

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
26 avril 2012 (26.04.2012)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/052629 A2

(51) Classification internationale des brevets :
G01N 33/574 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2011/000559

(22) Date de dépôt international :
18 octobre 2011 (18.10.2011)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
10 58459 18 octobre 2010 (18.10.2010) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange,
F-75794 Paris Cédex 16 (FR). UNIVERSITE
MONTPELLIER 2 SCIENCES ET TECHNIQUES
[FR/FR]; Place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier
Cédex (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
BLANCHARD Jean-Marie [FR/FR]; 27, rue Charles
Gide, F-34293 Castelnau Le Lez (FR). LEMMERS,
Bénédicte [FR/FR]; Les Terrasses du Pic Saint Loup,
Bât. C2, 389 rue de l'Espinouse, F-34090 Montpellier
(FR). BENDRIS, Nawal [FR/FR]; Résidence Savary,
Bât. C Appt 220, 298, rue Maurice et Katia Krafft,
F-34090 Montpellier (FR). ARSIC, Nikola [FR/FR];
135, allée du Carlit, F-34090 Montpellier (FR).

(74) Mandataires : PEAUCELLE, Chantal et al.; Cabinet
Armengaud Ainé, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris
(FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))

— avec la partie de la description réservée au listage des
séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : TUMOURIGENESIS BIOMARKERS AND USES FOR OBTAINING ANTI-METASTATIC COMPOUNDS

(54) Titre : BIOMARQUEURS DE TUMORIGÉNÈSE ET APPLICATIONS POUR L'OBTENTION DE COMPOSÉS ANTI-MÉTASTATIQUES

(57) Abstract : The invention relates to Cyc A2 for use as a specific biomarker of the invasive capacity of cancer cells of human or animal origin and to a method for evaluating the invasive power of cancer cells. Use as medicaments and for the screening of anti-metastatic compounds.

(57) Abrégé : L'invention porte sur Cyc A2 pour utilisation en tant que biomarqueur spécifique de la capacité invasive des cellules cancéreuses d'origine humaine ou animale et sur une méthode d'évaluation du pouvoir invasif de cellules cancéreuses. Application comme médicaments et pour le criblage de composés anti-métastatiques.



WO 2012/052629 A2

Biomarqueurs de tumorigénèse et applications pour l'obtention de composés anti-métastatiques

5 L'invention a pour objet des biomarqueurs de tumorigénèse et leurs applications pour l'obtention de composés anti-métastatiques.

10 La métastase est le problème central du cancer. De nombreuses recherches portent donc sur la conception de composés thérapeutiques spécifiquement anti-invasifs permettant d'envisager des effets secondaires plus faibles que les anti-cancéreux classiques.

Dans ce contexte, les travaux des inventeurs ont porté sur l'étude du rôle d'un constituant clé dans la régulation du cycle cellulaire, à savoir la cycline A2 (ci-après Cyc A2 en abrégé), dans la migration et le potentiel métastatique des cellules cancéreuses.

15 Cyc A2 est impliquée dans le contrôle de la phase S et de la mitose du cycle cellulaire. Les recherches effectuées ont permis de mettre en évidence une fonction inattendue de Cyc A2.

20 Plus spécialement, il est apparu que l'inactivation de Cyc A2 endogène par ARN interférence, à l'aide de shARNs, engendre 2 phénotypes distincts : 1) l'un sur le cycle cellulaire correspondant à la fonction déjà connue de Cyc A2 selon une activité dépendante des kinases CDK1 et CDK2 ; 2) l'autre sur le cytosquelette d'actine et la migration cellulaire correspondant à une nouvelle fonction de Cyc A2, cytoplasmique, ne nécessitant pas d'activation des kinases CDK1 et CDK2.

25 Les inventeurs ont alors établi que la déficience de cellules en Cyc A2 était associée à une augmentation de la motilité cellulaire et du pouvoir invasif.

30 En absence de la Cyc A2, les cellules acquièrent un pouvoir invasif accru *via* une diminution de l'activité RhoA. Corrélativement, l'expression de Cyc A2 est détectée dans des tumeurs primaires humaines, mais diminue dans les métastases hépatiques issues de mêmes patients. Ainsi, une corrélation inverse entre le niveau cellulaire de Cyc A2 et le pouvoir invasif des cellules a été établie.

De plus, les travaux effectués ont montré que l'acquisition du caractère invasif des cellules, suite à une déficience en Cyc A2, est due à une diminution de l'activité de la voie RhoA/ROCK.

- 5 Comme démontré par les inventeurs, la voie RhoA/ROCK est activée grâce à l'interaction entre la partie amino-terminale de Cyc A2 et RhoA. La restauration de cette voie, obtenue en réintroduisant de la Cyc A2 dans les cellules déficientes, permet de diminuer le caractère invasif acquis par les cellules.
- 10 L'interaction Cyc A2/RhoA constitue donc une cible privilégiée pour le criblage de composés anti-métastatiques. Des mimétiques, en termes de fonction, de la partie amino-terminale de Cyc A2, en particulier des analogues peptidiques, sont des candidats médicaments pour une action anti-métastatique.
- 15 L'invention a donc pour but de fournir un biomarqueur spécifique du pouvoir invasif des cellules, en particulier pour les métastases.

Elle a également pour but l'utilisation du site d'interaction de Cyc A2 avec RhoA comme système de criblage de composés anti-métastatiques.

20

Elle vise en outre à fournir, en tant que nouveaux produits, la partie amino-terminale de Cyc A2 avec RhoA et les analogues peptidiques, comme candidats médicaments à action anti-métastatique.

- 25 Selon un premier aspect, l'invention vise donc Cyc A2 pour une utilisation en tant que biomarqueur spécifique de la capacité invasive des cellules cancéreuses d'origine humaine ou animale. Plus spécialement, l'invention vise l'utilisation de Cyc A2 comme biomarqueur prédictif des métastases, un niveau faible de Cyc A2 dans les cellules cancéreuses indiquant un mauvais pronostic.

30

L'invention vise ainsi également une méthode d'évaluation du pouvoir invasif de cellules cancéreuses, caractérisée en ce qu'elle comprend la détection du taux de Cyc A2 sur des biopsies, d'origine humaine ou animale, plus spécialement des lysats cellulaires issus des biopsies, le taux étant alors rapporté au taux de GAPDH, ou sur des coupes d'un tissu

d'origine humaine ou animale, déjà qualifié comme cancéreux, en comparaison à des tumeurs préétablies comme exprimant fortement ou faiblement Cyc A2. Dès lors, une déficience en Cyc A2 ou une faible expression de Cyc A2 sera associée à un caractère invasif de la cellule.

- 5 La détection du taux de Cyc A2 est avantageusement réalisée par Western Blot ou, dans le cas de biopsies, par immunohistochimie.

L'invention fournit ainsi les moyens d'orienter un traitement anticancéreux vers la nécessité ou non de traitements thérapeutiques lourds.

10

Selon un deuxième aspect, l'invention vise une composition de Cyc A2 pour utilisation comme médicament anti-métastatique.

15

Elle vise ainsi plus spécialement une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle renferme une quantité thérapeutiquement efficace de Cyc A2 ou de sa partie N-terminale en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable. L'ADNc codant pour Cyc A2 présente la séquence SEQ ID N°1.

20

Selon un troisième aspect, l'invention vise l'utilisation du site d'interaction Cyc A2/RhoA comme cible pour le criblage de composés anti-métastatiques capables d'activer la voie RhoA/ROCK.

25

Selon un quatrième aspect, elle vise l'utilisation de la partie amino-terminale de Cyc A2 et tout analogue peptidique (mimétique fonctionnel), comme candidat médicament à action anti-métastatique.

30

Les expérimentations réalisées par les inventeurs ont montré, comme illustré par les exemples, que la partie amino-terminale de Cyc A2, en particulier, les fragments N-terminaux de 70, 140 et 196 acides aminés de Cyc A2 qui ne contiennent pas le domaine « cyclin box » de Cyc A2 s'avèrent appropriés comme composés anti-métastatiques.

La moitié N terminale de Cycline A2 s'est révélée seule capable de restaurer une distribution normale de l'actine dans les cellules traitées par shRNAcycA2. La région impliquée est réduite aux 70 premiers acides aminés.

La partie amino-terminale de Cyc A2 et les fragments de cette partie de 70, 140 et 196 acides aminés sont codés par des ADNc de séquences, respectivement, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3 et
5 SEQ ID N°4.

Les composés anti-métastatiques correspondant à des mimétiques de la partie amino-terminale de Cyc A2 entrent également dans le champ de l'invention.

10 L'invention vise en particulier des peptides correspondant à des mimétiques de la partie amino-terminale de Cyc A2 et présentant des propriétés anti-métastatiques.

Dans les applications comme médicaments, les composés sont utilisés à des doses et selon des voies d'administration les plus appropriées pour l'homme du métier au vu des applications
15 envisagées.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés à titre illustratif dans les exemples qui suivent, avec référence aux Figures 1 à 7, qui représentent, respectivement,

- Figure 1 : la redistribution de l'actine et de la vinculine dans les cellules déficientes en cycline A2. A : analyse par Western Blot de l'expression de Cyc A2 dans les cellules
20 NIH3T3 non infectées, ou infectées par un sh contrôle (sh Luc) ou sh Cyc A2 (on note la disparition de la protéine Cyc A2 dans les cellules sh Cyc A2 par rapport aux contrôles) . B : marquage de l'actine-F et des plaques focales d'adhérence dans les cellules NIH3T3 contrôle (sh Luc) ou sh Cyc A2 par immunofluorescence à l'aide de
25 la phalloïdine-Rhodamine (rouge) et d'un anticorps anti-Vinculine (vert), respectivement. Les cellules sh Cyc A2 présentent une corticalisation du cytosquelette d'actine et une redistribution des plaques focales d'adhérence par rapport aux cellules contrôle sh Luc.

- Figure 2 : la correction du phénotype cytoplasmique par la Cyc A2 WT et la Cyc A2 mutante (Cyc A2 Mut). A et B : analyse par immunofluorescence de l'organisation de
30 l'actine-F dans les cellules NIH3T3 sh Cyc A2 non transfectées ou transfectées par Cyc A2 WT, Cyc A2 Mut ou Cyc A2 Mut comportant le NLS de l'antigène T de SV40 (Cyc A2 Mut NLS). B : quantification du pourcentage de cellules NIH3T3 sh

Cyc A2 présentant une restauration d'un cytosquelette d'actine normal après transfection par Cyc A2 WT, Cyc A2 Mut ou Cyc A2 Mut-NLS.

- Commentaire : les cellules NIH3T3 sh Cyc A2 présentent une corticalisation du cytosquelette d'actine. L'organisation normale du cytosquelette (illustrée par les cellules NIH3T3 sh Luc) est rétablie dans près de 90% des cellules NIH 3T3 Sh Cyc A2 transfectées par Cyc A2 WT et 75 % des cellules transfectées par Cyc A2 Mut contrairement aux cellules transfectées par Cyc A2 Mut-NLS (environ 10% de restauration).
- Figure 3 : modulation de l'activité RhoA dans les cellules déficientes en Cyc A2 ou présentant une expression forcée de Cyc A2. A : détection par Western Blot de la proportion des formes actives RhoA après précipitation à l'aide de billes GST-Rhotekin sur des lysats cellulaire générées à partir de cellules NIH3T3 contrôle (sh Luc et contrôle), cellules déficientes en Cyc A2 (sh Cyc A2) ou présentant une surexpression de Cyc A2 (+ Cyc A2-Flag). B : quantification de l'activité de RhoA détectée par Western Blot et établie en rapport à la quantité de protéine RhoA totale (Total) et la quantité de protéine totale (GAPDH).
- Commentaire : la déficience en Cyc A2 (sh Cyc A2) induit une diminution de la quantité des formes actives de RhoA (ratio d'activité de 0.48 par rapport au contrôle de 1) alors que son expression forcée conduit à une augmentation de la proportion des formes actives de RhoA (ratio d'activité de 2 par rapport à 1). L'activité de RhoA est donc diminuée en absence de Cyc A2 et augmentée lors de sa surexpression.
- Figure 4 : le pouvoir migratoire et invasif des cellules déficientes en Cyc A2 est augmenté. A : vitesse de migration des cellules NIH3T3 sh Cyc A2 établie par test de blessure sur un tapis confluent de cellules NIH3T3 sh Luc ou sh Cyc A2 (2D). La vitesse de migration des cellules NIH 3T3 sh Cyc A2 est calculée d'après un enregistrement par vidéo microscopie en temps réel effectué pendant 24H après l'établissement de la blessure et normalisé par rapport à la vitesse des cellules NIH3T3 sh Luc. B : taux d'invasion des cellules NIH3T3 et NIH3T3RasV12, déficientes (sh Cyc A2) ou non (sh Luc) en Cyc A2 dans une matrice collagène I (3D). C : invasion des cellules de cancer mammaire MDA-MB-231 déficientes en Cyc A2 (sh Cyc A2) ou exprimant de façon ectopique Cyc A2 (Cyc A2 Flag) dans une matrice de collagène I (3D). Le taux d'invasion des cellules inactivées en Cyc A2 ou surexprimant la Cyc A2 est établi par rapport aux cellules contrôles.

- Commentaire : l'inactivation de Cyc A2 dans les cellules NIH3T3 induit une augmentation de la vitesse de migration en 2D (A). Ces cellules nécessitent une étape de transformation par RasV12 pour présenter des capacités invasives mesurables en test 3D (B). Dans ces conditions, les cellules NIH3T3RasV12 déficientes pour Cyc A2 présentent un pouvoir invasif supérieur aux cellules NIH3T3RasV12 sh Luc (B). Ces observations ont été confirmées dans un modèle cellulaire de cancer mammaire, les MDA-MB-231 (C). Inversement, dans ce même modèle, l'expression forcée de Cyc A2 induite par infection rétrovirale inhibe le potentiel invasif des cellules par rapport aux cellules contrôle infectées par un virus vide.
- Figure 5 : Cyc A2 interagit directement avec RhoA par l'intermédiaire de sa partie N-terminale (aa1 à 196 et aa1 à 70). A : Co-immunoprécipitation de Cyc A2 endogène avec RhoA. Des lysats cellulaires générés à partir de cellules NIH3T3 transfectées à l'aide d'un vecteur vide (ctrl) ou exprimant RhoAV14-GFP ont été immunoprécipités par des billes GFP-Trap. L'interaction entre les deux molécules a été détectée par western blotting à l'aide de l'anticorps anti- Cyc A2 (Sigma) après migration sur gel et transfert des immunoprécipitats (IP). L'expression de Cyc A2 et RhoAV14 dans ces cellules est déterminée en parallèle (Input). B : Cyc A2 recombinante (production en bactéries) a été incubée soit avec les billes glutathion comme contrôle (billes) ou la protéine recombinante RhoA couplée aux billes glutathion (RhoA GST billes). La fraction de Cyc A2 liée à la protéine RhoA-GST a été détectée par Western Blot après élution. C : panneau de gauche : représentation schématique des mutants de délétion de la Cyc A2. Le mutant N-terminal (N-ter) comprend la partie N-terminale de Cyc A2 de l'acide aminé 1 à 196 en amont de la partie « cyclin box ». Le mutant C-terminal comprend la partie C-terminale de Cyc A2 de 197 à 422 qui inclut la « cyclin box ». Deux mutants de délétion de la partie N-terminale de Cyc A2 ont été générés et comprennent respectivement les fragments 1 à 70 (N-ter1-70) et 1 à 140 (N-ter1-140) de Cyc A2. D et E : interaction de RhoA avec les différents fragments de Cyc A2. Des immunoprécipitations effectuées à l'aide de l'anticorps anti-Flag couplé à des billes d'agarose ont été effectuées sur des lysats cellulaires générés à partir de cellules NIH3T3 co-transfectées par les plasmides codant respectivement pour RhoA-EGFP et les différents fragments de Cyc A2. La liaison de RhoA aux fragments Cyc A2 a été détectée par immunoblotting à l'aide de l'anticorps anti-GFP. L'expression des différents fragments dans les cellules et leur immunoprécipitation Cyc A2 est indiquée en E, panel droit.

- Commentaire : la détection de Cyc A2 par Western Blot dans l'immunoprécipitat RhoAV14-GFP (IP) démontre l'existence d'une interaction entre Cyc A2 et RhoA *in cellulo* (A). La présence de Cyc A2 dans l'éluat des billes RhoA-GST démontre l'existence d'une interaction directe entre RhoA et Cyc A2 *in vitro* (B). La forte proportion de N-ter Cyc A2 (aa1-196) dans l'immunoprécipitat RhoA-GFP par rapport à la proportion du fragment C-ter démontre une association de RhoA avec le fragment N-ter de Cyc A2 (D). L'utilisation de fragments Cyc A2 plus petits (aa 1 à 140 et aa 1 à 70) dans les mêmes types d'expériences démontre que la région de liaison de RhoA à Cyc A2 se situe entre les acides aminés 1 à 70 de Cyc A2 (E).
- Figure 6 : la restauration de l'effet de la déficience de Cyc A2 sur le cytosquelette par la partie N-terminale de Cyc A2. A. Analyse par immunofluorescence du cytosquelette d'actine (l'actine F est détectée par un marquage à la phalloïdine-Rhodamine) dans les cellules NIH3T3 déficientes ou non en Cyc A2 et après transfection de Cyc A2 WT ou des fragments N-ter (1-196) et C-ter. L'expression de Cyc A2 WT et des fragments est détectée à l'aide d'un marquage par l'anticorps anti-Flag. B : quantification du pourcentage de cellules NIH3T3 sh Cyc A2 présentant une restauration d'un cytosquelette d'actine normal après transfection par Cyc A2 WT, Cyc A2 N-ter ou Cyc A2-C-ter.
- Commentaire : les cellules NIH3T3 sh Cyc A2 présentent une corticalisation du cytosquelette d'actine. L'organisation normale du cytosquelette (illustrée par les cellules NIH3T3 sh Luc) est rétablie dans près de 90% des cellules NIH 3T3 Sh Cyc A2 transfectées par Cyc A2 WT et 80 % des cellules transfectées par Cyc A2 N-ter contrairement aux cellules transfectées par Cyc A2 C-ter.
- Figure 7 : les quantifications de Cyc A2 (Western Blot) dans divers échantillons de tumeurs humaines primaires du colon (T) et leurs métastases hépatiques (M) issues de six patients. Pour l'ensemble de ces échantillons, une quantité identique de protéines (20 µg) a été séparée par électrophorèse puis transférée et analysée pour l'expression de Cyc A2 à l'aide de l'anticorps anti-Cyc A2 (Sigma). B. Quantification du taux d'expression de Cyc A2 à partir de l'analyse par Western Blot. La normalisation s'effectue en rapportant le taux d'expression de Cyc A2 sur celui de la protéine GAPDH.
- Figure 8 : Cyc A2 recombinante interagit directement et préférentiellement avec la forme vide de RhoA (A) et potentialise sa charge en GTP en présence de deux GEF :

Dbl (B, C) et Tgat (D, E). B et D : cinétique d'incorporation de GTP fluorescent ; C et E : quantification des vitesses initiales.

- Figure 9 : coprécipitation de Cycline A2 endogène après transfection de cellules NIH3T3 avec des constructions exprimant RhoB-GFP ou RhoC-GFP (pull down GFP et Western Blot Cycline A2).
- Figure 10 : les cellules épithéliales NMuMG traitées par shRNAcycA2 adoptent une morphologie fibroblastique (A) associée à une perte de E cadhérine (B) et une redistribution de la vinculine, de la β caténine ainsi que de la p120 caténine (C).
- Figure 11 : les cellules dépourvues de Cycline A2 sont plus invasives (A). Alors que l'activité de Rac1 n'est pas modifiée (B), celle de RhoA est inhibée (C) et celle de RhoC augmentée (D). Cycline A2 interagit avec RhoC (E).
- Figure 12 : modulation des marqueurs de l'EMT par l'élimination de la Cycline A2 dans des cellules NMuMG normales ou transformées par RasV12. Comparaison avec l'effet d'un inducteur comme le TGF β .
- Figure 13 : les cellules NMuMG transformées par RasV12 et dépourvues de Cycline A2 forment plus de tumoresphères qui contiennent plus de cellules.

Matériels et Méthodes

Plasmides

L'ADNc de Cyc A2 de séquence SEQ ID N°1 de souris a été obtenu à partir de cellules NIH3T3 par RT-PCR et a été cloné dans pBluescriptII (KS) (Stratagene) et séquencé.

Les mutants de Cyc A2 ont été obtenus par mutagenèse dirigée à l'aide du kit QuickChange II Mutagenesis (Stratagene) afin de permettre la substitution d'acides aminés choisis par l'Alanine.

Les différentes constructions de Cyc A2 ont été en outre mutées pour être résistantes au shRNA utilisé et sous-clonées dans pcDNA3 (Invitrogen). L'ensemble des cDNA ainsi mutés ou non de Cyc A2 ont été fusionnés à une étiquette 3xFlag à leur extrémité 3'.

Dans le cas du Mutant Cyc A2, le signal de localisation nucléaire (NLS) du grand antigène T de SV40 a été inséré entre l'ADNc de Cyc A2 et le tag Flag. Flag-CycA2 de type sauvage et les ADNc mutés ont été introduits dans pMSCVhyg (Clontech) pour la production de rétrovirus.

Pour la détermination des interactions Cyc A2/RhoA *in vitro*, l'ADNc de Cyc A2 de séquence SEQ ID N°1 et celui de RhoA de séquence SEQ ID N°5 ont respectivement été sous-clonés dans pGEX-6P-1 et pGEX-2T (GE Healthcare).

- 5 Les shARNs a et b répondant aux séquences SEQ ID N°6 et 7 ont été utilisés pour induire l'inactivation de Cyc A2 dans les cellules:

a) : SEQ ID N°6 : 5'-GAAATGGAGGTTAAATGA-3'

b): SEQ ID N°7 : 5'-GTAGCAGAGTTTGTGTATA-3'

10

Ces séquences ont été clonées dans le vecteur RNAi-Ready pSIREN-RetroQ (Clontech).

Culture cellulaire, transfections et infections

- 15 Les cellules NIH3T3, NIH3T3 RasV12, ont été cultivées dans un milieu DMEM-10% de sérum de veau fœtal (SVF). Les cellules MDA-MB-231 ont été cultivées en milieu MEM-10% SVF.

- 20 L'expression ectopique de Cyc A2 ou son inactivation dans les cellules est effective après transfection à l'aide de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) ou après infection virale. Dans le cas de l'infection, les cellules ont été sélectionnées pendant 2 jours en présence de 1-10 µg/ml de puromycine (InvivoGen) (infection par les rétrovirus codant pour le sh RNA de Cyc A2), ou de 200-250 µg/ml d'hygromycine B (Invitrogen) (expression ectopique de Cyc A2) selon les lignées cellulaires.

25

Anticorps, immunoblots et immunofluorescence

Les anticorps suivants ont été utilisés pour réaliser les immunoblots :

- 30 Anticorps monoclonal anti-cycline A2 (clone CY-A1-Sigma), anti-Cyc A2 (sc-751, Santa Cruz Biotechnology) anti-RhoA (sc-418 Santa Cruz Biotechnology), anti-GAPDH (G9545, Sigma).

Les anticorps suivants ont été utilisés pour la coloration par immunofluorescence : monoclonal anti-vinculine (clone (hVIN-Sigma). La coloration de la F-actine a été réalisée

avec de la phalloïdine conjuguée à de la rhodamine (Sigma). Les anticorps conjugués AlexaFluor (Invitrogen) ont été utilisés comme anticorps secondaires. Avant d'effectuer les analyses par immunofluorescence, les cellules ont été fixées avec 3,2% de paraformaldéhyde et perméabilisées avec 0,2% de Triton X-100. Les cellules ont été visualisées en utilisant un microscope Leica DMRA ou DM600 et le logiciel MetaMorph.

Tests de migration et d'invasion

Test de blessure : la migration des cellules a été évaluée en réponse à une blessure pratiquée sur le tapis de cellules confluentes. L'enregistrement des données s'est effectué toutes les 5 minutes pendant 24H à l'aide d'un microscope Zeiss Axiovert 200M géré par le logiciel MetaMorph.

Test d'invasion : cet essai s'est effectué en plaque 96 puits recouverts de 0.2% d'albumine sérique bovine et selon les conditions décrites dans l'article Smith and Marsall, *J Cell Biol* 182, 777-790 (2008).

Quantification de l'activité RhoA

Les lysats cellulaires ont été incubés pendant 1h à 4°C avec 60 µg de billes GST-Rhotekin-RBD (Cytoskeleton). Après lavages et séparation sur gel d'acrylamide, la quantité des formes RhoA-GTP ainsi précipitée a été évaluée par western blotting.

Co-immunoprécipitation et GST

Les immunoprécipitations anti-Cyc A2 et anti-RhoA ont été réalisées à l'aide de billes anti-Flag M2 (Sigma) et de billes GFP-Trap® (Chromotek), respectivement. L'existence d'un complexe RhoA/Cyc A2 a été identifiée après séparation des protéines immunoprécipitées et western blotting.

La détermination de l'existence d'une interaction directe entre Cyc A2 et RhoA in vitro a été réalisée à l'aide des protéines Cyc A2 et RhoA fusionnées à la GST et produites en bactéries. Cyc A2 recombinante a été purifiée à partir des billes conjuguées à la GST par digestion en utilisant une protéase PreScission et incubée avec RhoA GST lié aux billes d'agarose. Après

lavage, les billes de RhoA-GST et les billes contrôle sont récupérées et soumises à une analyse par Western Blot.

Sélection d'échantillons de tumeurs humaines primaires ou métastatiques

5

L'analyse de l'expression de Cyc A2 a été effectuée par Western Blot sur six couples de biopsies de cancers colorectaux humains (tumeurs primaires et métastases hépatiques correspondantes).

10 4 tumeurs ont été identifiées comme cancers du colon et 2 comme cancers rectaux.

Toutes les tumeurs sont des adénocarcinomes classifiées d'après la 7^{ième} classification TNM des tumeurs malignes.

15 Pour la détection des taux de Cyc A2 par Western Blot, les sections congelées des échantillons de tumeurs ont été homogénéisées dans un tampon d'extraction (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton Y-100, 0,5% NP 40 complété par des inhibiteurs de protéases) pendant 20 sec à 4000 Hz, à l'aide du système Mag NA Lysa (Roche Diagnostic). Après incubation sur glace (30 min.), les échantillons sont centrifugés 30
20 min. à 14000 rpm. Pour chaque échantillon, 20 µg de l'extrait protéique total est analysé par Western Blot.

Analyse statistique

25 Les analyses statistiques sont effectuées en utilisant le test de Mann Whitney non paramétrique et le logiciel GraphPad Prism ($P < 0,05$ est retenu comme étant significatif d'un point de vue statistique).

Résultats

30

Effets d'une déficience en Cyc A2 sur la morphologie cellulaire,

Un système fondé sur l'inactivation de Cyc A2 endogène par shRNA a été utilisé. Une série de mutants (voir Matériels et Méthodes) ont été construits pour évaluer leur capacité à restaurer les phénotypes altérés dans des cellules NIH3T3.

Deux phénotypes ont été obtenus lors de l'inactivation de Cyc A2, dont le premier était attendu : les cellules s'accumulent en phase G2/M et présentent des défauts mitotiques. La réintroduction de Cyc A2 native (ci-après WT) insensible au shRNA, corrige ces défauts, contrairement aux mutants qui s'avèrent incapables d'activer CDK1 et CDK2, validant ainsi le système.

Le deuxième phénotype est inattendu et montre une corticalisation du cytosquelette d'actine et une redistribution des plaques focales d'adhérence (Figure 1). De manière surprenante, le mutant est tout aussi efficace que le WT dans la restauration d'un phénotype normal.

De façon intéressante, ce mutant est cytoplasmique : Cyc A2 n'ayant pas de signal de localisation nucléaire (NLS) fait la navette entre noyau et cytoplasme grâce à son association à ses partenaires. Au vu de cette observation, Cyc A2 a été fusionnée au NLS de l'antigène T de SV40 et dans ce cas, le mutant n'est plus opérationnel (Figure 2).

Les mêmes observations sont valables dans un contexte dépourvu d'activités CDK1 et CDK2. Ces résultats mettent en évidence l'existence d'une nouvelle fonction pour Cyc A2 qui apparaît cytoplasmique et indépendante des activités des kinases du cycle cellulaire.

Effets de la déficience de Cyc A2 sur l'activation de RhoA et l'invasion cellulaire

Les cellules déficientes en Cyc A2 révèlent une diminution de l'activation de la voie RhoA/ROCK (Figure 3), associée à une augmentation de la motilité cellulaire telle qu'on peut la mesurer dans des tests de blessure en culture 2D (Figure 4 A).

Toutefois, les cellules NIH3T3 dans lesquelles ces observations ont été effectuées ne sont pas invasives dans un test 3D conduit en matrice de collagène (figures 4B).

Ces résultats ont conduit à tester la possibilité qu'un événement de transformation soit un pré requis à l'acquisition de cette propriété.

Les résultats obtenus montrent qu'effectivement, les mêmes cellules transformées par Ras V12 acquièrent un pouvoir invasif, et l'inactivation de cycline A2 augmente significativement ce pouvoir (Figure 4B). Ces résultats ont été reproduits pour une lignée cellulaire issue de cancer du sein humain, MDA-MB-231 (Figure 4C). Inversement, dans cette lignée, l'expression forcée de Cyc A2 réduit le potentiel invasif (Figure 4C). Ce phénotype est corrélé à une augmentation de l'état d'activation de RhoA (Figure 3A et B)

Interaction directe entre RhoA et Cyc A2

- 10 Du point de vue mécanistique, les résultats montrent une interaction entre RhoA et Cyc A2 (pull down) (Figure 5A et B) *in cellulo* et *in vitro*. Une caractérisation plus poussée de la partie de Cyc A2 interagissant avec RhoA a permis de déterminer l'implication du fragment N-terminal de Cyc A2 (Figure 5C, D, E) dans l'interaction avec RhoA.
- 15 De même que pour la Cyc A2 WT, la réintroduction du fragment Cyc A2 N-ter 1-196 dans les cellules déficientes pour Cyc A2 permet de restaurer un cytosquelette d'actine normal (Figure 6)

Expression de Cyc A2 dans les tumeurs primaires et métastases de cancers humains.

- 20 Ces observations expliquent potentiellement la diminution du taux d'expression de Cyc A2 dans les métastases hépatiques de cancers colorectaux humains par rapport aux tumeurs primaires (Figure 7). Le faible taux d'expression de Cyc A2 apparaît donc inversement corrélé au pouvoir invasif des cellules cancéreuses et doit donc représenter un facteur de mauvais pronostic.

Interaction, in vitro, de Cyc A2 avec la forme vide de RhoA

- 30 *In vitro*, Cycline A2 recombinante interagit de façon préférentielle avec la forme dépourvue de tout nucléotide de RhoA. Elle est par ailleurs capable de potentialiser (40-50% d'augmentation) l'activité de deux GEF de RhoA (Tgta et Dbl) dans un test cinétique de charge en GTP (Figure 8).

Interaction de Cyc A2 avec RhobB et RhoC

- 5 Les résultats montrant l'interaction de Cyc A2 également avec RhoB et RhoC sont donnés sur la Figure 9.

Effets de l'élimination de Cyc A2 dans des cellules épithéliales mammaires normales de souris : changements morphologiques et géniques.

10

- L'élimination de Cycline A2 dans des cellules épithéliales mammaires normales de souris induit des changements morphologiques et géniques possédant certaines des caractéristiques de l'EMT (transition épithélio-mésenchymateuse), phénomène renforcé si transformation des cellules par Ras V12 (Figure 10). Dans ce cas, l'inhibition de RhoA est associée à une
- 15 activation de RhoC alors que Rac 1 n'est toujours pas touché (Figure 11). Les cellules voient leur potentiel invasif augmenté ainsi que la production de marqueurs comme les facteurs de transcription E12, E47, Twist 2, Slug, ou encore les métallo protéases matricielles MMP3, MMP7 et MMP14 (Figure 12). Les cellules deviennent également résistantes à l'anoïkis et forment un plus grand nombre de tumorosphères qui contiennent plus de cellules (Figure 13).

20

REVENDICATIONS

- 1 - Cyc A2 pour utilisation en tant que biomarqueur spécifique de la capacité invasive des cellules cancéreuses d'origine humaine ou animale.
- 5 2 - Cyc A2 pour utilisation selon la revendication 1, comme biomarqueur prédictif des métastases.
- 3 - Méthode d'évaluation du pouvoir invasif de cellules cancéreuses, caractérisée en ce qu'elle comprend la détection du taux de Cyc A2 sur des biopsies d'origine humaine ou animale, plus spécialement sur des lysats cellulaires issus des biopsies, le taux de Cyc A2
- 10 étant alors rapporté au taux de GAPDH ou, sur des coupes d'un tissu d'origine humaine ou animale, déjà qualifié comme cancéreux, en comparaison à des tumeurs préétablies comme exprimant fortement ou faiblement Cyc A2, une déficience en Cyc A2 ou une faible expression de Cyc A2 sera alors associée à un caractère invasif de la cellule.
- 4 - Méthode selon la revendication 3, caractérisée en ce que la détection du taux de Cyc A2
- 15 est réalisée par Western Blot ou par immunohistochimie dans le cas de biopsies.
- 5 - Composition de Cyc A2 pour utilisation comme médicament anti-métastatique.
- 6 - Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle renferme une quantité thérapeutiquement efficace de Cyc A2 ou de sa partie N-aminoterminal ou de fragments de cette partie, notamment les fragments N-terminaux de 70, 140 et 196 acides aminés de Cyc
- 20 A2, codés respectivement par les ADNc de séquences SEQ ID N°2, 3 et 4 en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 7 - Utilisation du site d'interaction Cyc A2/RhoA comme cible pour le criblage de composés anti-métastatiques capables d'activer la voie RhoA/ROCK.
- 8 - Utilisation de la partie amino-terminale de Cyc A2 et de mimétique peptidique
- 25 fonctionnel, comme candidat médicament à action anti-métastatique.
- 9 - Composés anti-métastatiques correspondant à des mimétiques de la partie amino-terminale de Cyc A2.
- 10 - Composés selon la revendication 9, caractérisés en ce qu'il s'agit de peptides.

Vérification de l'effet
du sh Cyc A2

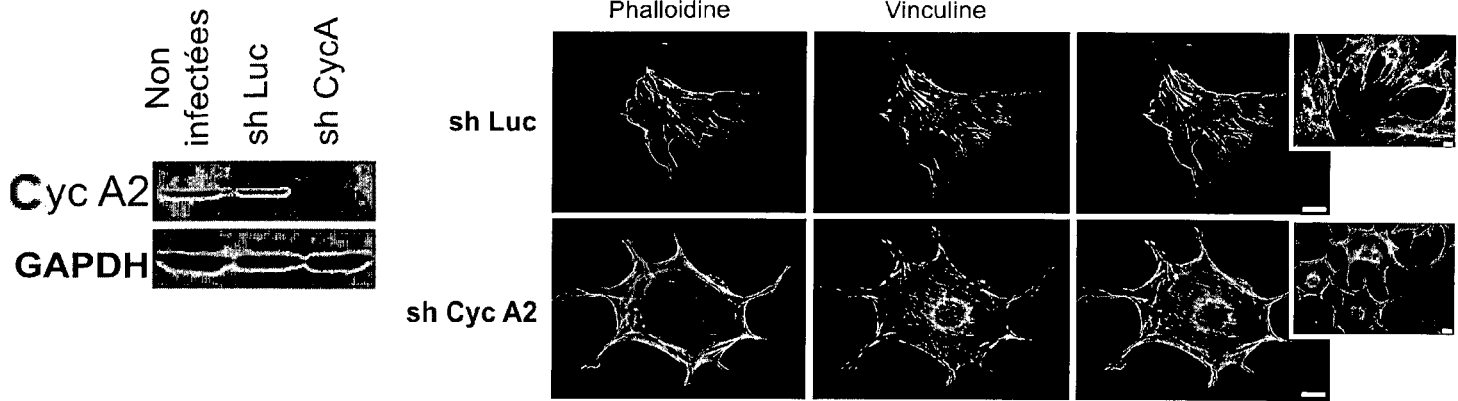


Figure 1

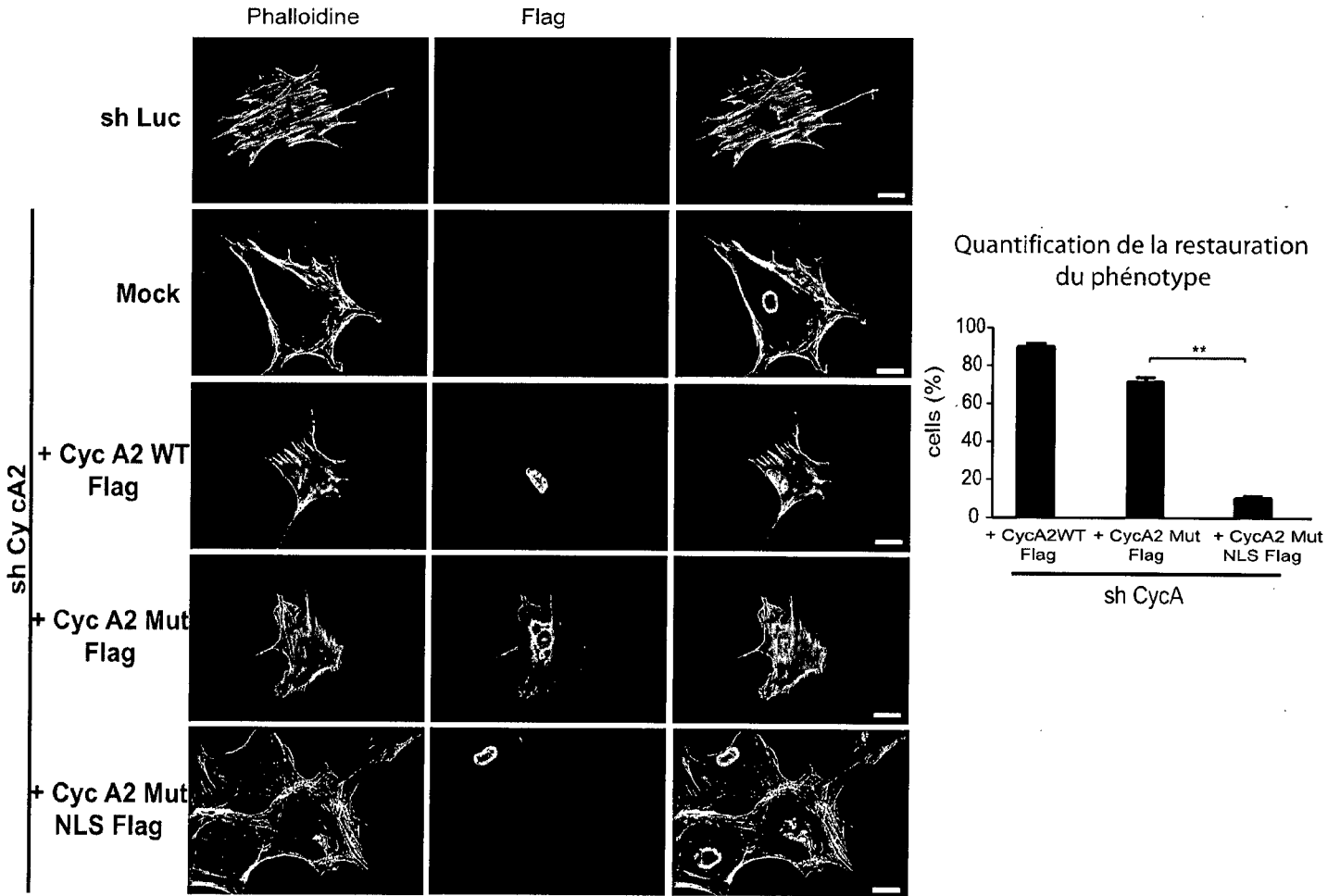


Figure 2

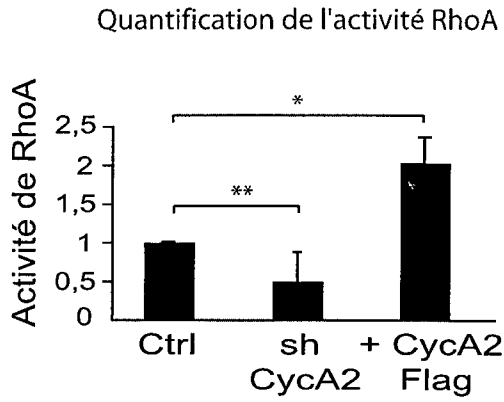
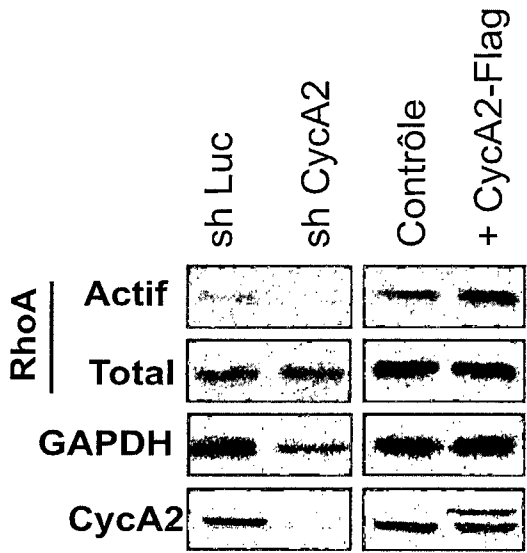
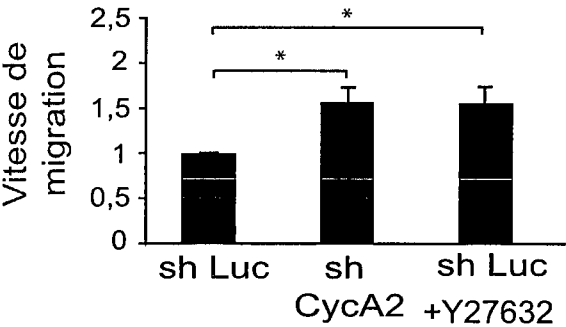
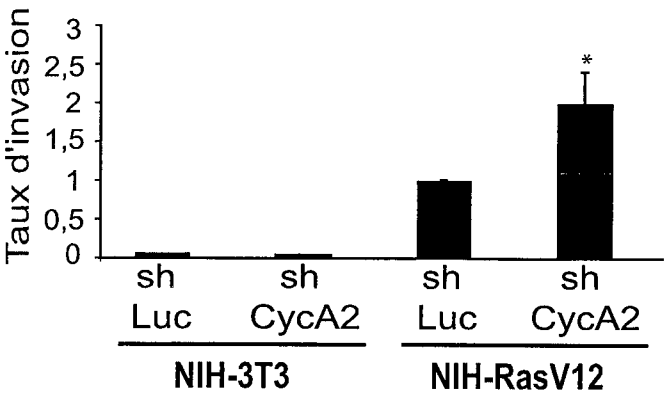


Figure 3

A



B



C

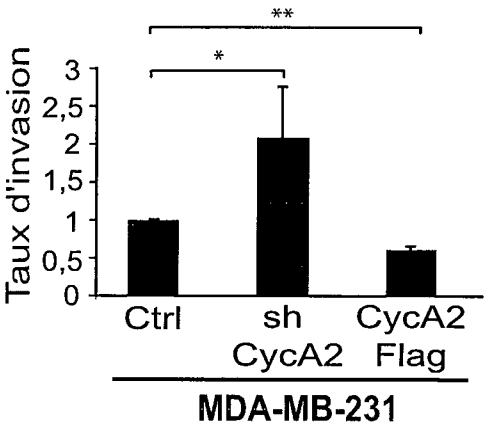


Figure 4

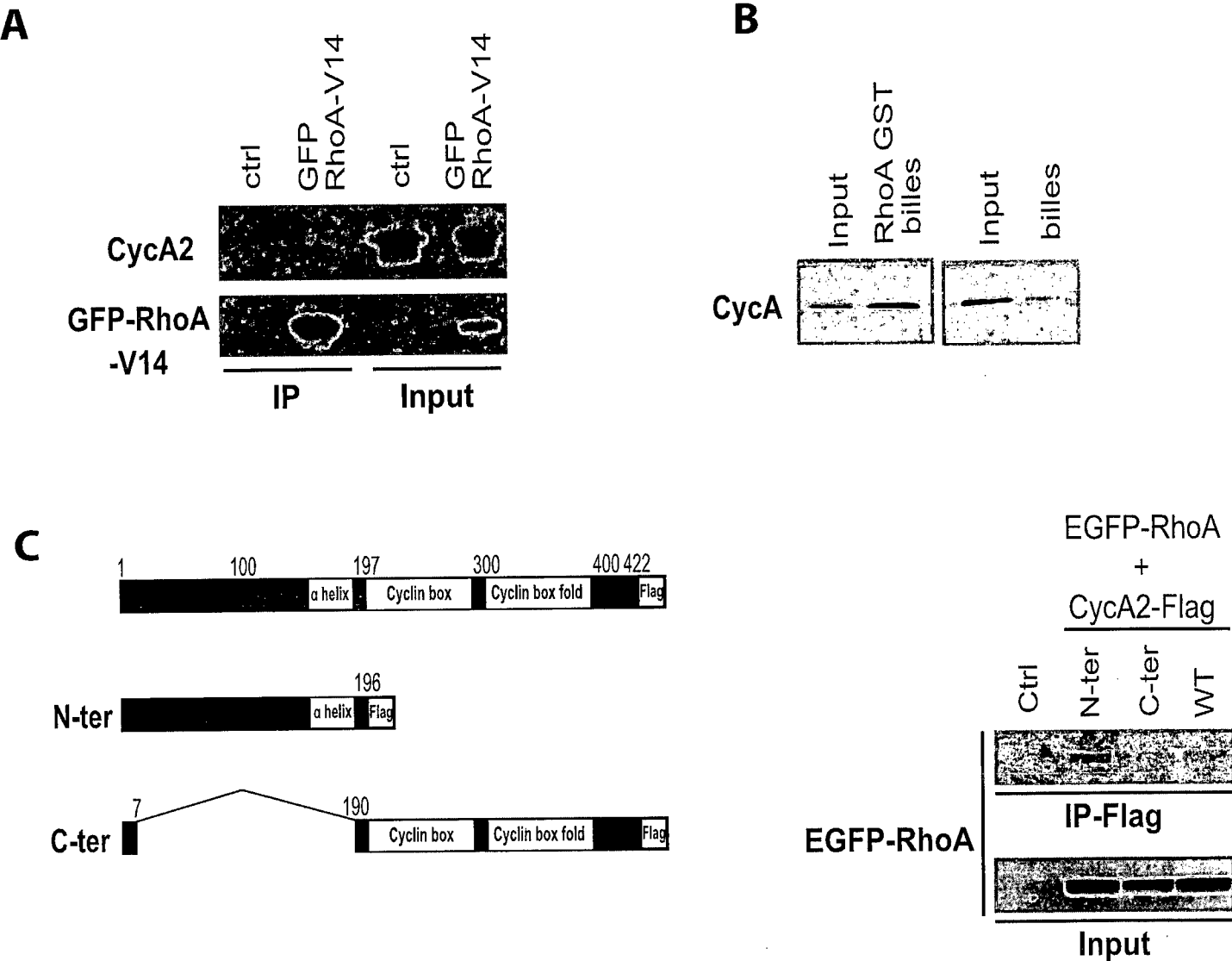
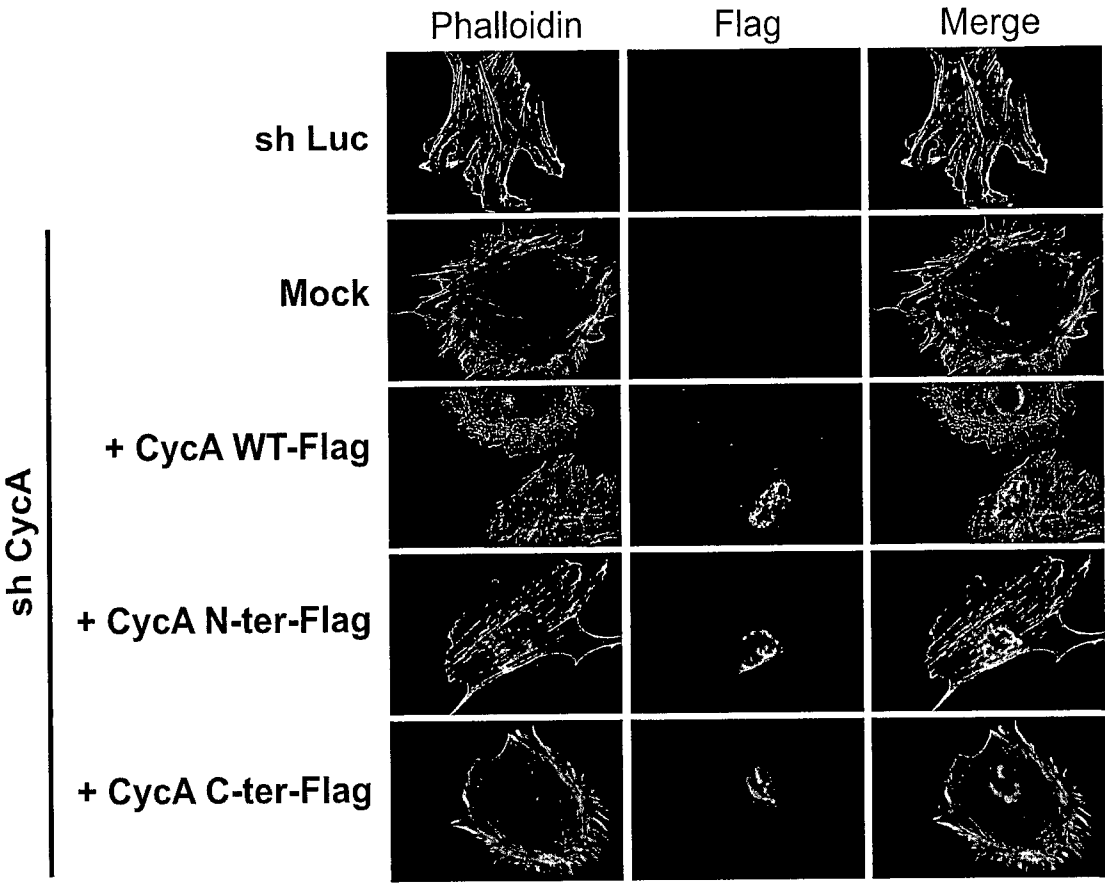


Figure 5



Quantification de la restauration du phénotype

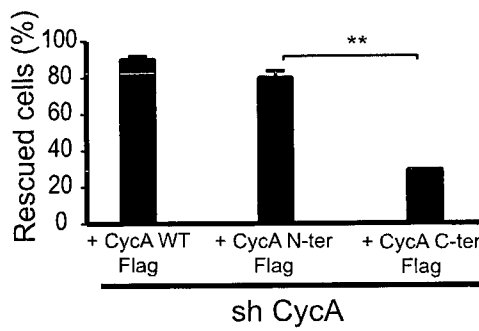


Figure 6

Quantification du taux d'expression Cyc A2

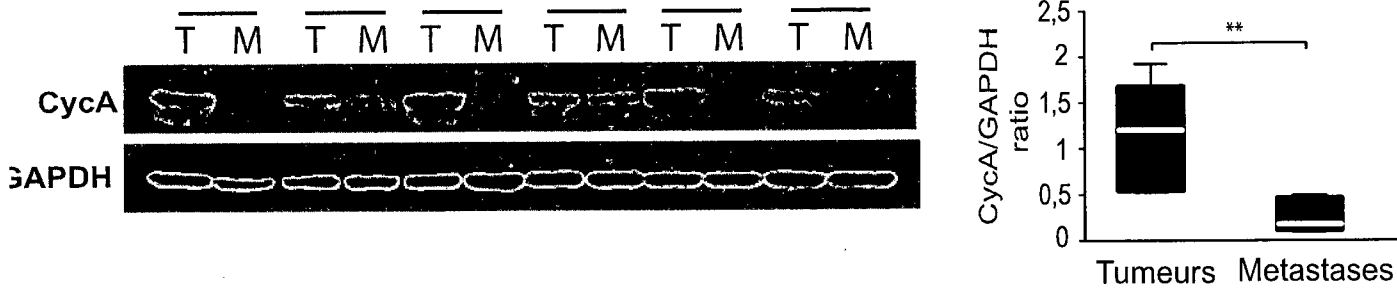


Figure 7

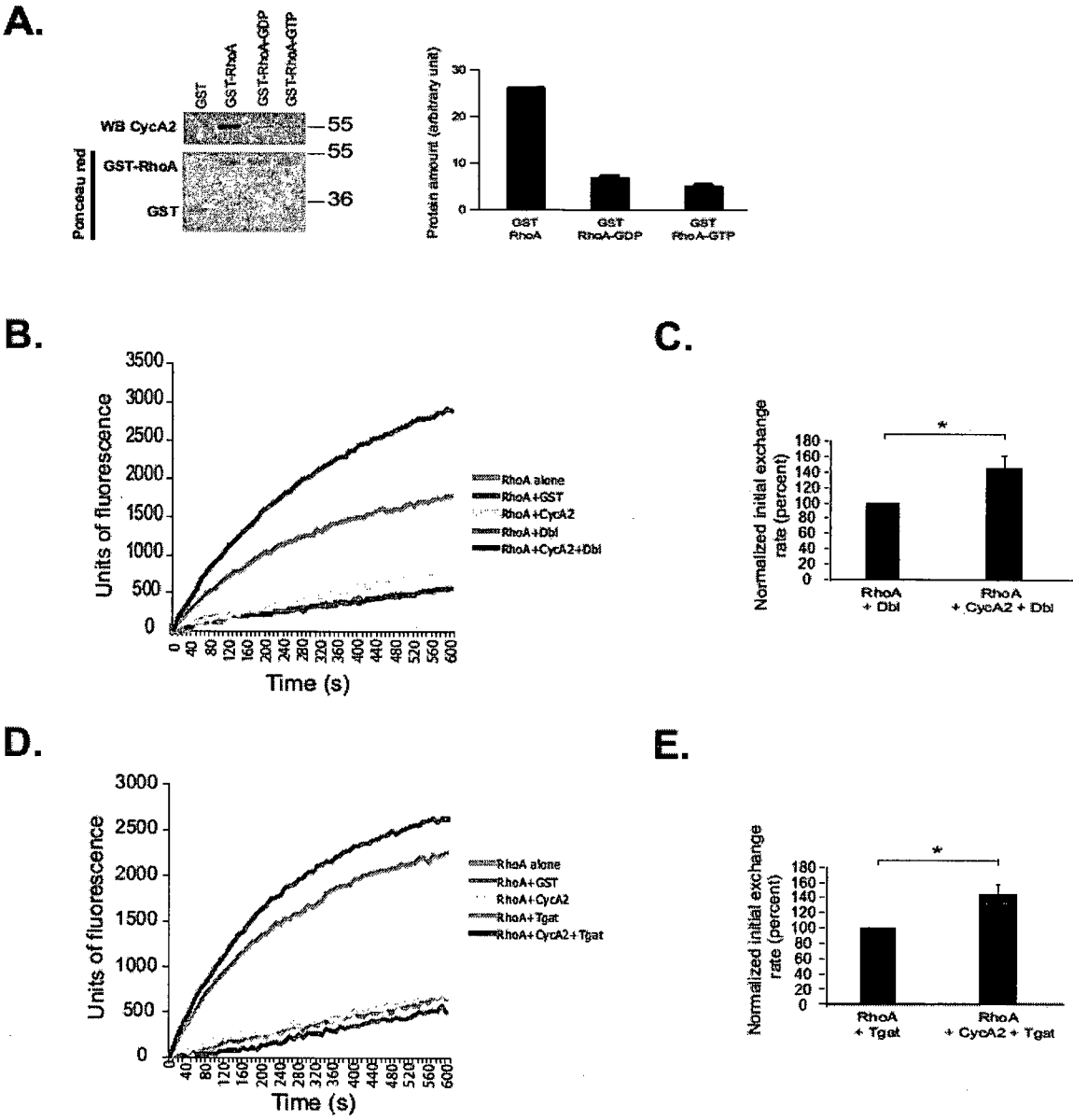


Figure 8

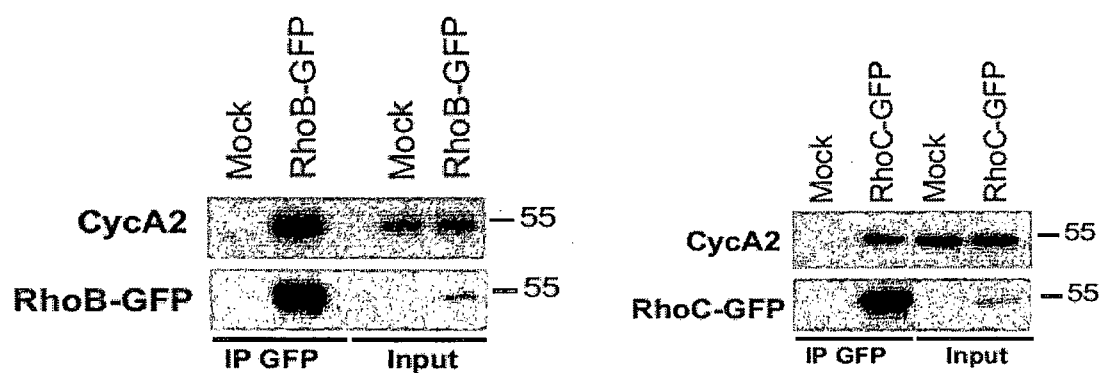


Figure 9

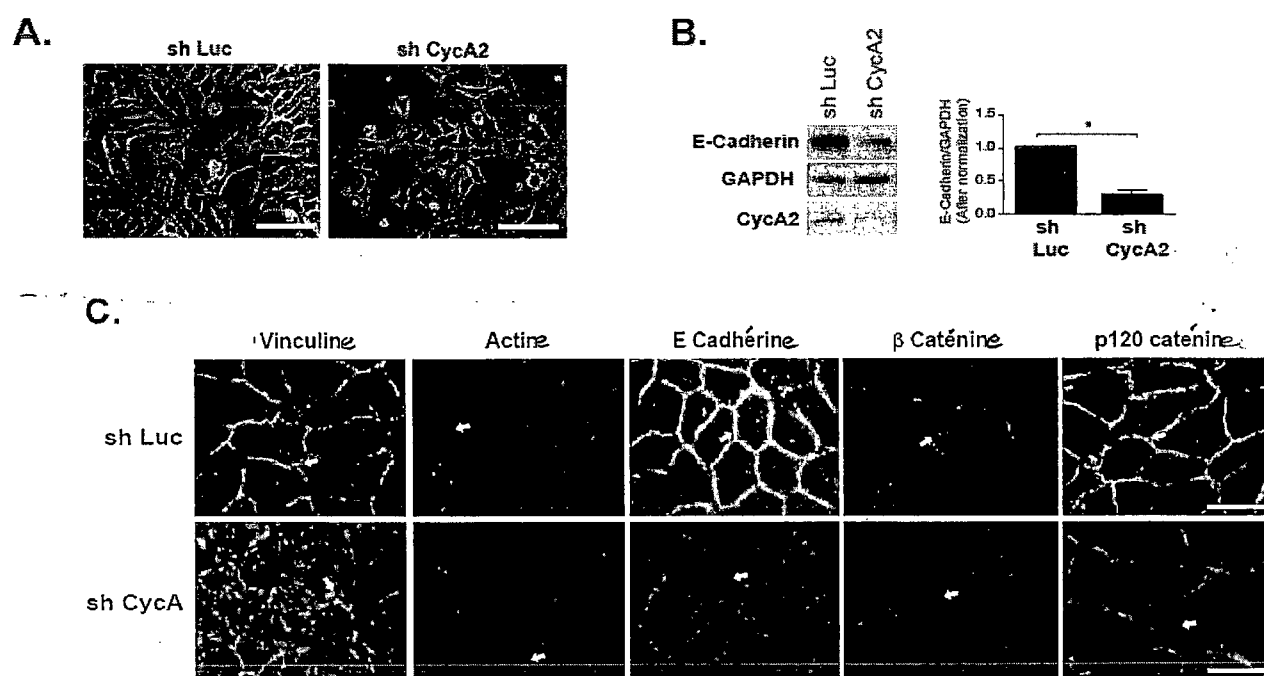


Figure 10

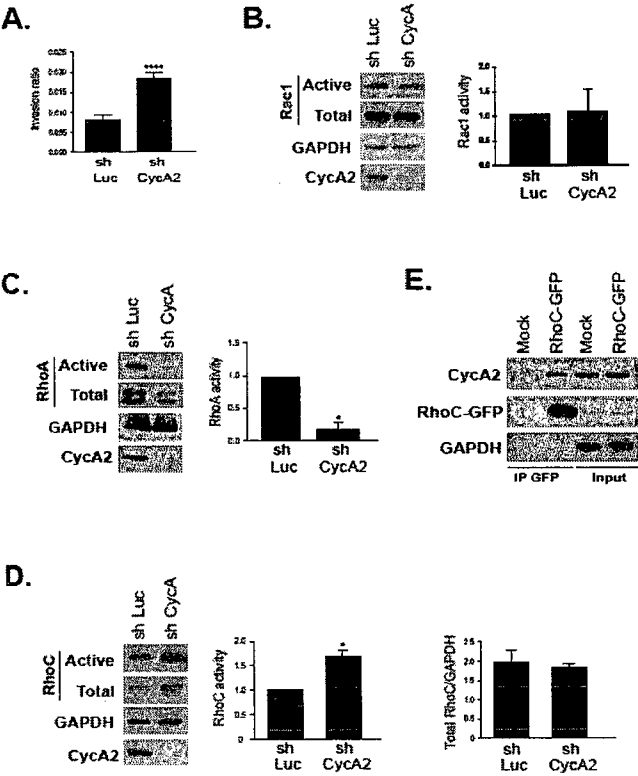


Figure 11

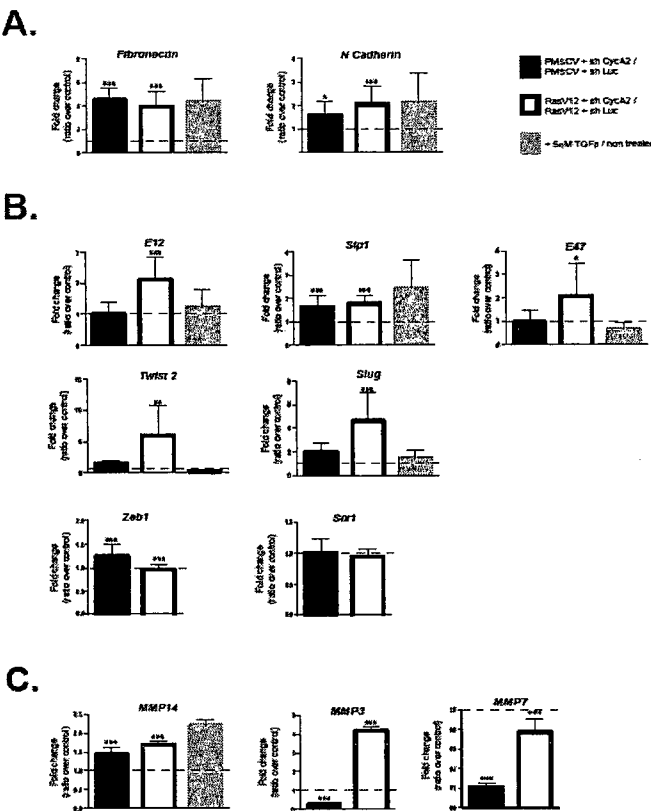
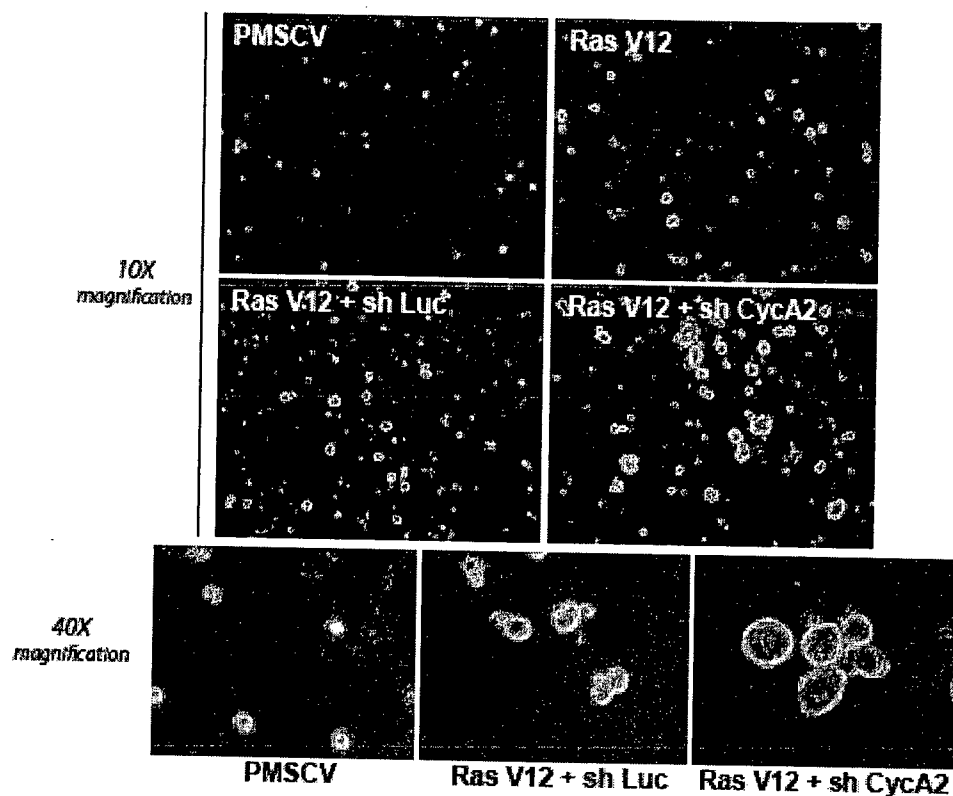
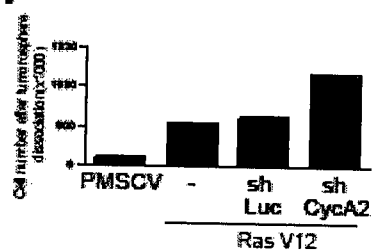


Figure 12

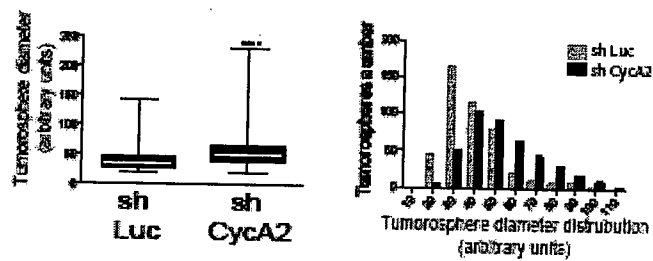
A.



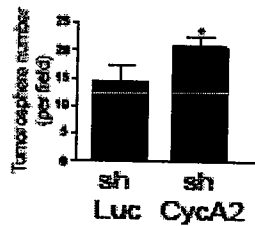
B.



D.



C.



E.

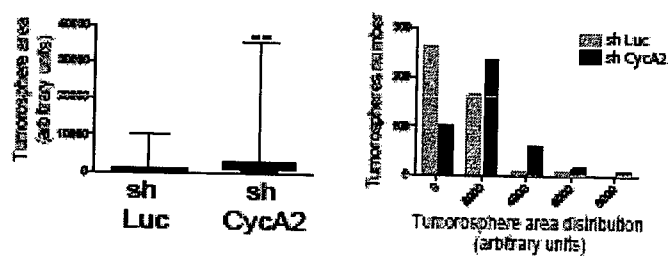


Figure 13