ittmann, M., et al. (2011). The alkylphospholipid, perifosine, radiosensitizes prostate cancer cells both in vitro and in vivo. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* 6, 39.

Gard, D.L., and Kirschner, M.W. (1987). Microtubule assembly in cytoplasmic extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *J. Cell Biol.* 105, 2191–2201.

Garnham, C.P., and Roll-Mecak, A. (2012). The chemical complexity of cellular microtubules: tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions. *Cytoskelet. Hoboken NJ* 69, 442–463.

Gatenby, R.A., and Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4, 891–899.

Giatromanolaki, A., Koukourakis, M.I., O’Byrne, K., Kaklamanis, L., Dicoğlu, C., Trichia, E., Whitehouse, R., Harris, A.L., and Gatter, K.C. (1996). Non-small cell lung cancer: c-erbB-2 overexpression correlates with low angiogenesis and poor prognosis. *Anticancer Res.* 16, 3819–3825.

Gierke, S., and Wittmann, T. (2012). EB1-recruited microtubule +TIP complexes coordinate protrusion dynamics during 3D epithelial remodeling. *Curr. Biol. CB* 22, 753–762.

- Gilkerson, R.W., Margineantu, D.H., Capaldi, R.A., and Selker, J.M. (2000). Mitochondrial DNA depletion causes morphological changes in the mitochondrial reticulum of cultured human cells. *FEBS Lett.* *474*, 1–4.
- Gilley, J., Coffey, P.J., and Ham, J. (2003). FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J. Cell Biol.* *162*, 613–622.
- Gireesh, K.K., Sreeja, J.S., Chakraborti, S., Singh, P., Thomas, G.E., Gupta, H., and Manna, T. (2014). Microtubule +TIP protein EB1 binds to GTP and undergoes dissociation from dimer to monomer on binding GTP. *Biochemistry (Mosc.)* *53*, 5551–5557.
- Giustiniani, J., Daire, V., Cantaloube, I., Durand, G., Poüs, C., Perdiz, D., and Baillet, A. (2009). Tubulin acetylation favors Hsp90 recruitment to microtubules and stimulates the signaling function of the Hsp90 clients Akt/PKB and p53. *Cell. Signal.* *21*, 529–539.
- Godena, V.K., Brookes-Hocking, N., Moller, A., Shaw, G., Oswald, M., Sancho, R.M., Miller, C.C.J., Whitworth, A.J., and De Vos, K.J. (2014). Increasing microtubule acetylation rescues axonal transport and locomotor deficits caused by LRRK2 Roc-COR domain mutations. *Nat. Commun.* *5*, 5245.
- Goel, S., Duda, D.G., Xu, L., Munn, L.L., Boucher, Y., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2011). Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol. Rev.* *91*, 1071–1121.
- Goetze, K., Walenta, S., Ksiazkiewicz, M., Kunz-Schughart, L.A., and Mueller-Klieser, W. (2011). Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *Int. J. Oncol.* *39*, 453–463.
- Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2010). The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. *Mol. Aspects Med.* *31*, 60–74.
- Goñi-Oliver, P., Lucas, J.J., Avila, J., and Hernández, F. (2007). N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: a new form of GSK-3 regulation. *J. Biol. Chem.* *282*, 22406–22413.
- Gonzalez, E., and McGraw, T.E. (2009). The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle Georget. Tex* *8*, 2502–2508.
- Gonzalez-Angulo, A.M., Krop, I., Akcakanat, A., Chen, H., Liu, S., Li, Y., Culotta, K.S., Tarco, E., Piha-Paul, S., Moulder-Thompson, S., et al. (2015). SU2C phase Ib study of paclitaxel and MK-2206 in advanced solid tumors and metastatic breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *107*.
- Gottesman, M.M., Fojo, T., and Bates, S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 48–58.
- Gouveia, S.M., and Akhmanova, A. (2010). Cell and molecular biology of microtubule plus end tracking proteins: end binding proteins and their partners. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *285*, 1–74.
- Gradishar, W.J., Tjulandin, S., Davidson, N., Shaw, H., Desai, N., Bhar, P., Hawkins, M., and O’Shaughnessy, J. (2005). Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared

with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 7794–7803.

Grigoriev, I., Borisy, G., and Vorobjev, I. (2006). Regulation of microtubule dynamics in 3T3 fibroblasts by Rho family GTPases. *Cell Motil. Cytoskeleton* 63, 29–40.

Griparic, L., van der Wel, N.N., Orozco, I.J., Peters, P.J., and van der Blik, A.M. (2004). Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 18792–18798.

Grivennikova, V.G., and Vinogradov, A.D. (2006). Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 553–561.

Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S.J. (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.* 274, 1156–1163.

Grosse-Gehling, P., Fargeas, C.A., Dittfeld, C., Garbe, Y., Alison, M.R., Corbeil, D., and Kunz-Schughart, L.A. (2013). CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges. *J. Pathol.* 229, 355–378.

Gundersen, G.G., and Bulinski, J.C. (1988). Selective stabilization of microtubules oriented toward the direction of cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5946–5950.

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, 251–264.

Gupta, A., Rosenberger, S.F., and Bowden, G.T. (1999). Increased ROS levels contribute to elevated transcription factor and MAP kinase activities in malignantly progressed mouse keratinocyte cell lines. *Carcinogenesis* 20, 2063–2073.

Gupta, M.L., Carvalho, P., Roof, D.M., and Pellman, D. (2006). Plus end-specific depolymerase activity of Kip3, a kinesin-8 protein, explains its role in positioning the yeast mitotic spindle. *Nat. Cell Biol.* 8, 913–923.

Gupta, N., Hatoum, H., and Dy, G.K. (2014). First line treatment of advanced non-small-cell lung cancer - specific focus on albumin bound paclitaxel. *Int. J. Nanomedicine* 9, 209–221.

Guzun, R., Gonzalez-Granillo, M., Karu-Varikmaa, M., Grichine, A., Usson, Y., Kaambre, T., Guerrero-Roesch, K., Kuznetsov, A., Schlattner, U., and Saks, V. (2012). Regulation of respiration in muscle cells in vivo by VDAC through interaction with the cytoskeleton and MtCK within Mitochondrial Interactosome. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 1545–1554.

H

Hackenbrock, C.R. (1966). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J. Cell Biol.* *30*, 269–297.

Hafsi, S., Pezzino, F.M., Candido, S., Ligresti, G., Spandidos, D.A., Souza, Z., McCubrey, J.A., Travali, S., and Libra, M. (2012). Gene alterations in the PI3K/PTEN/AKT pathway as a mechanism of drug-resistance (review). *Int. J. Oncol.* *40*, 639–644.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.

Hanahan, D., Bergers, G., and Bergsland, E. (2000). Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *J. Clin. Invest.* *105*, 1045–1047.

Harada, H., Itasaka, S., Kizaka-Kondoh, S., Shibuya, K., Morinibu, A., Shinomiya, K., and Hiraoka, M. (2009). The Akt/mTOR Pathway Assures the Synthesis of HIF-1 α Protein in a Glucose- and Reoxygenation-dependent Manner in Irradiated Tumors. *J. Biol. Chem.* *284*, 5332–5342.

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*, 270–278.

Hassan, H.M. (1980). Superoxide dismutases. *Ciba Found. Symp.* *79*, 125–142.

Hayashi, I., Wilde, A., Mal, T.K., and Ikura, M. (2005). Structural basis for the activation of microtubule assembly by the EB1 and p150Glued complex. *Mol. Cell* *19*, 449–460.

He, K., Xu, T., Xu, Y., Ring, A., Kahn, M., and Goldkorn, A. (2014). Cancer cells acquire a drug resistant, highly tumorigenic, cancer stem-like phenotype through modulation of the PI3K/Akt/ β -catenin/CBP pathway. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *134*, 43–54.

Head, B., Griparic, L., Amiri, M., Gandre-Babbe, S., and van der Bliek, A.M. (2009). Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *J. Cell Biol.* *187*, 959–966.

Helgason, H.H., Kruijtzter, C.M.F., Huitema, A.D.R., Marcus, S.G., Bokkel Huinink, W.W. ten, Schot, M.E., Schornagel, J.H., Beijnen, J.H., and Schellens, J.H.M. (2006). Phase II and pharmacological study of oral paclitaxel (Paxoral) plus ciclosporin in anthracycline-pretreated metastatic breast cancer. *Br. J. Cancer* *95*, 794–800.

Herrera, B., Alvarez, A.M., Sánchez, A., Fernández, M., Roncero, C., Benito, M., and Fabregat, I. (2001). Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *15*, 741–751.

- Herst, P.M., and Berridge, M.V. (2007). Cell surface oxygen consumption: a major contributor to cellular oxygen consumption in glycolytic cancer cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 170–177.
- Hertzer, K.M., Ems-McClung, S.C., and Walczak, C.E. (2003). Kin I kinesins: insights into the mechanism of depolymerization. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38, 453–469.
- Heymann, J.A.W., and Hinshaw, J.E. (2009). Dynamins at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 3427–3431.
- Hideshima, T., Catley, L., Yasui, H., Ishitsuka, K., Raje, N., Mitsiades, C., Podar, K., Munshi, N.C., Chauhan, D., Richardson, P.G., et al. (2006). Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood* 107, 4053–4062.
- Hirai, H., Sootome, H., Nakatsuru, Y., Miyama, K., Taguchi, S., Tsujioka, K., Ueno, Y., Hatch, H., Majumder, P.K., Pan, B.-S., et al. (2010). MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* 9, 1956–1967.
- Hirokawa, N., and Takemura, R. (2005). Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 201–214.
- Hoeflich, K.P., Luo, J., Rubie, E.A., Tsao, M.S., Jin, O., and Woodgett, J.R. (2000). Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406, 86–90.
- Von Hoff, D.D., Ervin, T., Arena, F.P., Chiorean, E.G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S.A., Ma, W.W., Saleh, M.N., et al. (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N. Engl. J. Med.* 369, 1691–1703.
- Honnappa, S., John, C.M., Kostrewa, D., Winkler, F.K., and Steinmetz, M.O. (2005). Structural insights into the EB1-APC interaction. *EMBO J.* 24, 261–269.
- Honnappa, S., Okhrimenko, O., Jaussi, R., Jawhari, H., Jelesarov, I., Winkler, F.K., and Steinmetz, M.O. (2006). Key interaction modes of dynamic +TIP networks. *Mol. Cell* 23, 663–671.
- Honore, S., and Braguer, D. (2011). Investigating microtubule dynamic instability using microtubule-targeting agents. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 777, 245–260.
- Honore, S., Pasquier, E., and Braguer, D. (2005). Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 62, 3039–3056.
- Honoré, S., Pagano, A., Gauthier, G., Bourgarel-Rey, V., Verdier-Pinard, P., Civiletti, K., Kruczynski, A., and Braguer, D. (2008). Antiangiogenic vinflunine affects EB1 localization and microtubule targeting to adhesion sites. *Mol. Cancer Ther.* 7, 2080–2089.
- Höök, P., and Vallee, R.B. (2006). The dynein family at a glance. *J. Cell Sci.* 119, 4369–4371.

Hoppins, S., Edlich, F., Cleland, M.M., Banerjee, S., McCaffery, J.M., Youle, R.J., and Nunnari, J. (2011). The soluble form of Bax regulates mitochondrial fusion via MFN2 homotypic complexes. *Mol. Cell* *41*, 150–160.

Horio, T., and Murata, T. (2014). The role of dynamic instability in microtubule organization. *Front. Plant Sci.* *5*, 511.

Hoshi, M., Takashima, A., Noguchi, K., Murayama, M., Sato, M., Kondo, S., Saitoh, Y., Ishiguro, K., Hoshino, T., and Imahori, K. (1996). Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 2719–2723.

Howard, J., and Hyman, A.A. (2007). Microtubule polymerases and depolymerases. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 31–35.

Howell, B., Deacon, H., and Cassimeris, L. (1999). Decreasing oncoprotein 18/stathmin levels reduces microtubule catastrophes and increases microtubule polymer in vivo. *J. Cell Sci.* *112 (Pt 21)*, 3713–3722.

Huang, Y., Goel, S., Duda, D.G., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2013). Vascular normalization as an emerging strategy to enhance cancer immunotherapy. *Cancer Res.* *73*, 2943–2948.

Hughes, K., Nikolakaki, E., Plyte, S.E., Totty, N.F., and Woodgett, J.R. (1993). Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* *12*, 803–808.

Hyman, A.A., and Mitchison, T.J. (1991). Two different microtubule-based motor activities with opposite polarities in kinetochores. *Nature* *351*, 206–211.

I

Iimori, M., Ozaki, K., Chikashige, Y., Habu, T., Hiraoka, Y., Maki, T., Hayashi, I., Obuse, C., and Matsumoto, T. (2012). A mutation of the fission yeast EB1 overcomes negative regulation by phosphorylation and stabilizes microtubules. *Exp. Cell Res.* *318*, 262–275.

Irie, H.Y., Pearline, R.V., Grueneberg, D., Hsia, M., Ravichandran, P., Kothari, N., Natesan, S., and Brugge, J.S. (2005). Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* *171*, 1023–1034.

Irwin, M.S., and Park, J.R. (2015). Neuroblastoma: paradigm for precision medicine. *Pediatr. Clin. North Am.* *62*, 225–256.

J

Jain, R.K. (2013). Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *31*, 2205–2218.

Janke, C. (2014). The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. *J. Cell Biol.* *206*, 461–472.

Jimenez, C., Jones, D.R., Rodríguez-Viciana, P., Gonzalez-García, A., Leonardo, E., Wennström, S., von Kobbe, C., Toran, J.L., R-Borlado, L., Calvo, V., et al. (1998). Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *EMBO J.* *17*, 743–753.

Jiménez-Mateos, E.-M., González-Billault, C., Dawson, H.N., Vitek, M.P., and Avila, J. (2006). Role of MAP1B in axonal retrograde transport of mitochondria. *Biochem. J.* *397*, 53–59.

Jin, X., Mo, R., Ding, Y., Zheng, W., and Zhang, C. (2014). Paclitaxel-loaded N-octyl-O-sulfate chitosan micelles for superior cancer therapeutic efficacy and overcoming drug resistance. *Mol. Pharm.* *11*, 145–157.

Jope, R.S., and Johnson, G.V.W. (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* *29*, 95–102.

Jordan, M.A., and Wilson, L. (1998). Use of drugs to study role of microtubule assembly dynamics in living cells. *Methods Enzymol.* *298*, 252–276.

Jordan, M.A., and Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 253–265.

Jordan, M.A., Thrower, D., and Wilson, L. (1991). Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. *Cancer Res.* *51*, 2212–2222.

Jordan, M.A., Toso, R.J., Thrower, D., and Wilson, L. (1993). Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 9552–9556.

Jordan, M.A., Kamath, K., Manna, T., Okouneva, T., Miller, H.P., Davis, C., Littlefield, B.A., and Wilson, L. (2005). The primary antimetabolic mechanism of action of the synthetic halichondrin E7389 is suppression of microtubule growth. *Mol. Cancer Ther.* *4*, 1086–1095.

Jose, C., and Rossignol, R. (2013). Rationale for mitochondria-targeting strategies in cancer bioenergetic therapies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *45*, 123–129.

Joshi, H.C. (1994). Microtubule organizing centers and gamma-tubulin. *Curr. Opin. Cell Biol.* *6*, 54–62.

Joza, N., Pospisilik, J.A., Hangen, E., Hanada, T., Modjtahedi, N., Penninger, J.M., and Kroemer, G. (2009). AIF: not just an apoptosis-inducing factor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1171*, 2–11.

K

Kaidanovich-Beilin, O., Lipina, T.V., Takao, K., van Eede, M., Hattori, S., Laliberté, C., Khan, M., Okamoto, K., Chambers, J.W., Fletcher, P.J., et al. (2009). Abnormalities in brain structure and behavior in GSK-3alpha mutant mice. *Mol. Brain* *2*, 35.

- Kanaba, T., Maesaki, R., Mori, T., Ito, Y., Hakoshima, T., and Mishima, M. (2013). Microtubule-binding sites of the CH domain of EB1 and its autoinhibition revealed by NMR. *Biochim. Biophys. Acta* *1834*, 499–507.
- Kang, J.-S., Tian, J.-H., Pan, P.-Y., Zald, P., Li, C., Deng, C., and Sheng, Z.-H. (2008). Docking of axonal mitochondria by syntaphilin controls their mobility and affects short-term facilitation. *Cell* *132*, 137–148.
- Kankotia, S., and Stacpoole, P.W. (2014). Dichloroacetate and cancer: new home for an orphan drug? *Biochim. Biophys. Acta* *1846*, 617–629.
- Kanthou, C., and Tozer, G.M. (2009). Microtubule depolymerizing vascular disrupting agents: novel therapeutic agents for oncology and other pathologies. *Int. J. Exp. Pathol.* *90*, 284–294.
- Kapoor, S., and Panda, D. (2012). Kinetic stabilization of microtubule dynamics by indanocine perturbs EB1 localization, induces defects in cell polarity and inhibits migration of MDA-MB-231 cells. *Biochem. Pharmacol.* *83*, 1495–1506.
- Karbowski, M., Lee, Y.-J., Gaume, B., Jeong, S.-Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J. Cell Biol.* *159*, 931–938.
- Karki, R., Mariani, M., Andreoli, M., He, S., Scambia, G., Shahabi, S., and Ferlini, C. (2013). β III-Tubulin: biomarker of taxane resistance or drug target? *Expert Opin. Ther. Targets* *17*, 461–472.
- Katsetos, C.D., Koutzaki, S., and Melvin, J.J. (2013). Mitochondrial dysfunction in neuromuscular disorders. *Semin. Pediatr. Neurol.* *20*, 202–215.
- Kaverina, I., Krylyshkina, O., Gimona, M., Beningo, K., Wang, Y.L., and Small, J.V. (2000). Enforced polarisation and locomotion of fibroblasts lacking microtubules. *Curr. Biol. CB* *10*, 739–742.
- Kawase, T., Ohki, R., Shibata, T., Tsutsumi, S., Kamimura, N., Inazawa, J., Ohta, T., Ichikawa, H., Aburatani, H., Tashiro, F., et al. (2009). PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt. *Cell* *136*, 535–550.
- Keller, P.J., Pampaloni, F., Lattanzi, G., and Stelzer, E.H.K. (2008). Three-dimensional microtubule behavior in *Xenopus* egg extracts reveals four dynamic states and state-dependent elastic properties. *Biophys. J.* *95*, 1474–1486.
- Kelly, R.J., Robey, R.W., Chen, C.C., Draper, D., Luchenko, V., Barnett, D., Oldham, R.K., Caluag, Z., Frye, A.R., Steinberg, S.M., et al. (2012). A pharmacodynamic study of the P-glycoprotein antagonist CBT-1® in combination with paclitaxel in solid tumors. *The Oncologist* *17*, 512.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* *26*, 239–257.

- Khawaja, N.R., Carré, M., Kovacic, H., Estève, M.A., and Braguer, D. (2008). Patupilone-induced apoptosis is mediated by mitochondrial reactive oxygen species through Bim relocalization to mitochondria. *Mol. Pharmacol.* *74*, 1072–1083.
- Khodiyar, V.K., Maltais, L.J., Ruef, B.J., Sneddon, K.M.B., Smith, J.R., Shimoyama, M., Cabral, F., Dumontet, C., Dutcher, S.K., Harvey, R.J., et al. (2007). A revised nomenclature for the human and rodent alpha-tubulin gene family. *Genomics* *90*, 285–289.
- Kim, B.M., and Chung, H.W. (2007). Hypoxia/reoxygenation induces apoptosis through a ROS-mediated caspase-8/Bid/Bax pathway in human lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *363*, 745–750.
- Kim, D.H., Zhang, T., Lee, S., and Dong, H.H. (2013a). FoxO6 in glucose metabolism (FoxO6). *J. Diabetes* *5*, 233–240.
- Kim, E.S., Moon, J., Herbst, R.S., Redman, M.W., Dakhil, S.R., Velasco, M.R., Hirsch, F.R., Mack, P.C., Kelly, K., Heymach, J.V., et al. (2013b). Phase II trial of carboplatin, paclitaxel, cetuximab, and bevacizumab followed by cetuximab and bevacizumab in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer: SWOG S0536. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* *8*, 1519–1528.
- Kirkegaard, T., Witton, C.J., Edwards, J., Nielsen, K.V., Jensen, L.B., Campbell, F.M., Cooke, T.G., and Bartlett, J.M.S. (2010). Molecular alterations in AKT1, AKT2 and AKT3 detected in breast and prostatic cancer by FISH. *Histopathology* *56*, 203–211.
- Kirschner, M.W., and Williams, R.C. (1974). The mechanism of microtubule assembly in vitro. *J. Supramol. Struct.* *2*, 412–428.
- Knowling, M., Blackstein, M., Tozer, R., Bramwell, V., Dancey, J., Dore, N., Matthews, S., and Eisenhauer, E. (2006). A phase II study of perifosine (D-21226) in patients with previously untreated metastatic or locally advanced soft tissue sarcoma: A National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial. *Invest. New Drugs* *24*, 435–439.
- Kohn, A.D., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., and Roth, R.A. (1996). Expression of a Constitutively Active Akt Ser/Thr Kinase in 3T3-L1 Adipocytes Stimulates Glucose Uptake and Glucose Transporter 4 Translocation. *J. Biol. Chem.* *271*, 31372–31378.
- Komarova, Y., Lansbergen, G., Galjart, N., Grosveld, F., Borisy, G.G., and Akhmanova, A. (2005). EB1 and EB3 control CLIP dissociation from the ends of growing microtubules. *Mol. Biol. Cell* *16*, 5334–5345.
- Komarova, Y., De Groot, C.O., Grigoriev, I., Gouveia, S.M., Munteanu, E.L., Schober, J.M., Honnappa, S., Buey, R.M., Hoogenraad, C.C., Dogterom, M., et al. (2009). Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *J. Cell Biol.* *184*, 691–706.
- Komarova, Y.A., Akhmanova, A.S., Kojima, S.-I., Galjart, N., and Borisy, G.G. (2002). Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. *J. Cell Biol.* *159*, 589–599.
- Komarova, Y.A., Huang, F., Geyer, M., Daneshjou, N., Garcia, A., Idalino, L., Kreutz, B., Mehta, D., and Malik, A.B. (2012). VE-cadherin signaling induces EB3 phosphorylation to suppress microtubule growth and assemble adherens junctions. *Mol. Cell* *48*, 914–925.

Kondapaka, S.B., Singh, S.S., Dasmahapatra, G.P., Sausville, E.A., and Roy, K.K. (2003). Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol. Cancer Ther.* 2, 1093–1103.

Kueh, H.Y., and Mitchison, T.J. (2009). Structural plasticity in actin and tubulin polymer dynamics. *Science* 325, 960–963.

Kumar, C.C., and Madison, V. (2005). AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* 24, 7493–7501.

Kumar, A., Fillmore, H.L., Kadian, R., Broaddus, W.C., Tye, G.W., and Van Meter, T.E. (2009). The alkylphospholipid perifosine induces apoptosis and p21-mediated cell cycle arrest in medulloblastoma. *Mol. Cancer Res. MCR* 7, 1813–1821.

Kupfer, A., Louvard, D., and Singer, S.J. (1982). Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 2603–2607.

Kuranaga, E. (2012). Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions in vivo. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 17, 83–97.

L

Lackner, L.L. (2014). Shaping the dynamic mitochondrial network. *BMC Biol.* 12, 35.

Lackner, L.L., and Nunnari, J.M. (2009). The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 1138–1144.

Lansbergen, G., and Akhmanova, A. (2006). Microtubule plus end: a hub of cellular activities. *Traffic Cph. Den.* 7, 499–507.

Lara, P.N., Longmate, J., Mack, P.C., Kelly, K., Socinski, M.A., Salgia, R., Gitlitz, B., Li, T., Koczywas, M., Reckamp, K.L., et al. (2015). Phase II Study of the AKT inhibitor MK-2206 plus Erlotinib in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer who Previously Progressed on Erlotinib. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*

Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359–369.

Leandro-García, L.J., Leskelä, S., Landa, I., Montero-Conde, C., López-Jiménez, E., Letón, R., Cascón, A., Robledo, M., and Rodríguez-Antona, C. (2010). Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isotypes. *Cytoskelet. Hoboken NJ* 67, 214–223.

Lee, H.J., Heo, D.-S., Cho, J.-Y., Han, S.-W., Chang, H.-J., Yi, H.-G., Kim, T.-E., Lee, S.-H., Oh, D.-Y., Im, S.-A., et al. (2014). A Phase I Study of Oral Paclitaxel with a Novel P-Glycoprotein Inhibitor, HM30181A, in Patients with Advanced Solid Cancer. *Cancer Res. Treat. Off. J. Korean Cancer Assoc.* 46, 234–242.

Le Grand, M., Rovini, A., Bourgarel-Rey, V., Honore, S., Bastonero, S., Braguer, D., and Carre, M. (2014). ROS-mediated EBI phosphorylation through Akt/GSK3 β pathway: implication in cancer cell response to microtubule-targeting agents. *Oncotarget* 5, 3408–3423.

Leighl, N.B., Dent, S., Clemons, M., Vandenberg, T.A., Tozer, R., Warr, D.G., Crump, R.M., Hedley, D., Pond, G.R., Dancey, J.E., et al. (2008). A Phase 2 study of perifosine in advanced or metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *108*, 87–92.

Lewis, S.A., Gu, W., and Cowan, N.J. (1987). Free intermingling of mammalian beta-tubulin isotypes among functionally distinct microtubules. *Cell* *49*, 539–548.

L'Hernault, S.W., and Rosenbaum, J.L. (1985). Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry (Mosc.)* *24*, 473–478.

Li, D., Gao, J., Yang, Y., Sun, L., Suo, S., Luo, Y., Shui, W., Zhou, J., and Liu, M. (2014). CYLD coordinates with EB1 to regulate microtubule dynamics and cell migration. *Cell Cycle Georget. Tex* *13*, 974–983.

Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* *412*, 95–99.

Li, R., Moudgil, T., Ross, H.J., and Hu, H.-M. (2005). Apoptosis of non-small-cell lung cancer cell lines after paclitaxel treatment involves the BH3-only proapoptotic protein Bim. *Cell Death Differ.* *12*, 292–303.

Li, Z., Tan, F., Liewehr, D.J., Steinberg, S.M., and Thiele, C.J. (2010). In vitro and in vivo inhibition of neuroblastoma tumor cell growth by AKT inhibitor perifosine. *J. Natl. Cancer Inst.* *102*, 758–770.

Li, Z., Oh, D.-Y., Nakamura, K., and Thiele, C.J. (2011). Perifosine-induced inhibition of Akt attenuates brain-derived neurotrophic factor/TrkB-induced chemoresistance in neuroblastoma in vivo. *Cancer* *117*, 5412–5422.

Liao, Y., and Hung, M.-C. (2010). Physiological regulation of Akt activity and stability. *Am. J. Transl. Res.* *2*, 19–42.

Ligon, L.A., and Steward, O. (2000). Role of microtubules and actin filaments in the movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. *J. Comp. Neurol.* *427*, 351–361.

Lim, H.-S., Bae, K.-S., Jung, J.-A., Noh, Y.-H., Hwang, A.-K., Jo, Y.-W., Hong, Y.S., Kim, K., Lee, J.-L., Joon Park, S., et al. (2015). Predicting the Efficacy of an Oral Paclitaxel Formulation (DHP107) Through Modeling and Simulation. *Clin. Ther.*

Linseman, D.A., Butts, B.D., Precht, T.A., Phelps, R.A., Le, S.S., Laessig, T.A., Bouchard, R.J., Florez-McClure, M.L., and Heidenreich, K.A. (2004). Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 9993–10002.

Liu, Y.-M., Chen, H.-L., Lee, H.-Y., and Liou, J.-P. (2014). Tubulin inhibitors: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* *24*, 69–88.

Longthorne, V.L., and Williams, G.T. (1997). Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *EMBO J.* *16*, 3805–3812.

Lopez, J., and Tait, S.W.G. (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br. J. Cancer* *112*, 957–962.

López de Heredia, M., and Jansen, R.-P. (2004). mRNA localization and the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 80–85.

Louie, R.K., Bahmanyar, S., Siemers, K.A., Votin, V., Chang, P., Stearns, T., Nelson, W.J., and Barth, A.I.M. (2004). Adenomatous polyposis coli and EB1 localize in close proximity of the mother centriole and EB1 is a functional component of centrosomes. *J. Cell Sci.* *117*, 1117–1128.

Lovestone, S., Reynolds, C.H., Latimer, D., Davis, D.R., Anderton, B.H., Gallo, J.M., Hanger, D., Mulot, S., Marquardt, B., and Stabel, S. (1994). Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr. Biol. CB* *4*, 1077–1086.

Lu, C.-L., Qin, L., Liu, H.-C., Candas, D., Fan, M., and Li, J.J. (2015a). Tumor cells switch to mitochondrial oxidative phosphorylation under radiation via mTOR-mediated hexokinase II inhibition--a Warburg-reversing effect. *PloS One* *10*, e0121046.

Lu, J.-W., Lin, Y.-M., Lai, Y.-L., Chen, C.-Y., Hu, C.-Y., Tien, H.-F., Ou, D.-L., and Lin, L.-I. (2015b). MK-2206 induces apoptosis of AML cells and enhances the cytotoxicity of cytarabine. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* *32*, 650.

Ludueña, R.F. (1998). Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int. Rev. Cytol.* *178*, 207–275.

Ludueña, R.F. (2013). A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *302*, 41–185.

Luo, Y., Li, D., Ran, J., Yan, B., Chen, J., Dong, X., Liu, Z., Liu, R., Zhou, J., and Liu, M. (2014). End-binding protein 1 stimulates paclitaxel sensitivity in breast cancer by promoting its actions toward microtubule assembly and stability. *Protein Cell* *5*, 469–479.

M

MacAulay, K., Doble, B.W., Patel, S., Hansotia, T., Sinclair, E.M., Drucker, D.J., Nagy, A., and Woodgett, J.R. (2007). Glycogen synthase kinase 3alpha-specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. *Cell Metab.* *6*, 329–337.

Maccario, H., Perera, N.M., Davidson, L., Downes, C.P., and Leslie, N.R. (2007). PTEN is destabilized by phosphorylation on Thr366. *Biochem. J.* *405*, 439–444.

Maccioni, R.B., and Cambiazo, V. (1995). Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol. Rev.* *75*, 835–864.

Maeda, K., Hazama, S., Tokuno, K., Kan, S., Maeda, Y., Watanabe, Y., Kamei, R., Shindo, Y., Maeda, N., Yoshimura, K., et al. (2011). Impact of chemotherapy for colorectal cancer on regulatory T-cells and tumor immunity. *Anticancer Res.* *31*, 4569–4574.

- Majewski, N., Nogueira, V., Robey, R.B., and Hay, N. (2004). Akt inhibits apoptosis downstream of BID cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 730–740.
- Mak, B.C., and Yeung, R.S. (2004). The tuberous sclerosis complex genes in tumor development. *Cancer Invest.* *22*, 588–603.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* *129*, 1261–1274.
- Marchand, B., Tremblay, I., Cagnol, S., and Boucher, M.-J. (2012). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 activity triggers an apoptotic response in pancreatic cancer cells through JNK-dependent mechanisms. *Carcinogenesis* *33*, 529–537.
- Marchiq, I., and Pouyssegur, J. (2015). Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H(+) symporters. *J. Mol. Med. Berl. Ger.*
- Margolis, R.L., and Wilson, L. (1978). Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro. *Cell* *13*, 1–8.
- Margolis, R.L., and Wilson, L. (1981). Microtubule treadmills--possible molecular machinery. *Nature* *293*, 705–711.
- Margolis, R.L., and Wilson, L. (1998). Microtubule treadmilling: what goes around comes around. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *20*, 830–836.
- Maris, J.M., Hogarty, M.D., Bagatell, R., and Cohn, S.L. (2007). Neuroblastoma. *The Lancet* *369*, 2106–2120.
- Martelli, A.M., Evangelisti, C., Chiarini, F., and McCubrey, J.A. (2010). The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. *Oncotarget* *1*, 89–103.
- Martello, L.A., Verdier-Pinard, P., Shen, H.-J., He, L., Torres, K., Orr, G.A., and Horwitz, S.B. (2003). Elevated levels of microtubule destabilizing factors in a Taxol-resistant/dependent A549 cell line with an alpha-tubulin mutation. *Cancer Res.* *63*, 1207–1213.
- Martinez-Outschoorn, U., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2014). Tumor microenvironment and metabolic synergy in breast cancers: critical importance of mitochondrial fuels and function. *Semin. Oncol.* *41*, 195–216.
- Martinez-Outschoorn, U.E., Pestell, R.G., Howell, A., Tykocinski, M.L., Nagajyothi, F., Machado, F.S., Tanowitz, H.B., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2011). Energy transfer in “parasitic” cancer metabolism: mitochondria are the powerhouse and Achilles’ heel of tumor cells. *Cell Cycle Georget. Tex* *10*, 4208–4216.
- Martinez-Outschoorn, U.E., Balliet, R., Lin, Z., Whitaker-Menezes, D., Birbe, R.C., Bombonati, A., Pavlides, S., Lamb, R., Sneddon, S., Howell, A., et al. (2012). BRCA1 mutations drive oxidative stress and glycolysis in the tumor microenvironment: implications for breast cancer prevention with antioxidant therapies. *Cell Cycle Georget. Tex* *11*, 4402–4413.

- Marx, J. (2002). Nobel Prize in Physiology or Medicine. Tiny worm takes a star turn. *Science* 298, 526.
- Massarelli, E., Papadimitrakopoulou, V., Welsh, J., Tang, C., and Tsao, A.S. (2014). Immunotherapy in lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* 3, 53–63.
- Masure, S., Haefner, B., Wesselink, J.J., Hoefnagel, E., Mortier, E., Verhasselt, P., Tuytelaars, A., Gordon, R., and Richardson, A. (1999). Molecular cloning, expression and characterization of the human serine/threonine kinase Akt-3. *Eur. J. Biochem. FEBS* 265, 353–360.
- Matenia, D., and Mandelkow, E.-M. (2009). The tau of MARK: a polarized view of the cytoskeleton. *Trends Biochem. Sci.* 34, 332–342.
- Mathupala, S.P., Ko, Y.H., and Pedersen, P.L. (2006). Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene* 25, 4777–4786.
- Matov, A., Applegate, K., Kumar, P., Thoma, C., Krek, W., Danuser, G., and Wittmann, T. (2010). Analysis of microtubule dynamic instability using a plus-end growth marker. *Nat. Methods* 7, 761–768.
- Maulik, N. (2002). Redox signaling of angiogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* 4, 805–815.
- Maurer, S.P., Bieling, P., Cope, J., Hoenger, A., and Surrey, T. (2011). GTPgammaS microtubules mimic the growing microtubule end structure recognized by end-binding proteins (EBs). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 3988–3993.
- Maurer, S.P., Cade, N.I., Bohner, G., Gustafsson, N., Boutant, E., and Surrey, T. (2014). EB1 accelerates two conformational transitions important for microtubule maturation and dynamics. *Curr. Biol. CB* 24, 372–384.
- Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A.S., Dejardin, E., and Green, D.R. (2006). Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol. Cell* 21, 749–760.
- Mayo, L.D., and Donner, D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11598–11603.
- McCubrey, J.A., Davis, N.M., Abrams, S.L., Montalto, G., Cervello, M., Basecke, J., Libra, M., Nicoletti, F., Cocco, L., Martelli, A.M., et al. (2014). Diverse roles of GSK-3: tumor promoter-tumor suppressor, target in cancer therapy. *Adv. Biol. Regul.* 54, 176–196.
- McDermott-Roe, C., Ye, J., Ahmed, R., Sun, X.-M., Serafin, A., Ware, J., Bottolo, L., Muckett, P., Cañas, X., Zhang, J., et al. (2011). Endonuclease G is a novel determinant of cardiac hypertrophy and mitochondrial function. *Nature* 478, 114–118.
- McIntosh, J.R., Grishchuk, E.L., and West, R.R. (2002). Chromosome-microtubule interactions during mitosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 193–219.

- Meares, G.P., and Jope, R.S. (2007). Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3: functional effects in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 282, 16989–17001.
- Medema, R.H., Kops, G.J., Bos, J.L., and Burgering, B.M. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404, 782–787.
- Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J.M., and Nunnari, J. (2006). Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* 127, 383–395.
- Mehrad, B., Keane, M.P., and Strieter, R.M. (2007). Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thromb. Haemost.* 97, 755–762.
- Meier, P., Finch, A., and Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* 407, 796–801.
- Miller, K.E., and Sheetz, M.P. (2004). Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J. Cell Sci.* 117, 2791–2804.
- Miller, L.M., Xiao, H., Burd, B., Horwitz, S.B., Angeletti, R.H., and Verdier-Pinard, P. (2010). Methods in tubulin proteomics. *Methods Cell Biol.* 95, 105–126.
- Mimori-Kiyosue, Y., Grigoriev, I., Lansbergen, G., Sasaki, H., Matsui, C., Severin, F., Galjart, N., Grosveld, F., Vorobjev, I., Tsukita, S., et al. (2005). CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *J. Cell Biol.* 168, 141–153.
- Mishra, P., Carelli, V., Manfredi, G., and Chan, D.C. (2014). Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* 19, 630–641.
- Mistry, P., Deacon, K., Mistry, S., Blank, J., and Patel, R. (2004). NF-kappaB promotes survival during mitotic cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* 279, 1482–1490.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144–148.
- Mitchison, T.J. (1993). Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* 261, 1044–1047.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237–242.
- Mohan, R., Katrukha, E.A., Doodhi, H., Smal, I., Meijering, E., Kapitein, L.C., Steinmetz, M.O., and Akhmanova, A. (2013). End-binding proteins sensitize microtubules to the action of microtubule-targeting agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 8900–8905.
- Monteserin-Garcia, J., Al-Massadi, O., Seoane, L.M., Alvarez, C.V., Shan, B., Stalla, J., Paez-Pereda, M., Casanueva, F.F., Stalla, G.K., and Theodoropoulou, M. (2013). Sirt1 inhibits the transcription factor CREB to regulate pituitary growth hormone synthesis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 1561–1571.

- Morbidelli, L., Donnini, S., and Ziche, M. (2003). Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Curr. Pharm. Des.* *9*, 521–530.
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., and Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* *274*, 1393–1418.
- Morfini, G., Szebenyi, G., Elluru, R., Ratner, N., and Brady, S.T. (2002). Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *EMBO J.* *21*, 281–293.
- Morfini, G., Szebenyi, G., Brown, H., Pant, H.C., Pigino, G., DeBoer, S., Beffert, U., and Brady, S.T. (2004). A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *EMBO J.* *23*, 2235–2245.
- Moriyama, M., Metzger, S., van der Vlies, A.J., Uyama, H., Ehrbar, M., and Hasegawa, U. (2014). Inhibition of Angiogenesis by Antioxidant Micelles. *Adv. Healthc. Mater.*
- Morris, R.L., and Hollenbeck, P.J. (1995). Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J. Cell Biol.* *131*, 1315–1326.
- Morrison, E.E. (2009). The APC-EB1 interaction. *Adv. Exp. Med. Biol.* *656*, 41–50.
- Mostowy, S., and Cossart, P. (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 183–194.
- Moughamian, A.J., Osborn, G.E., Lazarus, J.E., Maday, S., and Holzbaur, E.L.F. (2013). Ordered Recruitment of Dynactin to the Microtubule Plus-End is Required for Efficient Initiation of Retrograde Axonal Transport. *J. Neurosci.* *33*, 13190–13203.
- Muñoz-Pinedo, C., Mjiyad, N. El, and Ricci, J.-E. (2012). Cancer metabolism: current perspectives and future directions. *Cell Death Dis.* *3*, e248.

N

- Nakamura, M., Zhou, X.Z., and Lu, K.P. (2001). Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization. *Curr. Biol. CB* *11*, 1062–1067.
- Nakamura, N., Kimura, Y., Tokuda, M., Honda, S., and Hirose, S. (2006). MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep.* *7*, 1019–1022.
- Nakano, A., Kato, H., Watanabe, T., Min, K.-D., Yamazaki, S., Asano, Y., Seguchi, O., Higo, S., Shintani, Y., Asanuma, H., et al. (2010). AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* *12*, 583–590.
- Nakashio, A., Fujita, N., Rokudai, S., Sato, S., and Tsuruo, T. (2000). Prevention of phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt survival signaling pathway during topotecan-induced apoptosis. *Cancer Res.* *60*, 5303–5309.

Nakatani, K., Sakaue, H., Thompson, D.A., Weigel, R.J., and Roth, R.A. (1999). Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 906–910.

Neuzil, J., Dong, L.-F., Rohlena, J., Truksa, J., and Ralph, S.J. (2013). Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion* 13, 199–208.

Newton, C.N., Wagenbach, M., Ovechkina, Y., Wordeman, L., and Wilson, L. (2004). MCAK, a Kin I kinesin, increases the catastrophe frequency of steady-state HeLa cell microtubules in an ATP-dependent manner in vitro. *FEBS Lett.* 572, 80–84.

Nobili, S., Landini, I., Mazzei, T., and Mini, E. (2012). Overcoming tumor multidrug resistance using drugs able to evade P-glycoprotein or to exploit its expression. *Med. Res. Rev.* 32, 1220–1262.

Nogales, E. (2000). Structural insights into microtubule function. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 277–302.

Nogales, E., and Wang, H.-W. (2006). Structural mechanisms underlying nucleotide-dependent self-assembly of tubulin and its relatives. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 221–229.

Nyåkern, M., Cappellini, A., Mantovani, I., and Martelli, A.M. (2006). Synergistic induction of apoptosis in human leukemia T cells by the Akt inhibitor perifosine and etoposide through activation of intrinsic and Fas-mediated extrinsic cell death pathways. *Mol. Cancer Ther.* 5, 1559–1570.

O

O'Brien, S., Moore, J.O., Boyd, T.E., Larratt, L.M., Skotnicki, A.B., Koziner, B., Chanan-Khan, A.A., Seymour, J.F., Gribben, J., Itri, L.M., et al. (2009). 5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 5208–5212.

Oddoux, S., Zaal, K.J., Tate, V., Kenea, A., Nandkeolyar, S.A., Reid, E., Liu, W., and Ralston, E. (2013). Microtubules that form the stationary lattice of muscle fibers are dynamic and nucleated at Golgi elements. *J. Cell Biol.* 203, 205–213.

Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., and Lenaers, G. (2003). Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 7743–7746.

Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 359–371.

Oren, M., Damalas, A., Gottlieb, T., Michael, D., Taplick, J., Leal, J.F.M., Maya, R., Moas, M., Seger, R., Taya, Y., et al. (2002). Regulation of p53: intricate loops and delicate balances. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 973, 374–383.

Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in

invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* *121*, 335–348.

Orimo, T., Ojima, H., Hiraoka, N., Saito, S., Kosuge, T., Kakisaka, T., Yokoo, H., Nakanishi, K., Kamiyama, T., Todo, S., et al. (2008). Proteomic profiling reveals the prognostic value of adenomatous polyposis coli-end-binding protein 1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. *Baltim. Md* *48*, 1851–1863.

O'Rourke, B., Yang, C.-P.H., Sharp, D., and Horwitz, S.B. (2014). Eribulin disrupts EB1-microtubule plus-tip complex formation. *Cell Cycle Georget. Tex* *13*, 3218–3221.

Ota, K., Azuma, K., Kawahara, A., Hattori, S., Iwama, E., Tanizaki, J., Harada, T., Matsumoto, K., Takayama, K., Takamori, S., et al. (2015). Induction of PD-L1 Expression by the EML4-ALK Oncoprotein and Downstream Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*

Otera, H., Wang, C., Cleland, M.M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R.J., and Mihara, K. (2010). Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Biol.* *191*, 1141–1158.

Ott, M., Robertson, J.D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 1259–1263.

P

Pagano, A., Honoré, S., Mohan, R., Berges, R., Akhmanova, A., and Braguer, D. (2012). Epothilone B inhibits migration of glioblastoma cells by inducing microtubule catastrophes and affecting EB1 accumulation at microtubule plus ends. *Biochem. Pharmacol.* *84*, 432–443.

Page, C., Lin, H.J., Jin, Y., Castle, V.P., Nunez, G., Huang, M., and Lin, J. (2000). Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. *Anticancer Res.* *20*, 407–416.

Paik, P.K., Rudin, C.M., Pietanza, M.C., Brown, A., Rizvi, N.A., Takebe, N., Travis, W., James, L., Ginsberg, M.S., Juergens, R., et al. (2011). A phase II study of obatoclox mesylate, a Bcl-2 antagonist, plus topotecan in relapsed small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* *74*, 481–485.

Palade, G.E. (1952). The fine structure of mitochondria. *Anat. Rec.* *114*, 427–451.

Palazzo, A., Ackerman, B., and Gundersen, G.G. (2003). Cell biology: Tubulin acetylation and cell motility. *Nature* *421*, 230.

Palazzo, A.F., Cook, T.A., Alberts, A.S., and Gundersen, G.G. (2001). mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat. Cell Biol.* *3*, 723–729.

Panda, D., Miller, H.P., and Wilson, L. (2002). Determination of the size and chemical nature of the stabilizing “cap” at microtubule ends using modulators of polymerization dynamics. *Biochemistry (Mosc.)* *41*, 1609–1617.

- Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1986). Involvement of guanosine triphosphate (GTP) hydrolysis in the mechanism of tubulin polymerization: regulation of microtubule dynamics at steady state by a GTP cap. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *466*, 496–509.
- Parsa, A.T., Waldron, J.S., Panner, A., Crane, C.A., Parney, I.F., Barry, J.J., Cachola, K.E., Murray, J.C., Tihan, T., Jensen, M.C., et al. (2007). Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat. Med.* *13*, 84–88.
- Pasquier, E., Carré, M., Pourroy, B., Camoin, L., Rebaï, O., Briand, C., and Braguer, D. (2004). Antiangiogenic activity of paclitaxel is associated with its cytostatic effect, mediated by the initiation but not completion of a mitochondrial apoptotic signaling pathway. *Mol. Cancer Ther.* *3*, 1301–1310.
- Pasquier, E., Ciccolini, J., Carre, M., Giacometti, S., Fanciullino, R., Pouchy, C., Montero, M.-P., Serdjebi, C., Kavallaris, M., and André, N. (2011). Propranolol potentiates the anti-angiogenic effects and anti-tumor efficacy of chemotherapy agents: implication in breast cancer treatment. *Oncotarget* *2*, 797–809.
- Pasquier, E., Street, J., Pouchy, C., Carre, M., Gifford, A.J., Murray, J., Norris, M.D., Trahair, T., Andre, N., and Kavallaris, M. (2013a). β -blockers increase response to chemotherapy via direct antitumour and anti-angiogenic mechanisms in neuroblastoma. *Br. J. Cancer* *108*, 2485–2494.
- Pasquier, E., Tuset, M.-P., Street, J., Sinnappan, S., MacKenzie, K.L., Braguer, D., Andre, N., and Kavallaris, M. (2013b). Concentration- and schedule-dependent effects of chemotherapy on the angiogenic potential and drug sensitivity of vascular endothelial cells. *Angiogenesis* *16*, 373–386.
- Pastorino, J.G., Shulga, N., and Hoek, J.B. (2002). Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* *277*, 7610–7618.
- Pastorino, J.G., Hoek, J.B., and Shulga, N. (2005). Activation of glycogen synthase kinase 3 β disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Res.* *65*, 10545–10554.
- Patel, S., Doble, B.W., MacAulay, K., Sinclair, E.M., Drucker, D.J., and Woodgett, J.R. (2008). Tissue-specific role of glycogen synthase kinase 3 β in glucose homeostasis and insulin action. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 6314–6328.
- Patel, V., Lahusen, T., Sy, T., Sausville, E.A., Gutkind, J.S., and Senderowicz, A.M. (2002). Perifosine, a novel alkylphospholipid, induces p21(WAF1) expression in squamous carcinoma cells through a p53-independent pathway, leading to loss in cyclin-dependent kinase activity and cell cycle arrest. *Cancer Res.* *62*, 1401–1409.
- Pathan, N., Aime-Sempe, C., Kitada, S., Basu, A., Haldar, S., and Reed, J.C. (2001). Microtubule-targeting drugs induce bcl-2 phosphorylation and association with Pin1. *Neoplasia* *N. Y. N* *3*, 550–559.
- Pavlides, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A.K., Frank, P.G., Casimiro, M.C., Wang, C., Fortina, P., Addya, S., et al. (2009). The reverse

Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 3984–4001.

Pereira, G., and Schiebel, E. (1997). Centrosome-microtubule nucleation. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 3), 295–300.

Perez, E.A. (2009). Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. *Mol. Cancer Ther.* 8, 2086–2095.

Peris, L., They, M., Fauré, J., Saoudi, Y., Lafanechère, L., Chilton, J.K., Gordon-Weeks, P., Galjart, N., Bornens, M., Wordeman, L., et al. (2006). Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J. Cell Biol.* 174, 839–849.

Peters, S., Adjei, A.A., Gridelli, C., Reck, M., Kerr, K., Felip, E., and ESMO Guidelines Working Group (2012). Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO 23 Suppl 7*, vii56–vii64.

Peth, A., Boettcher, J.P., and Dubiel, W. (2007). Ubiquitin-dependent proteolysis of the microtubule end-binding protein 1, EB1, is controlled by the COP9 signalosome: possible consequences for microtubule filament stability. *J. Mol. Biol.* 368, 550–563.

Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., Pistolese, M., and Paradies, G. (2001). Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in the apoptosis. *FEBS Lett.* 509, 435–438.

Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., Pistolese, M., and Paradies, G. (2004). Ca²⁺-induced reactive oxygen species production promotes cytochrome c release from rat liver mitochondria via mitochondrial permeability transition (MPT)-dependent and MPT-independent mechanisms: role of cardiolipin. *J. Biol. Chem.* 279, 53103–53108.

Pham-Huy, L.A., He, H., and Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS* 4, 89–96.

Picard, M., and Castells, M.C. (2014). Re-visiting Hypersensitivity Reactions to Taxanes: A Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*

Pich, S., Bach, D., Briones, P., Liesa, M., Camps, M., Testar, X., Palacín, M., and Zorzano, A. (2005). The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1405–1415.

Pilon, A., and Poüs, C. (2013). [Compartmentalization and plasticity of the microtubule network]. *Médecine Sci. MS* 29, 194–199.

Poreba, M., Strózyk, A., Salvesen, G.S., and Drag, M. (2013). Caspase substrates and inhibitors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a008680.

Potter, D.S., Kelly, P., Denny, O., Juvin, V., Stephens, L.R., Dive, C., and Morrow, C.J. (2014). BMX acts downstream of PI3K to promote colorectal cancer cell survival and pathway inhibition sensitizes to the BH3 mimetic ABT-737. *Neoplasia N. Y. N* 16, 147–157.

Pourroy, B., Carré, M., Honoré, S., Bourgarel-Rey, V., Kruczynski, A., Briand, C., and Braguer, D. (2004). Low concentrations of vinflunine induce apoptosis in human SK-N-SH neuroblastoma cells through a postmitotic G1 arrest and a mitochondrial pathway. *Mol. Pharmacol.* *66*, 580–591.

Pourroy, B., Honoré, S., Pasquier, E., Bourgarel-Rey, V., Kruczynski, A., Briand, C., and Braguer, D. (2006). Antiangiogenic concentrations of vinflunine increase the interphase microtubule dynamics and decrease the motility of endothelial cells. *Cancer Res.* *66*, 3256–3263.

Pronzato, P. (2008). New therapeutic options for chemotherapy-resistant metastatic breast cancer: the epothilones. *Drugs* *68*, 139–146.

Q

Quast, S.-A., Berger, A., and Eberle, J. (2013). ROS-dependent phosphorylation of Bax by wortmannin sensitizes melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Dis.* *4*, e839.

R

Rathmell, J.C., and Thompson, C.B. (2002). Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* *109 Suppl*, S97–S107.

Ray, P.D., Huang, B.-W., and Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* *24*, 981–990.

Rayasam, G.V., Tulasi, V.K., Sodhi, R., Davis, J.A., and Ray, A. (2009). Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *Br. J. Pharmacol.* *156*, 885–898.

Ready, N., Karaseva, N.A., Orlov, S.V., Luft, A.V., Popovych, O., Holmlund, J.T., Wood, B.A., and Leopold, L. (2011). Double-blind, placebo-controlled, randomized phase 2 study of the proapoptotic agent AT-101 plus docetaxel, in second-line non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* *6*, 781–785.

Rebecca, V.W., Massaro, R.R., Fedorenko, I.V., Sondak, V.K., Anderson, A.R.A., Kim, E., Amaravadi, R.K., Maria-Engler, S.S., Messina, J.L., Gibney, G.T., et al. (2014). Inhibition of autophagy enhances the effects of the AKT inhibitor MK-2206 when combined with paclitaxel and carboplatin in BRAF wild-type melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* *27*, 465–478.

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. CB* *16*, 2166–2172.

Rehberg, M., and Gräf, R. (2002). Dictyostelium EB1 is a genuine centrosomal component required for proper spindle formation. *Mol. Biol. Cell* *13*, 2301–2310.

Ren, H., Koo, J., Guan, B., Yue, P., Deng, X., Chen, M., Khuri, F.R., and Sun, S.-Y. (2013). The E3 ubiquitin ligases β -TrCP and FBXW7 cooperatively mediates GSK3-dependent Mcl-1 degradation induced by the Akt inhibitor API-1, resulting in apoptosis. *Mol. Cancer* *12*, 146.

- Ricci, J.-E., Gottlieb, R.A., and Green, D.R. (2003). Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J. Cell Biol.* *160*, 65–75.
- Rice, S., Lin, A.W., Safer, D., Hart, C.L., Naber, N., Carragher, B.O., Cain, S.M., Pechatnikova, E., Wilson-Kubalek, E.M., Whittaker, M., et al. (1999). A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature* *402*, 778–784.
- Richardson, P.G., Wolf, J., Jakubowiak, A., Zonder, J., Lonial, S., Irwin, D., Densmore, J., Krishnan, A., Raje, N., Bar, M., et al. (2011). Perifosine plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed/refractory multiple myeloma previously treated with bortezomib: results of a multicenter phase I/II trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 4243–4249.
- Rickard, J.E., and Kreis, T.E. (1990). Identification of a novel nucleotide-sensitive microtubule-binding protein in HeLa cells. *J. Cell Biol.* *110*, 1623–1633.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* *302*, 1704–1709.
- Riedl, S.J., and Salvesen, G.S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 405–413.
- Riedl, S.J., and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 897–907.
- Riehemann, K., and Sorg, C. (1993). Sequence homologies between four cytoskeleton-associated proteins. *Trends Biochem. Sci.* *18*, 82–83.
- Roberge, S., Roussel, J., Andersson, D.C., Meli, A.C., Vidal, B., Blandel, F., Lanner, J.T., Le Guennec, J.-Y., Katz, A., Westerblad, H., et al. (2014). TNF- α -mediated caspase-8 activation induces ROS production and TRPM2 activation in adult ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* *103*, 90–99.
- Roberts, D.J., and Miyamoto, S. (2014). Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell Death Differ.*
- Rodon, J., Dienstmann, R., Serra, V., and Tabernero, J. (2013). Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *10*, 143–153.
- Rodon, J., Braña, I., Siu, L.L., De Jonge, M.J., Homji, N., Mills, D., Di Tomaso, E., Sarr, C., Trandafir, L., Massacesi, C., et al. (2014). Phase I dose-escalation and -expansion study of buparlisib (BKM120), an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Invest. New Drugs* *32*, 670–681.
- Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S.J., and Capaldi, R.A. (2004). Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* *64*, 985–993.
- Rovini, A., Carré, M., Bordet, T., Pruss, R.M., and Braguer, D. (2010). Olesoxime prevents microtubule-targeting drug neurotoxicity: selective preservation of EB comets in differentiated neuronal cells. *Biochem. Pharmacol.* *80*, 884–894.

Rovini, A., Gauthier, G., Bergès, R., Kruczynski, A., Braguer, D., and Honoré, S. (2013). Anti-migratory effect of vinflunine in endothelial and glioblastoma cells is associated with changes in EB1 C-terminal detyrosinated/tyrosinated status. *PLoS One* 8, e65694.

Rudin, C.M., Hann, C.L., Garon, E.B., Ribeiro de Oliveira, M., Bonomi, P.D., Camidge, D.R., Chu, Q., Giaccone, G., Khaira, D., Ramalingam, S.S., et al. (2012). Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 3163–3169.

Rusch, V., Klimstra, D., Venkatraman, E., Pisters, P.W., Langenfeld, J., and Dmitrovsky, E. (1997). Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 3, 515–522.

Rychahou, P.G., Kang, J., Gulhati, P., Doan, H.Q., Chen, L.A., Xiao, S.-Y., Chung, D.H., and Evers, B.M. (2008). Akt2 overexpression plays a critical role in the establishment of colorectal cancer metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20315–20320.

S

Sakamoto, K., and Holman, G.D. (2008). Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E29–E37.

Salem, A.F., Whitaker-Menezes, D., Lin, Z., Martinez-Outschoorn, U.E., Tanowitz, H.B., Al-Zoubi, M.S., Howell, A., Pestell, R.G., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2012). Two-compartment tumor metabolism: autophagy in the tumor microenvironment and oxidative mitochondrial metabolism (OXPHOS) in cancer cells. *Cell Cycle Georget. Tex* 11, 2545–2556.

Sánchez-Aragó, M., Chamorro, M., and Cuezva, J.M. (2010). Selection of cancer cells with repressed mitochondria triggers colon cancer progression. *Carcinogenesis* 31, 567–576.

Sansal, I., and Sellers, W.R. (2004). The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 22, 2954–2963.

Santel, A., and Fuller, M.T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.* 114, 867–874.

Sartelet, H., Imbriglio, T., Nyalendo, C., Haddad, E., Annabi, B., Duval, M., Fetni, R., Victor, K., Alexendrov, L., Sinnett, D., et al. (2012). CD133 expression is associated with poor outcome in neuroblastoma via chemoresistance mediated by the AKT pathway. *Histopathology* 60, 1144–1155.

Satouchi, M., Okamoto, I., Sakai, H., Yamamoto, N., Ichinose, Y., Ohmatsu, H., Nogami, N., Takeda, K., Mitsudomi, T., Kasahara, K., et al. (2013). Efficacy and safety of weekly nab-paclitaxel plus carboplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* 81, 97–101.

Savry, A., Carre, M., Berges, R., Rovini, A., Pobel, I., Chacon, C., Braguer, D., and Bourgarel-Rey, V. (2013). Bcl-2-enhanced efficacy of microtubule-targeting chemotherapy through Bim overexpression: implications for cancer treatment. *Neoplasia N. Y.* 15, 49–60.

- Sawa, H., Kobayashi, T., Mukai, K., Zhang, W., and Shiku, H. (2000). Bax overexpression enhances cytochrome c release from mitochondria and sensitizes KATOIII gastric cancer cells to chemotherapeutic agent-induced apoptosis. *Int. J. Oncol.* *16*, 745–749.
- Sawyers, C.L. (2008). The cancer biomarker problem. *Nature* *452*, 548–552.
- Saxton, W.M., and Hollenbeck, P.J. (2012). The axonal transport of mitochondria. *J. Cell Sci.* *125*, 2095–2104.
- Schimmer, A.D. (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res.* *64*, 7183–7190.
- Schober, J.M., Cain, J.M., Komarova, Y.A., and Borisy, G.G. (2009). Migration and actin protrusion in melanoma cells are regulated by EB1 protein. *Cancer Lett.* *284*, 30–36.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* *331*, 1565–1570.
- Schuyler, S.C., and Pellman, D. (2001). Microtubule “plus-end-tracking proteins”: The end is just the beginning. *Cell* *105*, 421–424.
- Schwartz, E.L. (2009). Antivascular actions of microtubule-binding drugs. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 2594–2601.
- Schwartz, K., Richards, K., and Botstein, D. (1997). BIM1 encodes a microtubule-binding protein in yeast. *Mol. Biol. Cell* *8*, 2677–2691.
- Sekimoto, T., Fukumoto, M., and Yoneda, Y. (2004). 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27(Kip1). *EMBO J.* *23*, 1934–1942.
- Seliger, C., Leukel, P., Moeckel, S., Jachnik, B., Lottaz, C., Kreutz, M., Brawanski, A., Proescholdt, M., Bogdahn, U., Bosserhoff, A.-K., et al. (2013). Lactate-modulated induction of THBS-1 activates transforming growth factor (TGF)-beta2 and migration of glioma cells in vitro. *PloS One* *8*, e78935.
- Semenza, G.L. (2010). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *20*, 51–56.
- Sen, I., Veprintsev, D., Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O. (2013). End binding proteins are obligatory dimers. *PloS One* *8*, e74448.
- Sen, P., Mukherjee, S., Ray, D., and Raha, S. (2003). Involvement of the Akt/PKB signaling pathway with disease processes. *Mol. Cell. Biochem.* *253*, 241–246.
- Sève, P., and Dumontet, C. (2008). Is class III beta-tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents? *Lancet Oncol.* *9*, 168–175.
- Shapiro, G.I., Rodon, J., Bedell, C., Kwak, E.L., Baselga, J., Braña, I., Pandya, S.S., Scheffold, C., Laird, A.D., Nguyen, L.T., et al. (2014). Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of SAR245408 (XL147), an oral pan-class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *20*, 233–245.

- Sharma, S., Verma, A., Teja, B.V., Shukla, P., and Mishra, P.R. (2015). Development of stabilized Paclitaxel nanocrystals: In-vitro and in-vivo efficacy studies. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.*
- Sharp, D.J., and Rogers, G.C. (2004). A Kin I-dependent Pacman-flux mechanism for anaphase A. *Cell Cycle Georget. Tex* 3, 707–710.
- Sharp, D.J., and Ross, J.L. (2012). Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *J. Cell Sci.* 125, 2561–2569.
- Shaw, S.L., Kamyar, R., and Ehrhardt, D.W. (2003). Sustained microtubule treadmilling in Arabidopsis cortical arrays. *Science* 300, 1715–1718.
- Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W.L., Baldocchi, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinkel, D., Powell, B., Mills, G.B., and Gray, J.W. (1999). PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat. Genet.* 21, 99–102.
- Shemesh, O.A., and Spira, M.E. (2011). Rescue of neurons from undergoing hallmark tau-induced Alzheimer’s disease cell pathologies by the antimitotic drug paclitaxel. *Neurobiol. Dis.* 43, 163–175.
- Sheng, Z.-H. (2014). Mitochondrial trafficking and anchoring in neurons: New insight and implications. *J. Cell Biol.* 204, 1087–1098.
- Shetty, N., and Gupta, S. (2014). Eribulin drug review. *South Asian J. Cancer* 3, 57–59.
- Shimizu, R., Fujimoto, D., Kato, R., Otsoshi, T., Kawamura, T., Tamai, K., Matsumoto, T., Nagata, K., Otsuka, K., Nakagawa, A., et al. (2014). The safety and efficacy of paclitaxel and carboplatin with or without bevacizumab for treating patients with advanced nonsquamous non-small cell lung cancer with interstitial lung disease. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 74, 1159–1166.
- Shirakawa, K., Takara, K., Tanigawara, Y., Aoyama, N., Kasuga, M., Komada, F., Sakaeda, T., and Okumura, K. (1999). Interaction of docetaxel (“Taxotere”) with human P-glycoprotein. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 90, 1380–1386.
- Shirendeb, U., Reddy, A.P., Manczak, M., Calkins, M.J., Mao, P., Tagle, D.A., and Reddy, P.H. (2011). Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington’s disease: implications for selective neuronal damage. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1438–1455.
- Simcox, E.M., Reeve, A., and Turnbull, D. (2013). Monitoring mitochondrial dynamics and complex I dysfunction in neurons: implications for Parkinson’s disease. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1618–1624.
- Singh, A.M., Bechard, M., Smith, K., and Dalton, S. (2012). Reconciling the different roles of Gsk3 β in “naïve” and “primed” pluripotent stem cells. *Cell Cycle Georget. Tex* 11, 2991–2996.
- Skube, S.B., Chaverri, J.M., and Goodson, H.V. (2010). Effect of GFP tags on the localization of EB1 and EB1 fragments in vivo. *Cytoskelet. Hoboken NJ* 67, 1–12.

- Slep, K.C. (2009). The role of TOG domains in microtubule plus end dynamics. *Biochem. Soc. Trans.* *37*, 1002–1006.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L., and van der Blik, A.M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* *12*, 2245–2256.
- Smith, J.A., Wilson, L., Azarenko, O., Zhu, X., Lewis, B.M., Littlefield, B.A., and Jordan, M.A. (2010). Eribulin binds at microtubule ends to a single site on tubulin to suppress dynamic instability. *Biochemistry (Mosc.)* *49*, 1331–1337.
- Smyth, J.W., Hong, T.-T., Gao, D., Vogan, J.M., Jensen, B.C., Fong, T.S., Simpson, P.C., Stainier, D.Y.R., Chi, N.C., and Shaw, R.M. (2010). Limited forward trafficking of connexin 43 reduces cell-cell coupling in stressed human and mouse myocardium. *J. Clin. Invest.* *120*, 266–279.
- Socinski, M.A., Bondarenko, I., Karaseva, N.A., Makhson, A.M., Vynnychenko, I., Okamoto, I., Hon, J.K., Hirsh, V., Bhar, P., Zhang, H., et al. (2012). Weekly nab-paclitaxel in combination with carboplatin versus solvent-based paclitaxel plus carboplatin as first-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: final results of a phase III trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *30*, 2055–2062.
- Solomon, M.A., Shah, A.A., and D'Souza, G.G.M. (2013). In Vitro assessment of the utility of stearyl triphenyl phosphonium modified liposomes in overcoming the resistance of ovarian carcinoma Ovar-3 cells to paclitaxel. *Mitochondrion* *13*, 464–472.
- Son, Y., Kim, S., Chung, H.-T., and Pae, H.-O. (2013). Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. *Methods Enzymol.* *528*, 27–48.
- Song, W.-J., Song, E.-A.C., Jung, M.-S., Choi, S.-H., Baik, H.-H., Jin, B.K., Kim, J.H., and Chung, S.-H. (2014). Phosphorylation and Inactivation of GSK3 β by Dual-Specificity Tyrosine(Y)-Phosphorylation-Regulated Kinase 1A (Dyrk1A). *J. Biol. Chem.*
- Sonpavde, G., Matveev, V., Burke, J.M., Caton, J.R., Fleming, M.T., Hutson, T.E., Galsky, M.D., Berry, W.R., Karlov, P., Holmlund, J.T., et al. (2012). Randomized phase II trial of docetaxel plus prednisone in combination with placebo or AT-101, an oral small molecule Bcl-2 family antagonist, as first-line therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* *23*, 1803–1808.
- Soria, J.-C., Lee, H.-Y., Lee, J.I., Wang, L., Issa, J.-P., Kemp, B.L., Liu, D.D., Kurie, J.M., Mao, L., and Khuri, F.R. (2002). Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *8*, 1178–1184.
- Staal, S.P. (1987). Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 5034–5037.
- Staal, S.P., Hartley, J.W., and Rowe, W.P. (1977). Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *74*, 3065–3067.

- Stadler, S.C., Vincent, C.T., Fedorov, V.D., Patsialou, A., Cherrington, B.D., Wakshlag, J.J., Mohanan, S., Zee, B.M., Zhang, X., Garcia, B.A., et al. (2013). Dysregulation of PAD4-mediated citrullination of nuclear GSK3 β activates TGF- β signaling and induces epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 11851–11856.
- Stebbing, H. (2001). Cytoskeleton-dependent transport and localization of mRNA. *Int. Rev. Cytol.* *211*, 1–31.
- Stemke-Hale, K., Gonzalez-Angulo, A.M., Lluch, A., Neve, R.M., Kuo, W.-L., Davies, M., Carey, M., Hu, Z., Guan, Y., Sahin, A., et al. (2008). An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res.* *68*, 6084–6091.
- Steuer, C.E., and Ramalingam, S.S. (2015). Targeting EGFR in lung cancer: Lessons learned and future perspectives. *Mol. Aspects Med.*
- Stiles, B.L. (2009). PI-3-K and AKT: Onto the mitochondria. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *61*, 1276–1282.
- Strobel, T., Tai, Y.T., Korsmeyer, S., and Cannistra, S.A. (1998). BAD partly reverses paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Oncogene* *17*, 2419–2427.
- Stypula-Cyrus, Y., Mutyal, N.N., Cruz, M. Dela, Kunte, D.P., Radosevich, A.J., Wali, R., Roy, H.K., and Backman, V. (2014). End-binding protein 1 (EB1) up-regulation is an early event in colorectal carcinogenesis. *FEBS Lett.* *588*, 829–835.
- Su, L.K., and Qi, Y. (2001). Characterization of human MAPRE genes and their proteins. *Genomics* *71*, 142–149.
- Sugihara, Y., Taniguchi, H., Kushima, R., Tsuda, H., Kubota, D., Ichikawa, H., Sakamoto, K., Nakamura, Y., Tomonaga, T., Fujita, S., et al. (2012). Proteomic-based identification of the APC-binding protein EB1 as a candidate of novel tissue biomarker and therapeutic target for colorectal cancer. *J. Proteomics* *75*, 5342–5355.
- Suizu, F., Hiramuki, Y., Okumura, F., Matsuda, M., Okumura, A.J., Hirata, N., Narita, M., Kohno, T., Yokota, J., Bohgaki, M., et al. (2009). The E3 ligase TTC3 facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt. *Dev. Cell* *17*, 800–810.
- Sullivan, K.F. (1988). Structure and utilization of tubulin isotypes. *Annu. Rev. Cell Biol.* *4*, 687–716.
- Sun, H., Yu, T., and Li, J. (2011). Co-administration of perifosine with paclitaxel synergistically induces apoptosis in ovarian cancer cells: more than just AKT inhibition. *Cancer Lett.* *310*, 118–128.
- Sun, L., Gao, J., Dong, X., Liu, M., Li, D., Shi, X., Dong, J.-T., Lu, X., Liu, C., and Zhou, J. (2008). EB1 promotes Aurora-B kinase activity through blocking its inactivation by protein phosphatase 2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 7153–7158.
- Sun, M., Wang, G., Paciga, J.E., Feldman, R.I., Yuan, Z.Q., Ma, X.L., Shelley, S.A., Jove, R., Tschlis, P.N., Nicosia, S.V., et al. (2001). AKT1/PKB α kinase is frequently elevated in

human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am. J. Pathol.* *159*, 431–437.

Sunters, A., Fernández de Mattos, S., Stahl, M., Brosens, J.J., Zoumpoulidou, G., Saunders, C.A., Coffey, P.J., Medema, R.H., Coombes, R.C., and Lam, E.W.-F. (2003). FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *J. Biol. Chem.* *278*, 49795–49805.

Szelechowski, M., Bétourné, A., Monnet, Y., Ferré, C.A., Thouard, A., Foret, C., Peyrin, J.-M., Hunot, S., and Gonzalez-Dunia, D. (2014). A viral peptide that targets mitochondria protects against neuronal degeneration in models of Parkinson's disease. *Nat. Commun.* *5*, 5181.

T

Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2012). Mitochondria and cell signalling. *J. Cell Sci.* *125*, 807–815.

Takashima, A. (2006). GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* *9*, 309–317.

Takashima, A., Honda, T., Yasutake, K., Michel, G., Murayama, O., Murayama, M., Ishiguro, K., and Yamaguchi, H. (1998). Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta by amyloid beta peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* *31*, 317–323.

Tamura, N., and Draviam, V.M. (2012). Microtubule plus-ends within a mitotic cell are “moving platforms” with anchoring, signalling and force-coupling roles. *Open Biol.* *2*, 120132.

Tanabe, K., Liu, Z., Patel, S., Doble, B.W., Li, L., Cras-Méneur, C., Martinez, S.C., Welling, C.M., White, M.F., Bernal-Mizrachi, E., et al. (2008). Genetic deficiency of glycogen synthase kinase-3beta corrects diabetes in mouse models of insulin resistance. *PLoS Biol.* *6*, e37.

Tanno, M., Kuno, A., Ishikawa, S., Miki, T., Kouzu, H., Yano, T., Murase, H., Tobisawa, T., Ogasawara, M., Horio, Y., et al. (2014). Translocation of glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β), a trigger of permeability transition, is kinase activity-dependent and mediated by interaction with voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2). *J. Biol. Chem.* *289*, 29285–29296.

Thomas, G.E., Sreeja, J.S., Gireesh, K.K., Gupta, H., and Manna, T.K. (2015). +TIP EB1 downregulates paclitaxel-induced proliferation inhibition and apoptosis in breast cancer cells through inhibition of paclitaxel binding on microtubules. *Int. J. Oncol.* *46*, 133–146.

Thomas, J.E., Venugopalan, M., Galvin, R., Wang, Y., Bokoch, G.M., and Vlahos, C.J. (1997). Inhibition of MG-63 cell proliferation and PDGF-stimulated cellular processes by inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Cell. Biochem.* *64*, 182–195.

Thornton, T.M., Pedraza-Alva, G., Deng, B., Wood, C.D., Aronshtam, A., Clements, J.L., Sabio, G., Davis, R.J., Matthews, D.E., Doble, B., et al. (2008). Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science* 320, 667–670.

Tirnauer, J.S., Canman, J.C., Salmon, E.D., and Mitchison, T.J. (2002). EB1 targets to kinetochores with attached, polymerizing microtubules. *Mol. Biol. Cell* 13, 4308–4316.

Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* 65, 87–108.

Tortosa, E., Galjart, N., Avila, J., and Sayas, C.L. (2013). MAP1B regulates microtubule dynamics by sequestering EB1/3 in the cytosol of developing neuronal cells. *EMBO J.* 32, 1293–1306.

Tropini, C., Roth, E.A., Zanic, M., Gardner, M.K., and Howard, J. (2012). Islands containing slowly hydrolyzable GTP analogs promote microtubule rescues. *PloS One* 7, e30103.

Tudor, G., Aguilera, A., Halverson, D.O., Laing, N.D., and Sausville, E.A. (2000). Susceptibility to drug-induced apoptosis correlates with differential modulation of Bad, Bcl-2 and Bcl-xL protein levels. *Cell Death Differ.* 7, 574–586.

Turner, P.F., and Margolis, R.L. (1984). Taxol-induced bundling of brain-derived microtubules. *J. Cell Biol.* 99, 940–946.

Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335–344.

Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J.A., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., et al. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 27, 433–446.

V

Valiron, O., Arnal, I., Caudron, N., and Job, D. (2010). GDP-tubulin incorporation into growing microtubules modulates polymer stability. *J. Biol. Chem.* 285, 17507–17513.

Vander Heiden, M.G., Plas, D.R., Rathmell, J.C., Fox, C.J., Harris, M.H., and Thompson, C.B. (2001). Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5899–5912.

Varbiro, G., Veres, B., Gallyas, F., and Sumegi, B. (2001). Direct effect of Taxol on free radical formation and mitochondrial permeability transition. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 548–558.

Vasiliev, J.M., Gelfand, I.M., Domnina, L.V., Ivanova, O.Y., Komm, S.G., and Olshevskaja, L.V. (1970). Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 24, 625–640.

Vaux, D.L., and Silke, J. (2003). Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 499–504.

Verburg, J., and Hollenbeck, P.J. (2008). Mitochondrial membrane potential in axons increases with local nerve growth factor or semaphorin signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 8306–8315.

Verdejo, H.E., del Campo, A., Troncoso, R., Gutierrez, T., Toro, B., Quiroga, C., Pedrozo, Z., Munoz, J.P., Garcia, L., Castro, P.F., et al. (2012). Mitochondria, myocardial remodeling, and cardiovascular disease. *Curr. Hypertens. Rep.* 14, 532–539.

Verdier-Pinard, P., Garès, M., and Wright, M. (1999). Differential in vitro association of vinca alkaloid-induced tubulin spiral filaments into aggregated spirals. *Biochem. Pharmacol.* 58, 959–971.

Verdier-Pinard, P., Pasquier, E., Xiao, H., Burd, B., Villard, C., Lafitte, D., Miller, L.M., Angeletti, R.H., Horwitz, S.B., and Braguer, D. (2009). Tubulin proteomics: towards breaking the code. *Anal. Biochem.* 384, 197–206.

Vignaud, J.M., Marie, B., Klein, N., Plénat, F., Pech, M., Borrelly, J., Martinet, N., Duprez, A., and Martinet, Y. (1994). The role of platelet-derived growth factor production by tumor-associated macrophages in tumor stroma formation in lung cancer. *Cancer Res.* 54, 5455–5463.

Vink, S.R., Schellens, J.H.M., Beijnen, J.H., Sindermann, H., Engel, J., Dubbelman, R., Moppi, G., Hillebrand, M.J.X., Bartelink, H., and Verheij, M. (2006). Phase I and pharmacokinetic study of combined treatment with perifosine and radiation in patients with advanced solid tumours. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 80, 207–213.

Vos, J.W., Dogterom, M., and Emons, A.M.C. (2004). Microtubules become more dynamic but not shorter during preprophase band formation: a possible “search-and-capture” mechanism for microtubule translocation. *Cell Motil. Cytoskeleton* 57, 246–258.

W

Walczak, C.E., and Heald, R. (2008). Mechanisms of mitotic spindle assembly and function. *Int. Rev. Cytol.* 265, 111–158.

Walter, W.J., Beránek, V., Fischermeier, E., and Diez, S. (2012). Tubulin acetylation alone does not affect kinesin-1 velocity and run length in vitro. *PloS One* 7, e42218.

Wang, J., and Yi, J. (2008). Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol. Ther.* 7, 1875–1884.

Wang, C., Guo, L.-B., Ma, J.-Y., Li, Y.-M., and Liu, H.-M. (2013). Establishment and characterization of a paclitaxel-resistant human esophageal carcinoma cell line. *Int. J. Oncol.* 43, 1607–1617.

Wang, F.Z., Fei, H.R., Li, X.Q., Shi, R., and Wang, D.C. (2012a). Perifosine as potential anti-cancer agent inhibits proliferation, migration, and tube formation of human umbilical vein endothelial cells. *Mol. Cell. Biochem.* 368, 1–8.

- Wang, H., Zhang, Q., Wen, Q., Zheng, Y., Lazarovici, P., Philip, L., Jiang, H., Lin, J., and Zheng, W. (2012b). Proline-rich Akt substrate of 40kDa (PRAS40): a novel downstream target of PI3k/Akt signaling pathway. *Cell. Signal.* *24*, 17–24.
- Wang, X., Su, B., Lee, H., Li, X., Perry, G., Smith, M.A., and Zhu, X. (2009). Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 9090–9103.
- Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* *124*, 269–270.
- Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J. Gen. Physiol.* *8*, 519–530.
- Wasiak, S., Zunino, R., and McBride, H.M. (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J. Cell Biol.* *177*, 439–450.
- Watanabe, T., Noritake, J., and Kaibuchi, K. (2005). Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol.* *15*, 76–83.
- Watcharasit, P., Bijur, G.N., Zmijewski, J.W., Song, L., Zmijewska, A., Chen, X., Johnson, G.V.W., and Jope, R.S. (2002). Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3beta and p53 after DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 7951–7955.
- Webb, S.J., Harrison, D.J., and Wyllie, A.H. (1997). Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* *41*, 1–34.
- Wehrle-Haller, B., and Imhof, B.A. (2003). Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *35*, 39–50.
- Weinhouse, S. (1955). Oxidative metabolism of neoplastic tissues. *Adv. Cancer Res.* *3*, 269–325.
- Weinhouse, S., and Wenner, C.E. (1956). Metabolism of neoplastic tissue. IX. An isotope tracer study of glucose catabolism pathways in normal and neoplastic tissues. *J. Biol. Chem.* *222*, 399–414.
- Weinhouse, S., Millington, R.H., and Wenner, C.E. (1951). Metabolism of neoplastic tissue. I. The oxidation of carbohydrate and fatty acids in transplanted tumors. *Cancer Res.* *11*, 845–850.
- Wen, Y., Eng, C.H., Schmoranzer, J., Cabrera-Poch, N., Morris, E.J.S., Chen, M., Wallar, B.J., Alberts, A.S., and Gundersen, G.G. (2004). EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat. Cell Biol.* *6*, 820–830.
- Westermann, B. (2012). Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim. Biophys. Acta* *1817*, 1833–1838.
- Wilczewska, A.Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K.H., and Car, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol. Rep. PR* *64*, 1020–1037.

Wittmann, T., and Waterman-Storer, C.M. (2001). Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J. Cell Sci.* *114*, 3795–3803.

Wollman, R., Cytrynbaum, E.N., Jones, J.T., Meyer, T., Scholey, J.M., and Mogilner, A. (2005). Efficient chromosome capture requires a bias in the “search-and-capture” process during mitotic-spindle assembly. *Curr. Biol. CB* *15*, 828–832.

Wong, D.J.L., and Hurvitz, S.A. (2014). Recent advances in the development of anti-HER2 antibodies and antibody-drug conjugates. *Ann. Transl. Med.* *2*.

Wu, D., and Pan, W. (2010). GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem. Sci.* *35*, 161–168.

Wu, G., Qin, X.-Q., Guo, J.-J., Li, T.-Y., and Chen, J.-H. (2014). AKT/ERK activation is associated with gastric cancer cell resistance to paclitaxel. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *7*, 1449–1458.

Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* *124*, 471–484.

X

Xia, P., Wang, Z., Liu, X., Wu, B., Wang, J., Ward, T., Zhang, L., Ding, X., Gibbons, G., Shi, Y., et al. (2012). EB1 acetylation by P300/CBP-associated factor (PCAF) ensures accurate kinetochore-microtubule interactions in mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 16564–16569.

Xia, P., Liu, X., Wu, B., Zhang, S., Song, X., Yao, P.Y., Lippincott-Schwartz, J., and Yao, X. (2014). Super-resolution imaging reveals structural features of EB1 in microtubule plus-end tracking. *Mol. Biol. Cell.*

Xian, S.-L., Cao, W., Zhang, X.-D., and Lu, Y.-F. (2015). 3-Bromopyruvate inhibits human gastric cancer tumor growth in nude mice via the inhibition of glycolysis. *Oncol. Lett.* *9*, 739–744.

Xin, Y., Shen, X., Cheng, L., Hong, D., and Chen, B. (2014). Perifosine inhibits S6K1-Gli1 signaling and enhances gemcitabine-induced anti-pancreatic cancer efficiency. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *73*, 711–719.

Xu, J., Liu, D., and Songyang, Z. (2002). The role of Asp-462 in regulating Akt activity. *J. Biol. Chem.* *277*, 35561–35566.

Xu, X., Sakon, M., Nagano, H., Hiraoka, N., Yamamoto, H., Hayashi, N., Dono, K., Nakamori, S., Umeshita, K., Ito, Y., et al. (2004). Akt2 expression correlates with prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.* *11*, 25–32.

Y

Yaffe, M.P., Stuurman, N., and Vale, R.D. (2003). Mitochondrial positioning in fission yeast is driven by association with dynamic microtubules and mitotic spindle poles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 11424–11428.

- Yan, J., Liu, X.-H., Han, M.-Z., Wang, Y.-M., Sun, X.-L., Yu, N., Li, T., Su, B., and Chen, Z.-Y. (2015). Blockage of GSK3 β -mediated Drp1 phosphorylation provides neuroprotection in neuronal and mouse models of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 36, 211–227.
- Yang, W.-L., Wang, J., Chan, C.-H., Lee, S.-W., Campos, A.D., Lamothe, B., Hur, L., Grabiner, B.C., Lin, X., Darnay, B.G., et al. (2009). The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation. *Science* 325, 1134–1138.
- Yang, W.-L., Wu, C.-Y., Wu, J., and Lin, H.-K. (2010). Regulation of Akt signaling activation by ubiquitination. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 487–497.
- Yao, X.-Q., Zhang, X.-X., Yin, Y.-Y., Liu, B., Luo, D.-J., Liu, D., Chen, N.-N., Ni, Z.-F., Wang, X., Wang, Q., et al. (2011). Glycogen synthase kinase-3 β regulates Tyr307 phosphorylation of protein phosphatase-2A via protein tyrosine phosphatase 1B but not Src. *Biochem. J.* 437, 335–344.
- Yao, X.-Q., Li, X.-C., Zhang, X.-X., Yin, Y.-Y., Liu, B., Luo, D.-J., Wang, Q., Wang, J.-Z., and Liu, G.-P. (2012). Glycogen synthase kinase-3 β regulates leucine-309 demethylation of protein phosphatase-2A via PPMT1 and PME-1. *FEBS Lett.* 586, 2522–2528.
- Yap, T.A., Yan, L., Patnaik, A., Fearen, I., Olmos, D., Papadopoulos, K., Baird, R.D., Delgado, L., Taylor, A., Lupinacci, L., et al. (2011). First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 4688–4695.
- Yardley, D.A. (2013). nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 170, 365–372.
- Ye, H., Cande, C., Stephanou, N.C., Jiang, S., Gurbuxani, S., Larochette, N., Daugas, E., Garrido, C., Kroemer, G., and Wu, H. (2002). DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat. Struct. Biol.* 9, 680–684.
- Yin, X.M. (2000). Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways. *Cell Res.* 10, 161–167.
- Yin, S., Zeng, C., Hari, M., and Cabral, F. (2013). Paclitaxel resistance by random mutagenesis of α -tubulin. *Cytoskelet. Hoboken NJ* 70, 849–862.
- Ying, H., Kimmelman, A.C., Lyssiotis, C.A., Hua, S., Chu, G.C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J.W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J.L., et al. (2012). Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* 149, 656–670.
- Yuan, Z.Q., Sun, M., Feldman, R.I., Wang, G., Ma, X., Jiang, C., Coppola, D., Nicosia, S.V., and Cheng, J.Q. (2000). Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene* 19, 2324–2330.

Z

- Zanic, M., Stear, J.H., Hyman, A.A., and Howard, J. (2009). EB1 recognizes the nucleotide state of tubulin in the microtubule lattice. *PloS One* 4, e7585.

- Zhang, B., Carroll, J., Trojanowski, J.Q., Yao, Y., Iba, M., Potuzak, J.S., Hogan, A.-M.L., Xie, S.X., Ballatore, C., Smith, A.B., et al. (2012). The microtubule-stabilizing agent, epothilone D, reduces axonal dysfunction, neurotoxicity, cognitive deficits, and Alzheimer-like pathology in an interventional study with aged tau transgenic mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 3601–3611.
- Zhang, K., Li, H., and Song, Z. (2014a). Membrane depolarization activates the mitochondrial protease OMA1 by stimulating self-cleavage. *EMBO Rep.* *15*, 576–585.
- Zhang, Q., Zhang, Y., Zhang, P., Chao, Z., Xia, F., Jiang, C., Zhang, X., Jiang, Z., and Liu, H. (2014b). Hexokinase II inhibitor, 3-BrPA induced autophagy by stimulating ROS formation in human breast cancer cells. *Genes Cancer* *5*, 100–112.
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H., and Hung, M.C. (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat. Cell Biol.* *3*, 245–252.
- Zhou, J., Zhao, W.-Y., Ma, X., Ju, R.-J., Li, X.-Y., Li, N., Sun, M.-G., Shi, J.-F., Zhang, C.-X., and Lu, W.-L. (2013a). The anticancer efficacy of paclitaxel liposomes modified with mitochondrial targeting conjugate in resistant lung cancer. *Biomaterials* *34*, 3626–3638.
- Zhou, P., Lin, Y., Huang, M., Xie, K., and Tang, P. (2013b). [2-deoxyglucose enhances chemosensitivity of androgen-independent prostate cancer cells to docetaxel]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* *93*, 3230–3234.
- Zimniak, T., Stengl, K., Mechtler, K., and Westermann, S. (2009). Phosphoregulation of the budding yeast EB1 homologue Bim1p by Aurora/Ipl1p. *J. Cell Biol.* *186*, 379–391.
- Zinda, M.J., Johnson, M.A., Paul, J.D., Horn, C., Konicek, B.W., Lu, Z.H., Sandusky, G., Thomas, J.E., Neubauer, B.L., Lai, M.T., et al. (2001). AKT-1, -2, and -3 are expressed in both normal and tumor tissues of the lung, breast, prostate, and colon. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *7*, 2475–2479.
- Zlotnik, A., Burkhardt, A.M., and Homey, B. (2011). Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 597–606.
- Zumbrunn, J., Kinoshita, K., Hyman, A.A., and Näthke, I.S. (2001). Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Curr. Biol. CB* *11*, 44–49.