



## LE SYSTEME TUBULINE-MICROTUBULES ET LA RECHERCHE DE NOUVELLES SUBSTANCES ANTIMITOTIQUES

Daniel GUÉNARD

I.C.S.N. - C.N.R.S., BP 1, 91198 Gif sur Yvette, France

**Résumé :** l'un des buts de notre laboratoire est de découvrir de nouveaux poisons du fuseau d'origine naturelle ou synthétique. A cette fin, un test biologique simple et fiable est utilisé: il s'agit du test tubuline.

In vivo, le système tubuline-microtubules possède différentes fonctions au sein de la cellule : il est le constituant majeur du fuseau mitotique, il est essentiel pour la motilité des cellules spécialisées, il a un rôle clé dans le transport axonal ainsi que dans la constitution du cytosquelette et la sécrétion cellulaire. Les microtubules sont formés par l'assemblage de sous-unités protéiques appelées tubuline a et b.

In vitro, la tubuline peut être facilement préparée à partir de cervelles fraîches de mammifères et son activité suivie par un spectrophotomètre UV équipé d'une cellule thermostatée. La vitesse d'assemblage (37°C) ou de désassemblage (0°C) est mesurée pour chaque concentration de drogue. Ainsi, le test tubuline est un outil très efficace pour détecter de potentiels agents antitumoraux et permet d'établir des relations structure-activité au sein de familles de produits conduisant à l'isolement de nouvelles substances pré-sélectionnées pour les tests pharmacologiques classiques.

Par exemple dans la série de la vinblastine, le test tubuline a permis la sélection de la navelbine qui est actuellement sur le marché des anticancéreux.

En ce qui concerne le taxol et dérivés, l'utilisation du test a permis la mise en évidence de nombreux produits actifs dans l'If et a conduit à l'hémisynthèse d'un nouvel analogue plus actif que le taxol, le taxotère actuellement en phase II clinique. Récemment un extrait éthanolique brut a montré une activité particulière sur la tubuline et a conduit à l'isolement du rhazinilame, nouvel agent antitubuline. Cette substance induit une spiralisation de la tubuline comme la vinblastine et inhibe le désassemblage des microtubules par le froid comme le taxol. Cette substance est donc le prototype d'une nouvelle classe de poison du fuseau.

**Abstract :** one of the aim of our laboratory is to find new highly active spindle poisons of natural or synthetic origin. To detect this potential antitumor activity, we use a simple acellular assay called the tubulin test.

In vivo, microtubules fulfill different functions in cells : besides to be the major constituent of the spindle apparatus, they are essential for the generation of movement by cilia and flagella and they play a key role during axoplasmic transport, cytoskeleton framework and in cell secretion. Microtubules are formed by assembly of protein subunit called a and b tubulin.

In vitro, tubulin can be easily purified from fresh mammalian brain and its activity monitored by a UV spectrophotometer equipped with a thermostated cell. The rate of assembly (37°C) or disassembly (0°C) is checked for each drug or mixture at different concentration. Thus, the tubulin assay is a very efficient tool to detect new potential antitumor substances and from the time we developed this in vitro assay in our laboratory, we discovered the antimetabolic activity of known compounds and by structure activity relationships studies, new natural or synthetic compounds were selected for pharmacological assay as cytotoxicity.

For example in the vinblastine-type compounds, this tubulin assay allowed the selection of Navelbine, a new synthetic antitumor vinca-alkaloids which is now in clinical use (1).

In the taxol family, the use of this test led first to the isolation of a large number of new natural active analogs of taxol and next allowed the selection of taxotere for the beginning of the pharmacological and clinical assays (2).

Recently, from an ethanolic extract of the trunk bark we found a known substance, rhazinilam, with a new activity on the tubulin-microtubules system : it induces the spiralization of tubulin dimer as vinblastine and it inhibits the disassembly of microtubules as taxol. Rhazinilam is the prototype of a new class of antitubulin compounds (3).

### Introduction

La recherche de substances naturelles biologiquement actives est un axe de recherche prioritaire dans notre laboratoire et parmi les différentes activités biologiques, la recherche de nouveaux poisons du fuseau est très féconde depuis quelques années.

Le cancer reste une des causes principales de décès dans le monde et la recherche de nouveaux agents anticancéreux un travail toujours d'actualité. L'extraction de plantes ou



d'organismes marins constitue le moyen traditionnel de découverte de nouvelles substances à activité cytotoxique pouvant alors servir de tête de série de développement d'anticancéreux.

A côté des grandes classes de substances de la chimiothérapie - i.e. les antimétabolites, les alkylants et les intercalants - une classe plus petite et très pointue dans son mécanisme d'action regroupe ceux que l'on appelle les poisons du fuseau dont les deux représentants les plus connus sont la vinblastine (Velbé) et la vincristine (Oncovin).

Ces agents agissent au niveau de la formation ou de l'évolution du fuseau mitotique inhibant ainsi la mitose et par conséquent la prolifération cellulaire; ils interagissent avec la protéine constituant ce fuseau : la tubuline.

### La tubuline

**répartition** : la tubuline se retrouve dans tout le monde eucaryote avec des propriétés physiques assez voisines, montrant ainsi une grande conservation associée à des activités cellulaires très importantes ; le plus souvent elle est présente dans la cellule sous la forme de microtubules auxquels sont associés un certain nombre de protéines dont les propriétés ne sont pas toutes encore connues : l'ensemble formant ce que l'on appelle les protéines microtubulaires. Chez les mammifères le système tubuline-microtubule est impliqué dans un certain nombre d'activités cellulaires

**propriétés in vivo** : ainsi comme nous venons de le voir, ce système est impliqué dans la mitose , le transport axonal, le cytosquelette, la constitution des cils et flagelles et la sécrétion cellulaire.

Il s'agit d'un système très bien régulé aussi bien dans l'expression de ses gènes - au demeurant fort nombreux- que dans la régulation de l'équilibre entre la forme microtubule et la forme tubuline que nous allons voir maintenant. Au sein d'une même cellule nous pouvons avoir assemblage et désassemblage.

**propriétés in vitro** : cette protéine est très facilement préparée à partir de cerveaux de mammifères par des cycles d'assemblage-désassemblage; elle constitue environ 20% des protéines solubles. Ceci a permis, depuis quelques années, une étude assez détaillée par de nombreuses équipes, des propriétés essentielles de la tubuline notamment en ce qui concerne l'interaction avec les drogues. Brièvement, le passage tubuline-microtubule est un équilibre contrôlé par plusieurs paramètres tels que la température, les ions magnésium et calcium, le GTP et la présence de protéines associées copurifiant avec la tubuline lors de la préparation.

### Le test tubuline

**principe** : l'équilibre tubuline-microtubules peut être suivi de différentes manières: diffusion, viscosité, centrifugation, microscopie électronique. La diffusion par le biais de la modification de l'absorption UV consécutive à une perte de lumière par diffusion sur les microtubules a été retenue; c'est la technique la plus simple à mettre en oeuvre, la moins "chère", la plus couramment utilisée et celle dont la fiabilité est la meilleure tant que l'on procède à des mesures relatives.

Nous avons choisi de prendre comme mesure, la vitesse maximale de (dé)polymérisation de la tubuline. Cette mesure, effectuée en présence de quantités croissantes d'inhibiteurs conduit à la détermination du I50 de cette substance (dose inhibant de 50% la (dé)polymérisation de la tubuline).

Ce n'est évidemment pas une mesure de l'affinité de cette substance pour la tubuline mais, dans la plupart des cas, elle y est proportionnelle. Et cette simplification est d'autant plus légitime, en ce qui nous concerne, que cette inhibition représente, en fait, la véritable conséquence de l'action de cette molécule in vivo; de plus on ne retient que le rapport du I50 de la molécule considérée à celui d'une substance de référence mesuré le même jour sur le même lot de tubuline; ce rapport est alors totalement indépendant des divers paramètres de l'expérience: température, pH, force ionique, vieillissement de la tubuline etc...à condition de rester à une concentration de tubuline de 2-3mg/ml.



**utilisation** : ce test est bien évidemment utilisé pour mesurer l'activité potentiellement antimittotique de composés purs, et, dans ce cas, seuls seront considérés comme présentant une activité "intéressante" les drogues ayant un I50 inférieur à 10 micromolaires, mais il sera aussi employé avec des extraits bruts mettant ainsi en évidence la présence possible de substances antitubuline.

### Principaux résultats

Il existe trois grandes familles de poisons du fuseau, chacune d'entre elles présentant un ou deux sites de fixation spécifique sur la tubuline.

**colchicine** : il y a un site de fixation par dimère de tubuline. Cette fixation est température-dépendante et partiellement irréversible (suivant les molécules) sans toutefois créer de liaison covalente.

**vinblastine** : la tubuline possède deux sites de fixation, réversible et indépendant de la température; ils sont d'affinité différentes et responsables, l'un de l'inhibition de l'assemblage et l'autre d'une pseudopolymérisation appelée "spiralisation".

**taxol** : la fixation, réversible, ne se produit que sur le microtubule et conduit à une inhibition du désassemblage. Le taxol peut aussi initier l'assemblage de la tubuline même à froid et en présence de quantités réduites de tubuline.

### La navelbine

Après cette description succincte des trois grandes classes de produits interagissant avec la tubuline, nous pouvons décrire quelques uns des résultats les plus marquants obtenus avec cette méthode.

Si la classe colchicine n'a pas jusqu'à ce jour donné de nouveaux agents anticancéreux, du moins les études entreprises dans ce domaine ont elles permis de mieux définir les relations structure-activité et, de manière anecdotique, de modifier la configuration absolue publiée de l'un de ses représentants : la stéganacine.

Par contre le bilan n'est pas le même dans le groupe de la vinblastine où les corrélations in vivo-in vitro sont bien meilleures. En effet grâce à l'emploi de ce test ne nécessitant que des fractions de milligrammes de substance, un sous produit de réaction d'une tentative d'hémisynthèse de la vinblastine (Potier, Langlois) s'est révélé avoir une activité particulière sur notre système : aussi actif que la vinblastine mais présentant des propriétés différentes du VLB en ce qui concerne le deuxième site VLB sur la tubuline. Il était donc intéressant d'explorer plus à fond les caractéristiques d'interaction de ce produit sur la tubuline puis d'évaluer ce produit in vivo. Dix ans après ce travail s'est traduit par la mise récente sur le marché de la navelbine par les laboratoires P.Fabre, nouvel analogue de la vinblastine aux propriétés antitumorales intéressantes.

### Le taxotère

Alors que l'exemple précédent illustre l'utilisation de ce test au cours d'un travail de synthèse chimique, les travaux présentés dans ce cliché résultent de l'emploi de ce test sur un travail typique d'extraction de substances naturelles. Il s'agit de l'If, *Taxus baccata*, où la sensibilité du test tubuline nous a permis d'isoler quelques substances, essentielles dans la suite de ce travail, et de parvenir au taxotère qui, je l'espère, aura un avenir aussi intéressant que la navelbine. Cette approche a permis d'éviter l'emploi de l'écorce de l'If d'où était extrait le taxol, (matière première rare) en utilisant seulement les feuilles qui peuvent être récoltées sans dommage tous les ans. La désacétyl baccatine III ainsi extraite conduit par hémisynthèse au taxol ou au taxotère (Guéritte-Voegelein, Guénard).

### Le rhazinilame

L'emploi systématique du test tubuline pour le screening de plantes ne doit évidemment pas être considéré comme étant le meilleur moyen d'obtenir de nouveaux antitumoraux, mais



son caractère très pointu en fait un excellent outil de mise en évidence d'agents antitubuline et donc d'outils biologiques, tant mieux si au bout du compte on a trouvé un nouvel agent thérapeutique.

Deux exemples donneront une idée de l'emploi de cette technique et de ses résultats. Le premier concerne des extraits de thuya dont on savait qu'un extrait alcoolique des feuilles est verrucide; cet extrait mis en présence de tubuline inhibe totalement l'assemblage de la protéine. Après un travail de quelques semaines, la séparation des composants actifs par le test tubuline conduit à l'isolement de la desoxypodophyllotoxine. Ce résultat n'est pas révolutionnaire car beaucoup de plantes renferment des lignanes mais il montre la puissance du test à révéler rapidement une propriété cytotoxique.

Le deuxième exemple concerne une plante provenant de Malaisie, *Kopsia singapurensis*, dont l'un des produits, le rhazinilame, isolé par une démarche comparable à la précédente, s'est révélé être un nouvel agent antitubuline avec une activité tenant à la fois de la vinblastine et du taxol.

En effet ce produit inhibe le désassemblage par le froid des microtubules en se fixant à l'extrémité du microtubule et de plus il provoque à froid une spiralisation de la tubuline comparable partiellement à celle observée avec la vinblastine. Quelques analogues et un produit radioactif réalisés par hémisynthèse nous ont permis de parfaitement caractériser cette interaction (David, Wright).

Pour le moment, il ne s'agit pas d'un nouvel agent antitumoral, mais il constitue une tête de série qui pourra peut-être conduire à une nouvelle classe thérapeutique.

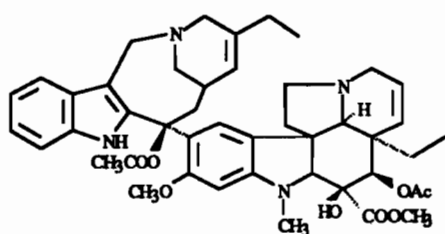
### Conclusion

A ce jour de nombreux produits se sont révélés actifs sur le système tubuline-microtubule et la variété des structures rencontrées ne peut que nous inciter à la prudence dans une quelconque prédictabilité de l'activité antitubuline d'un produit. Ainsi la famille de la vinblastine, bien que très homogène si l'on considère ses seuls analogues, contient en fait des substances tout à fait différentes comme la maytansine qui ne présentent aucune parenté structurale avec la vinblastine. Il s'agit là d'un point difficile à expliquer et qui doit nous inciter à la prudence.

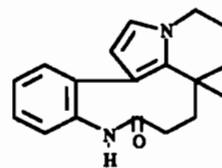
D'une manière encore plus brutale, l'exemple constitué par le VP16 et le VM26, deux dérivés de la podophyllotoxine, n'auraient jamais pu être retenus dans ce test; en effet ils sont totalement inactifs et agissent *in vivo* par l'intermédiaire de la topoisomérase II.

L'ensemble de ces résultats nous conduit donc à adopter une certaine attitude vis à vis de l'emploi et des résultats de ce test:

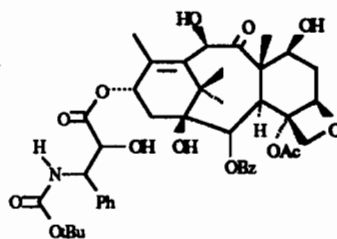
- une activité antitubuline ne constitue qu'une condition nécessaire mais non suffisante pour qu'un produit soit un poison du fuseau *in vivo*,
- il existe un seuil d'activité antitubuline au delà duquel cette activité ne représente rien *in vivo*,
- un résultat négatif dans une série active n'est pas définitif car le test ne tient évidemment pas compte des phénomènes de passage membranaire et de métabolisation,
- il s'agit là d'un test très pointu qui peut laisser passer un certain nombre d'agents cytotoxiques, il faut donc l'associer, pour des extraits rares, aux tests habituels; par contre il pourra conduire à d'excellents outils biologiques et à des produits ayant une bonne spécificité dans leur action thérapeutique.



NAVELBINE



RHAZINILAM



TAXOTERE

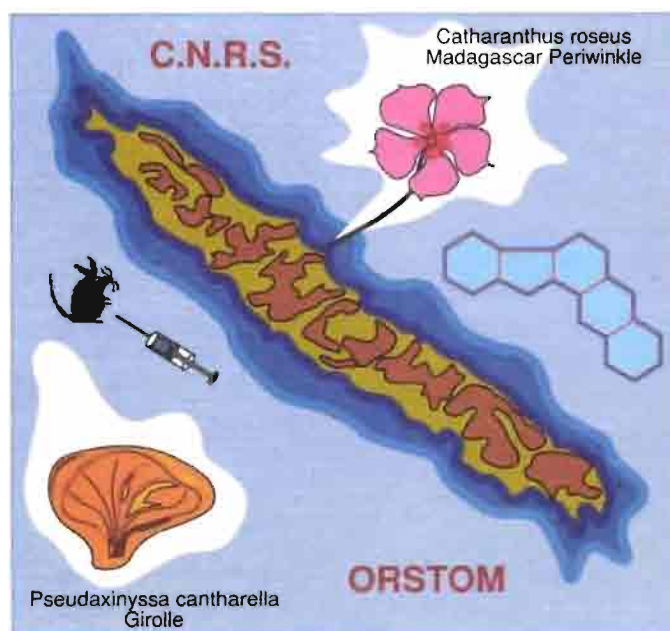
### Bibliographie

1. Zavala F., Guénard D. et Potier P., *Experientia* **34**, 1497-1499 (1978)
2. Lataste H., Senilh V., Guénard D., Wright M. et Potier P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4090-4094 (1984)
3. Thoison O., Sévenet T., Guénard D., Kan-Fan C., Quirion J.C., Husson H.P., Deverre J.R., Chan K.C. et Potier P., *C. R. Acad. Sc. Paris Ser. II* **304**, 157-160 (1987)

# Troisième Symposium sur les substances naturelles d'intérêt biologique de la région Pacifique-Asie

Nouméa, Nouvelle-Calédonie, 26-30 Août 1991

## ACTES



Editeurs : Cécile DEBITUS, Philippe AMADE,  
Dominique LAURENT, Jean-Pierre COSSON