



**HAL**  
open science

# Mécanismes d'action des inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes : identification de leurs cibles intracellulaires par chromatographie d'affinité

Marie Knockaert

## ► To cite this version:

Marie Knockaert. Mécanismes d'action des inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes : identification de leurs cibles intracellulaires par chromatographie d'affinité. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Bretagne Occidentale, 2002. Français. <NNT : >. <tel-01116136>

**HAL Id: tel-01116136**

**<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01116136v1>**

Submitted on 24 Feb 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

## **Avertissement**

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

*Ecole Doctorale  
Sciences de la Matière, de l'Information et du Vivant  
(ED SMIV 0373)*

THESE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

***Spécialité Biologie Cellulaire***

Présentée par

MARIE KNOCKAERT

***“ Mécanismes d'action des inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes :  
identification de leurs cibles intracellulaires par chromatographie d'affinité ”.***

**Thèse dirigée par le Dr Laurent MEIJER  
Soutenue le 18 décembre 2002 devant le jury composé de :**

**Rapporteurs :**

- **Dr Catherine JESSUS**, Directeur de Recherches au CNRS (Paris).
- **Dr Danièle HERNANDEZ-VERDUN**, Directeur de Recherches au CNRS (Paris).

**Examineurs :**

- **Dr Michel JANICOT**, Directeur du Département Oncologie pour Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development (Beerse, Belgique).
- **Dr Jean-Luc CARRE**, Maître de Conférences, Université de Bretagne Occidentale (Brest).
- **Pr Claude FEREC**, Professeur, Université de Bretagne Occidentale (Brest).
- **Dr Laurent MEIJER**, Directeur de Recherches au CNRS (Roscoff).

Réunion d'équipe sur l'île de Sein, mai 2001



Réunion d'équipe sur l'île d'Hoedic, juin 2002



## AVANT-PROPOS

Cette thèse a été réalisée à la Station Biologique, au sein de l'équipe Cycle Cellulaire, sous la direction du Docteur Laurent Meijer. Elle a été financée par le Ministère de la Recherche pour une durée de trois ans, puis par l'Association pour la Recherche sur le Cancer pour six mois supplémentaires.

Je tiens à remercier le Professeur André Toulmond pour son accueil à la Station Biologique.

Je remercie le Docteur Laurent Meijer, pour ses conseils et son soutien tout au long de ces trois années de thèse et aussi pour avoir encouragé et facilité l'établissement de collaborations extérieures. Merci pour la confiance que tu m'as accordée.

Merci à l'ensemble de l'équipe Cycle Cellulaire, Aline, Alix, Armelle, Blandine, Eliane, Marc, Marie, Maryse, Matthieu, Olivier, Sophie, Stéphanie et Virginie, pour votre soutien, vos conseils et votre bonne humeur. Je garderai un excellent souvenir de nos deux escapades dans les îles bretonnes à la recherche des galets magiques...

Un grand merci à Nicole Guyard et Maryse Collin du service de documentation scientifique, à Olivier Collin, Jean Pennors et Claude Leroux du service informatique ainsi qu'au personnel de l'hôtel de France et au personnel des services généraux et administratifs.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'être rapporteurs et examinateurs de ce travail.

Ce travail de thèse est le fruit de nombreuses collaborations scientifiques. J'aimerais en remercier les principaux acteurs, chimistes et biologistes : Nathanael Gray pour les billes de purvalanol et d'indirubine, Karen Wieking et Conrad Kunick pour les billes de gwennpauillone, Brigitte Malgrange pour le projet sur l'organe de Corti, Luis Schang et Priscillia Schaffer pour les effets des purines sur la réplication virale. Enfin, pour le travail portant sur les MAPKs, j'aimerais aussi remercier le Docteur Jacques Pouyssegur qui a eu la gentillesse de m'accueillir quelques semaines à Nice dans son unité de recherche. Au cours de ce séjour, j'ai travaillé avec le Docteur Philippe Lenormand, à qui j'adresse aussi ces remerciements. Merci pour ton aide, ta patience, ton enthousiasme et ton accueil. Je n'oublie pas la manière dont tu t'es investi pour ce sujet de recherche qui n'était pas le tien.

Un merci tout particulier à Stéphanie qui a sans aucun doute bien mesuré, tout au long de ces trois années de thèse la signification du mot "pire" dans l'expression consacrée "pour le meilleur et pour le pire". Merci pour ta patience, ton aide et tes conseils avisés. Merci aussi à Marie-Cécile et à Marie, pour votre soutien et votre présence à mes côtés. Merci à Serge Thomas pour tous les cafés de ma thèse. Enfin, merci à Isabelle, Julia et Pascal, Xavier et Gaëlle, Serge Bénamou et Manu, Magali, Julie, Arnaud, Patrick, Gaëtan, Sandrine et Naâthalie...pour tous les bons moments passés ensemble.

Enfin, j'adresse une pensée particulière à Guy et Liliane, JEQ, Bea, Hélène et Mathieu.

# SOMMAIRE

Résumé	p. 6
Abréviations	p. 8
Liste des figures et tableaux	p. 10
<b>INTRODUCTION</b>	p. 11
<b>1- Les protéines kinases cyclines-dépendantes</b>	p. 12
A) Généralités	p. 12
B) Historique	p. 14
C) Régulation de l'activité des CDKs	p. 14
1) L'association avec la cycline	p. 15
2) La phosphorylation activatrice	p. 15
3) Les phosphorylations inhibitrices	p. 16
4) L'interaction avec de petites protéines inhibitrices	p. 16
D) Fonctions des CDKs	p. 16
1) Le contrôle du cycle cellulaire	p. 17
2) La transcription	p. 18
3) L'apoptose	p. 20
4) Les fonctions neuronales	p. 21
5) La différenciation	p. 22
E) Implications des CDKs dans la pathologie	p. 23
1) Cancers	p. 23
2) Maladies neurodégénératives	p. 24
<b>2 - Les inhibiteurs de CDKs</b>	p. 26
A) Généralités	p. 27
1) Recherche et optimisation d'inhibiteurs de CDKs	p. 27
2) Principaux effets cellulaires des inhibiteurs de CDKs	p. 29
3) Applications potentielles des inhibiteurs de CDKs	p. 30
B) Présentation des trois familles d'inhibiteurs utilisées dans la partie expérimentale du travail	p. 33
1) Les purvalanols	p.33

2) Les paullones	p. 35
3) Les indirubines	p. 36
<b>3 - Introduction au travail de recherche</b>	p. 37
<b>RESULTATS</b>	p. 39
Liste des publications	p.39
 <i><u>Chapitre I : Identification des cibles intracellulaires des inhibiteurs de CDKs après chromatographie d'affinité sur inhibiteur immobilisé</u></i>	
<b>1 - Identification des cibles intracellulaires du purvalanol : article 1</b>	p. 41
A) Présentation des principaux résultats	p. 41
1) Principe général de la technique et mise au point des outils	p. 42
2) Résultats	p. 42
B) Article 1	p. 44
<b>2 - Identification des cibles intracellulaires des paullones : article 2</b>	p. 45
A) Présentation des principaux résultats	p. 45
1) Mise au point des outils	p. 45
2) Résultats	p. 46
B) Article 2	p. 47
<b>3 - Identification des cibles intracellulaires de l'indirubine</b>	p. 48
A) Présentation des résultats obtenus	p. 48
1) Mise au point des outils	p. 48
2) Résultats	p. 48
B) Perspectives	p. 50

Chapitre II : p44/MAPK (Erk1) et p42/MAPK (Erk2) sont-elles des cibles intracellulaires du purvalanol ?

<b>1 - Présentation des principaux résultats</b>	p. 51
A) Effets cellulaires du purvalanol	p. 51
B) Cibles intracellulaires du purvalanol	p. 51
1) Chromatographie d'affinité	p. 51
2) Validation par le test en système cellulaire	p. 52
C) Article 3	p. 53

Chapitre III : Applications de la technique de chromatographie d'affinité sur inhibiteur immobilisé à d'autres problématiques

<b>1 - Effet des purines sur la réplication virale <i>in vitro</i> : article 4</b>	p. 54
A) Introduction au travail de recherche	p. 54
1) Le virus de l'herpes simplex	p. 54
2) Rôle des CDKs dans la réplication virale	p. 55
3) Mécanisme d'action des inhibiteurs de CDKs	p. 56
B) Résultats de chromatographie d'affinité	p. 57
1) Recherche de protéines virales sur la matrice de purvalanol	p. 58
2) Analyse des protéines cellulaires retenues sur la matrice de purvalanol	p. 59
C) Article 4	p. 60
<b>2 - Effet des purines sur l'organe de Corti d'embryon de rat : article 5</b>	p. 61
A) Introduction au travail de recherche	p. 61
1) Notions d'anatomie de l'oreille interne	p. 61
2) La régénération des cellules ciliées, un défi pour le traitement des surdités de perception ?	p. 62
3) Effets cellulaires de la roscovitine sur la régénération des cellules ciliées de l'organe de Corti	p. 62
B) Résultats de chromatographie d'affinité	p. 63
1) Expression et activité de CDK1 et CDK2	p. 64
2) Cibles intracellulaires du purvalanol dans l'organe de Corti	p. 65
C) Article 5	p. 65

<b>CONCLUSIONS – PERSPECTIVES</b>	p. 66
<b>1 - Conclusions générales sur les résultats obtenus</b>	p. 67
A) Cibles intracellulaires du purvalanol	p. 67
B) Cibles intracellulaires des paullones	p. 69
C) Cibles intracellulaires de l'indirubine	p. 71
D) Réflexions générales	p. 73
<b>2 - Possibilités de la technique</b>	p. 74
<b>3 - Sélectivité des inhibiteurs de CDKs</b>	p. 77
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	p. 81
<b>ANNEXES</b>	p. 99

## RESUME

Parmi les 850 protéines kinases estimées du génome humain, la famille des kinases cyclines-dépendantes (CDK) a fait l'objet de nombreuses études en raison de ses fonctions cellulaires essentielles. Les CDKs interviennent dans le contrôle du cycle cellulaire, mais aussi dans la transcription, la différenciation, l'apoptose ou le développement et le fonctionnement du système nerveux central. Très fréquemment, des dérégulations des CDKs sont observées dans les cancers, et ces observations ont encouragé la recherche d'inhibiteurs chimiques de leur activité catalytique en vue d'applications thérapeutiques. A l'heure actuelle, plus de cinquante inhibiteurs chimiques de CDKs ont été identifiés sur la base de leur capacité à inhiber *in vitro* l'activité de CDKs purifiées. Ces inhibiteurs ont des propriétés antiprolifératives, anti-neurodégénératives, anti-virales et anti-parasitaires. Le potentiel anticancéreux des composés les plus prometteurs est actuellement évalué dans des études pré-cliniques et cliniques.

Ce travail de thèse porte sur la compréhension du mécanisme d'action intracellulaire des inhibiteurs de CDKs. Nous avons choisi d'aborder cette question en nous intéressant à l'identification des cibles intracellulaires de ces composés. En effet, même si ces inhibiteurs ont été mis au point sur la base de leur capacité à inhiber efficacement les CDKs *in vitro*, leurs cibles réelles dans la cellule ne sont pas connues. Pour répondre à cette question, nous avons développé une approche de chromatographie d'affinité permettant de repêcher, dans des extraits cellulaires, les cibles intracellulaires des inhibiteurs. Nous avons ainsi étudié la sélectivité de trois inhibiteurs de CDKs différents, le purvalanol, les paullones et l'indirubine. Pour chacun des composés, les cibles connues ont été retrouvées sur la matrice. Mais cette approche nous a permis de mettre en évidence des interactions inattendues entre les inhibiteurs de CDKs et d'autres enzymes, kinases (p42/p44 MAPKs avec le purvalanol) ou autres (malate déshydrogénase mitochondriale avec les paullones et glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase avec l'indirubine). Dans chacun des cas, nous avons étudié la base moléculaire des interactions entre l'inhibiteur de CDKs et sa nouvelle

cible en vérifiant que l'activité de l'enzyme était sensible à l'inhibiteur. A partir de ces résultats, nous avons examiné plus en détail comment l'interaction entre le purvalanol et les MAPKs participait aux effets cellulaires antiprolifératifs du composé. Enfin, la technique de chromatographie d'affinité sur inhibiteur immobilisé pour identifier les cibles des composés a été mise à profit pour mieux comprendre deux effets cellulaires du purvalanol : l'inhibition de la réplication du virus de l'herpes simplex (HSV-1) et l'apparition de cellules ciliées surnuméraires dans l'organe de Corti d'embryons de rats.

En conclusion, la technique de chromatographie d'affinité sur inhibiteur immobilisé a permis de confirmer les fortes interactions qui existent entre les inhibiteurs de CDKs et les cibles sur lesquelles ils ont été optimisés. Mais surtout, elle a permis de découvrir des cibles inattendues, dont l'existence n'aurait pu être déduite des résultats des tests *in vitro* et dont l'inhibition participe certainement aux effets pharmacologiques des composés.

## ABREVIATIONS

<b>ADN:</b>	<u>A</u> cide <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique
<b>ALS :</b>	<u>A</u> myotrophic <u>l</u> ateral <u>s</u> clerosis
<b>ARN :</b>	<u>A</u> cide <u>r</u> ibo <u>n</u> ucléique
<b>ATP :</b>	<u>A</u> dénosine <u>t</u> ri <u>p</u> hosphate
<b>CAK :</b>	<u>C</u> DK <u>a</u> ctivating <u>k</u> inase
<b>CaMKII:</b>	<u>C</u> al <u>m</u> odulin-dependent <u>k</u> inase II
<b>CDC :</b>	<u>C</u> ell <u>d</u> ivision <u>c</u> ycle
<b>CDK:</b>	<u>C</u> yclin- <u>d</u> ependent <u>k</u> inase
<b>CK1:</b>	<u>C</u> aséine <u>k</u> inase 1
<b>CKI :</b>	<u>C</u> yclin-dependent <u>k</u> inase <u>i</u> nhibitor
<b>DARPP-32:</b>	<u>d</u> opamine-and cyclic <u>A</u> MP- <u>r</u> egulated <u>p</u> hospho- <u>p</u> rotein of molecular mass 32,000
<b>Erk :</b>	<u>E</u> xtracellular <u>r</u> egulated <u>k</u> inase
<b>GAPDH:</b>	<u>G</u> lycér <u>a</u> ldéhyde-3- <u>p</u> hosphate <u>d</u> ésh <u>h</u> ydrogénase
<b>GI<sub>50</sub>:</b>	<u>G</u> rowth <u>i</u> nhibitory concentration 50
<b>GSK-3:</b>	<u>G</u> lycogen <u>s</u> ynthase <u>k</u> inase-3
<b>HCMV :</b>	<u>H</u> uman <u>c</u> yto <u>m</u> egalo <u>v</u> irus
<b>hrp:</b>	<u>H</u> orse <u>r</u> adish <u>p</u> eroxidase
<b>HSV :</b>	<u>H</u> erpes <u>s</u> implex <u>v</u> irus
<b>IC<sub>50</sub>:</b>	<u>I</u> nhibitory <u>c</u> oncentration 50
<b>INK4 :</b>	<u>I</u> nhibiteurs de <u>C</u> DK <u>4</u>
<b>MAPK :</b>	<u>M</u> itogen <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase
<b>MAT1 :</b>	<u>M</u> énage <u>à</u> <u>t</u> rois 1
<b>MDH:</b>	<u>M</u> alate <u>d</u> ésh <u>h</u> ydrogénase
<b>MS:</b>	<u>M</u> icro <u>s</u> éque <u>n</u> çage

<b>NAD:</b>	<u>N</u> icotinamide <u>A</u> dénine <u>D</u> inucléotide
<b>NCI:</b>	<u>N</u> ational <u>C</u> ancer <u>I</u> nstitute
<b>PCR :</b>	<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
<b>pRb :</b>	<u>P</u> rotéine du <u>R</u> etinob <u>l</u> astome
<b>p-TEFb :</b>	<u>P</u> ositive <u>t</u> ranscription <u>e</u> longation <u>f</u> actor b
<b>SDS-PAGE:</b>	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate- <u>P</u> oly <u>a</u> crylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis
<b>SOD:</b>	<u>S</u> uper <u>o</u> xyde <u>d</u> ismutase
<b>VIH:</b>	<u>V</u> irus de l' <u>i</u> mmunodéficienc <u>e</u> <u>h</u> umaine
<b>WB:</b>	<u>W</u> estern <u>b</u> lot

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

### Figures :

- Figure 1 :** Associations CDK/cyclines retrouvées *in vivo*
- Figure 2 :** Fonctions des CDKs
- Figure 3 :** Rôle des CDKs dans le contrôle du cycle cellulaire
- Figure 4 :** Principe du dosage de l'activité CDK1/cycline B et exemple d'une étude structure-activité
- Figure 5 :** Applications potentielles des inhibiteurs de CDKs
- Figure 6 :** Structure et sélectivité des composés de la famille des purvalanols
- Figure 7 :** Structure et sélectivité de la kenpaullone (9-bromo-paullone) et de l'alsterpaullone (9-nitro-paullone)
- Figure 8 :** Identification du principe actif de la recette chinoise anti-leucémique Danggui Longhui Wan
- Figure 9 :** Structure et sélectivité de l'indirubine-3'-monoxime
- Figure 10 :** Billes de purvalanol
- Figure 11 :** Principe général de la méthode de chromatographie d'affinité sur inhibiteur immobilisé pour identifier les cibles intracellulaires des inhibiteurs de CDKs
- Figure 12 :** Billes de paullones
- Figure 13 :** Billes d'indirubine
- Figure 14 :** Cibles intracellulaires de l'indirubine dans la lignée de fibroblastes de hamster CCL39
- Figure 15 :** Cibles intracellulaires de l'indirubine dans le cerveau de porc
- Figure 16 :** Effet de l'indirubine-3'-monoxime sur l'activité GAPDH
- Figure 17 :** Recherche de cibles virales du purvalanol
- Figure 18 :** Analyse des protéines cellulaires retenues sur la matrice de purvalanol
- Figure 19 :** Anatomie de l'oreille interne
- Figure 20 :** Effet de la roscovitine sur l'organisation des cellules de l'organe de Corti d'embryon de rat au stade E19 (embryon de 19 jours)
- Figure 21 :** Expression et activité de CDK1 et CDK2 dans l'organe de Corti d'embryons de rats aux stades E19 (embryon de 19 jours) et P0 (jour de la naissance)
- Figure 22 :** Cibles intracellulaires du purvalanol dans l'organe de Corti

### Tableau :

- Tableau 1 :** Ensemble des kinases retrouvées sur la matrice de purvalanol

# INTRODUCTION

### INTRODUCTION

L'introduction au sujet de recherche s'articule autour de trois points.

Le premier point consiste en une **présentation des cibles contre lesquelles ont été optimisés les inhibiteurs : la famille des kinases cyclines-dépendantes**. Après une brève introduction rappelant les caractéristiques de cette famille de kinases, l'historique de leur découverte et leur mode de régulation sera présenté. Nous envisagerons ensuite leurs principales fonctions ainsi que leurs implications dans les pathologies.

Le deuxième point est consacré à la **présentation des principaux inhibiteurs chimiques de CDKs et de leurs effets cellulaires**. Les inhibiteurs seront d'abord envisagés de manière globale, puis nous insisterons sur trois familles d'inhibiteurs utilisées dans la partie expérimentale de ce travail : les purvalanols, les paullones et les indirubines.

Enfin, nous terminerons le chapitre d'introduction en formulant **les questions posées au début de ce travail de thèse** et en présentant les moyens mis en œuvre pour tenter d'y répondre.

### 1- Les protéines kinases cyclines-dépendantes

#### A) Généralités

Les kinases<sup>1</sup> cyclines-dépendantes (CDKs) appartiennent à la famille des sérine/thréonine kinases, c'est à dire qu'elles catalysent le transfert d'un groupement phosphate sur les résidus sérine et thréonine de leurs substrats. Comme toutes les protéines kinases, le domaine catalytique des CDKs contient onze sous-domaines typiques (numérotés de I à XI) présentant des motifs conservés au sein de la famille (Hanks *et al.*, 1988).

Les CDKs possèdent un certain nombre de caractéristiques communes (Meyerson *et al.*, 1992; Morgan, 1995). Elles ont un poids moléculaire apparent compris entre 33 et 60 kDa. Elles sont assez proches en séquence (au moins 40% d'identité) et possèdent un motif très conservé au niveau du sous-domaine catalytique III appelé motif PSTAIRE (en code acides aminés à une lettre) et qui constitue la signature des CDKs. Les CDKs sont inactives sous forme monomérique et nécessitent l'association avec une sous-unité régulatrice, la cycline, pour être actives. En plus de l'association aux cyclines, l'activité des CDKs est régulée à d'autres niveaux : par des processus de phosphorylations et déphosphorylations, par protéolyse et par interaction avec des petites protéines inhibitrices (Morgan, 1997).

La nomenclature définie par Meyerson et coll. (Meyerson *et al.*, 1992) est utilisée pour identifier et répertorier les CDKs. Pour être classées dans la famille des CDKs, les kinases doivent posséder un motif PSTAIRE au niveau du sous-domaine catalytique III et s'associer à une protéine régulatrice de type cycline.

Actuellement, dix CDKs (CDK1-CDK9 et CDK11) ont été identifiées chez l'homme. Une CDK peut s'associer à des cyclines différentes et une même cycline peut avoir des

---

<sup>1</sup> Les kinases sont des enzymes capables de transférer un groupement phosphate sur des protéines ou sur des lipides. Dans le premier cas, ce sont des "protéine kinases" et dans le second des "lipide kinases".

partenaires CDKs différents. La **figure 1** présente les différentes CDKs et les cyclines qui leur sont associées *in vivo*. Parmi ces dix CDKs, CDK3 et CDK5 sont atypiques car elles ne satisfont pas exactement à toutes les conditions qui définissent l'appartenance à la famille des CDKs. Par exemple, la cycline associée à CDK3 n'a pas encore été identifiée. CDK3 a pourtant été classée dans la famille à cause de sa proximité de séquence avec CDK1. De la même manière, CDK5 est également une CDK particulière car elle n'est pas activée par la fixation d'une cycline mais par des protéines appelées p35 ou p39, ne partageant pas d'identités de séquences avec les cyclines, sauf au niveau de 17 acides aminés de p35 qui présentent une similarité avec une région conservée des cyclines (Lew *et al.*, 1994). CDK5 a pourtant été intégrée à la famille car à l'origine, elle a été isolée lors d'un criblage qui recherchait des kinases homologues de CDK1 et sa séquence primaire partage près de 60% d'identité avec CDK1 (Meyerson *et al.*, 1992).

En plus des dix CDKs identifiées chez l'homme, un certain nombre de protéines homologues des CDKs ont été mises en évidence. Pour l'instant, elles sont classées dans les "CDK-like" car la cycline qui leur est associée *in vivo* n'a pas encore été identifiée. Elles ne portent pas de numéro mais sont nommées selon leur séquence d'acides aminés au niveau de leur motif PSTAIRE (PCTAIRE 1-3, PFTAIRE, PITAIRE, KKIALRE, PISSLRE et NKIAMRE). Cette classification est susceptible d'évoluer lorsque les protéines activatrices de ces kinases seront identifiées.

Après une présentation de l'historique de la découverte de cette famille de kinases, nous envisagerons successivement leur mode de régulation, leurs principales fonctions cellulaires et leurs implications dans les pathologies. Dans cette étude, nous n'avons volontairement retenu que les CDKs dont la cycline associée est identifiée.

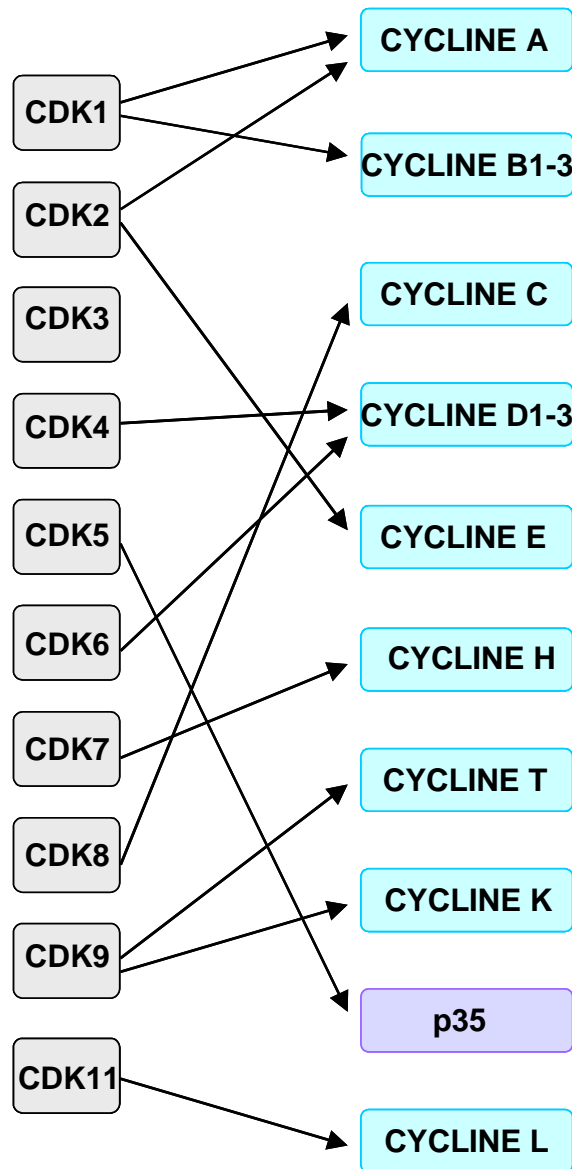


Figure 1: Associations CDK/cyclines retrouvées *in vivo*

### **B) Historique**

Les premières CDKs ont été découvertes chez la levure par une approche génétique. Cette approche utilise des mutants thermosensibles dont la progression dans le cycle cellulaire est altérée, pour identifier les gènes importants dans le contrôle du cycle cellulaire. Ces mutants appelés *CDC* (Cell Division Cycle) s'arrêtent au point du cycle où le produit du gène muté fonctionne en conditions normales. Ainsi, *cdc2* (CDK1) a été identifiée chez *S. pombe* à partir d'un mutant bloqué en phase G1 et M du cycle cellulaire (Nurse & Bissett, 1981) et son homologue CDC28 chez *S. cerevisiae* (Beach *et al.*, 1982). L'homologue humain de *cdc2* a ensuite été cloné par complémentation (Lee & Nurse, 1987). Des purifications à partir d'ovocytes d'étoile de mer et d'œufs de xénope ont ensuite permis d'isoler le complexe actif, constitué d'une sérine/thréonine kinase de 34 kDa, correspondant au produit du gène *cdc2* et responsable de l'activité histone H1 associée à une sous-unité régulatrice initialement identifiée dans les stades embryonnaires précoces d'oursin appelée cycline B. Le complexe *cdc2*/cycline B s'est révélé être l'enzyme clé de la transition G2/M du cycle cellulaire (revue par Nurse, 1990). Par des méthodes de PCR, d'autres CDKs impliquées ou non dans le contrôle du cycle cellulaire, ont ensuite été clonées (Meyerson *et al.*, 1992).

### **C) Régulation de l'activité des CDKs**

Initialement, les premières CDKs ont été découvertes comme des molécules clé du cycle cellulaire et la découverte de leur implication dans d'autres fonctions cellulaires n'a été que plus récente. Ceci explique pourquoi le rôle ainsi que le mode de régulation des CDKs intervenant dans le cycle est mieux caractérisé que celui des autres CDKs.

Sous forme monomérique et déphosphorylée, la sous-unité catalytique des CDKs est totalement inactive. La structure cristalline de l'apoenzyme CDK2 (Jeffrey *et al.*, 1995) révèle

deux contraintes structurales majeures qui peuvent expliquer le maintien sous forme inactive: d'abord, le site de liaison au substrat est bloqué par une structure appelée la T-loop et ensuite des chaînes latérales des acides aminés bordant la poche de fixation à l'ATP sont orientées de telle manière que les phosphates de la molécule d'ATP sont mal positionnés pour le transfert. L'activité des CDKs (du cycle cellulaire) est principalement régulée à quatre niveaux : l'association avec la cycline, les phosphorylations activatrices et inhibitrices et l'interaction avec des protéines inhibitrices (Morgan, 1995; Pavletich, 1999).

### 1) L'association avec la cycline

L'association avec la cycline est une condition indispensable à l'activation des CDKs. Cette étape est cruciale car l'abondance des cyclines est très étroitement contrôlée au niveau de leur synthèse comme au niveau de leur dégradation. La liaison de la cycline à la CDK entraîne des changements de conformation de la CDK qui permettent son activation : la liaison de la cycline déplace l'hélice PSTAIRE qui effectue une rotation de 90°. Cette rotation permet le réarrangement des acides aminés de la poche catalytique pour accueillir la molécule d'ATP dans une orientation permettant le transfert des phosphates. La liaison de la cycline modifie également la position de la T-loop ce qui permet de démasquer la poche catalytique pour la rendre plus accessible au substrat.

### 2) La phosphorylation activatrice

La phosphorylation d'un résidu thréonine situé au niveau de la T-loop (T160 de CDK1, T161 de CDK2) entraîne également des changements de conformation qui s'ajoutent à ceux initiés par la fixation de la cycline et contribuent ainsi à la réorganisation du site de liaison au substrat. Cette phosphorylation est réalisée par une CAK (CDK activating kinase).

Chez les mammifères, cette CAK est un complexe enzymatique trimérique constitué de la cycline H, MAT1 et de CDK7.

### 3) Les phosphorylations inhibitrices

Les phosphorylations au niveau des résidus thréonine 14 et tyrosine 15 de CDK1 et CDK2 sont inhibitrices. Le mécanisme de cette inhibition n'est pas connu mais la structure cristalline de CDK2 révèle que les chaînes latérales de ces deux résidus bordent les parois de la poche de fixation à l'ATP et cette position affecte certainement l'activité de la kinase lorsqu'ils sont phosphorylés. La phosphorylation de ces deux résidus est catalysée par les kinases wee-1 et Myt-1 et la déphosphorylation par les phosphatases CDC25 A-C.

### 4) L'interaction avec de petites protéines inhibitrices

Deux familles de protéines inhibitrices de CDKs ont été mises en évidence (revue par Sherr & Roberts, 1999). La famille des protéines INK4 (Inhibiteurs de CDK4) (p15, p16, p18, p19) est spécifique des CDK4 et 6, alors que les protéines de la famille Cip1 (p21) et Kip (p27, p57) ont un spectre d'action plus large. Les deux familles diffèrent également au niveau de leur mode d'action : les membres de la famille Cip1 et Kip se fixent sur les complexes CDK/cycline et les inhibent, alors que les membres de la famille INK4 semblent utiliser une stratégie plus indirecte : ils se lient à la CDK monomérique et empêchent son association à la cycline (Pavletich, 1999).

## **D) Fonctions des CDKs**

Après la découverte de cdc2 chez la levure, les complexes CDKs/cycline ont été caractérisés dans de nombreux organismes et les CDKs se sont rapidement imposées

comme les régulateurs universels de la division cellulaire. Plus récemment, la découverte de nouvelles CDKs sans rôle apparent dans le cycle cellulaire mais possédant d'autres fonctions dans la cellule a permis d'élargir le spectre d'action de la famille des CDKs au contrôle de la transcription, à l'apoptose, la différenciation ou encore aux fonctions neuronales (**Figure 2**).

### 1) Le contrôle du cycle cellulaire

#### Présentation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est l'ensemble des processus par lesquels une cellule croît et se divise en deux cellules filles. Il est constitué de quatre phases : G1, S, G2 et M. Au cours de la phase S, la cellule duplique son ADN et au cours de la phase M elle répartit son ADN entre les deux futures cellules filles puis se divise. Les phases S et M sont séparées par des périodes de « Gap », G1 avant la phase S et G2 avant la phase M.

#### Les CDKs du cycle cellulaire : CDK1, 2, 3, 4, 6 et 7

La progression à travers les différentes phases du cycle cellulaire est contrôlée par l'activation transitoire et séquentielle de complexes CDK/cyclines (**Figure 3**). CDK1, 2, 4, 6 sont impliquées de manière directe en phosphorylant des substrats intervenant dans la transition des différentes phases (protéine du Rétinoblastome en phase G1, lamines au moment de la transition G2/M) (revue par Arellano & Moreno, 1997; Obaya & Sedivy, 2002). CDK7 intervient de manière plus indirecte en catalysant la phosphorylation activatrice de CDK1 et 2. A l'heure actuelle, la compréhension du rôle de CDK3 est assez limitée, en raison notamment de l'absence de partenaire cycline identifié et de son très faible niveau d'expression dans les tissus. Elle a cependant été classée dans les CDKs du cycle cellulaire car l'utilisation de dominants négatifs a permis de montrer qu'elle possède un rôle propre et non redondant avec celui des autres CDKs dans la progression en phase G1 du cycle (van

### Rôle positif des CDKs dans l'apoptose

**CDK1, CDK2, CDK5**

Shi *et al.*, 1994  
Meikrantz et Schlegel, 1996  
Sandal *et al.*, 2002

### Rôle négatif des CDKs dans l'apoptose

**CDK1, CDK2**

Ongkeko *et al.*, 1995

### CYCLE CELLULAIRE

**CDK1, CDK2, CDK3,  
CDK4, CDK6, CDK7**

Revue :

Nurse, 1990  
Morgan, 1995  
Arellano et Moreno, 1997  
Malumbres et Barbacid, 2001  
Obaya et Sedivy, 2002

Matushansky *et al.*, 2001  
Guo *et al.*, 1997  
Tintignac *et al.*, 2000

**CDK2, CDK6**

### Rôle négatif des CDKs dans la différenciation

### DIFFÉRENCIATION

### Rôle positif des CDKs dans la différenciation

**CDK9, CDK5**

Différenciation de cellules hématopoïétiques:  
Chen *et al.*, 2001

Différenciation neuronale:  
Bagella *et al.*, 1999  
Nicolic *et al.*, 1996

### TRANSCRIPTION

**CDK7, CDK8, CDK9**

Revue :  
Oelgeschlager, 2002  
Egly, 2001  
Price, 2000

# CDKs

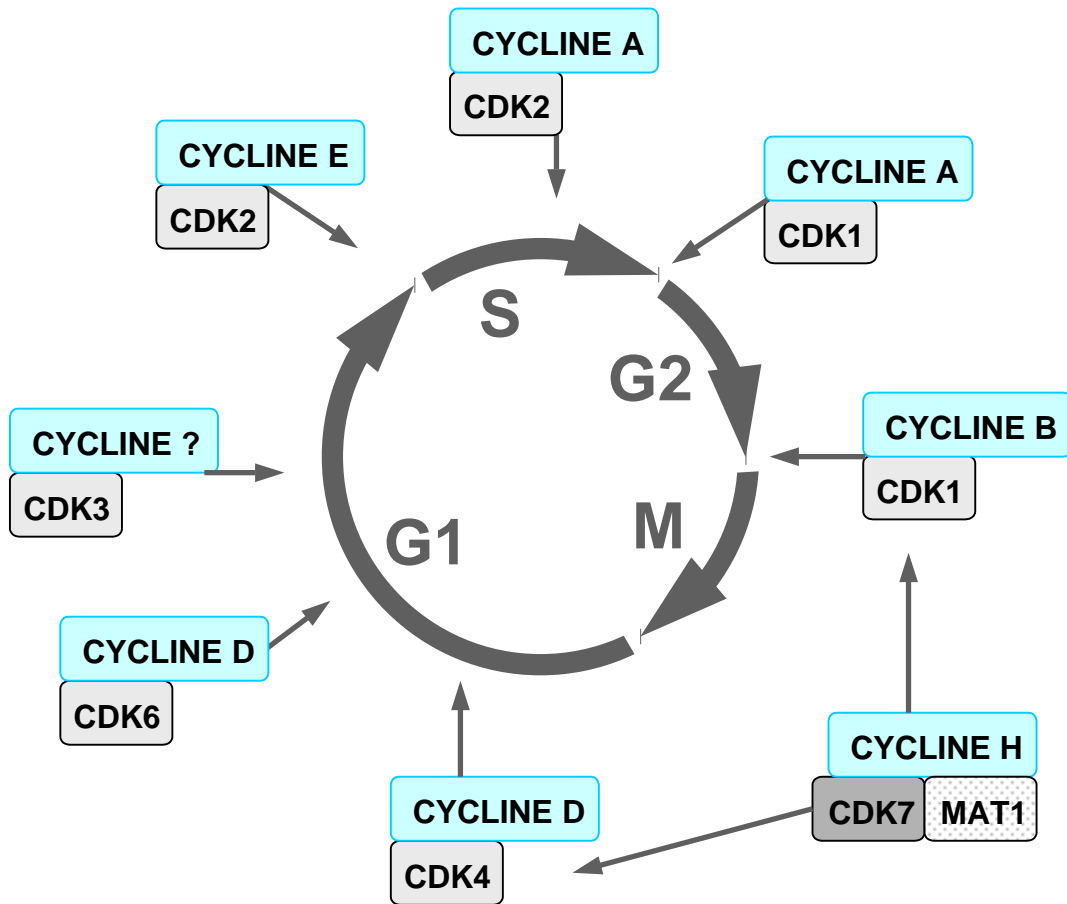
### FONCTIONS NEURONALES

**CDK5**

Revue :  
Dhavan et Tsai, 2001  
Smith et Tsai, 2002

### Figure 2: Fonctions des CDKs

Les CDKs jouent un rôle dans le contrôle du **cycle cellulaire** (CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK6 et CDK7), **l'apoptose** (CDK1, CDK2, CDK5), la **différenciation** (CDK2, CDK5, CDK9), le **fonctionnement du système nerveux central** (CDK5) et la **transcription** (CDK7, CDK8, CDK9).



### Figure 3: Rôle des CDKs dans le contrôle du cycle cellulaire

En début de phase G1, des signaux extracellulaires permettent l'activation des kinases CDK4 et CDK6 associées aux cyclines D. Ces complexes phosphorylent et inactivent la protéine du Rétinoblastome (pRb), entraînant alors la libération des facteurs de transcription E2F et DP1, qui contrôlent l'expression de gènes requis pour la transition G1/S et la progression en phase S. Le complexe CDK2/cycline E contrôle la transition G1/S mais également la duplication des centrosomes. Pendant la phase S, CDK2 s'associe à la cycline A et phosphoryle différents substrats permettant à la duplication de l'ADN de s'accomplir ainsi que l'inactivation des facteurs de transcription de G1. Au moment de la transition S/G2, CDK1 s'associe à la cycline A puis à la cycline B et déclenche la transition G2/M en phosphorylant un certain nombre de substrats. La phosphorylation de «l'Anaphase Promoting Complex» par CDK1/cycline B entraîne la transition vers l'anaphase et la fin de la mitose (dégradation de la cycline B). La kinase CDK7 en complexe avec la cycline H et la protéine MAT1 intervient dans le contrôle du cycle cellulaire de manière plus indirecte grâce à sa capacité d'exécuter la phosphorylation activatrice des CDKs au niveau de la T-loop.

den Heuvel & Harlow, 1993). L'existence de ce rôle est remise en cause par une étude récente portant sur des souris possédant une CDK3 mutée dans sa partie catalytique et ne présentant aucun défaut de développement (Ye *et al.*, 2001b).

### 2) La transcription

#### Généralités

La transcription est le processus par lequel un ARN est synthétisé à partir de l'ADN. Elle est accomplie grâce à l'activité d'une enzyme, l'ARN polymérase et comporte trois étapes successives : l'initiation, l'élongation et la terminaison.

Chez les eucaryotes, la synthèse des ARN messagers est catalysée par l'ARN polymérase II. L'initiation de la transcription requiert l'assemblage d'un complexe composé de l'ARN polymérase II et de facteurs de transcription généraux (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF et TFIIH) au niveau d'un site promoteur de la molécule d'ADN (Orphanides *et al.*, 1996). Dans sa partie C-terminale, l'ARN polymérase II comporte des répétitions d'un heptapeptide riche en résidus sérine et thréonine qui constituent des sites de phosphorylations potentiels. Par ailleurs, il a été montré que la phosphorylation de cette partie C-terminale joue un rôle important dans la régulation de l'activité transcriptionnelle et varie en fonction du cycle de transcription : hypophosphorylée pendant la phase d'initiation, la partie C-terminale de l'ARN polymérase II est hyperphosphorylée lorsqu'elle est engagée dans le processus d'élongation (Dahmus, 1995).

#### Les CDKs impliquées dans la transcription : CDK7, CDK8 et CDK9

Plusieurs kinases phosphorylent la partie C-terminale de l'ARN polymérase II, parmi lesquelles CDK7, CDK8 et CDK9 (revue par Oelgeschlager, 2002).

Le lien entre CDK7 et la transcription a été établi par des études portant sur le facteur général de transcription TFIIH (revue par Egly, 2001). Indispensable à la transcription, ce

facteur intervient lors de l'étape d'initiation en s'associant avec l'ARN polymérase II. Egly et coll. ont purifié TFIIH à partir de cellules de mammifères, et son étude biochimique a révélé qu'il s'agissait d'un complexe protéique constitué de neuf polypeptides et possédant une activité kinase envers le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II. L'identification des sous-unités de ce complexe a révélé que CDK7, cycline H et MAT1 étaient des composants de TFIIH et qu'ils étaient responsables de son activité kinase (Roy *et al.*, 1994; Serizawa *et al.*, 1995; Shiekhattar *et al.*, 1995).

La kinase CDK8/cycline C est également capable de phosphoryler le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II. Lors de l'identification du complexe CDK8/cycline C (Tassan *et al.*, 1995), des comparaisons de séquence ont permis de mettre en évidence une très forte similarité avec le complexe SRB10/SRB11 de *Saccharomyces cerevisiae*. L'observation que ce complexe est impliqué dans la phosphorylation de l'ARN polymérase II chez la levure a permis de suggérer que CDK8/cycline C pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la transcription. Cette hypothèse a été vérifiée par Rickert et coll. qui ont mis en évidence que le complexe CDK8/cycline C est capable de phosphoryler le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II (Rickert *et al.*, 1996). Des travaux récents montrent que CDK8 peut également réguler la transcription indépendamment de l'ARN polymérase II, en phosphorylant la cycline H associée au complexe CDK7/MAT1 du facteur de transcription TFIIH. Cette phosphorylation abolit l'activité kinase de TFIIH et sa capacité à activer la transcription (Akoulitchev *et al.*, 2000).

La troisième CDK impliquée dans la transcription est CDK9. Initialement clonée sur la base de sa similitude de séquence avec CDK1, la CDK9 humaine a ensuite été identifiée comme faisant partie de P-TEFb, un facteur d'élongation de la transcription agissant de manière positive sur la transcription ARN polymérase II-dépendante et capable de phosphoryler sa partie C-terminale (Marshall *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1998; revue par Price, 2000).

### 3) L'apoptose

#### Généralités

L'apoptose, aussi appelée mort cellulaire programmée ou suicide cellulaire est un processus physiologique hautement régulé permettant l'élimination de la cellule sans réaction inflammatoire. Le processus d'apoptose est vital pour les organismes pluricellulaires, il joue un rôle central dans le développement embryonnaire et fœtal, lors de la morphogenèse des membres, dans l'organisation du système nerveux central ainsi que dans l'élaboration du système immunitaire (Hengartner, 2000).

#### Les CDKs de l'apoptose

De très nombreuses études suggèrent que les CDKs sont impliquées dans le processus d'apoptose (revue par Borgne & Golsteyn, 2002). Cependant, les conclusions contradictoires auxquelles ces études aboutissent ne permettent pas encore de définir le rôle exact joué par les CDKs dans l'apoptose. Alors que certains travaux suggèrent que les CDKs sont impliquées de manière "positive" dans le déclenchement de l'apoptose, d'autres en revanche soutiennent l'hypothèse inverse. La diversité des modèles cellulaires utilisés et des stimulus apoptotiques employés est certainement, en partie, à l'origine de ces contradictions. Pour prouver l'implication des CDKs dans l'apoptose, différents arguments ont été avancés.

Le premier argument réside dans l'observation que l'activité de certaines CDKs est modifiée pendant l'apoptose et que la modulation de cette activité peut influencer sur le déclenchement de ce processus. Ainsi, certaines CDKs (CDK1, CDK2, CDK5) sont activées au cours de l'apoptose et l'abolition de leur activité par différents moyens (compétition avec un excès de peptide, dominants négatifs de CDKs) inhibe l'apoptose (Meikrantz & Schlegel, 1996; Shi *et al.*, 1994; Ye *et al.*, 2001a). A l'inverse, une autre étude a démontré que

l'abolition de l'activité CDK favorise l'apoptose, suggérant une implication négative des CDKs dans le déclenchement de ce processus (Ongkeko *et al.*, 1995).

Le deuxième argument supportant l'hypothèse de l'implication des CDKs dans l'apoptose réside dans l'observation que les CDKs phosphorylent et modifient les propriétés physiologiques de certains régulateurs de l'apoptose. Ainsi, Bcl-2 est phosphorylée de façon dépendante du cycle en phase M par CDK1/cycline B (Scatena *et al.*, 1998). Un autre exemple est apporté par la survivine (O'Connor *et al.*, 2000). La survivine phosphorylée sur la Thr34 en phase M par CDK1/cycline B séquestre la caspase 9, empêchant l'apoptose. L'abolition de cette phosphorylation par mutation du résidu thréonine en alanine (et probablement l'inhibition directe de CDK1/cycline B) conduit à la libération de la caspase 9 et au déclenchement de l'apoptose. En d'autres termes, la survivine doit ses propriétés anti-apoptotiques en mitose à la phosphorylation par CDK1/cycline B.

Enfin, le troisième argument soutenant l'hypothèse de l'implication des CDKs dans l'apoptose est apporté par les études ayant utilisé l'approche pharmacologique à l'aide d'inhibiteurs chimiques de CDKs. Dans ce paragraphe, nous avons volontairement choisi de ne pas évoquer ces travaux. En effet, ces études seront présentées dans le second point de l'introduction, dans une partie consacrée aux effets cellulaires des inhibiteurs de CDKs. De plus, compte tenu de la question posée par le travail de thèse, à savoir la sélectivité *in vivo* des inhibiteurs de CDKs, il ne serait pas rigoureux d'attribuer de manière stricte des fonctions cellulaires sur la base d'études uniquement pharmacologiques.

#### 4) Les fonctions neuronales

Le premier indice soutenant l'hypothèse de l'implication des CDKs dans le fonctionnement du système nerveux central a été fourni par des études d'expression et d'activité de CDK5 dans les tissus de souris. Alors que CDK5 est exprimée dans tous les tissus d'une souris adulte, son activité kinase est restreinte au système nerveux central où

ses activateurs, p35 et p39 sont majoritairement exprimés (Lew *et al.*, 1994; Meyerson *et al.*, 1992; Tsai *et al.*, 1993). De plus, l'observation que CDK5 est capable de phosphoryler des protéines neuronales comme les protéines des neurofilaments (Sun *et al.*, 1996), la protéine associée aux microtubules Tau (Baumann *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 1993) et la protéine DARPP-32 (Bibb *et al.*, 1999) a conforté cette hypothèse de l'implication de CDK5 dans des fonctions neuronales.

L'analyse des cerveaux de souris déficientes en CDK5 (Ohshima *et al.*, 1996) ou en l'un de ses activateurs, p35 ou p39 (Chae *et al.*, 1997; Ko *et al.*, 2001) a ensuite permis de confirmer cette hypothèse et de découvrir plus en détail les fonctions exercées par CDK5. Elle joue un rôle fondamental dans l'architecture cellulaire pendant le développement du système nerveux central (positionnement, modelage et guidage des axones) mais elle est également impliquée dans la régulation du cytosquelette, le transport membranaire, l'adhésion cellulaire, le fonctionnement des synapses, la signalisation de la dopamine et d'autres neurotransmetteurs, et l'addiction à la cocaïne (revue par Dhavan & Tsai, 2001; Smith & Tsai, 2002).

### 5) La différenciation

La différenciation est un processus qui permet aux cellules des organismes pluricellulaires de se spécialiser c'est à dire d'acquérir des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles particulières.

Logiquement, l'antagonisme qui existe de fait entre prolifération et différenciation implique que les voies qui contrôlent la prolifération soient supprimées pour permettre la différenciation. Les CDKs exerçant un rôle "positif" sur la progression du cycle cellulaire, elles pourraient avoir un effet "négatif" sur la différenciation. Certains travaux soutiennent cette hypothèse en mettant en évidence les rôles négatifs exercés par CDK2 et CDK6 dans des études de différenciation *in vitro* (Guo & Walsh, 1997; Matushansky *et al.*, 2000;

Tintignac *et al.*, 2000). En revanche, d'autres travaux soutiennent l'hypothèse opposée en mettant en évidence le rôle positif joué par certaines CDKs dans des processus de différenciation *in vitro*. Ainsi CDK5 intervient de manière positive dans le processus de différenciation neuronale (Nikolic *et al.*, 1996) et dans la différenciation d'une lignée cellulaire leucémique vers la lignée monocyttaire (Chen & Studzinski, 2001). CDK9 semble impliquée dans la myogenèse et dans le processus de différenciation neuronale (Bagella *et al.*, 1998).

Ainsi, l'activation ou l'inhibition des CDKs semblent jouer un rôle crucial dans le processus de différenciation, mais les résultats des études réalisées jusqu'à présent ne permettent pas de définir un schéma général.

### **E) Implications des CDKs dans la pathologie**

L'implication des CDKs dans des fonctions cellulaires essentielles comme le cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la transcription, nécessite que leur activité soit régulée de manière très précise pour maintenir l'intégrité de la cellule et assurer son bon fonctionnement. Des anomalies de la régulation des CDKs sont observées dans certaines pathologies, sans qu'il ait été toujours clairement établi si elles sont une cause ou une conséquence de la maladie. La plupart des exemples concerne des dérégulations conduisant à l'hyperactivité des CDKs. Ainsi, une hyperactivité des CDKs du cycle cellulaire est observée dans de nombreux cancers. L'hyperactivité de CDK5 semble impliquée dans certaines maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la sclérose latérale amyotrophique. Ce paragraphe présente de manière non exhaustive quelques exemples des liens parfois complexes qui existent entre les CDKs et la pathologie.

#### 1) Cancers

Les anomalies de la régulation des CDKs du cycle cellulaire, et en particulier celles qui conduisent à leur hyperactivité, permettent à la cellule d'échapper à ses contrôles et de proliférer de manière anarchique, conduisant à l'apparition et au développement d'un cancer.

Les altérations les plus fréquemment retrouvées incluent des surexpressions de cyclines (souvent la D1 ou la E) et de CDKs ainsi que des inactivations de CKI (revue par Kamb, 1998; Karp & Broder, 1995; Malumbres & Barbacid, 2001; Wolowiec & Ffrench, 1996). Pour illustrer ce propos, nous citerons quelques exemples parmi les nombreuses altérations décrites dans la littérature. Ainsi, la surexpression simultanée de CDK2 et cycline E est observée dans les carcinomes hépatocellulaires (Kohzato *et al.*, 2001). Les surexpressions de la cycline D1 ou de la cycline E sont observées dans certains carcinomes mammaires et peuvent parfois être synonymes de mauvais pronostic vital (Keyomarsi *et al.*, 1994; Keyomarsi & Pardee, 1993). La perte de la protéine p27<sup>Kip1</sup> est souvent constatée chez les patients atteints de cancers gastriques, du sein, de la prostate, du poumon ou du colon et cette perte est souvent indicatrice d'un mauvais pronostic vital (revue par Tsihlias *et al.*, 1999).

### 2) Maladies neurodégénératives

Dans certaines conditions, p35 l'activateur de CDK5, est clivé en p25 par une protéase calcium-dépendante, la calpaïne (Kusakawa *et al.*, 2000). Cette forme tronquée de p35 est non seulement capable d'activer CDK5, mais elle entraîne une modification de la localisation sub-cellulaire de CDK5, ainsi qu'une augmentation de son activité. Dans la maladie d'Alzheimer comme dans la sclérose latérale amyotrophique, une augmentation du ratio p25 :p35 est observée et la dérégulation de CDK5 qui en résulte pourrait participer à la pathogénie de ces maladies.

## Introduction

---

La maladie d'Alzheimer est une démence dégénérative grave débutant le plus souvent par des troubles de la mémoire et du langage accompagnés d'états dépressifs. Puis apparaissent progressivement des désordres de la motricité, des troubles de la perception des informations du monde extérieur et de l'utilisation du langage qui aboutissent à un état grabataire. Les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent une atrophie diffuse ainsi que deux types de lésions caractéristiques : les dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires formées par l'agrégation de la protéine Tau et les plaques amyloïdes extracellulaires. En conditions normales, la protéine Tau est phosphorylée sur 2-3 sites et associée aux microtubules. Son hyperphosphorylation anormale (sur plus de 20 sites) par différentes kinases dont CDK5, CK1 et GSK-3 entraîne son agrégation en structures appelées "paired helical filaments" constituant les dégénérescences neurofibrillaires observées dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Récemment, Patrick et coll. ont mis en évidence une accumulation de la protéine p25 dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et une augmentation du ratio p25 :p35 (Patrick *et al.*, 1999). L'hypothèse alors émise est que l'hyperactivité de CDK5 qui en résulte pourrait participer à la pathogénie de la maladie, notamment par le biais de l'hyperphosphorylation de Tau.

La sclérose latérale amyotrophique (ALS) est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte des motoneurones, entraînant paralysie et mort. Pour étudier cette maladie, un modèle de souris transgénique portant une mutation dans le gène de la superoxyde dismutase (SOD) est utilisé. Cette mutation du gène de la SOD est aussi retrouvée dans 20% des cas familiaux d'ALS et les souris portant cette mutation développent des lésions au niveau des motoneurones, en particulier des accumulations anormales de neurofilaments, semblables à celles retrouvées chez les patients. En utilisant ce modèle, Nguyen et coll. ont observé une hyperactivité ainsi qu'un défaut de localisation de la kinase CDK5, très probablement dus à une augmentation du ratio p25 :p35 (Nguyen *et al.*, 2001).

On ne sait pas encore si cette dérégulation de CDK5 contribue à la dégénérescence des motoneurones observée dans cette pathologie, mais une des hypothèses émises propose que la phosphorylation aberrante des neurofilaments par CDK5 perturbe sévèrement leur fonction, contribuant ainsi à la dégénérescence (revue par Patzke & Tsai, 2002).

### **2- Les inhibiteurs de CDKs**

L'implication des CDKs dans un nombre croissant de pathologies a permis de confirmer que cette famille de kinases constitue une cible thérapeutique de choix et a encouragé la recherche de stratégies permettant de moduler leur activité. Étant donné la régulation complexe de cette famille de kinases, la modulation de l'activité des CDKs peut être réalisée par différentes approches, soit en inhibant l'un de leurs principaux régulateurs (cyclines, CKI, ou autres kinases et phosphatases impliquées dans l'activation des CDKs), soit en interférant directement avec leur activité catalytique.

Cette dernière approche a été la plus largement explorée et elle a conduit au développement d'environ une cinquantaine d'inhibiteurs chimiques de CDKs. Les structures de ces molécules diffèrent considérablement les unes des autres et chaque molécule constitue une "tête de file" à partir de laquelle de nouveaux dérivés sont obtenus par synthèse chimique classique ou combinatoire. Des produits plus actifs, plus sélectifs ou plus stables dans la cellule sont ainsi mis au point par des études structure/activité et par modélisation moléculaire basée sur la structure cristalline des complexes CDK/inhibiteur. Malgré leur diversité chimique, tous sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP et environ une vingtaine d'entre eux a été cristallisée avec CDK2. De nombreuses revues de synthèse présentent ces différents composés et permettent de comparer leurs structures, leurs efficacité et sélectivité ainsi que leurs effets cellulaires (revues par Fischer & Lane, 2000;

Garrett & Fattaey, 1999; Gray *et al.*, 1999; Hardcastle *et al.*, 2002; Kaubisch & Schwartz, 2000; Knockaert *et al.*, 2002; Mani *et al.*, 2000; Meijer, 2000; Rosania & Chang, 2000; Sausville, 2002; Senderowicz & Sausville, 2000; Sielecki *et al.*, 2000; Toogood, 2001).

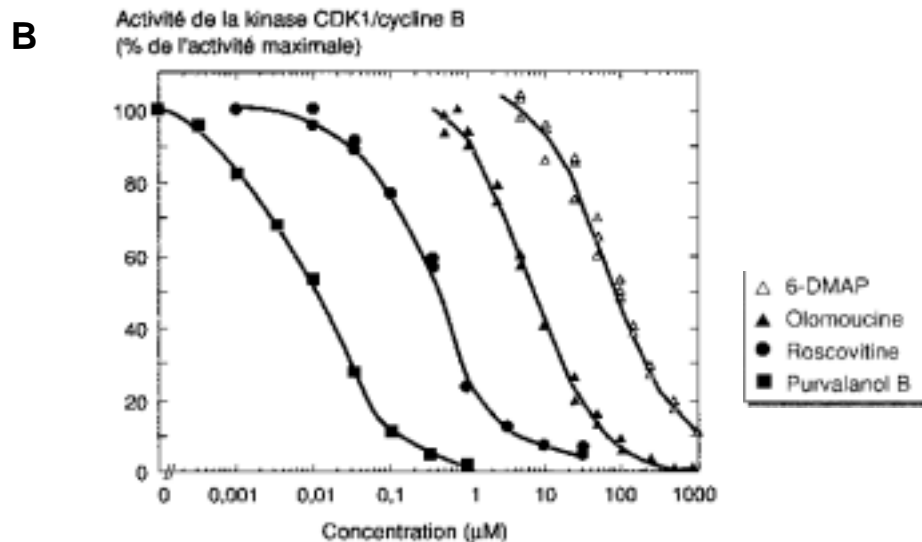
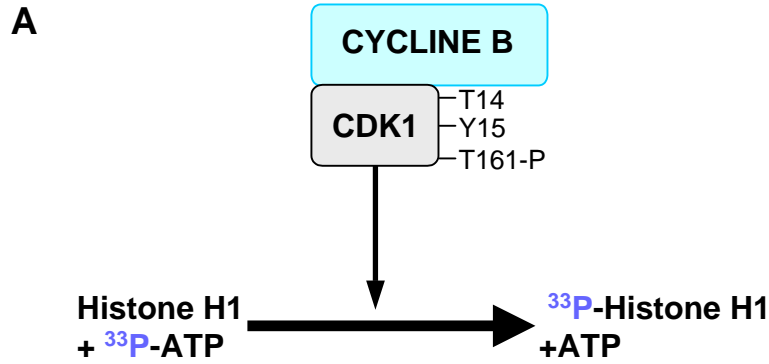
Dans la présente introduction, les inhibiteurs de CDKs seront d'abord envisagés de manière globale en présentant successivement le principe général de leur mise au point, leurs principaux effets cellulaires et leurs applications potentielles. Ensuite, nous présenterons plus en détail trois familles d'inhibiteurs de CDKs (les purvalanols, les paullones et les indirubines) qui ont été utilisées pour la partie expérimentale de ce travail.

### A) Généralités

#### 1) Recherche et optimisation des inhibiteurs de CDKs

D'une manière générale, l'identification et l'optimisation d'inhibiteurs de CDKs débute par une étape de criblage de collections de composés au cours de laquelle les molécules candidates sont soumises à des tests permettant d'évaluer successivement deux critères principaux, leur efficacité et leur sélectivité.

L'évaluation de l'efficacité des composés sur la cible choisie (CDK1, CDK4) s'effectue par un dosage d'activité kinase *in vitro* en présence de concentrations croissantes de la molécule candidate. Dans ce test, l'enzyme purifiée (native ou recombinante) est incubée en présence de son substrat et d'ATP radio-marqué. L'activité de l'enzyme est évaluée en mesurant la quantité de phosphate radioactif incorporé dans le substrat. L'addition de concentrations croissantes de la molécule à tester permet d'obtenir une courbe dose-réponse et de déterminer l'IC<sub>50</sub> de la molécule, c'est à dire la concentration de molécule qui inhibe 50% de l'activité maximale de l'enzyme (Rialet & Meijer, 1991) (**Figure 4**). Cette IC<sub>50</sub> permet d'évaluer le potentiel inhibiteur du composé et facilite la comparaison des différents



**Figure 4:**

**A. Principe du dosage de l'activité CDK1/cycline B**

L'enzyme purifiée à partir de cellules en phase M (ovocytes d'étoile de mer) est déphosphorylée sur les résidus Thréonine 14 et Tyrosine 15, mais est phosphorylée sur son résidu Thréonine 161. Le dosage de l'activité enzymatique du complexe s'effectue en présence d'histone H1 et d'ATP- $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ . La quantité de phosphate  $^{33}\text{P}$  incorporé dans l'histone H1 est proportionnelle à l'activité de l'enzyme. L'ajout d'un composé dans cette réaction permet d'estimer sa capacité inhibitrice vis-à-vis de la kinase.

**B. Un exemple d'étude structure-activité**

Courbes dose-réponse montrant l'efficacité inhibitrice croissante de dérivés de purines: 6-DMAP (identifiée en 1988 comme inhibiteur de CDK1), olomoucine (1994), roscovitine (1997), purvalanol (1998). (D'après Borgne et Meijer, 1999)

inhibiteurs entre eux. Cependant, il convient de rester prudent lors de la comparaison des  $IC_{50}$  d'un composé à l'autre. En effet, cette valeur dépend de la concentration en ATP utilisée dans le dosage et cette concentration peut varier selon les études. Par exemple, l' $IC_{50}$  du purvalanol B sur CDK1/cycline B passe de 6 nM en présence de 15  $\mu$ M ATP, à 50 nM en présence de 150  $\mu$ M ATP et à 250 en présence de 1.5 mM ATP (Gray *et al.*, 1998). Dans cette introduction, les  $IC_{50}$  présentées concerneront toujours des dosages d'activité kinase réalisés en présence de 15  $\mu$ M ATP.

Lorsqu'un composé montre une  $IC_{50}$  intéressante à l'issue de ce premier test, il est ensuite soumis à une seconde série de tests visant à évaluer sa sélectivité. La sélectivité d'un composé mesure sa capacité ou non à inhiber d'autres kinases que celles sur lesquelles il a été initialement identifié. Le plus souvent elle se mesure en testant l'efficacité du composé sur un panel de kinases purifiées. Un composé est dit non sélectif s'il inhibe un grand nombre de kinases sans montrer de préférence particulière pour une famille plutôt qu'une autre. En revanche, un composé est dit sélectif s'il est capable d'inhiber plus efficacement une famille de kinases plutôt qu'une autre ou même au sein d'une famille, un membre plutôt qu'un autre. A la différence de l'efficacité, la sélectivité ne se mesure pas de manière stricte et son appréciation est soumise à de grandes variations selon l'importance des moyens mis en œuvre pour l'évaluer (nombre de kinases testées et éloignement de ces kinases de la cible initiale). En d'autres termes, plus on teste le composé sur des kinases différentes, plus l'évaluation de sa sélectivité aura des chances d'être précise. Parmi les inhibiteurs de CDKs identifiés, certains inhibiteurs ne sont pas sélectifs du tout pour une CDK particulière: par exemple le flavopiridol inhibe à la fois CDK1, CDK2, CDK4, CDK6 et CDK9 (revue par Sausville, 2002). En revanche, les purines semblent plus sélectives. Au sein de la famille des CDKs, elles ne semblent inhiber que CDK1, CDK2 et CDK5, mais n'ont aucun effet sur CDK4 et CDK6 (Meijer *et al.*, 1997). A l'heure actuelle, aucun inhibiteur sélectif pour une seule CDK n'a été identifié. Ceci est probablement dû à la grande conservation des acides aminés formant la poche de fixation à l'ATP.

### 2) Principaux effets cellulaires des inhibiteurs de CDKs

Chaque inhibiteur de CDK possède des effets cellulaires qui lui sont propres. Dans ce paragraphe, notre but n'est pas de dresser une liste exhaustive des effets cellulaires de tous les inhibiteurs, mais plutôt de dessiner un schéma général à partir des données convergentes de la littérature.

D'une manière générale, les inhibiteurs de CDKs possèdent des effets cellulaires antiprolifératifs et sont capables de bloquer le cycle cellulaire à la fois en phase G1 et en phase G2/M, dépendant du type cellulaire et des conditions. L'arrêt en phase G1 s'accompagne d'une réduction de la phosphorylation de la protéine du Rétinoblastome (pRb) (Kitagawa *et al.*, 1993) et peut à ce titre être attribuée à l'inhibition de CDK2/cycline E notamment. L'arrêt en G2/M s'accompagne d'une réduction de phosphorylation de la vimentine et de la nucléoline et peut être attribué à l'inhibition de CDK1/cycline B (Damien *et al.*, 2001; Meijer *et al.*, 1997). Dans certains cas, les inhibiteurs de CDKs peuvent induire la différenciation (Matushansky *et al.*, 2000; Rosania *et al.*, 1999).

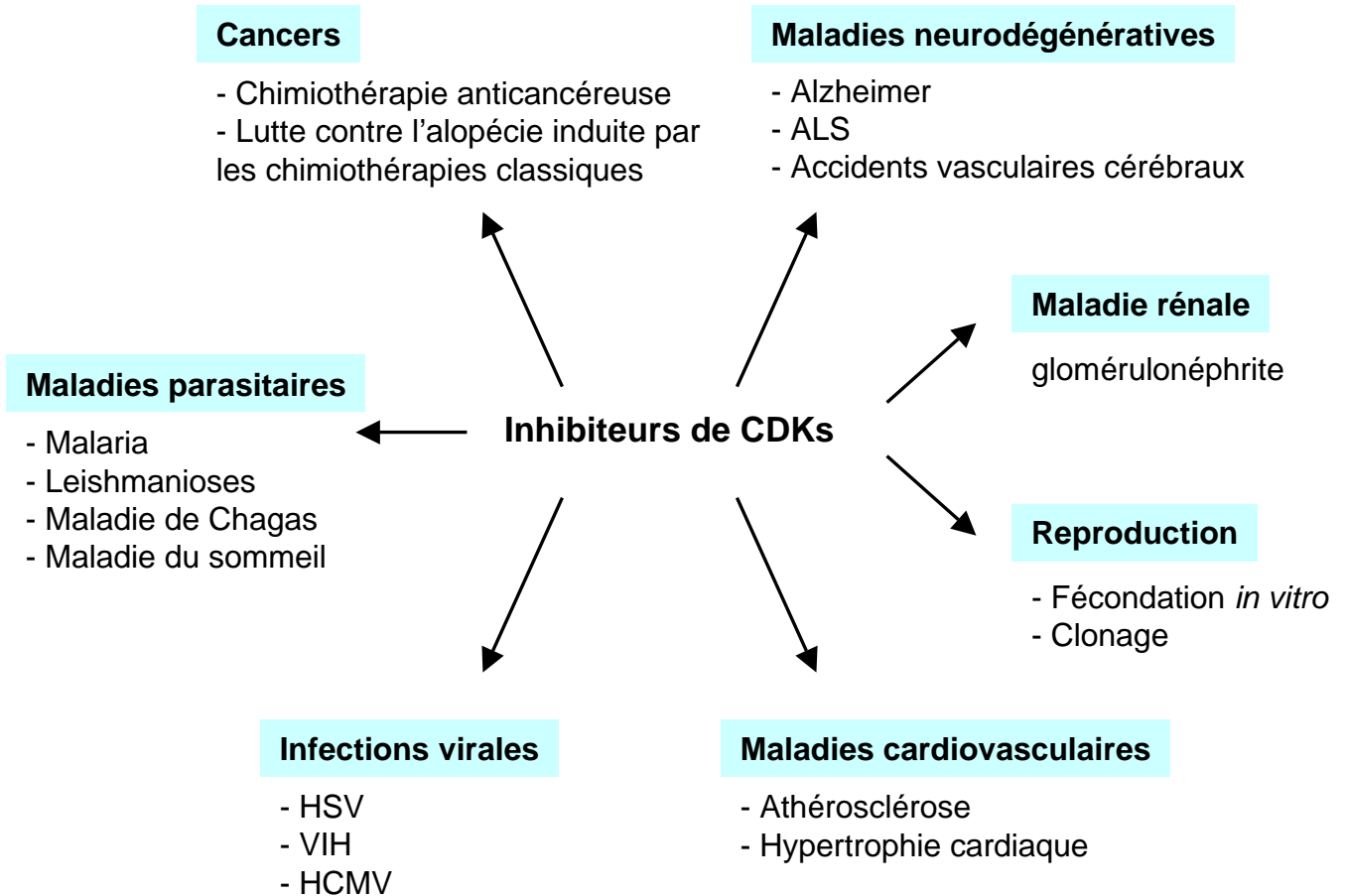
En ce qui concerne le déclenchement de l'apoptose, les effets cellulaires des inhibiteurs de CDKs varient selon les modèles cellulaires. Dans les cellules qui prolifèrent, ils ont tendance à déclencher l'apoptose, seuls ou en combinaison avec d'autres drogues (Edamatsu *et al.*, 2000; O'Connor *et al.*, 2002; Park *et al.*, 1996). En revanche, dans les cellules différenciées (thymocytes, cardiomyocytes, neurones) les mêmes inhibiteurs utilisés à des concentrations similaires ont l'effet inverse et protègent de l'apoptose (Adachi *et al.*, 2001; Gil-Gomez *et al.*, 1998; Hakem *et al.*, 1999; Padmanabhan *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1997).

### 3) Applications potentielles des inhibiteurs de CDKs

Initialement, les inhibiteurs de CDKs ont été mis au point et caractérisés pour leurs applications potentielles en cancérologie. Leurs effets sur le cycle cellulaire et sur le déclenchement de l'apoptose sont deux propriétés très favorables à leur développement en tant qu'agents anticancéreux. A l'heure actuelle, plusieurs inhibiteurs de CDKs sont en phase clinique d'étude pour de telles applications (revue par Damiens & Meijer, 2000). Par exemple, le flavopiridol (Zhai *et al.*, 2002) et la roscovitine sont en phase II d'étude clinique. D'autre part, des chercheurs de Glaxo Wellcome ont récemment mis en évidence une nouvelle possibilité d'utilisation des inhibiteurs de CDKs dans la prévention de l'alopécie induite par les chimiothérapies classiques (Davis *et al.*, 2001). Appliqués localement sur le crâne de rats, ces inhibiteurs de CDK sont capables de protéger les cellules saines de l'apoptose induite par des agents anticancéreux et d'empêcher la chute du pelage normalement observée.

D'autre part, la découverte progressive de l'implication des CDKs dans d'autres domaines que le contrôle du cycle cellulaire a considérablement élargi le champ d'applications potentielles de ces composés (revue par Borgne & Meijer, 1999; Knockaert *et al.*, 2002). Les inhibiteurs de CDKs pourraient avoir des applications dans le domaine des maladies neuro-dégénératives, des infections par des virus ou par des parasites unicellulaires, dans certaines maladies rénales ou encore dans le domaine cardiovasculaire (**Figure 5**).

Dans certaines maladies neuro-dégénératives (maladie d'Alzheimer, sclérose latérale amyotrophique), des anomalies de la régulation de CDK5 sont observées sans qu'il ait été clairement établi si elles contribuent à la pathogénie de ces troubles. Ces observations suggèrent que cette kinase pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante et que la modulation de son activité pourrait limiter le développement de ces pathologies, pour



**Figure 5: Applications potentielles des inhibiteurs de CDKs**

L'implication des CDKs dans des fonctions cellulaires essentielles comme la prolifération, l'apoptose, le fonctionnement du système nerveux central ou encore la différenciation permet d'envisager de nombreuses applications pour les inhibiteurs de ce groupe de kinases.

lesquelles il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement curatif (voir paragraphe 1- E) 2) de cette introduction).

Les inhibiteurs de CDKs pourraient également avoir des applications dans la lutte contre certaines maladies virales. En effet, des virus comme le virus de l'immunodéficience humaine (HIV), le virus de l'herpes simplex (HSV) ou encore le cytomégalovirus humain (HCMV) utilisent des CDKs ou de cyclines cellulaires pour se répliquer. Plusieurs groupes ont montré que les inhibiteurs de CDKs sont capables d'inhiber efficacement la réplication de ces virus *in vitro* (revue par Schang, 2001). Actuellement, des études sont réalisées chez l'animal pour tenter de confirmer *in vivo* l'effet antiviral des inhibiteurs de CDKs observé *in vitro*.

Certains inhibiteurs de CDKs inhibent *in vitro* la survie du parasite unicellulaire *Plasmodium falciparum* responsable de la malaria (Harmse *et al.*, 2001) mais à l'heure actuelle, leur mécanisme d'action n'est pas connu. D'autre part, l'analyse des séquences de CDKs de parasites comme *Plasmodium falciparum*, mais aussi *Leishmania major* (leishmanioses), *Trypanosoma brucei* (maladie du sommeil) ou *Trypanosoma cruzi* (maladie de Chagas) montre qu'elles sont assez éloignées des CDKs humaines (40 à 50 % d'acides aminés identiques au niveau du domaine catalytique seulement). La divergence entre les CDKs du parasite et celles de l'hôte pourrait être mise à profit pour trouver des inhibiteurs relativement sélectifs des CDKs parasitaires et n'ayant pas ou peu d'effet sur les CDKs humaines afin de limiter leurs effets secondaires et leur toxicité. Les collections de composés déjà utilisées pour le criblage sur les CDKs de mammifères pourraient constituer une ressource importante pour le criblage de molécules inhibitrices des CDKs parasitaires (Doerig *et al.*, 2002).

L'application clinique des inhibiteurs de CDKs est également évaluée dans un certain nombre de cas de proliférations cellulaires non cancéreuses mais pathologiques. En néphrologie, la glomérulonéphrite est une inflammation du rein caractérisée par une prolifération anormale des cellules mésangiales aboutissant progressivement à la destruction

des structures internes du rein, les glomérules. Un inhibiteur de CDK, la roscovitine est capable d'inhiber *in vivo* cette prolifération anormale et de restaurer les fonctions rénales (Pippin *et al.*, 1997). La roscovitine est actuellement en phase I d'étude clinique pour cette application (Clough, 2002). Dans le domaine cardiovasculaire, la prolifération des cellules vasculaires est associée à un certain nombre de pathologies (athérosclérose, angiogenèse au niveau des tumeurs) contre lesquelles les inhibiteurs de CDKs pourraient se révéler utiles. Un dérivé de l'olomoucine/roscovitine, le CVT-313 inhibe la prolifération vasculaire de la carotide dénudée de rat *in vivo* (Brooks *et al.*, 1997).

Le clonage animal présente de nombreux intérêts à la fois scientifiques, écologiques et économiques. Il consiste à introduire le noyau d'une cellule somatique (la cellule donneuse) de l'animal que l'on veut cloner, dans un ovocyte préalablement énucléé. L'ovocyte va se diviser pour donner un embryon qui sera transplanté dans l'utérus d'une mère porteuse. Après le temps de gestation, le nouveau-né sera la copie de l'animal de départ. En théorie, le principe du clonage animal est simple. En pratique, les problèmes de survie des fœtus et des nouveaux-nés sont un obstacle à l'utilisation large de cette technologie. En particulier, le stade du cycle cellulaire auquel se trouve la cellule somatique dont le noyau est prélevé semble déterminant dans le succès du transfert nucléaire chez les animaux. Habituellement, ces cellules donneuses sont synchronisées par retrait du sérum. Récemment, une étude conduite chez des bovins montre que la survie des fœtus et des nouveaux-nés après transfert nucléaire est nettement améliorée lorsque la cellule somatique donneuse est synchronisée par la roscovitine, par rapport aux cellules contrôles synchronisées par retrait du sérum (Gibbons *et al.*, 2002).

Enfin, les inhibiteurs de CDKs sont également utilisés pour améliorer les rendements de production *in vitro* d'embryons d'animaux domestiques. Actuellement, ces rendements sont assez faibles à cause notamment de la mauvaise capacité de développement *in vitro* des ovocytes (mauvaise différenciation de ces ovocytes, qui achèvent spontanément leur maturation méiotique lorsqu'on les isole des follicules ovariens, même à des stades pré-

matures). Les inhibiteurs de CDKs sont utilisés pour empêcher temporairement cette maturation nucléaire *in vitro*, afin de permettre à ces ovocytes d'accomplir leur maturation cytoplasmique (Mermillod *et al.*, 2000; Ponderato *et al.*, 2002). Après retrait de l'inhibiteur, les ovocytes peuvent être fécondés *in vitro* et ils conservent leur capacité à se développer normalement. Des études sont en cours pour déterminer les conditions de culture optimales permettant aux ovocytes traités par les inhibiteurs de CDKs d'acquies un potentiel de développement maximal après le retrait de l'inhibiteur.

### **B) Présentation des trois familles d'inhibiteurs utilisées dans la partie expérimentale du travail**

#### 1) Les purvalanols

Le premier composé identifié comme inhibiteur de CDK, et en particulier de CDK1, est la 6-diméthylaminopurine ( $IC_{50}$  : 120  $\mu$ M) (Meijer & Pondaven, 1988; Neant & Guerrier, 1988). A partir de ce premier inhibiteur décrit, des optimisations de sa structure ont successivement conduit à la description de l'isopentenyladenine ( $IC_{50}$  sur CDK1/cycline B: 55  $\mu$ M) (Rialet & Meijer, 1991) et de l'olomoucine<sup>1</sup> ( $IC_{50}$  : 7  $\mu$ M) (Vesely *et al.*, 1994). A mesure que l'efficacité des inhibiteurs décrits augmentait, une amélioration de la sélectivité était aussi remarquée. Ainsi, l'activité inhibitrice de l'olomoucine évaluée sur un panel de 35 kinases purifiées a permis de montrer la bonne spécificité de ce composé vis-à-vis de CDK1, CDK2 et CDK5 ( $IC_{50}$  comprises entre 2 et 7  $\mu$ M) et de la p44MAPK (Erk1) ( $IC_{50}$  : 25  $\mu$ M) (Vesely *et al.*, 1994). En revanche, CDK4 et CDK6 ne sont pas sensibles à l'olomoucine. La cristallisation avec CDK2 et les études d'enzymologie classique ont permis de déterminer que l'olomoucine agit en inhibant de manière compétitive la fixation de l'ATP au niveau de son site de fixation sur la kinase. La remarquable sélectivité de ce composé a motivé la

---

<sup>1</sup> nommée d'après la ville tchèque Olomouc, de l'Université de J. Vesely.

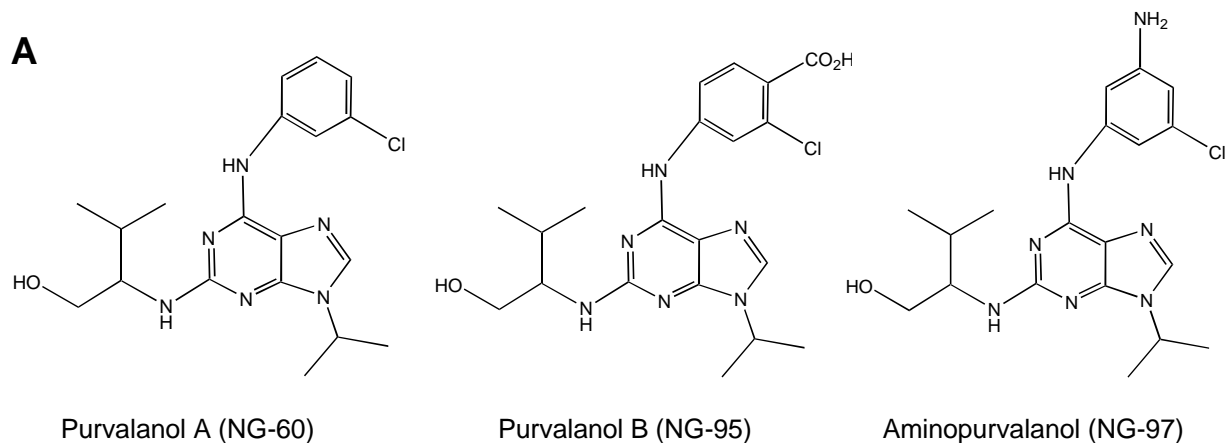
recherche d'analogues ayant une meilleure affinité pour CDK1, CDK2 et CDK5 mais possédant toujours la même spécificité. Les études structure-activité qui ont été conduites à partir de banques de purines tri-substituées en position 2, 6 et 9 ont abouti à l'identification de la roscovitine<sup>1</sup> (De Azevedo *et al.*, 1997; Meijer *et al.*, 1997) et des purvalanols<sup>2</sup> (Chang *et al.*, 1999; Gray *et al.*, 1998). Ces composés conservent toujours la même sélectivité, mais leur efficacité sur CDK1, CDK2 et CDK5 est très nettement améliorée. Comprises entre 0.45 et 0.7  $\mu\text{M}$  pour la roscovitine, les  $\text{IC}_{50}$  sont de 4 à 75 nM pour les purvalanols. La **figure 6** présente les structures des composés de la famille des purvalanols (purvalanol A, purvalanol B et aminopurvalanol) ainsi que la sélectivité du purvalanol B.

De nombreuses études mettent en évidence les propriétés antiprolifératives des composés de la famille des purvalanols. Sur le panel des 60 lignées du National Cancer Institute (NCI), le purvalanol A et l'aminopurvalanol inhibent la prolifération avec des  $\text{GI}_{50}$  (concentration inhibant la croissance de 50%) de 2  $\mu\text{M}$  et 1.8  $\mu\text{M}$ , respectivement (Gray *et al.*, 1998). Cette activité antiproliférative se traduit par un arrêt du cycle cellulaire à la fois en phase G1 et en phase G2/M (Chang *et al.*, 1999; Gray *et al.*, 1998; Rosania *et al.*, 1999; Villerbu *et al.*, 2002). Dans le cas du purvalanol A, les blocages en G1 et G2 sont réversibles même après 16 heures de traitement (temps maximal testé) et le traitement des cellules s'accompagne d'une diminution de la phosphorylation de certaines protéines cellulaires, parmi lesquelles des substrats de CDKs (Villerbu *et al.*, 2002). Même si elles ne constituent pas une preuve directe, ces observations suggèrent que le purvalanol agit en inhibant les CDKs dans la cellule. Des études sont actuellement en cours pour tenter de mieux comprendre le mécanisme d'action intracellulaire de ces molécules prometteuses.

---

<sup>1</sup> ainsi nommée car elle a été identifiée à Roscoff, ville du Finistère (France).

<sup>2</sup> ainsi nommés car constitués d'une purine, d'une chaîne latérale de valine et d'une fonction alcool.



**B**

Kinases	IC <sub>50</sub> (nM)
CDK1/cycline B	6
CDK2/cycline A	6
CDK2/cycline E	9
CDK5/p35	6
CDK4/cycline D1	> 10 000
p44/MAPK (Erk1)	3 333
p42/MAPK (Erk2)	1 000
Raf kinase	> 10 000
c-jun NH2-terminal kinase	> 10 000
c-AMP dependent protein kinase	3 800
c-GMP dependent protein kinase	> 100 000
Protéine kinase C $\alpha$	> 100 000
Protéine kinase C $\beta$ 1	> 100 000
Protéine kinase C $\beta$ 2	> 100 000
Protéine kinase C $\gamma$	> 100 000
Protéine kinase C $\delta$	> 100 000
Protéine kinase C $\epsilon$	> 100 000
Protéine kinase C $\eta$	> 100 000
Protéine kinase C $\zeta$	> 100 000
GSK-3 $\beta$	> 10 000
Caséine kinase 1	3 333
Caséine kinase 2	> 10 000
Insulin-receptor tyrosine kinase	2 200
v-Abl	> 100 000

**Figure 6: Structure et sélectivité des composés de la famille des purvalanols.**

**A. Structure du purvalanol A, purvalanol B et aminopurvalanol**

**B. Sélectivité du purvalanol B**

La sélectivité du purvalanol B a été testée en mesurant l'efficacité de ce composé sur un panel de 24 kinases purifiées. Les IC<sub>50</sub> sont présentées en nM et correspondent à des tests réalisés en présence de 15  $\mu$ M ATP. **Bleu clair:** IC<sub>50</sub> inférieures à 1000 nM (1  $\mu$ M); **Bleu marine:** IC<sub>50</sub> comprises entre 1 et 10  $\mu$ M; **Noir:** IC<sub>50</sub> supérieures à 10  $\mu$ M.

(D'après Gray *et al.*, 1998)

### 2) Les paullones

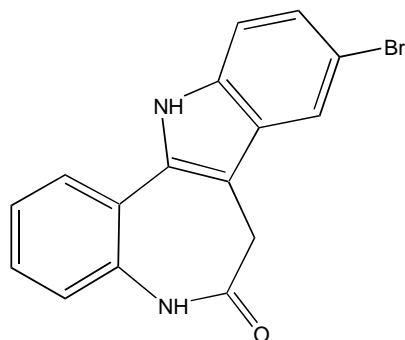
Le programme de criblage du National Cancer Institute et le développement de programmes assistés par ordinateur, notamment l'algorithme COMPARE, ont permis de tester et de comparer plusieurs dizaines de milliers de composés et de découvrir des nouvelles classes de molécules à activité antitumorale. Pour identifier ces composés, ce programme examine sur 60 lignées tumorales les effets cellulaires des molécules criblées et les compare à ceux d'un inhibiteur de CDK utilisé comme référence, le flavopiridol ou l'olomoucine, dont l'activité anti-tumorale est connue et bien caractérisée. Les similitudes entre le mode d'action du composé à tester et celui du flavopiridol sont détectées à l'aide du programme de reconnaissance informatique COMPARE (Paull *et al.*, 1992). Ce criblage a permis la mise en évidence d'une nouvelle famille d'inhibiteurs de CDKs, les paullones<sup>1</sup>. Des dosages d'activité kinase *in vitro* ont confirmé que les composés de cette famille et en particulier la kenpaullone (9-bromopaullone) étaient des inhibiteurs de CDK1 ( $IC_{50}$  : 0.4  $\mu$ M), CDK2 ( $IC_{50}$  : 0.68  $\mu$ M) et CDK5 ( $IC_{50}$  : 0.85  $\mu$ M) agissant par compétition avec la fixation de l'ATP sur les CDKs. Une étude structure-activité a conduit au développement de l'alsterpaullone (9-nitropaullone) qui a une  $IC_{50}$  de 0.035  $\mu$ M sur CDK1/cycline B (Schultz *et al.*, 1999). L'étude classique de sélectivité sur un panel de kinases purifiées a ensuite permis de montrer que les paullones sont également d'excellents inhibiteurs de la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3). En particulier, l'alsterpaullone et la kenpaullone sont environ dix fois plus efficaces sur GSK-3 que sur CDK1 (Leost *et al.*, 2000). La **figure 7** présente les structures de la kenpaullone et de l'alsterpaullone et présente les résultats des études de sélectivité menées pour ces deux composés.

L'activité antiproliférative de la kenpaullone sur les lignées cellulaires du NCI apparaît cependant modeste avec une  $GI_{50}$  de 43  $\mu$ m en moyenne. Cette activité antiproliférative se

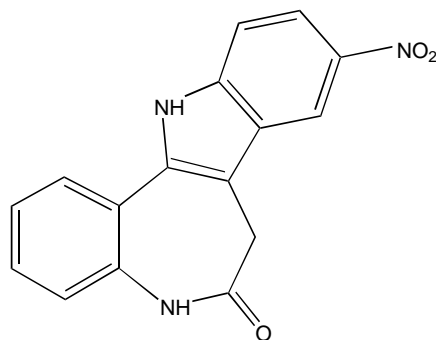
---

<sup>1</sup> Le nom "paullone" a été attribué à cette famille de composés en mémoire du Dr Kenneth Paull, l'inventeur de l'algorithme COMPARE qui a permis leur découverte.

**A**



Kenpaullone



Alsterpaullone

**B**

Kinases	Kenpaullone	Alsterpaullone
CDK1/cycline B	400	35
CDK2/cycline A	680	15
CDK2/cycline E	7 500	200
CDK4/cycline D1	> 100 000	>10 000
CDK5/p35	850	40
p44/MAPK (Erk1)	20 000	22 000
p42/MAPK (Erk2)	9 000	4 500
c-raf	38 000	> 10 000
MAPKK	> 100 000	> 100 000
c-jun NH2-terminal kinase	> 100 000	> 100 000
Protéine kinase C $\alpha$	> 100 000	> 100 000
Protéine kinase C $\beta$ 1	> 100 000	> 100 000
Protéine kinase C $\beta$ 2	> 100 000	> 100 000
Protéine kinase C $\gamma$	> 100 000	> 100 000
Protéine kinase C $\delta$	> 100 000	> 100 000
Protéine kinase C $\epsilon$	> 100 000	> 100 000
Protéine kinase C $\eta$	> 100 000	> 100 000
Protéine kinase C $\zeta$	> 100 000	> 100 000
c-AMP dependent protein kinase	> 100 000	7000
c-GMP dependent protein kinase	> 100 000	> 100 000
GSK-3 $\beta$	23	4
GSK-3 $\alpha$	n.t	4
Caséine kinase 1	> 100 000	> 100 000
Caséine kinase 2	20 000	> 100 000
Insulin-receptor tyrosine kinase	> 100 000	> 100 000
c-src	15 000	n.t
v-Abl	350 000	n.t

**Figure 7: Structure (A) et sélectivité (B) de la kenpaullone (9-bromo-paullone) et de l'alsterpaullone (9-nitro-paullone)**

La sélectivité a été testée en mesurant l'efficacité des composés sur un panel de 27 kinases purifiées. Les  $IC_{50}$  sont présentées en nM et correspondent à des tests réalisés en présence de 15  $\mu$ M ATP. **Bleu clair:**  $IC_{50}$  inférieures à 1000 nM (1 $\mu$ M); **Bleu marine:**  $IC_{50}$  comprises entre 1 et 10  $\mu$ M ; **Noir:**  $IC_{50}$  supérieures à 10  $\mu$ M.

(D'après Zaharevitz *et al.*, 1999; Leost *et al.*, 2000)

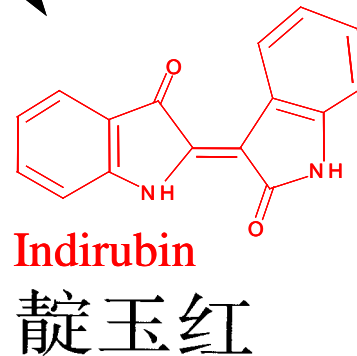
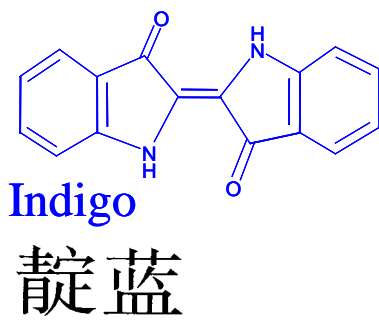
traduit dans les cellules MCF10A par un retard de la progression dans les phases G1 et S du cycle cellulaire (Zaharevitz *et al.*, 1999). En revanche, l'alsterpaullone présente une bonne activité antiproliférative sur les lignées cellulaires avec une efficacité environ 100 fois supérieure à celle de la kenpaullone. De plus, il a été montré que l'alsterpaullone est capable, dans un système cellulaire, d'inhiber la phosphorylation de DARPP-32, un substrat de CDK5 ainsi que celle de la protéine Tau sur des sites spécifiques de GSK-3. Ces données suggèrent que les paullones sont capables d'inhiber CDK5 et GSK-3 dans un contexte cellulaire. Le potentiel anticancéreux des paullones est actuellement évalué dans des tests pré-cliniques (Zaharevitz *et al.*, 1999).

### 3) Les indirubines

L'utilisation des plantes médicinales joue un rôle déterminant dans la stratégie thérapeutique orientale, notamment en Chine. Ainsi, la médecine traditionnelle chinoise soigne les leucémies myéloïdes chroniques avec un mélange de 11 herbes médicinales, le Danggui Longhui Wan. Dans les années 60, des chimistes ont entrepris d'identifier, parmi ces 11 ingrédients, le principe actif de cette recette qui s'est révélé être le Qing Dai (indigo naturalis), une poudre de couleur bleu nuit préparée à partir de plantes produisant de l'indigo. Le Qing Dai, est lui-même constitué d'un mélange de deux isomères : l'indigo, très majoritaire, de couleur bleue, et son isomère de couleur rouge, l'indirubine, très minoritaire mais néanmoins responsable de l'activité anti-leucémique du mélange (**Figure 8**). Bien qu'en Chine l'indirubine et son isomère soient utilisés en clinique depuis de nombreuses années, les mécanismes d'action responsables de l'activité antiproliférative sont restés mal connus. En 1999, une équipe de chercheurs européens a mis en évidence un mécanisme d'action potentiel pour ces composés, en démontrant que l'indirubine et ses analogues, en particulier l'indirubine-3'-monoxime sont capables d'inhiber *in vitro* l'activité de CDK1, CDK2 et CDK5 en se localisant dans la poche de fixation à l'ATP de ces kinases (Hoessel *et al.*, 1999). Plus

Danggui Longhui Wan  
当归龙荟丸

↓  
Qing Dai  
青黛



**Figure 8: Identification du principe actif de la recette chinoise anti-leucémique Danggui Longhui Wan**

Le Danggui Longhui Wan est une recette de onze ingrédients utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise pour soigner les leucémies. Le principe actif de cette recette est contenu dans l'un des ingrédients, le Qing Dai, une poudre de couleur bleu nuit, composée majoritairement d'indigo (de couleur bleue) et de son isomère de couleur rouge, l'indirubine, qui est responsable de l'activité anti-leucémique du mélange.

(D'après Damiens *et al.*, 2001 )

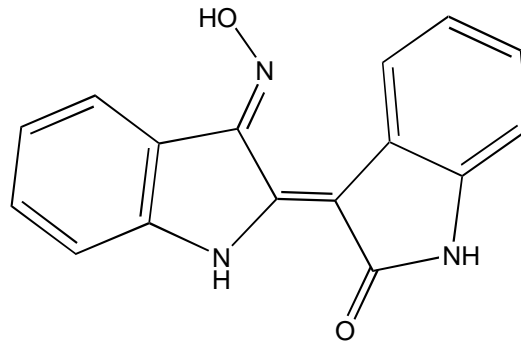
récemment, une autre étude a permis de montrer que les dérivés d'indirubine sont également de très bons inhibiteurs de GSK-3 (Leclerc *et al.*, 2001). La **figure 9** présente la structure de l'indirubine-3'-monoxime ainsi que les données de sélectivité disponibles pour ce composé.

L'indirubine-3'-monoxime présente une activité antiproliférative marquée sur un grand nombre de lignées cellulaires à des concentrations variant de 2.5 à 15  $\mu\text{M}$  (Damiens *et al.*, 2001; Hoessel *et al.*, 1999; Marko *et al.*, 2001). Cette activité antiproliférative se traduit par un blocage du cycle de ces cellules en G2/M avec dans certains cas un autre point de blocage en phase G1 (Hoessel *et al.*, 1999). Même si l'indirubine est utilisée en clinique en Chine pour le traitement des leucémies myéloïdes chroniques, des études pré-cliniques et cliniques ont été entreprises pour mieux caractériser son mode d'action et ses propriétés. Le développement de ces études a été ralenti par la faible solubilité de l'indirubine mais des recherches en cours ont permis d'obtenir des dérivés plus solubles.

### 3- Introduction au travail de recherche

Malgré les nombreuses études qui décrivent les propriétés des inhibiteurs de CDKs, leur mécanisme d'action intracellulaire reste assez mal compris. En effet, de nombreux facteurs, parfois difficiles à évaluer, sont susceptibles d'affecter les effets cellulaires d'un inhibiteur : la perméabilité de la membrane cellulaire à ce composé, la répartition dans les différents compartiments cellulaires, le métabolisme en composés inactifs, la compétition avec de fortes concentrations d'ATP intracellulaire, la fixation sur d'autres cibles enzymatiques non identifiées et, sans doute, une combinaison de tous ces facteurs.

Ce travail de thèse porte sur la compréhension du mécanisme d'action des inhibiteurs de CDKs. Nous avons choisi d'aborder cette question complexe en nous intéressant au

**A**

Indirubine-3'-monoxime

**B**

Kinases	Indirubine-3'-monoxime
CDK1/cycline B	180
CDK2/cycline A	440
CDK2/cycline E	250
CDK4/cycline D1	3 333
CDK5/p35	100
p44/MAPK (Erk1)	> 100 000
p42/MAPK (Erk2)	> 100 000
c-raf	> 100 000
MAPKK	> 100 000
Protéine kinase C $\alpha$	27 000
<b>Protéine kinase C <math>\beta</math>1</b>	<b>4 000</b>
Protéine kinase C $\beta$ 2	20 000
<b>Protéine kinase C <math>\gamma</math></b>	<b>8400</b>
Protéine kinase C $\delta$	> 100 000
Protéine kinase C $\epsilon$	20 000
Protéine kinase C $\eta$	52 000
Protéine kinase C $\zeta$	> 100 000
<b>c-AMP dependent protein kinase</b>	<b>6 300</b>
<b>c-GMP dependent protein kinase</b>	<b>9 000</b>
<b>GSK-3 <math>\alpha/\beta</math></b>	<b>22</b>
<b>Caséine kinase 1</b>	<b>9 000</b>
Caséine kinase 2	12 000
Insulin-receptor tyrosine kinase	11 000

**Figure 9: Structure (A) et sélectivité (B) de l'indirubine-3'-monoxime**

La sélectivité a été testée en mesurant l'efficacité des composés sur un panel de 23 kinases purifiées. Les  $IC_{50}$  sont présentées en nM et correspondent à des tests réalisés en présence de 15  $\mu$ M ATP. **Bleu clair**:  $IC_{50}$  inférieures à 1000 nM (1 $\mu$ M); **Bleu marine**:  $IC_{50}$  comprises entre 1 et 10  $\mu$ M ; **Noir**:  $IC_{50}$  supérieures à 10  $\mu$ M.

(D'après Hoessel *et al.*, 1999; Leclerc *et al.*, 2001)

problème des cibles intracellulaires de ces composés. Bien que ces inhibiteurs soient identifiés puis optimisés sur la base de leur capacité à inhiber l'activité des CDKs *in vitro*, leurs cibles intracellulaires réelles restent inconnues. Certains arguments forts soutiennent l'hypothèse que les inhibiteurs de CDKs agissent en inhibant les CDKs. Tout d'abord, l'effet antiprolifératif observé est compatible avec l'inhibition des CDKs. Ensuite, des effets similaires sont obtenus avec des inhibiteurs appartenant à des familles chimiques différentes. Cependant, ces arguments sont indirects et la question de la sélectivité *in vivo*<sup>1</sup> des inhibiteurs de CDKs reste une question ouverte. Classiquement, pour tester la sélectivité des composés, la technique la plus largement utilisée consiste à tester le composé contre un panel de kinases purifiées. Cependant, cette approche présente un certain nombre d'inconvénients : d'abord, elle requiert la production, la purification et le test enzymatique pour chacune des kinases, ce qui représente une somme de travail considérable. Ensuite, par cette technique, les enzymes utilisées sont souvent des enzymes recombinantes, ce qui pose un certain nombre de problèmes (enzymes peu actives ou mal repliées). Enfin, cette méthode ne permet pas de tester l'effet du composé sur des cibles autres que des kinases.

Au cours de cette étude, une technique alternative pour tester la sélectivité des composés a été développée. Elle repose sur une approche de chromatographie d'affinité par laquelle l'inhibiteur, utilisé comme appât, est attaché à une matrice d'agarose pour fixer et concentrer à partir d'extraits cellulaires, les protéines interagissant avec lui. Cette approche de chromatographie a été utilisée pour étudier les cibles intracellulaires du purvalanol, de la kenpaullone et de l'indirubine-3'-monoxime.

---

<sup>1</sup> Dans l'expression "sélectivité *in vivo*", le terme "*in vivo*" n'est pas utilisé au sens physiologique mais plutôt par opposition à la sélectivité mesurée *in vitro* par des tests enzymatiques sur des kinases purifiées.

**RESULTATS**

### Liste des publications

- 1- **Knockaert, M.**, Gray, N., Damiens, E., Chang, Y.T., Grellier, P., Grant, K., Fergusson, D., Mottram, J., Soete, M., Dubremetz, J.F., Le Roch, K., Doerig, C., Schultz, P.G. and Meijer, L. (2000). Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilized inhibitors. *Chem. & Biol.* **7**, 411-422.
- 2- **Knockaert, M.**, Wieking, K., Schmitt, S., Leost, M., Mottram, J., Kunick, C., and Meijer, L. (2002). Intracellular targets of paullones: identification by affinity chromatography using immobilized inhibitor. *J. Biol. Chem.* **277**(28), 25493-25501.
- 3- **Knockaert, M.**, Lenormand, P., Gray, N., Schultz, P., Pouyssegur, J. and Meijer, L. (2002). p42/p44 MAPKs are intracellular targets of the CDK inhibitor purvalanol. *Oncogene* **21**, 6413-6424.
- 4- Schang, L.M., Bantly, A., **Knockaert, M.**, Shaheen, F., Meijer, L., Malim, M.H., Gray, N.S. and Schaffer, P.A. (2002). Specificity and antiviral effects of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors against wild-type and drug-resistant strains of HSV and HIV-1. *J. Virol.* **76**(15), 7874-7882.
- 5- Malgrange, B., **Knockaert, M.**, Belachew, S., Nguyen, L., Moonen, G., Meijer, L. and Lefebvre, P.P. (2002). The kinase inhibitor roscovitine induces supernumerary hair cell and Deiters' cell differentiation in the developing organ of Corti. En préparation.
- 6- Meijer, L., **Knockaert, M.** and E. Damiens (2001). Prévention, par les inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes, de l'alopécie induite par la chimiothérapie. *Bull. Cancer* **88**, 347-350.
- 7- **Knockaert, M.** and Meijer, L. (2002). Identifying *in vivo* targets of cyclin-dependent kinase inhibitors by affinity chromatography. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 819-825.

- 8- **Knockaert, M.**, Greengard, P. and Meijer, L. (2002). Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol. Sci.* (invited review) **23**(9), 417-425.
  
- 9- Wieking, K., **Knockaert, M.**, Leost, M., Zaharevitz, D.W., Meijer, L. and Kunick, C. (2002). Synthesis of paullones with aminoalkyl side chains. *Arch Pharm (Weinheim)* **335**(7), 311-317.
  
- 10- Droucheau, E., Primot, A., Mattei, D., **Knockaert, M.**, Alano, P., Jafarshad, A., Baratte, B., Kunick, C., Parzy, D., Doerig, C. and Meijer, L. (2003). Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) of *Plasmodium falciparum*: expression, intracellular localization and selective inhibitors. *Mol. Cellul. Parasitol.*, in revision.

## RESULTATS

### Chapitre I

#### Identification des cibles intracellulaires des inhibiteurs de CDKs après chromatographie d'affinité sur inhibiteur immobilisé

La technique de chromatographie d'affinité a été utilisée pour identifier les cibles intracellulaires de trois inhibiteurs de CDKs :

- (I) le purvalanol
- (II) les paullones
- (III) l'indirubine

#### **1- Identification des cibles intracellulaires du purvalanol : article 1**

*“Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilized inhibitors”*

##### **A) Présentation des principaux résultats**

Nous avons étudié la sélectivité *in vivo* du purvalanol en caractérisant ses cibles intracellulaires dans un grand nombre de modèles. Pour cela, nous avons utilisé une approche de chromatographie d'affinité dans laquelle l'inhibiteur est fixé de manière covalente à une matrice d'agarose. La matrice ainsi obtenue est utilisée pour fixer et concentrer à partir d'extraits cellulaires, les protéines interagissant avec ce composé.

### 1) Principe général de la technique et mise au point des outils

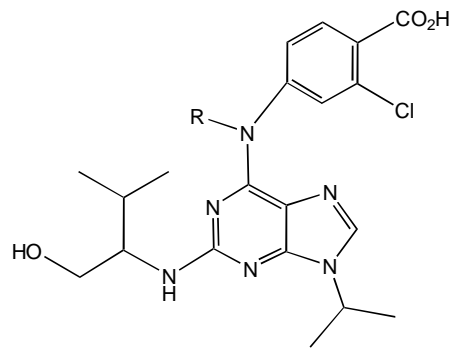
La structure cristalline du purvalanol avec CDK2 (Chang *et al.*, 1999; Gray *et al.*, 1999; Gray *et al.*, 1998), permet une analyse détaillée des interactions de l'inhibiteur avec sa cible. En particulier, cette structure révèle que la partie chlororaniline de l'inhibiteur est orientée vers l'extérieur de la poche de fixation à l'ATP de CDK2. Une chaîne carbonée peut donc être fixée à cet endroit sans perturber les interactions entre la kinase et l'inhibiteur. Si l'on fixe ensuite de manière covalente l'autre extrémité de cette chaîne carbonée à une matrice d'agarose, on obtient la matrice de purvalanol (95) qui a été utilisée tout au long de cette étude pour purifier, à partir d'extraits cellulaires, les protéines interagissant avec le composé. En parallèle, un dérivé du purvalanol inactif sur les kinases, a également été immobilisé sur les billes d'agarose. Cette matrice de methyl-purvalanol (95M) a été utilisée comme contrôle négatif (**Figure 10**).

Des extraits cellulaires ont été préparés à partir de nombreux types cellulaires et tissus, puis incubés sur les matrices de purvalanol et de methyl-purvalanol. Les protéines retenues ont ensuite été éluées par dénaturation puis séparées sur un gel de polyacrylamide. L'identification des protéines les plus abondantes retenues spécifiquement sur les billes de purvalanol est réalisée soit par microséquençage de peptides internes, soit par Western blot lorsque nous avons de fortes suspicions sur l'identité d'une bande. Le principe général de la technique est présenté à la **figure 11**.

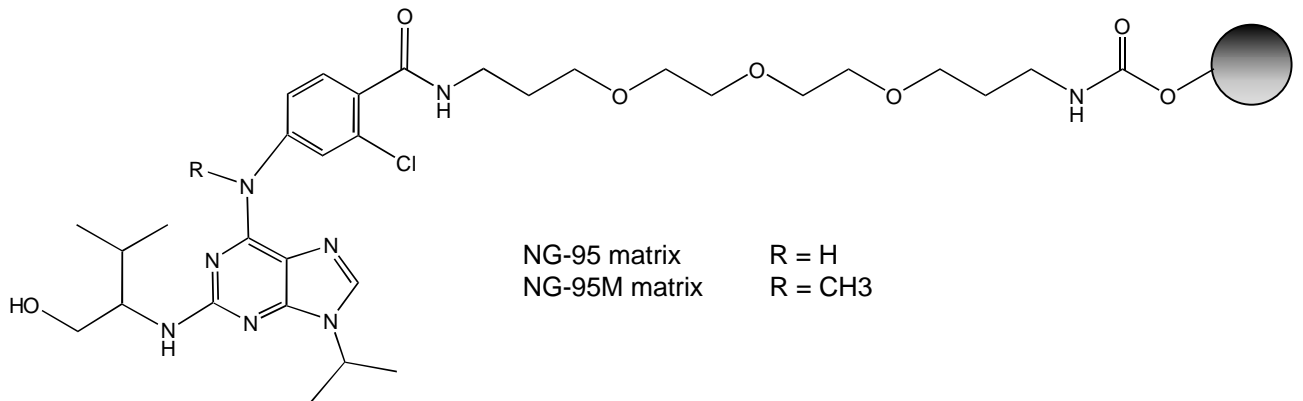
### 2) Résultats

La nature des cibles intracellulaires du purvalanol a été examinée dans une grande variété de tissus et de cellules que l'on peut regrouper dans trois catégories :

- les ovocytes, les œufs et les embryons: étoile de mer, arénicole, oursin et xénope



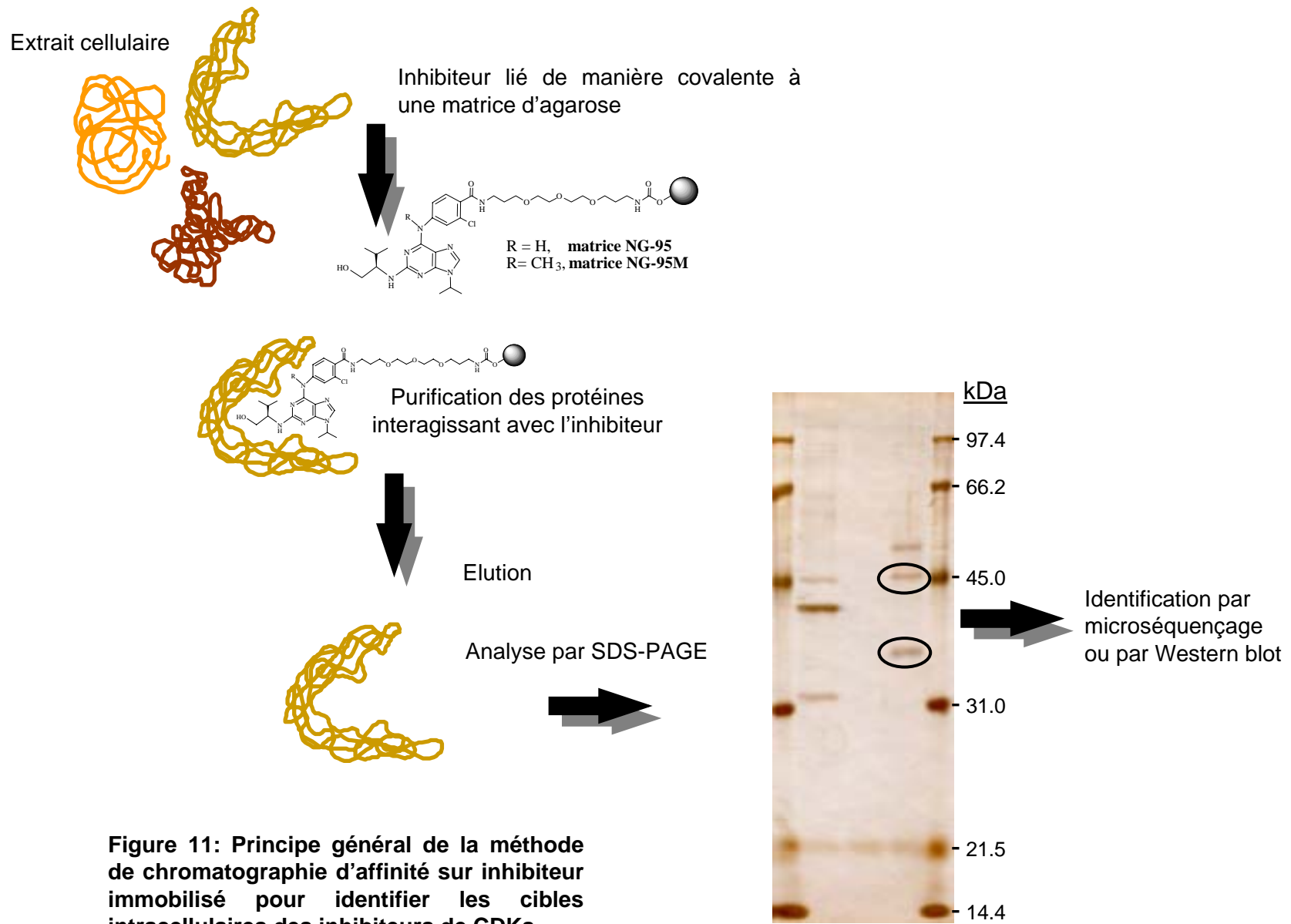
Purvalanol B (NG-95)      R = H  
 Méthyl Purvalanol B      R = CH<sub>3</sub>



NG-95 matrix      R = H  
 NG-95M matrix      R = CH<sub>3</sub>

### Figure 10: Billes de purvalanol

La structure cristalline du purvalanol avec CDK2 suggère que la partie chloroaniline de l'inhibiteur est tournée vers l'extérieur de la poche de fixation à l'ATP. Cette position a été utilisée pour fixer une chaîne carbonée sur l'inhibiteur et cette chaîne a ensuite été reliée à une matrice d'agarose pour obtenir la matrice de purvalanol (NG-95). En parallèle, un dérivé du purvalanol inactif sur les kinases, portant un groupement méthyle sur l'azote situé en position 6 a également été immobilisé. La matrice de méthyle purvalanol (NG-95M) a été utilisée comme contrôle négatif.



## Résultats

- les tissus de mammifères : organes de rat, cerveau de porc et lignées cellulaires humaines

- les parasites unicellulaires : *Plasmodium falciparum*, *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma cruzi* et *Toxoplasma gondii*

La caractérisation systématique des protéines majoritaires retenues spécifiquement sur les billes de purvalanol a conduit à l'identification de sept kinases et d'une réductase (la biliverdine réductase retrouvée dans le foie de rat). Les résultats ont confirmé que les CDKs sont bien des cibles du purvalanol dans la cellule dans un grand nombre de modèles. Cependant, cette technique a également permis de révéler que les protéines kinases p44 et p42 MAPK (Erk1 et Erk2) sont des cibles majoritaires du purvalanol notamment chez les mammifères. En outre, la caséine kinase 1 (CK1) a été identifiée comme une cible majoritaire du purvalanol dans les quatre parasites unicellulaires testés.

L'ensemble des kinases retenues sur la matrice de purvalanol et identifiées au cours de cette étude est résumé dans le tableau 1.

Ovocytes, œufs et embryons :	CDK1	CDK5	Erk1	Erk2	S6 kinase	CamKII	CK1
- Etoile de mer	WB				MS	MS	
- Arénicole	WB		MS		MS		
- Oursin	WB	WB					
- Xénope	WB			MS		MS	
Tissus et cellules de mammifères :	CDK1	CDK5	Erk1	Erk2	S6 kinase	CamKII	CK1
- cerveau de porc		MS	MS	MS			
- lignée cellulaire humaine				MS			
Parasites unicellulaires :	CDK1	CDK5	Erk1	Erk2	S6 kinase	CamKII	CK1
- <i>Plasmodium falciparum</i>							MS
- <i>Leishmania mexicana</i>							MS
- <i>Trypanosoma cruzi</i>							MS
- <i>Toxoplasma gondii</i>							MS

**Tableau 1 : Ensemble des kinases retrouvées sur la matrice de purvalanol**

Erk1 : Extracellular regulated kinase 1 ; Erk2 : Extracellular regulated kinase 2 ; S6 kinase : Ribosomal S6 kinase ; CamKII : Calmoduline protein kinase II, CK1 : Casein kinase 1. WB: identification par Western blot; MS: identification par microséquençage

**B) Article 1**

## Article 1:

**Knockaert, M.**, Gray, N., Damiens, E., Chang, Y.T., Grellier, P., Grant, K., Fergusson, D., Mottram, J., Soete, M., Dubremetz, J.F., Le Roch, K., Doerig, C., Schultz, P.G. and Meijer, L. (2000). Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilized inhibitors. **Chem. & Biol.** **7**, 411-422.

### ABSTRACT

**Background:** Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases (CDKs) have great therapeutic potential against various proliferative and neurodegenerative disorders. The founding member of the family of 2,6,9-trisubstituted purines, olomoucine, has been optimized for activity against CDK1/cyclin B by combinatorial and medicinal chemistry efforts to yield the purvalanol inhibitors (IC<sub>50</sub>: 6 nM). Despite their excellent *in vitro* selectivity against a collection of 25 purified kinases and numerous cell-based studies that support their action against CDKs, the actual intracellular targets of 2,6,9-trisubstituted purines remain unverified.

**Results:** To address this question, purvalanol B (95) and an N6-methylated, CDK-inactive derivative (95Me) were immobilized to an agarose matrix. Extracts from a diverse collection of cell types and organisms including starfish, *Arenicola* and *Xenopus* oocytes, sea urchin eggs, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana*, *Toxoplasma gondii*, a variety of rat organs, MCF-7 cells, and porcine brain were screened for purvalanol B binding proteins. In addition to validating CDKs as intracellular targets, a variety of unexpected protein kinases (Erk1, Erk2, RS6K, CaM K II and CK1) were specifically recovered from the 95-matrix. CK1 was identified as one of the major 95-matrix binding proteins in *P. falciparum*, *L. mexicana*, *T. gondii*, and *T. cruzi*. Purvalanol compounds were also demonstrated to inhibit the proliferation of these parasites suggesting that CK1 may serve as a valuable target for further screening with libraries of 2,6,9-trisubstituted purines.

**Conclusions:** The ease with which a simple batchwise affinity chromatography approach using two purine derivatives resulted in the isolation of a small set of highly purified kinases suggests that this approach may serve as a general method for identifying the intracellular targets relevant to a particular class of ligands. This method allows a close correlation to be established between the pattern of proteins bound to a small family of related compounds and the pattern of cellular responses to these compounds.

### 2- Identification des cibles intracellulaires des paullones : article 2

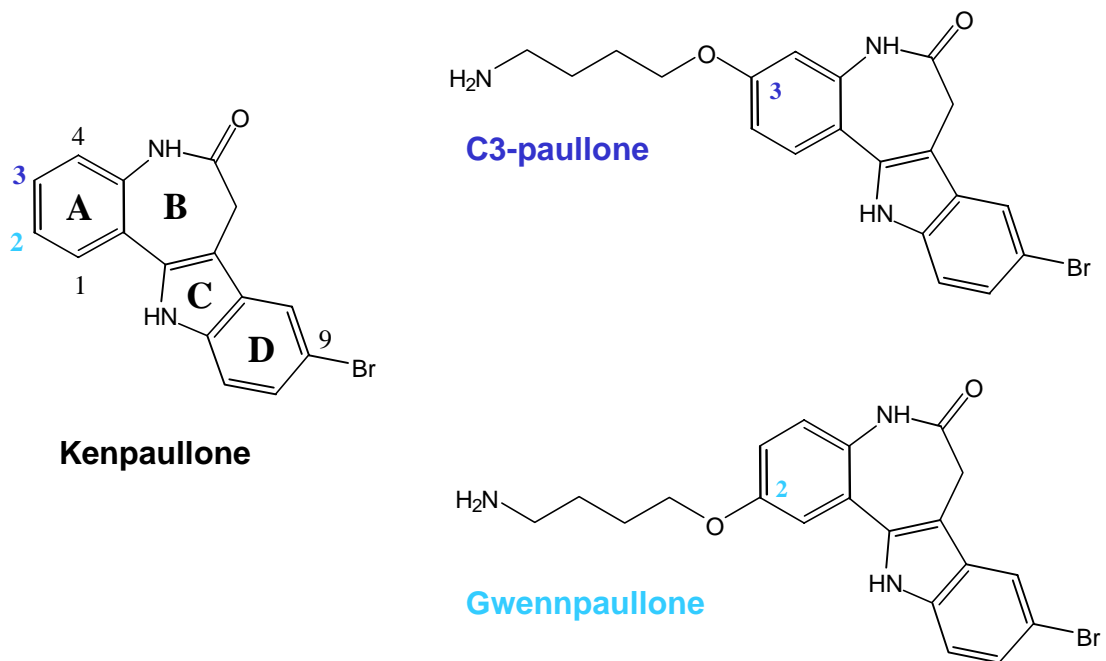
*“Intracellular targets of paullones: identification following affinity purification on immobilized inhibitor”*

#### A) Présentation des principaux résultats

Nous avons étudié la sélectivité *in vivo* des paullones en caractérisant leurs cibles intracellulaires dans un grand nombre de modèles. Pour cela, nous avons utilisé l'approche de chromatographie d'affinité sur inhibiteur immobilisé déjà décrite pour le purvalanol.

##### 1) Mise au point des outils

A la différence du purvalanol, les paullones n'ont pas été co-cristallisées avec CDK2. Cependant, elles ont été "insérées" *in silico* dans la poche de fixation à l'ATP du complexe CDK1/cycline B, modélisée à partir de la structure cristalline de CDK2/cycline A (Gussio *et al.*, 2000). Ces données suggèrent que les positions C-2 et C-3 de l'anneau A seraient les plus appropriées pour attacher la chaîne latérale. Deux paullones portant des chaînes latérales en C-2 et en C-3 ont donc été synthétisées à partir de la kenpaullone (9-bromo-paullone), puis attachées sur des billes d'agarose (**Figure 12**). Les tests préliminaires réalisés avec du cerveau de porc montrent une bien meilleure fixation des protéines avec la matrice de C-2-paullone qu'avec la matrice de C-3-paullone, donc la matrice de C-2-paullone a été conservée pour le reste de l'étude et cette paullone renommée "gwennpaullone". Des billes d'agarose sans inhibiteur ont été utilisées comme contrôle négatif.



### Figure 12: Billes de paullones

Les résultats des modélisations moléculaires de la kenpaullone dans la poche de fixation à l'ATP de CDK1 ont permis de suggérer deux positions possibles (C2 et C3) pour attacher la chaîne latérale sur l'inhibiteur sans gêner son interaction avec la kinase. Deux dérivés de kenpaullone portant des chaînes latérales en C2 et en C3 ont donc été synthétisés. A l'issue des tests préliminaires d'affinité, la matrice de C2 paullone a montré une bien meilleure fixation des protéines que la matrice de C3 paullone. Elle a donc été gardée pour le reste de l'étude et été renommée "Gwennpaullone".

## Résultats

---

Comme pour le purvalanol, des extraits de différents types cellulaires et organes ont été passés sur ces matrices et les protéines retenues ont été identifiées par Western blot ou par microséquençage.

### 2) Résultats

L'analyse des profils de protéines retenues sur les billes de gwennpaullone dans les différents modèles permet de proposer trois cibles majoritaires pour les paullones dans la cellule :

- (1) D'une part, les kinases GSK-3 $\alpha$  et GSK-3 $\beta$  sont retrouvées dans tous les modèles de cellules de mammifères testés : le cerveau de porc, les organes de rat et la lignée cellulaire PC12.
- (2) D'autre part, la malate déshydrogénase mitochondriale (MDH) est retrouvée sur la matrice de gwennpaullone, dans tous les modèles testés : les cellules de mammifères sus-citées, le parasite unicellulaire *Leishmania mexicana*, les ovocytes de xénope et les œufs d'oursin. Dans ces deux derniers modèles, la MDH mitochondriale est même la seule protéine retenue sur la matrice.

La présence inattendue de la MDH mitochondriale sur les billes de gwennpaullone dans tous les modèles testés nous a conduit à évaluer les bases moléculaires de cette interaction. Pour cela, nous avons utilisé les MDH mitochondriale et cytoplasmique de source commerciale et nous avons procédé à des tests d'activité enzymatique, en présence de quantités croissantes de paullones. Les résultats montrent que les paullones inhibent l'activité de la MDH mitochondriale avec des IC<sub>50</sub> de l'ordre du  $\mu$ M, et dans une moindre mesure, l'activité de la MDH cytoplasmique. Le mécanisme de cette inhibition fait appel à une compétition des paullones pour la fixation du NAD/NADH sur l'enzyme.

**B) Article 2**

## Article 2:

**Knockaert, M.**, Wieking, K., Schmitt, S., Leost, M., Mottram, J., Kunick, C., and Meijer, L. (2002). Intracellular targets of paullones: identification by affinity chromatography using immobilized inhibitor. **J. Biol. Chem.** **277**(28), 25493-25501.

### ABSTRACT

Numerous inhibitors of cyclin-dependent kinases (CDKs) and glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) are being developed in view of their potential applications against cancers and neurodegenerative disorders. Among these, paullones constitute a family of potent and apparently selective CDK and GSK-3 inhibitors. However their actual intracellular targets remain to be identified. To address this issue we have immobilized a paullone, gwenpaullone, on an agarose matrix. Extracts from various cell types and tissues were screened for proteins interacting with this matrix. This approach validated GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  as major intracellular paullone targets, but also mitochondrial, but not cytoplasmic MDH. Mitochondrial MDH was indeed inhibited by micromolar concentrations of paullones. mMDH was the major paullone-binding protein in the parasitic protozoon *Leishmania mexicana* and paullones inhibited growth of the parasite. This simple batch wise affinity chromatography approach constitutes a straightforward method for the identification of intracellular targets of this particular class of novel anti-mitotic compounds. It has revealed an unexpected target, mitochondrial MDH, the inhibition of which may participate to the pharmacological effects of paullones.

### 3- Identification des cibles intracellulaires de l'indirubine

#### A) Présentation des résultats obtenus

Nous avons étudié la sélectivité *in vivo* de l'indirubine en caractérisant ses cibles intracellulaires à l'aide de la technique de chromatographie d'affinité sur inhibiteur immobilisé déjà décrite pour le purvalanol et les paullones.

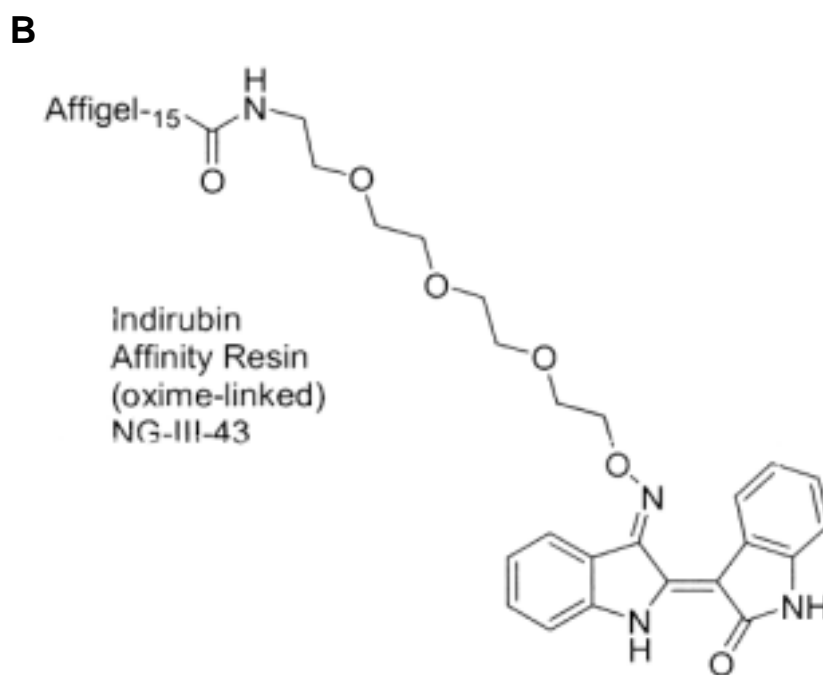
##### 1) Mise au point des outils

L'indirubine-3'-monoxime et l'indirubine-5-sulfonate ont été cristallisées avec CDK2 (Davies *et al.*, 2001; Hoessel *et al.*, 1999). L'analyse de ces structures cristallines suggère plusieurs positions possibles pour attacher l'inhibiteur à des billes, sans gêner l'interaction inhibiteur/kinase. Parmi ces possibilités, la position 3' sur l'indirubine-3'-monoxime a été retenue pour fixer la chaîne latérale. Comme pour le purvalanol et les paullones, cette chaîne latérale a ensuite été fixée de manière covalente à des billes d'agarose et les protéines interagissant avec cette matrice ont été analysées dans différents modèles (**Figure 13**). Des billes sans inhibiteur ont été utilisées comme contrôle négatif.

##### 2) Résultats

###### Chromatographie d'affinité

Les cibles intracellulaires de l'indirubine-3'-monoxime ont été étudiées dans deux modèles de cellules de mammifères : la lignée cellulaire de fibroblastes de hamster CCL39 et le cerveau de porc.



**Figure 13: Billes d'indirubine**

**A.** Photo de la matrice d'indirubine. L'indirubine donne sa couleur rouge aux billes sur lesquelles elle est fixée.

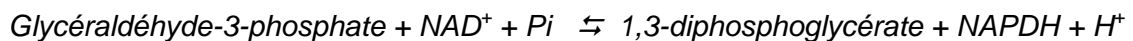
**B.** La chaîne latérale ajoutée en position 3' de la molécule d'indirubine-3'-monoxime permet de fixer de manière covalente l'inhibiteur sur les billes.

Dans la lignée cellulaire CCL39, un certain nombre de protéines interagissent avec la matrice d'indirubine-3'-monoxime, comme le montre la coloration à l'argent présentée à la **figure 14 A**. Parmi ces protéines, la présence de CDK1/2 a pu être mise en évidence par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-PSTAIR (Figure 14 B).

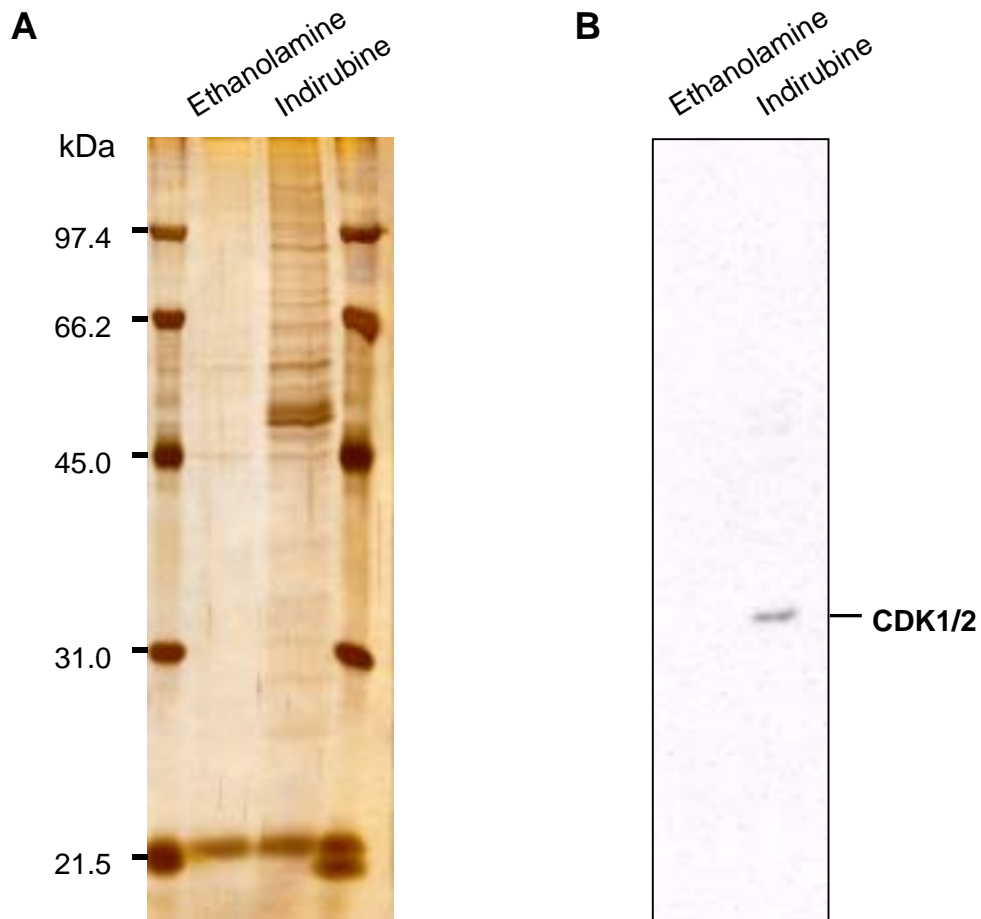
De la même manière, un grand nombre de protéines est retrouvé sur la matrice d'indirubine-3'-monoxime, après passage d'un lysat de cerveau de porc (Figure 15A). Parmi celles-ci, une protéine de poids moléculaire apparent 38 kDa, retenue sur les billes d'indirubine et absente de la matrice d'éthanolamine, a été excisée du gel et microséquencée. L'analyse de la séquence peptidique obtenue révèle 100% d'identité avec la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). En outre, la présence de CDK5 ainsi que celle des GSK-3  $\alpha/\beta$  a pu être mise en évidence par Western blot à l'aide d'anticorps spécifiques (Figure 15, B et C respectivement).

### Bases moléculaires de l'interaction entre la GAPDH et l'indirubine

La présence de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase sur les billes d'indirubine ne pouvait pas être déduite des données de sélectivité *in vitro* disponibles pour cet inhibiteur (Hoessel *et al.*, 1999; Leclerc *et al.*, 2001) (Figure 9) et nous avons donc cherché à expliquer les bases moléculaires de cette interaction. Pour cela, nous avons testé l'activité enzymatique de la GAPDH de source commerciale, en présence de concentrations croissantes d'indirubine. La GAPDH catalyse la réaction :

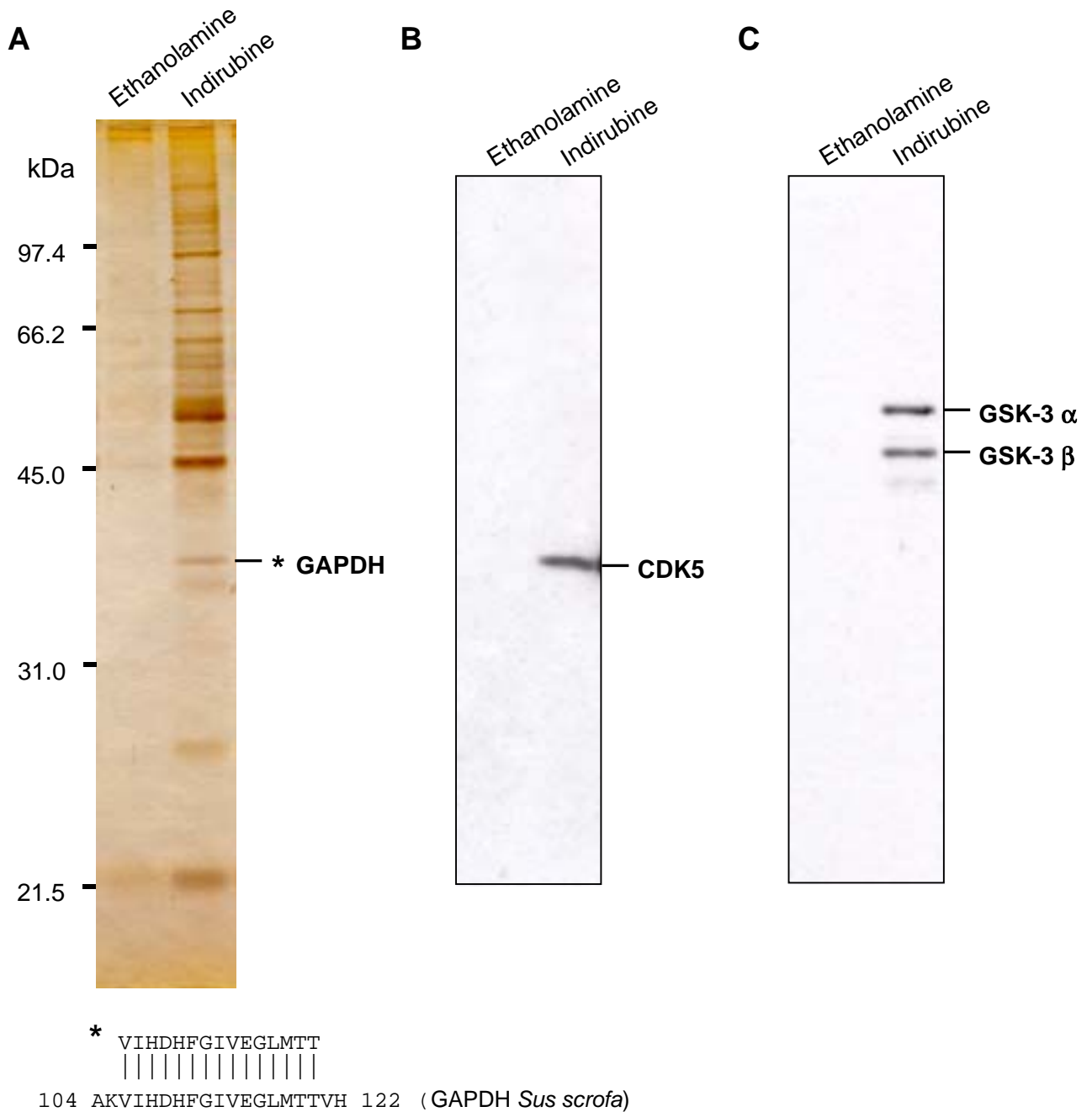


Les résultats présentés à la **figure 16** montrent que l'indirubine-3'-monoxime inhibe de manière dose-dépendante (mais à de fortes concentrations cependant) l'activité enzymatique de la GAPDH. Cette sensibilité de la GAPDH à l'indirubine est abolie lorsque le cofacteur de la réaction, le  $\text{NAD}^+$  est ajouté avant l'inhibiteur, ce qui suggère que l'inhibition pourrait être compétitive du  $\text{NAD}^+$ .



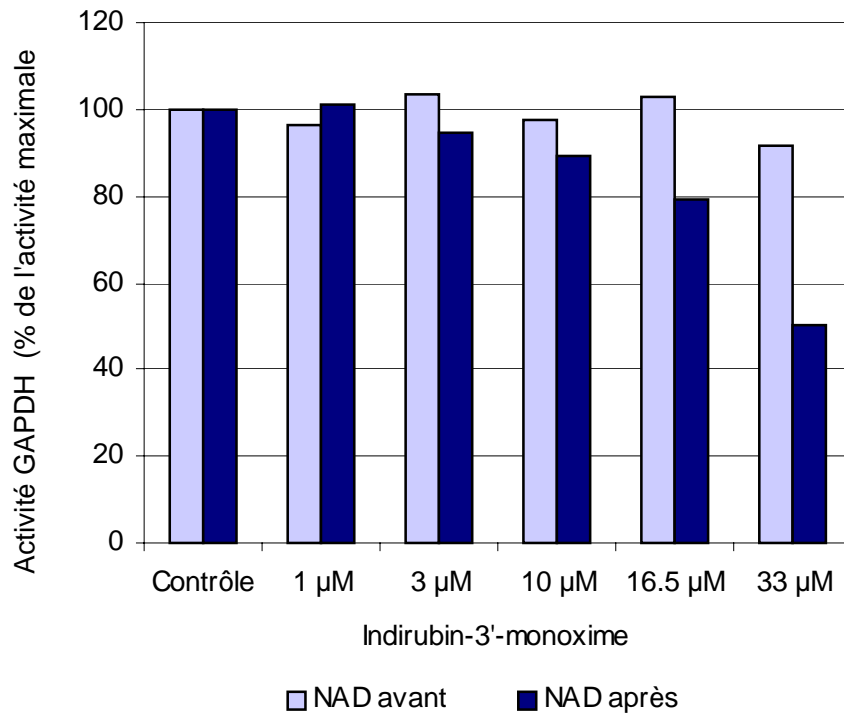
**Figure 14: Cibles intracellulaires de l'indirubine dans la lignée de fibroblastes de hamster CCL39**

Des extraits de cellules CCL39 ont été préparés puis incubés sur les billes d'indirubine ou d'éthanolamine (contrôle négatif). Les protéines retenues sur les matrices ont été éluées et séparées sur un gel SDS-PAGE 10%, puis analysées après coloration au nitrate d'argent (A) ou après un Western-blot en utilisant un anticorps anti-PSTAIRE (B).



**Figure 15: Cibles intracellulaires de l'indirubine dans le cerveau de porc**

Des extraits de cerveau de porc ont été préparés puis incubés sur les billes d'indirubine ou d'éthanolamine (contrôle négatif). Les protéines retenues sur les matrices ont été éluées et séparées sur un gel SDS-PAGE 10%, puis analysées après coloration au nitrate d'argent (**A**) ou après un Western-blot en utilisant un anticorps anti-CDK5 (**B**) ou anti-GSK-3  $\alpha/\beta$  (**C**). Une protéine observée après coloration à l'argent a ensuite été excisée du gel et microséquencée. La séquence peptidique de 15 acides aminés obtenue (\*) possède 100% d'identité avec la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) de porc, *Sus scrofa*.



**Figure 16: Effet de l'indirubine-3'-monoxime sur l'activité GAPDH**

L'activité GAPDH (dans le sens glycéraldéhyde-3-phosphate  $\Rightarrow$  1,3-diphosphoglycérate) a été mesurée en présence de différentes concentrations d'indirubine-3'-monoxime. Pour chaque concentration, l'activité a été mesurée dans deux conditions: lorsque le coenzyme NAD<sup>+</sup> (250 mM) est ajouté au milieu réactionnel avant l'inhibiteur et lorsqu'il est ajouté après l'inhibiteur. L'activité est présentée en pourcentage de l'activité maximale, sans inhibiteur.

### **B) Perspectives**

Les données présentées ici sur les cibles intracellulaires de l'indirubine ne constituent que des résultats préliminaires. Les expériences supplémentaires que nous envisageons de réaliser pour compléter cette étude seront présentées dans le chapitre **CONCLUSIONS-PERSPECTIVES** de ce manuscrit.

## Chapitre II

### p44/MAPK (Erk1) et p42/MAPK (Erk2) sont-elles des cibles intracellulaires du purvalanol ?

Article 3 : *“p42/p44 MAPKs are intracellular targets of the CDK inhibitor purvalanol”*

La chromatographie d'affinité sur inhibiteur immobilisé s'est révélée être une technique puissante pour identifier les cibles parfois inattendues des inhibiteurs de CDKs. Parmi ces cibles inattendues, la présence sur les billes de purvalanol des kinases p44 et p42 MAPKs dans un grand nombre de modèles a été étudiée plus en détail. Nous avons cherché à évaluer l'importance de l'interaction avec cette cible dans les effets cellulaires du purvalanol.

## **1- Présentation des principaux résultats**

### **A) Effets cellulaires du purvalanol**

La lignée cellulaire de fibroblastes de hamster CCL39 a été utilisée comme modèle d'étude pour caractériser les effets antiprolifératifs du purvalanol. Lorsqu'il est ajouté à des cellules en phase de croissance exponentielle, le composé inhibe la prolifération des cellules avec une  $GI_{50}$  de 2.5  $\mu$ M et provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, sans induire d'apoptose massive. En revanche, sur des cellules sevrées par retrait du sérum et re-stimulées par addition de sérum, le purvalanol induit un blocage du cycle cellulaire en phase G1 et empêche les cellules de re-renter dans le cycle cellulaire.

### **B) Cibles intracellulaires du purvalanol**

#### 1) Chromatographie d'affinité

Au cours de ce travail de thèse, la technique de chromatographie d'affinité a permis de mettre en évidence dans de nombreux types cellulaires, une interaction entre les p42/p44 MAPKs et le purvalanol. Dans la lignée cellulaire humaine MCF-7, p42/MAPK (Erk2) est même la protéine majoritaire retenue sur la matrice.

Afin de vérifier que l'interaction avec p42/MAPK n'est pas une spécificité de la lignée MCF-7, la présence sur les billes de purvalanol des MAPKs ainsi que celle de CDK1 a été étudiée dans 4 autres lignées cellulaires (dont la lignée CCL39). Les résultats obtenus confirment que CDK1 et p42/p44MAPK interagissent avec les billes de purvalanol dans ces différentes lignées cellulaires.

### 2) Validation des cibles par le test en système cellulaire

Nous avons ensuite entrepris de valider ces résultats de chromatographie d'affinité en vérifiant si les kinases p42/p44 MAPKs et CDK1 étaient réellement inhibées dans la cellule, en réponse à un traitement au purvalanol. L'activité des kinases a été mesurée de manière indirecte, en mesurant une conséquence ou un phénomène dépendant de l'activité des kinases. En effet, la lyse cellulaire nécessaire à la mesure directe de l'activité kinase pourrait décrocher de ses cibles une partie de l'inhibiteur. Pour évaluer l'activité CDK1, la phosphorylation de la nucléoline a été suivie à l'aide d'un anticorps qui ne reconnaît la nucléoline que lorsqu'elle est phosphorylée par CDK1/cycline B (Dranovsky *et al.*, 2001). L'activité p42/p44 MAPKs a été évaluée par deux méthodes différentes : (1) en mesurant la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription Elk à l'aide d'un système rapporteur (2) en étudiant par immunofluorescence la localisation sub-cellulaire de MAPK, un phénomène sous la dépendance de la voie MAPK (Lenormand *et al.*, 1998).

Le traitement des cellules au purvalanol inhibe de manière dose-dépendante l'activité CDK1 ainsi que l'activité p42/p44 MAPK. Ces résultats valident les données obtenues par la technique de chromatographie d'affinité et démontrent que CDK1 et p42/p44 MAPK sont

effectivement des cibles du purvalanol dans la cellule. Les effets cellulaires du purvalanol sont donc probablement médiés par l'inhibition conjointe des CDKs et des MAPKs.

### **C) Article 3**

### Article 3:

**Knockaert, M.**, Lenormand, P., Gray, N., Schultz, P., Pouyssegur, J. and Meijer, L. (2002). p42/p44 MAPKs are intracellular targets of the CDK inhibitor purvalanol. **Oncogene 21**, 6413-6424.

### ABSTRACT

Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases (CDKs) have a great therapeutic potential against various proliferative and neurodegenerative disorders. Intensive screening of a combinatorial chemistry library of 2,6,9-trisubstituted purines has led to the identification of purvalanol, one of the most potent and selective CDK inhibitor to date. In preliminary studies, this compound demonstrates definite anti-mitotic properties, consistent with its nanomolar range efficiency towards purified CDK1 and CDK2. However, the actual intracellular targets of purvalanol remain to be identified, and a method for the determination of its *in vivo* selectivity was developed. In this technique, cells extracts were screened for purvalanol-interacting proteins by affinity chromatography on immobilized inhibitor. In addition to CDK1, p42/p44 MAPK were found to be two major purvalanol-interacting proteins in five different mammalian cell lines (CCL39, PC12, HBL100, MCF-7 and Jurkat cells), suggesting the generality of the purvalanol/p42/p44 MAPK interaction. The Chinese hamster lung fibroblast cell line CCL39 was used as a model to investigate the anti-proliferative properties of purvalanol. The compound inhibited cell growth with a  $GI_{50}$  value of 2.5  $\mu$ M and induced a G2/M block when added to exponentially growing cells. It did not appear to trigger massive activation of caspase. We next tested whether CDKs and p42/p44 MAPK were actually targeted by the compound *in vivo*. p42/p44 MAPK activity was visualized using an Elk-Gal4 luciferase reporter system and CDK1 activity was detected by the phosphonucleolin level. When cells were treated with purvalanol, p42/p44 MAPK and CDK1 activities were inhibited in a dose-dependent manner. Furthermore, purvalanol inhibited the nuclear accumulation of p42/p44 MAPK, an event dependent on the catalytic activity of these kinases. We conclude that the anti-proliferative properties of purvalanol are mediated by inhibition of both p42/p44 MAPK and CDKs. These observations highlight the potency of moderate selectivity compounds and encourage the search for new therapeutics which simultaneously target distinct but relevant pathways of cell proliferation.

## Chapitre III

### Applications de la technique de chromatographie d'affinité sur inhibiteur immobilisé à d'autres problématiques

#### **1- Effet des purines sur la réplication virale *in vitro*: article 4**

*“Specificity and antiviral effects of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors against wild-type and drug-resistant strains of HSV and HIV-1”*

##### **A) Introduction au travail de recherche**

###### **1) Le virus de l'herpes simplex**

Les herpes simplex virus (HSV) sont des virus à ADN appartenant à la famille des Herpesviridae. Huit virus de l'herpès ont été identifiés chez l'homme : les virus de l'herpes simplex type 1 et type 2, le virus de la varicelle et du zona, le virus d'Epstein Barr (à l'origine de la mononucléose), le cytomégalovirus (HCMV) et les 6<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> herpesvirus humains. Les virus les plus fréquents sont herpes simplex 1 (HSV-1) et herpes simplex 2 (HSV-2) et ils se manifestent par des lésions cutanées dont la localisation dépend du type de virus. Le premier (HSV-1) est responsable de l'herpès labial, communément appelé "bouton de fièvre", et plus globalement de la majorité des herpès situés au dessus de la taille. Le HSV-2 correspond quant à lui à l'herpès génital et fait partie des maladies sexuellement transmissibles. L'espèce humaine en est le seul réservoir; la transmission est inter-humaine et peut se faire :

- par contact direct avec des lésions herpétiques ou des sécrétions contaminées, lors d'un rapport sexuel pour l'herpès génital, et par un simple baiser pour l'herpès labial.

- par "auto-contamination" ou "auto-inoculation". La personne porteuse du virus peut contaminer un autre endroit de son corps par l'intermédiaire de ses doigts.

Après la primo-infection, même si aucune lésion ne subsiste, le virus reste latent dans l'organisme. Sous certaines conditions (fièvre, stress, fatigue, exposition au soleil, règles), le virus en latence peut se réactiver et provoquer des récurrences, en général au même endroit que la première fois. Ce sont les poussées d'herpès dont la fréquence et l'intensité varient d'une personne à l'autre. A l'heure actuelle, il n'existe pas de vaccin pour lutter contre l'herpès. Les médicaments disponibles (Aciclovir principalement) ciblent la réplication d'ADN viral et ne sont donc pas efficaces sur les virus latents (dont l'ADN ne se réplique pas), mais permettent un traitement curatif des résurgences virales.

### 2) Rôles des CDKs dans la réplication virale

Actuellement, les drogues antivirales sont conçues pour cibler des protéines virales, afin de garantir une bonne spécificité d'action et de limiter la toxicité. Cependant, cette stratégie thérapeutique est souvent à l'origine de l'émergence de souches virales résistantes, qui tiennent en échec les thérapeutiques classiques. La mise au point de médicaments antiviraux qui ciblent des protéines cellulaires nécessaires à la réplication virale pourrait être une alternative de choix à cette limitation.

Depuis quelques années, différents groupes s'intéressent aux liens qui existent entre les régulateurs du cycle cellulaire et la réplication virale. En particulier, des études ont mis en évidence une augmentation de l'activité CDK lors de l'infection par le cytomegalovirus humain (Bresnahan *et al.*, 1997; Bresnahan *et al.*, 1996; Jault *et al.*, 1995), par HSV-1 (Advani *et al.*, 2000) et par HSV-2 (Hossain *et al.*, 1997). En outre, deux études montrent que la protéine virale Tat de HIV-1 est capable de s'associer à CDK9 (Zhu *et al.*, 1997) ainsi qu'à la cycline T (Wei *et al.*, 1998) et que le complexe CDK9/cycline T pourrait être impliqué dans la transcription des gènes viraux de HIV-1 médiée par Tat. Ces différents travaux

suggèrent que l'activité de CDKs cellulaires serait nécessaire à la réplication de ces virus. Cette hypothèse a été confortée plus récemment par des expériences dans lesquelles des inhibiteurs chimiques de CDKs ont été employés pour inhiber la réplication virale *in vitro*. Bresnahan et coll. ont mis en évidence que la roscovitine et l'olomoucine inhibent efficacement la réplication du cytomegalovirus humain (Bresnahan *et al.*, 1997). La transcription des gènes du HIV -1 est sensible à plusieurs classes d'inhibiteurs chimiques de CDKs dont la roscovitine et le flavopiridol (Chao *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 1999; Mancebo *et al.*, 1997; Nelson *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). Enfin, les inhibiteurs de CDKs appartenant à la famille des purines tri-substituées inhibent efficacement la réplication du virus HSV-1 en bloquant plusieurs fonctions virales simultanément : la réplication d'ADN viral et la transcription de gènes viraux (Jordan *et al.*, 1999; Schang *et al.*, 1998; Schang *et al.*, 1999; Schang *et al.*, 2000). L'ensemble des données disponibles sur les propriétés antivirales des inhibiteurs de CDKs a récemment fait l'objet d'une revue de synthèse (Schang, 2001).

### 3) Mécanisme d'action des inhibiteurs de CDKs

Comment ces inhibiteurs de CDKs parviennent-ils à inhiber la réplication virale ? Est-ce en ciblant des protéines cellulaires ou des protéines virales ? Différents arguments soutiennent l'hypothèse que c'est en agissant sur les CDKs cellulaires et non sur des protéines virales.

- (1) Les concentrations d'inhibiteurs qui inhibent la réplication virale de HSV sont similaires à celles qui inhibent la progression dans le cycle cellulaire, une conséquence connue de l'inhibition des CDKs et ces concentrations dépendent du type cellulaire, et non de la souche virale (Schang *et al.*, 1999).
- (2) Même après une exposition prolongée aux inhibiteurs de CDKs, aucune souche virale de HSV-1 résistante à ces drogues n'a pu être isolée (Schang *et al.*, 2002; Schang *et al.*, 1998).

- (3) Les inhibiteurs de CDKs n'ont aucune action antivirale sur trois virus qui n'ont pas besoin des CDKs pour se répliquer : le HTLV (Human T-lymphotrophic virus), le LCMV (Lymphocytic choriomeningitis virus) et le virus de la vaccine (Flores *et al.*, 1999; Schang *et al.*, 2002).
- (4) La roscovitine et le purvalanol sont aussi actifs sur des souches sauvages de HSV-1 que sur des souches résistantes aux antiviraux traditionnels (Schang *et al.*, 2002)

Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Schang et le Dr Schaffer (Département de Microbiologie, Université de Pennsylvanie), nous avons utilisé la technique de chromatographie d'affinité sur inhibiteur immobilisé pour apporter des éléments de réponse à la question du mécanisme d'action des inhibiteurs de CDKs dans la réplication virale et en particulier de la nature (cellulaire ou virale) des cibles de ces composés. La caractérisation des effets anti-HSV des inhibiteurs de CDKs a été réalisée en utilisant les purines tri-sustituées olomoucine, roscovitine et purvalanol (Jordan *et al.*, 1999; Schang *et al.*, 1998; Schang *et al.*, 1999; Schang *et al.*, 2000), c'est pourquoi nous avons utilisé les billes de purvalanol pour mener cette étude.

### **B) Résultats de chromatographie d'affinité**

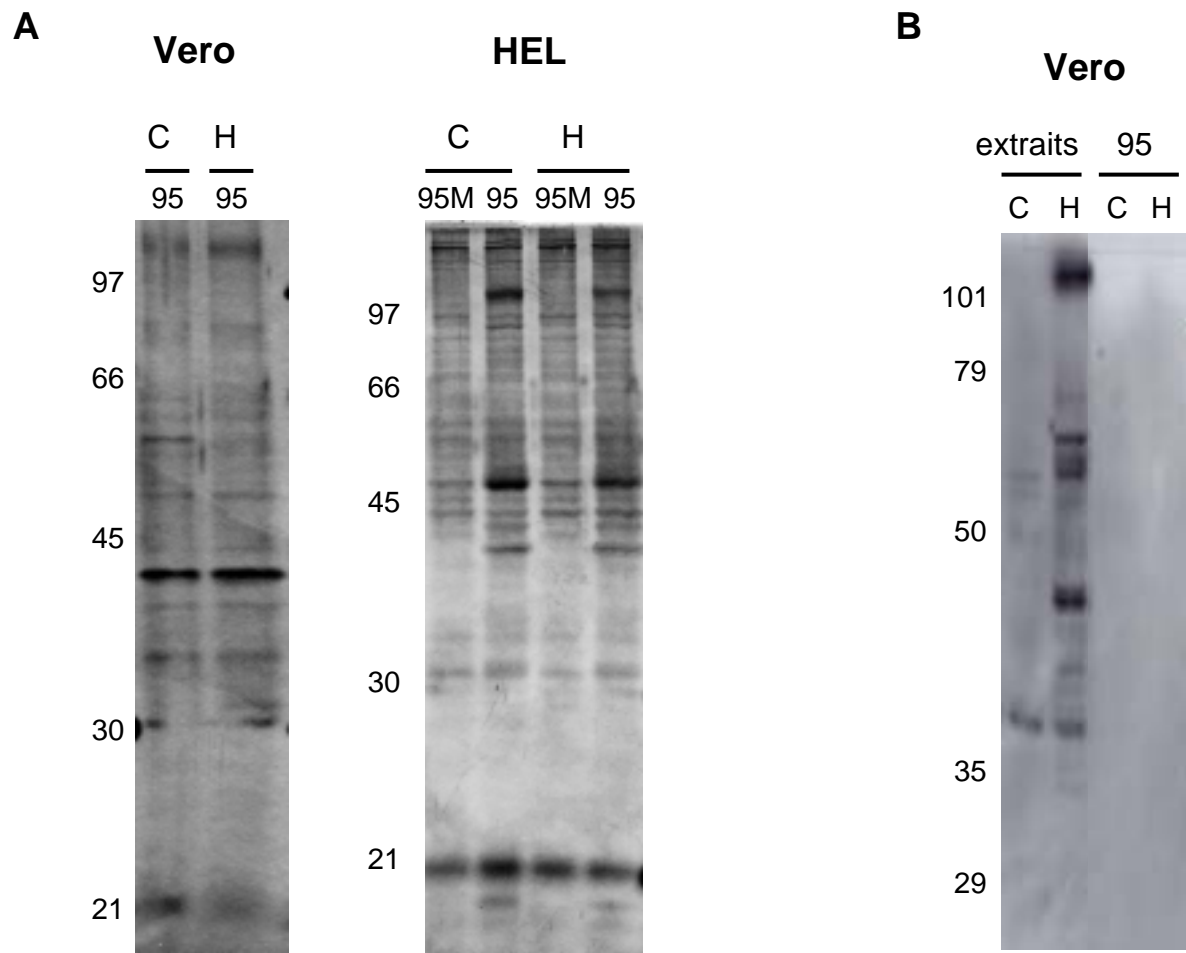
Des extraits de cellules infectées par HSV-1 ont été passés sur les billes de purvalanol et les profils des protéines retenues sur la matrice ont été comparés avec ceux obtenus pour les mêmes cellules non infectées (contrôle). Nous avons mené notre étude dans le but de répondre à deux questions : la première est de mettre en évidence l'éventuelle présence de protéines virales sur la matrice de purvalanol et la seconde d'identifier l'ensemble des protéines cellulaires interagissant avec la matrice à partir de la connaissance que nous en avons dans d'autres modèles.

### 1) Recherche de protéines virales sur la matrice de purvalanol

Si le purvalanol agit en inhibant à la fois des protéines cellulaires et virales, des protéines supplémentaires devraient être retenues sur les billes de purvalanol dans les cellules infectées par rapport aux cellules contrôles, non infectées. Les profils obtenus après passage de cellules infectées sur les billes de purvalanol ont donc été comparés à ceux obtenus pour des cellules non infectées. Pour cela, deux systèmes de détection ont été employés : les protéines "totales" retenues sur la matrice ont été révélées par coloration au nitrate d'argent (**Figure 17 A**) et la présence de protéines virales a également été examinée après western blot avec un anticorps polyclonal dirigé contre les protéines virales de HSV-1 (**Figure 17 B**). La matrice de méthyl-purvalanol a été utilisée en contrôle négatif.

Les résultats présentés à la **figure 17 A** montrent que dans les cellules Vero (gauche) comme dans les cellules HEL (droite), le même spectre de protéines est retenu sur les billes de purvalanol (95), dans les cellules infectées par HSV (H) et les cellules contrôle, non infectées (C). La coloration au nitrate d'argent des protéines retenues sur la matrice de purvalanol ne permet pas de détecter une bande présente sur la piste des cellules infectées et absente des contrôles. Parallèlement, nous avons réalisé sur les cellules Vero après passage sur les billes de purvalanol, un immunoblot avec un anticorps polyclonal dirigé contre les protéines virales de HSV-1 (**Figure 17 B**). Des extraits cellulaires de cellules Vero infectées et non infectées ont été utilisés comme témoins positif et négatif, respectivement. Aucune protéine retenue sur les billes de purvalanol n'est reconnue par l'anticorps anti-HSV-1.

A l'issue de ces résultats, aucune interaction entre le purvalanol et une protéine virale n'a pu être mise en évidence, ce qui suggère que les effets antiviraux du purvalanol sont probablement médiés par l'inhibition de protéines cellulaires et non virales.



**Figure 17: Recherche de cibles virales du purvalanol**

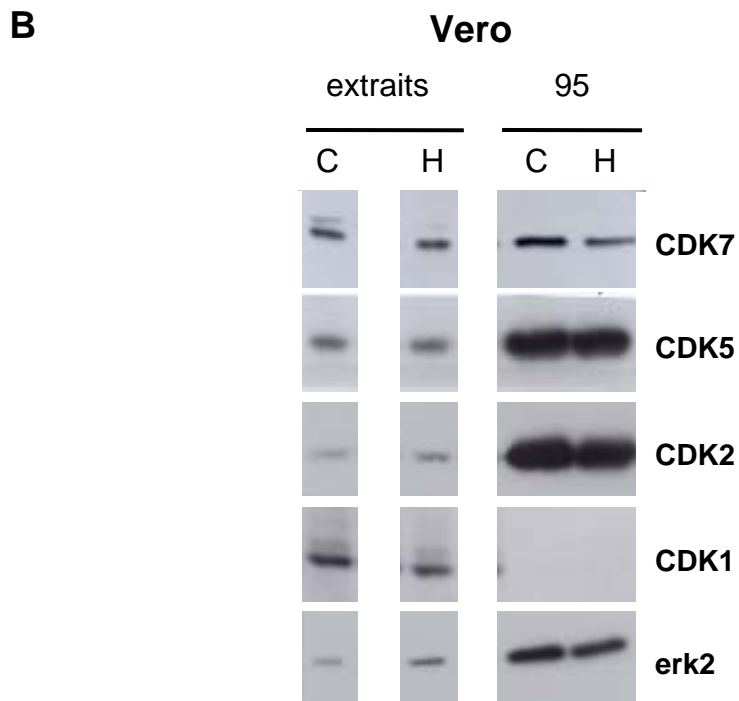
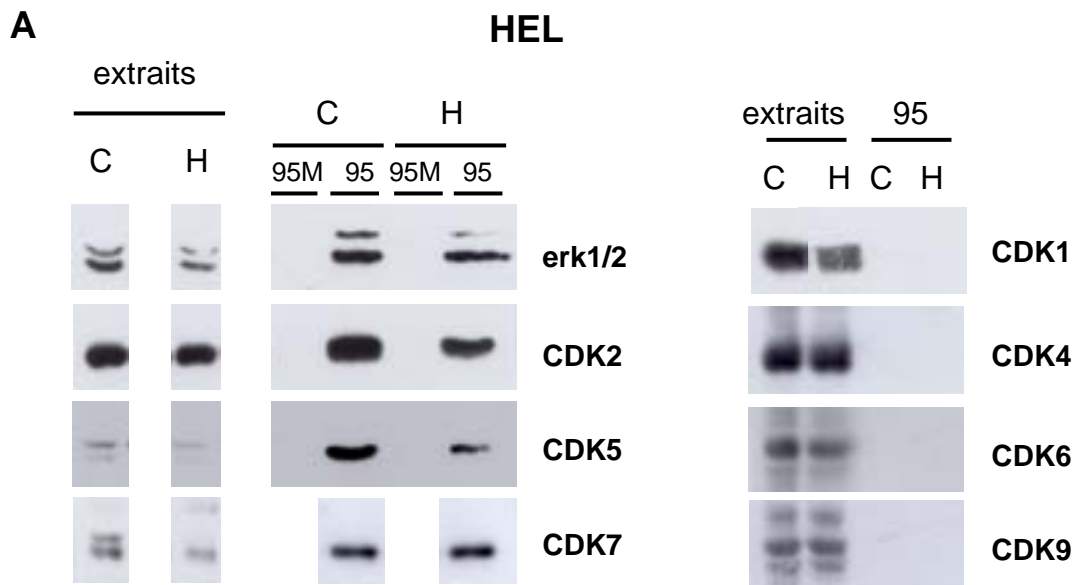
Des extraits de cellules infectées par HSV-1 (H) ou non infectées (C) ont été préparés à partir de cellules Vero et HEL puis incubés sur les billes de purvalanol (95) ou de méthyl-purvalanol (95M). Les protéines retenues sur les matrices ont été éluées et séparées sur un gel SDS-PAGE 10%, puis analysées après coloration au nitrate d'argent (**A**) ou après un Western-blot en utilisant un anticorps anti-HSV-1 dirigé contre les protéines virales de HSV-1 (**B**).

### 2) Analyse des protéines cellulaires retenues sur la matrice de purvalanol

Nous avons donc réalisé une deuxième série d'expériences pour identifier les protéines cellulaires retenues sur les billes de purvalanol. Nous avons testé la présence des cibles connues du purvalanol : Erk1/2, CDK1, CDK2, CDK5 déjà identifiées dans d'autres modèles ainsi que l'interaction du purvalanol avec 4 autres CDKs : CDK7 et CDK9 dont la sensibilité au purvalanol n'est pas connue et CDK4 et CDK6 qui sont insensibles au purvalanol (Gray *et al.*, 1998). Des extraits de cellules infectées par HSV (H) ou non infectées (C) ont été passés sur la matrice de purvalanol (95) et les protéines retenues ont été identifiées par Western blot avec des anticorps spécifiques. Pour chaque expérience, des extraits bruts de cellules infectées (H) ou non (C) ont été utilisés comme témoins positifs. Les résultats sont présentés à la **figure 18**.

Dans les cellules HEL (**Figure 18 A**), Erk1/2, CDK2 et CDK5 sont retrouvées spécifiquement sur la matrice de 95 (et absentes de la matrice de 95M), indépendamment de l'infection par HSV. En revanche, CDK1, pourtant une cible connue du purvalanol, n'est pas retenue sur les billes. Cette absence de fixation peut s'expliquer par le fait que seule la CDK1 active (déphosphorylée sur Thr14 et Tyr15) est capable de se fixer aux billes de 95 (article 1). Or, dans les conditions de notre expérience, les cellules sont récoltées en phase de croissance exponentielle et une très faible proportion d'entre elles est en phase M avec une CDK1 active. CDK7 est retrouvée sur la matrice de 95 dans les cellules infectées (H) comme dans les cellules contrôle (C) ce qui suggère que c'est une nouvelle cible intracellulaire du purvalanol. En revanche, CDK4, CDK6 et CDK9 ne se fixent pas aux billes.

A partir de ces résultats, l'étude des cibles intracellulaires du purvalanol a été réalisée dans les cellules Vero (**Figure 18 B**). Les résultats obtenus confirment que Erk2, CDK2, CDK5 et CDK7 sont retenues sur la matrice de purvalanol dans les cellules infectées comme



**Figure 18: Analyse des protéines cellulaires retenues sur la matrice de purvalanol**

Des extraits de cellules infectées par HSV-1 (H) ou non infectées (C) ont été préparés puis incubés sur les billes de purvalanol (95) ou de méthyl-purvalanol (95M). Les protéines retenues sur les matrices ont été éluées et séparées sur un gel SDS-PAGE 10%, puis analysées par Western-blot en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre Erk1/2, CDK1, CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK9. Pour chaque expérience, des extraits bruts ont été utilisés comme témoins positifs. (A) Cellules HEL (B) Cellules Vero.

dans les cellules contrôle. En revanche, CDK1 ne se fixe pas à la matrice, comme cela a déjà été observé pour les cellules HEL.

En conclusion, cette étude confirme que Erk1/2, CDK2 et CDK5 sont des cibles majoritaires du purvalanol dans la cellule et révèle CDK7 comme une nouvelle cible du composé, dont l'importance reste à étudier. Aucune différence n'a pu être notée entre les profils des cellules infectées par HSV-1 et des cellules non infectées, ce qui apporte un argument supplémentaire pour soutenir l'hypothèse que l'effet antiviral des inhibiteurs de CDKs est médié par leur interaction avec des protéines cellulaires et non virales.

### **C) Article 4**

#### **Article 4:**

Schang, L.M., Bantly, A., **Knockaert, M.**, Shaheen, F., Meijer, L., Malim, M.H., Gray, N.S. and Schaffer, P.A. (2002). Specificity and antiviral effects of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors against wild-type and drug-resistant strains of HSV and HIV-1. **J. Virol.** **76**(15), 7874-7882.

#### **ABSTRACT**

In studies designed to identify cellular proteins required for viral replication, we and others have shown that purine-derived pharmacological cdk inhibitors (P-PCIs) inhibit viral replication. Here we report that all proteins targeted by P-PCIs in virus-infected cells are cellular. Consistent with this finding, P-PCIs inhibited replication of two unrelated viruses, HSV and HIV-1, as well as drug-resistant strains of both viruses. Moreover, the anti-HSV effects of a P-PCI and a conventional antiviral drug, ACG, were additive. Because some PCIs are proving safe as anticancer drugs in human clinical trials, they may also serve as clinically useful antivirals. Importantly, PCIs would not be constrained by three intrinsic limitations of conventional antiviral drugs that target viral proteins: selection for drug resistant strains, narrow antiviral specificity and a limited number of potential molecular targets.

### 2- Effet des purines sur l'organe de Corti d'embryon de rat : article 5

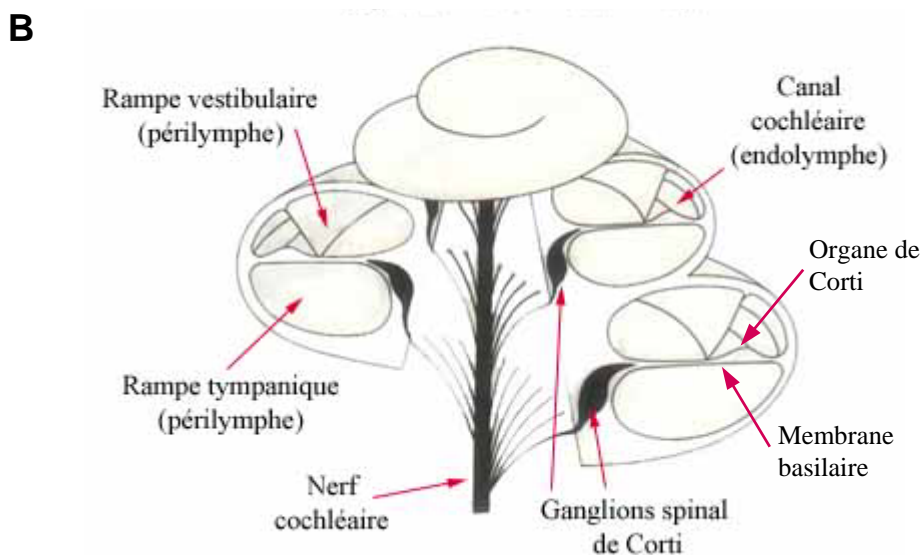
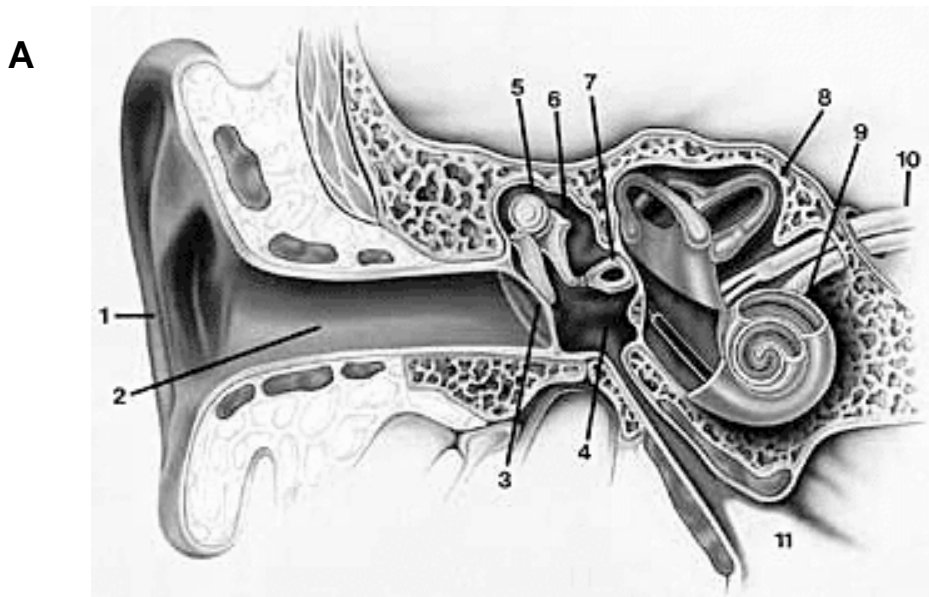
*"The kinase inhibitor roscovitine induces supernumerary hair cell and Deiters' cell differentiation in the developing organ of Corti"* (en préparation)

#### A) Introduction au travail de recherche

##### 1) Notions d'anatomie de l'oreille interne

L'oreille se compose d'une partie externe, d'une partie moyenne et d'une partie interne (**Figure 19**).

- L'oreille externe est formée du pavillon et du conduit auditif externe.
- L'oreille moyenne est constituée du tympan et de la chaîne des osselets (marteau, enclume, étrier).
- L'oreille interne est formée de deux organes sensoriels : le vestibule, qui est l'organe de l'équilibration et la cochlée, qui est l'organe de l'audition chez les mammifères. La cochlée est un tube enroulé sur lui-même sur 2 tours et demi de spires. La membrane basilaire divise ce tube en deux rampes : vestibulaire en haut et tympanique en bas et qui communiquent entre elles à l'apex. L'organe de Corti, ainsi nommé car Alfonso Corti fut l'un des premiers anatomistes à en faire une description détaillée en 1851, repose sur cette membrane basilaire. Il est composé de cellules sensorielles ou cellules ciliées, des fibres nerveuses qui leur sont connectées et des structures annexes ou de support. Dans l'organe de Corti, les cellules ciliées sont organisées en un rang de cellules internes et trois rangs de cellules externes (**Figure 20 A-C**).



**Figure 19: Anatomie de l'oreille interne**

**A. Coupe schématique de l'oreille humaine**

(1) Pavillon (2) Conduit auditif externe (3) Tympan (4) Oreille moyenne (5) Marteau (6) Enclume (7) Etrier (8) Vestibule (9) Cochlée (10) Nerf auditif

Source: <http://www.bien-entendre.ch>

**B. Coupe schématique de la cochlée**

Chez les mammifères, l'organe de l'audition, la cochlée, est un tube enroulé sur lui-même de deux tours et demi de spires. La membrane basilaire divise ce tube en deux rampes: vestibulaire en haut et tympanique en bas. L'organe de Corti repose sur cette membrane basilaire. Il contient des cellules sensorielles munies à leur surface de cils qui baignent dans l'endolymphe.

Lorsqu'un son est reçu par le tympan, il est transmis aux liquides de l'oreille interne par l'intermédiaire de la chaîne des osselets. Les vibrations liquidiennes générées par le son provoquent des mouvements au niveau des cils des cellules sensorielles de l'organe de Corti, qui les transforme en influx nerveux ensuite transmis aux centres cérébraux par le nerf auditif.

Source: <http://www.medecine-et-santé.com/anatomie/anatoreille.html>

L'arrivée d'un son provoque des vibrations au niveau du tympan. Ces vibrations sont retransmises à la chaîne des osselets, qui les amplifie et les communique aux liquides de l'oreille interne. Les vibrations liquidiennes transmises à la membrane basilaire sont transformées par les cellules sensorielles de l'organe de Corti en influx nerveux transmis aux centres cérébraux par le nerf auditif.

### 2) La régénération des cellules ciliées, un défi pour le traitement des surdités de perception ?

A l'âge adulte, les mammifères sont incapables de régénérer de nouvelles cellules ciliées dans la portion auditive de l'oreille interne. Cette capacité de production de cellules ciliées s'arrête à la fin de la période de développement. La lésion des cellules ciliées de l'organe de Corti, causée par divers facteurs tels que des antibiotiques, des polluants, des sons d'intensité élevée, le vieillissement ou la formation de tumeurs, entraîne des déficits auditifs irréversibles. Leur traitement est limité aux techniques de suppléance de la fonction auditive (lecture labiale, langue des signes, prothèses auditives, implants cochléaires) mais à l'heure actuelle, aucun traitement permettant de restaurer la fonction auditive ne peut être proposé (Malgrange *et al.*, 1998).

Le laboratoire du Pr Moonen à l'Université de Liège s'est engagé dans une recherche qui a pour objectif d'induire la régénération des éléments cellulaires de la portion auditive de l'oreille interne (Malgrange *et al.*, 1998). Pour cela, il utilise des explants d'organe de Corti d'embryons de rat en culture pour explorer les potentialités régénératrices de l'oreille interne.

### 3) Effets cellulaires de la roscovitine sur la régénération des cellules ciliées de l'organe de Corti

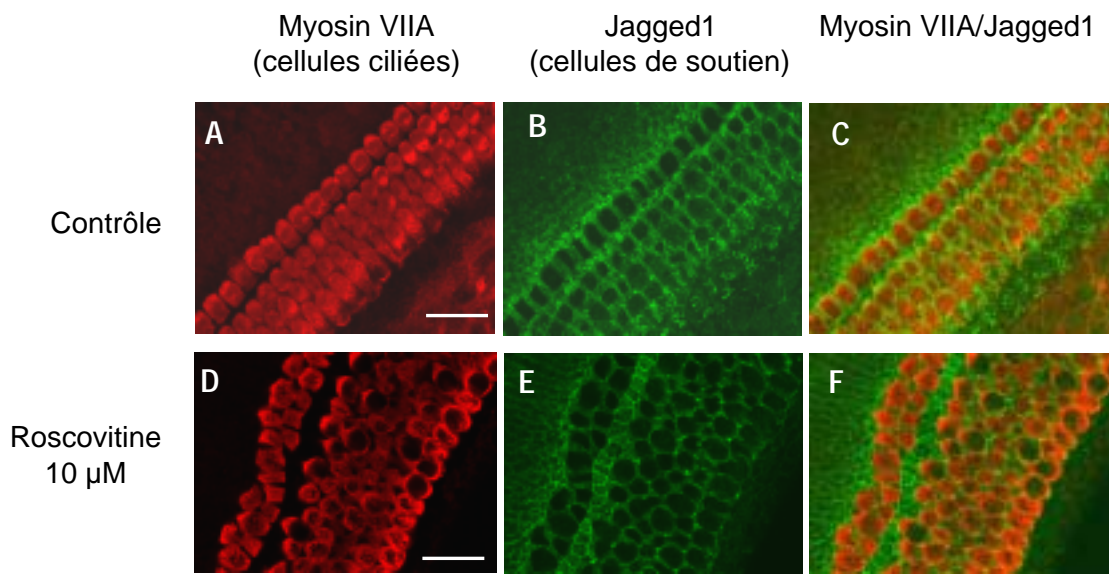
Récemment, l'équipe du Pr Moonen a mis en évidence que la roscovitine est capable d'induire de manière dose-dépendante la formation de cellules ciliées surnuméraires au niveau de l'organe de Corti d'embryon de rat en culture, en l'absence de toute lésion. En conditions normales, l'organe de Corti contient une rangée de cellules internes et trois rangées de cellules externes (**Figure 20 A-C**). En présence de roscovitine, l'apparition de cellules ciliées surnuméraires modifie cette organisation, et on observe deux rangées de cellules internes et 5 à 7 rangées de cellules externes (**Figure 20 D-F**). L'effet de la roscovitine est maximal après 5 jours de traitement, et limité dans le temps aux stades embryonnaires E17 (embryon de 17 jours) à E19 (embryon de 19 jours). A partir du stade de développement P0 (jour de la naissance), les cellules ciliées de l'organe de Corti en culture deviennent insensibles à la roscovitine.

Outre la roscovitine, l'olomoucine et l'aminopurvalanol, sont également capables d'induire la production de cellules surnuméraires et leur efficacité est proportionnelle à leur potentiel inhibiteur sur les kinases purifiées : l'aminopurvalanol est plus efficace que la roscovitine, elle-même plus efficace que l'olomoucine, tant pour l'inhibition des kinases *in vitro* que pour l'induction des cellules ciliées surnuméraires. En outre, d'autres inhibiteurs de CDKs appartenant à des familles chimiques distinctes de la roscovitine induisent également la production de cellules ciliées surnuméraires.

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr Moonen, nous avons étudié l'expression et l'activité de CDK1/CDK2 ainsi que les cibles intracellulaires du purvalanol dans des organes de Corti de rat aux stades E19 et P0.

### **B) Résultats de chromatographie d'affinité**

Pour cette étude, nous avons travaillé sur deux types de préparations d'organes de Corti, les explants qui correspondent à des organes de Corti *ex vivo*, c'est à dire directement



**Figure 20: Effet de la roscovitine sur l'organisation des cellules de l'organe de Corti d'embryon de rat au stade E19 (embryon de 19 jours)**

Des explants d'organes de Corti d'embryons de rats (stade E19) ont été maintenus en culture pendant cinq jours dans un milieu contrôle (A-C) ou dans un milieu contenant 10  $\mu$ M roscovitine (D-F). L'expression de la myosine VIIA (A et D) (spécifique des cellules ciliées) et de Jagged 1 (B et E) (spécifique des cellules de soutien) a été étudiée par immunofluorescence.

En l'absence de roscovitine, les cellules ciliées de l'organe de Corti sont organisées en une rangée de cellules internes et trois rangées de cellules externes. Après traitement à la roscovitine, cette organisation est perturbée, on observe deux rangées de cellules internes et cinq à sept rangées de cellules externes.

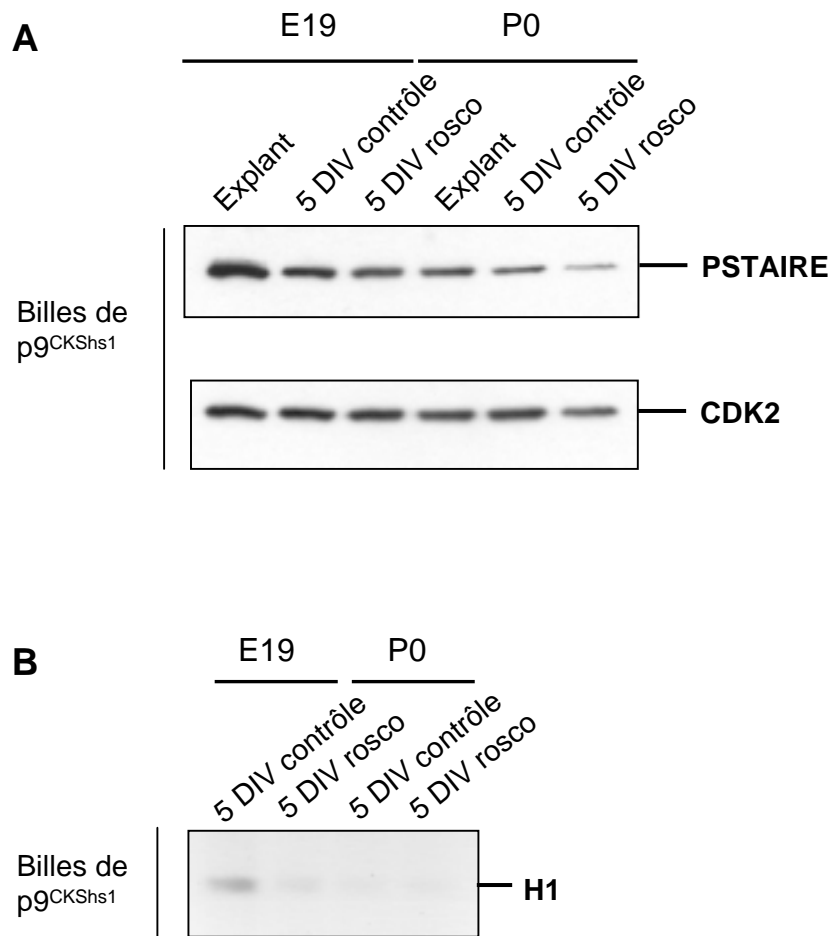
Echelle: 10  $\mu$ M

congelés après dissection et les cultures qui correspondent à des organes de Corti maintenus en culture pendant 5 jours après la dissection. Pour les cultures d'organes de Corti, deux conditions ont été comparées : en absence de roscovitine et en présence de 10  $\mu\text{M}$  roscovitine, condition dans laquelle l'obtention de cellules ciliées surnuméraires est observée. En outre, ces préparations ont été comparées à deux stades de développement embryonnaire différents : E19 (stade auquel la roscovitine induit des cellules surnuméraires) et P0 (stade auquel la roscovitine n'est plus capable d'induire des cellules ciliées surnuméraires).

### 1) Expression et activité de CDK1 et CDK2

Des extraits d'explants et de cultures traitées ou non avec 10  $\mu\text{M}$  de roscovitine ont été préparés et purifiés sur billes de  $\text{p9}^{\text{CKShs1}}$ , permettant ainsi de purifier en conditions non-dénaturantes CDK1, CDK2 ainsi que les protéines qui leur sont associées, comme décrit précédemment (Borgne & Meijer, 1996). L'expression de CDK1 et CDK2 est évaluée par Western blot en utilisant un anticorps anti-PSTAIRE qui reconnaît l'épitope conservé entre CDK1, CDK2 et CDK3, et l'expression de CDK2 seule est évaluée avec un anticorps anti-CDK2. Les résultats (**Figure 21 A, haut**) montrent que le niveau de CDK1/CDK2 chute légèrement entre les stades E19 et P0 pour chacune des conditions testées (explants, cultures avec et sans roscovitine). En revanche, le niveau de CDK2 reste constant (**Figure 21 A, bas**), ce qui suggère que la légère diminution d'expression détectée par l'anticorps anti-PSTAIRE est majoritairement due à une diminution de l'expression de CDK1 entre les stades E19 et P0.

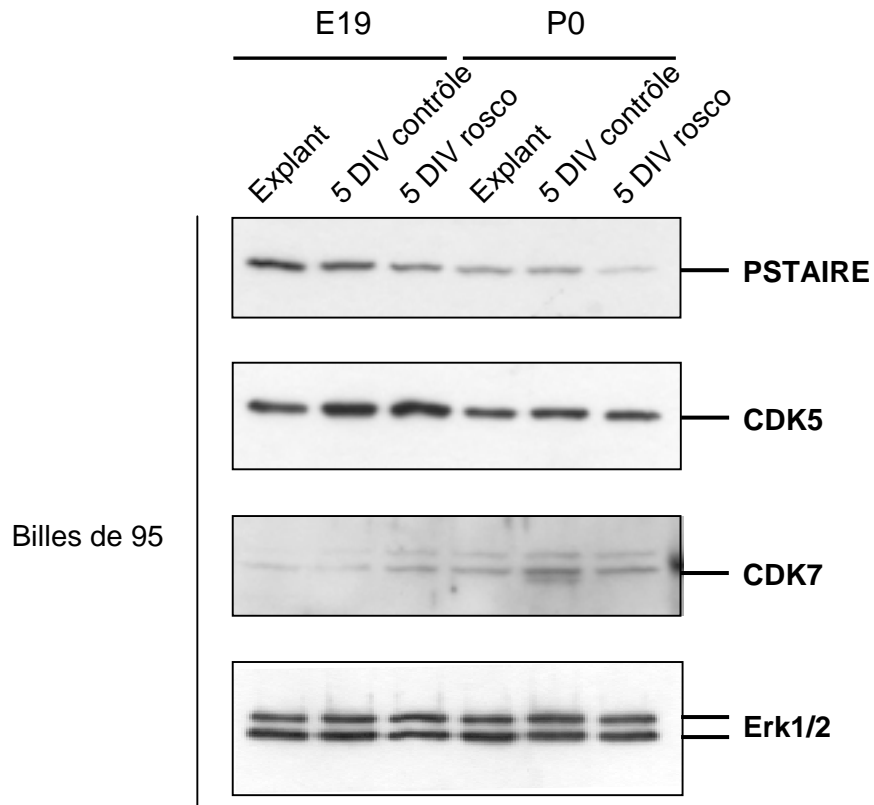
L'activité kinase de CDK1 et CDK2 a également été mesurée dans des cultures d'organes de Corti aux stades E19 et P0 (**Figure 21 B**). Comme l'expression protéique, l'activité CDK1/CDK2 mesurée sur les billes de  $\text{p9}^{\text{CKShs1}}$  diminue entre les stades E19 et P0,



**Figure 21: Expression et activité de CDK1 et CDK2 dans l'organe de Corti d'embryons de rats aux stades E19 (embryon de 19 jours) et P0 (jour de la naissance).**

**A. Expression de CDK1 et CDK2.** L'expression de CDK1 et CDK2 a été analysée dans des organes de Corti d'embryons de rats au stades E19 et P0. Pour chaque stade, différentes préparations ont été analysées: des explants (explant) et des cultures traitées (5DIV roscov) ou non traitées (5DIV contrôle) avec 10  $\mu\text{M}$  de roscovitine. Après purification sur billes de p9<sup>CKShs1</sup>, l'expression de CDK1 et CDK2 a été analysée par Western blot en utilisant un anticorps anti-PSTAIRE (haut) et un anticorps anti-CDK2 (bas).

**B. Activité de CDK1 et CDK2.** Des organes de Corti (E19 et P0) maintenus en culture pendant 5 jours, en présence (5DIV roscov) ou en l'absence de 10  $\mu\text{M}$  roscovitine (5DIV contrôle) ont été lysés puis incubés sur les billes de p9<sup>CKShs1</sup>. Le dosage d'activité kinase a été réalisé en utilisant l'histone H1 comme substrat et en présence de 15  $\mu\text{M}$  ATP. La réaction est stoppée par l'ajout de 40  $\mu\text{l}$  de tampon Laemmli et les échantillons sont séparés sur gel de polyacrylamide. L'activité kinase est ensuite évaluée par autoradiographie.



**Figure 22: Cibles intracellulaires du purvalanol dans l'organe de Corti**

Des organes de Corti préparés comme à la figure 21A ont été lysés puis incubés sur les billes de purvalanol (95). Les protéines retenues ont ensuite été séparées sur SDS-PAGE 10% et analysées avec des anticorps spécifiques: anti-PSTAIRE, anti-CDK5, anti-CDK7 et anti-Erk1/2.

pour devenir indétectable au stade P0. Les résultats montrent également que le traitement à la roscovitine inhibe efficacement l'activité kinase CDK1/CDK2 détectée au stade E19.

### 2) Cibles intracellulaires du purvalanol dans l'organe de Corti

Enfin, pour tenter de mieux comprendre l'apparition de cellules surnuméraires provoqué par la roscovitine et les autres inhibiteurs de CDKs, nous avons entrepris d'identifier les cibles intracellulaires du purvalanol dans l'organe de Corti. Des explants et des cultures ont été purifiés sur la matrice de purvalanol et nous avons cherché à détecter la présence de CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 et Erk1/2, à l'aide d'anticorps spécifiques (**Figure 22**). Toutes ces kinases sont retrouvées sur la matrice, suggérant qu'elles sont toutes capables d'interagir avec le purvalanol dans la cellule, comme cela a déjà été observé dans d'autres modèles. Mais parmi ces kinases, quelle est celle (ou quelles sont celles), dont l'inhibition est susceptible d'expliquer l'effet observé ? Etant donné que l'inhibiteur de la voie MAPK U0126 ne provoque pas l'apparition de cellules ciliées surnuméraires (article 5), il est assez peu probable que Erk1/2 soient les cibles de la roscovitine, dont l'inhibition est responsable de l'effet observé. De même, comme la quantité de CDK7 semble augmenter entre E19 et P0 et que la roscovitine n'a plus d'effet à P0, il est assez peu probable que CDK7 soit cette cible, même si on ne peut pas l'exclure totalement. A ce stade de l'étude, CDK1, CDK2, et CDK5 restent des candidates sérieuses. Des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour déterminer laquelle (ou lesquelles) est (sont) responsable(s) de l'apparition de cellules surnuméraires. La présence d'une cible non identifiée de la roscovitine n'est pas non plus exclue.

### **C) Article 5**

# The kinase inhibitor roscovitine induces differentiation of supernumerary hair cells and Deiters' cells in the developing organ of Corti

(Article en préparation, version non définitive)

Brigitte MALGRANGE<sup>1</sup>, Marie KNOCKAERT<sup>3</sup>, Shibeshih BELACHEW<sup>1,2</sup>, Noah F. SHROYER<sup>4</sup>, Laurent NGUYEN<sup>1</sup>, Huda ZOGHBI<sup>4</sup>, Gustave MOONEN<sup>1,2</sup>, Laurent MEIJER<sup>3</sup> and Philippe P. LEFEBVRE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center for Cellular and Molecular Neurobiology, <sup>2</sup>Department of Neurology, University of Liège, B-4000, Liège, Belgium; <sup>3</sup>CNRS, Station Biologique, Roscoff, Bretagne, France; <sup>4</sup>Howard Hughes Medical Institute, Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA.

**Running title:** Cochlear hair cells differentiation by roscovitine

**Corresponding author:** Brigitte Malgrange, Center for Cellular and Molecular Neurobiology, University of Liège, 17 Place Delcour, B-4020 Liège, Belgium  
Tel.: (32) 43 66 59 18; Fax: (32) 43 66 59 12; e-mail: <[bmalgrange@ulg.ac.be](mailto:bmalgrange@ulg.ac.be)>

**Key words:** organ of Corti, cochlea, cyclin-dependent kinase, MAP-kinase, 2,6,9-trisubstituted purines, kinase inhibitor, roscovitine

**Abbreviations:** CDK, cyclin-dependent kinases; CKIs, cyclin-dependent kinase inhibitors; DIV, days *in vitro*; HC, sensory hair cells; SC, non sensory supporting cells

**Acknowledgments** We thank P. Ernst, M. Wouters and A. Brose for their technical assistance. This work was supported by the National Fund for Scientific Research of Belgium, the Queen Elisabeth Medical Foundation of Belgium. We thank Pr. Tama Hasson (Department of Biology, UCSD, USA) for providing anti-myosin VIIA antibody and Dr. N. Gray for providing the purvalanol affinity reagent. M.K. and L.M. are supported by grants from the "Conseil Regional de Bretagne" and the "Association pour la Recherche sur le Cancer". B.M. is a research associate and S. B. is a postdoctoral researcher of the FNRS.

## SUMMARY

Development of the organ of Corti, the auditory sense organ of mammals, involves the differentiation of sensory hair cells (HC) (inner and outer) and non sensory supporting cells (SC) including Deiters' cells, pillar cells, inner phalangeal cells, tectal cells and Hensen's cells. Each of these cell types has a distinct morphology that contributes to the complex structural and functional properties of the organ of Corti. In mammals, embryonic HCs and SCs proliferation within the sensory epithelia culminates between embryonic day 13 (E13) and 15 (E15) in mice, but neonatal HC production never occurs under normal conditions. Loss of HCs results in loss of auditory functions and is observed in 70% of human deafness. Studies of how HCs production is controlled during development is crucial towards understanding the causes of deafness or attempting to induce HC regeneration.

In this study, we have investigated the involvement of cell cycle regulatory molecules in HC and SC differentiation of embryonic day 19 (E19) rat organ of Corti. E19 rat organ of Corti is a good model of HC and SC differentiation since culturing these explants results in the spontaneous appearance of supernumerary HCs and SCs via differentiation of Hensen's cells in 10% of the explants regions. Here, we report that roscovitine, a selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases CDK1, CDK2 and CDK5 and, to a lesser extent, of Erk1/Erk2, induces supernumerary HCs and SCs in E19 rat organ of Corti after 5 days *in vitro* (DIV) in a manner significantly greater than in control cultures. The effect of roscovitine is dose-dependant and maximal after 5 days in culture. Other structurally unrelated CDK inhibitors also induce supernumerary HCs and SCs. Organs of Corti at later developmental stages are insensitive to roscovitine. We also show that CDK2 is specifically expressed in Hensen's cells and that the effect of roscovitine is accompanied by a reduction of CDK1/2 activity. These results suggest that some pharmacological kinase inhibitors may have a direct inducing effect on the differentiation of HCs and SCs from yet to be identified stem cells.

## INTRODUCTION

Development of the organ of Corti, the auditory sense organ of mammals, involves the differentiation of sensory hair cells (HC) (inner and outer) and non sensory supporting cells (SC) including Deiters' cells, pillar cells, inner phalangeal cells, tectal cells and Hensen's cells (Figure 1). Each of these cell types has a distinct morphology that contributes to the complex structural and functional properties of the organ of Corti. Production of new HCs occurs throughout life in the auditory and vestibular sensory receptor of fishes and amphibians (Corwin, 1985) and in the vestibular receptors of birds (Jorgensen and Mathiesen, 1988; Roberson *et al.*, 1992). In contrast, ongoing production of auditory HCs during post-embryonic life does not appear to occur in avian auditory sensory epithelium, although HCs lost after sound trauma- or ototoxin-induced death are replaced (Corwin and Cotanche, 1988; Ryals and Rubel, 1988). In mammals, embryonic HCs and SCs proliferation within the sensory epithelia culminates between embryonic day 13 (E13) and 15 (E15) in mice (Ruben, 1967). Neonatal HC production never occurs under normal conditions.

In higher eucaryotes, the commitment to cellular differentiation is controlled by series of strictly regulated steps, each requiring specific signals for survival and simultaneous loss of proliferative potential. The decision to proliferate or differentiate is made during the G1 phase of the cell cycle by the interaction of G1 cyclins, cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK inhibitors. The D-cyclins and CDK4 form complexes, the activity of which is detectable at mid-G1 and increases as cells approach the G1-S transition (Matsushime *et al.*, 1992; Baldin *et al.*, 1993). Cyclin E associates with CDK2 and induces maximal kinase activity at the G1-S transition (Dulic *et al.*, 1992; Ekholm and Reed, 2000). In addition, cyclin A expression peaks at G1-S boundary and accumulates in early S phase, activating both CDK1 and CDK2 (Pagano *et al.*, 1992; Ohnuma *et al.*, 2001). CDK activity is regulated by multiple mechanisms, including 1) covalent modifications of the CDK catalytic and cyclin regulatory subunits (and the activity of corresponding stimulatory or inhibitory kinases and phosphatases), 2) the relative abundance of the activating cyclin partner, 3) the intracellular localization of the CDK/cyclin complex, 4) the binding of negative protein regulators, collectively referred to as CKIs, cyclin-dependent kinase inhibitors. Two classes of these CKIs have been identified: the INK4 family which are specific inhibitors of cyclin D-associated CDKs (CDK4 and CDK6), and the Cip/Kip family including p21, p27, and p57, which inhibit all types of CDK/cyclin complexes (Sherr and Roberts, 1995; Sherr and Roberts, 1999). Cip/Kip proteins have been implicated as critical terminal effectors of the signal transduction pathway that controls cell differentiation. p27<sup>KIP1</sup>, which specifically inhibits CDK2, 4 and 6, has been shown to be an essential mediator of oligodendrocyte terminal differentiation (Durand *et al.*, 1997). p27<sup>KIP1</sup> expression is induced in the primordial organ of Corti between E12 and E14, correlating with the cessation of cell division of HCs' and SCs' progenitors (Chen and Segil, 1999). In wild-type animals, p27<sup>KIP1</sup> expression is down-regulated during subsequent HC differentiation, but persists at high levels in differentiated SCs of the mature organ of Corti. In mice with a targeted deletion of the p27<sup>KIP1</sup> gene, ongoing cell

proliferation occurs in postnatal organ of Corti at time points well after the normal cessation of mitosis, leading to the appearance of supernumerary HCs and SCs (Chen and Segil, 1999; Lowenheim *et al.*, 1999). Ectopic expression of CDK2, but not CDK4 or any of the cyclin, inhibits NGF-mediated neuronal differentiation of PC12 cells (Dobashi *et al.*, 1995; Dobashi *et al.*, 1996). In addition, cell differentiation has been reported to correlate with the suppression or activation of kinase activity in several cell types including those of the neuronal, hematopoietic and myocytic lineages (Durand *et al.*, 1997; Xiong *et al.*, 1997; Erhardt and Pittman, 1998; Tang *et al.*, 1998; Urashima *et al.*, 1997; Franklin and Xiong, 1996). Taken together, it is clear that CDKs play a key role in the shift from cell proliferation to differentiation, and that the responsible CDKs varies with cell type.

We have investigated the involvement of cell cycle regulatory molecules in HC and SC differentiation of embryonic day 19 (E19) rat organ of Corti. E19 rat organ of Corti is a good model of HC and SC differentiation since culturing these explants results in the spontaneous appearance of supernumerary HCs and SCs via differentiation of Hensen's cells in 10% of the explants regions (Malgrange *et al.*, 2002b). Here, we report that roscovitine, a selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases CDK1, CDK2 and CDK5 and, to a lesser extent, of Erk1/Erk2 (Meijer *et al.*, 1997; Knockaert *et al.*, 2002b), induces supernumerary HCs and SCs in E19 rat organ of Corti after 5 days *in vitro* (DIV) in a manner significantly greater than in control cultures. Other structurally unrelated CDK inhibitors also induce supernumerary HCs and SCs. Organs of Corti at later developmental stages are insensitive to roscovitine. We also show that CDK2 is specifically expressed in Hensen's cells and that the effect of roscovitine is accompanied by a reduction of CDK1/2 activity. These results suggest that some pharmacological kinase inhibitors may have a direct inducing effect on the differentiation of HCs and SCs from yet to be identified stem cells.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Culture and treatments of organs of Corti*

Time-pregnant Sprague-Dawley rats or neonates were killed by euthanasia on gestational days 17 (E17), E19, or on postnatal days 0 (day of birth = P0), P2 and P4 with CO<sub>2</sub>. Both cochleae were dissected free from the calvaria with watchmaker forceps and under a stereomicroscope. Each organ of Corti was freed from surrounding tissues and explanted intact onto the surface of a sterile membrane (Millicell™, 12 mm, Millipore, Bedford, MA, USA) in minimum essential medium (MEM; Gibco, Gent, Belgium) into a 24-well culture plate (Nunc). Cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. Medium was renewed every 2 days. (R)-Roscovitine (Alexis Corporation, San Diego, USA) was dissolved as a stock solution in DMSO and added as indicated.

### *Semithin sections*

Explants were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) for 45 min. Specimens were then post-fixed in 1% OsO<sub>4</sub> in the same cacodylate buffer for 30 min., dehydrated in graded ethanol concentrations and propylene oxide and embedded in epoxy resin (Agar Scientific Ltd, UK). Organ of Corti explants were sectioned parallel to the longitudinal axis of the HCs. Serial semi-thin sections, 1 µm-thick, were cut with a diamond knife, stained with toluidine blue (0.5%) and observed by light microscopy.

### *BrdU incorporation and immunocytochemistry*

Whole-mount preparations were fixed with either 4% paraformaldehyde (10 min. at 20°C) or methanol (5 min. at -20°C). The following primary antibodies were used: rabbit anti-myosin VIIa (1/200; Tama Hasson, University of California at San Diego, San Diego, CA, USA), goat anti-CDK2 (1:100, Santa Cruz, Inc., USA), and goat anti-Jagged1 (1/100, Santa Cruz). The secondary antibodies used are alexa 488-conjugated donkey anti-goat antibody (1/500, Molecular Probes, USA) and TRITC-conjugated donkey anti-rabbit antibodies (1/500, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Primary antibodies incubations were performed overnight at 4°C, while secondary antibodies incubations were performed for 1 hr. at 20°C. Sequential double labeling experiments were done with a 4% paraformaldehyde fixation step in between each immunoreaction. Preparations were mounted on microscope slides and coverslipped with Fluoprep mounting medium (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). To label cells in S phase *in vitro*, BrdU (10 µM, Sigma, USA) which is incorporated into replicating DNA, was added to the cultures for 2 or 5 DIV prior staining. After fixation with methanol for 5 minutes at room temperature, a 5 minutes incubation in triton-X100 1% in PBS and a 30 minutes incubation in blocking buffer, cells were stained with anti-myosin VIIA or rabbit anti-jagged1 followed by Alexa 568 nm anti-rabbit or anti-goat antibody. Cells were post-fixed in 4% paraformaldehyde at room temperature for 10 minutes, incubated in 2N HCl for 10 minutes and then

neutralized with 0.1 M sodium tetraborate, pH 8.5. Cells were incubated for 45 min with anti-BrdU FITC-conjugated antibody (1:3, Becton-Dickinson, USA). The preparations were mounted in Fluoprep and imaged using a Bio-Rad MRC1024 laser scanning confocal microscope.

#### *In situ detection of apoptosis: TUNEL labelling*

To demonstrate apoptosis in E19 rat organ of Corti explants, we stained the specimens cultured for 1, 2 or 5 DIV with the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) method using the ApopTag fluorescent detection kit (Oncor, Gaithersburg, MD). The explants were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. Equilibration buffer was then applied for 30 min at 20°C. Cultures were incubated with working strength TdT enzyme for 1 hr at 37°C. The reaction was stopped with working strength stop/wash buffer. Cultures were washed and further incubated with anti-digoxigenin-FITC. The explants were then stained for f-actin with TRITC-phalloidin. These double-stained explants were observed using a confocal microscope.

#### *Dose-response experiments and temporal dependence*

Organs of Corti were dissected from E19 rats and maintained in culture. At the time of seeding, the culture medium contained roscovitine at 1.25, 2.5, 5, 10, 30 or 100  $\mu$ M. After 5 DIV, cultures were fixed and immunostained for myosin VIIa and Jagged1 as described above. In order to establish the time for optimal appearance of supernumerary HCs, E19 rat organs of Corti were treated with 10  $\mu$ M roscovitine and the fraction of supernumerary zone was determined following fixation and immunocytochemistry for myosin VIIa of the explants at 2, 4, 5 and 6 DIV. E17, E19, P0, P2 and P4 rat organs of Corti were dissected and cultured for 5DIV in the presence of 10  $\mu$ M roscovitine. For each condition, the explants were fixed and the supernumerary zones were counted after myosin VIIa immunostaining.

#### *Quantification of HCs within the organ of Corti*

Quantitative analysis of supernumerary HCs production was obtained by counting the number of HCs per length and surface of sensory epithelium regions from the medium turn as previously described (Malgrange *et al.*, 2002b). If supernumerary cells were actually produced, the number of cells per unit of length should increase while the number of cells per surface unit should remain at the same level. After showing that new cells effectively arose in our cultures conditions, the extent of supernumerary HCs was determined by measuring the length of the supernumerary zone on images obtained from the confocal microscope. The total length of each organ of Corti explant was measured and the extent of the region with supernumerary HCs was expressed as percent of total length. These supernumerary regions were defined by the presence of more than four rows of HCs.

#### *Western blot analysis*

Cultured organs of Corti from 10 cochleae for each experimental condition were lysed in homogenisation buffer containing of 60 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 15 mM p-nitrophenyl phosphate, 25 mM MOPS (pH 7.2), 15 mM EGTA, 15 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 1 mM phenyl phosphate, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml soybean trypsin inhibitor and 100  $\mu$ M benzamidine. After sonication, insoluble material was removed by centrifugation at 12 000 g for 15 minutes at 4°C. Protein concentration was determined by the Bradford assay (Biorad). For crude extract analysis, proteins were heat denaturated in Laemmli sample buffer and resolved by 10 % SDS-PAGE (0.75 mm thick gels) followed by transfer on 0.1  $\mu$ m nitrocellulose filters (Schleicher and Schuell). These were blocked with 5 % low fat milk in Tris-Buffered Saline-Tween-20 for 1 hour at room temperature, then incubated 1 hour with anti-ERK1 (1:4000) (Sigma, M7927), anti-PSTAIR (1:3000) (Sigma, P7962) and analyzed by Enhanced Chemiluminescence (ECL, Amersham).

#### *Affinity matrices*

Purvalanol (NG-95) and p9<sup>CKShs1</sup> affinity matrices were synthesized as described (Borgne and Meijer, 1996; Chang *et al.*, 1999; Rosania *et al.*, 1999; Knockaert *et al.*, 2000). Just before use, 10  $\mu$ l of settled beads were washed in 1 ml of Bead Buffer (50 mM Tris pH 7.4, 5 mM NaF, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 0.1% Nonidet P-40, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml soybean trypsin inhibitor, 100  $\mu$ M benzamidine) and resuspended in 400  $\mu$ l of this buffer. Cell extracts prepared as described above were then added (1 mg total protein) and the tubes rotated at 4°C for 30 minutes. After a brief spin, the supernatant was removed and the beads were washed four times with 1 ml Bead Buffer before addition of 50  $\mu$ l of Laemmli sample buffer. Following heat denaturation for 3 minutes, the bound proteins were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting as described above.

#### *Quantification of CDK activity*

p9<sup>CKShs1</sup>-sepharose affinity purification was also used to determine the histone H1 kinase activity of bound CDK1 and CDK2. After purification as described above, the p9<sup>CKShs1</sup>-sepharose kinases were incubated for 30 min at 30°C with 1  $\mu$ Ci [<sup>32</sup>P] ATP (1-3 Ci/mmol, Amersham) in the presence of 25  $\mu$ g histone H1 (Type III-S, Sigma) in a final volume of 30  $\mu$ l of buffer C (homogenization buffer but 5 mM EGTA, no NaF and no protease inhibitors). Assays were terminated by transferring the tube on ice. 30  $\mu$ l 2x Laemmli sample buffer was added. Phosphorylation of the substrate was assessed by autoradiography after SDS-PAGE.

#### *Scanning electron microscopy*

Explants for surface ultrastructural analysis were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.2) for 2 hours, washed three times in cacodylate buffer, then postfixed for 1 hour with 1% osmium tetroxide. Explants were dehydrated in ascending concentrations of ethanol,

critical-point dried from liquid CO<sub>2</sub> and sputter coated with gold. All material was examined in a JEOL JSM-840 scanning electron microscope operating at 20 kV.

## RESULTS

### *Induction of supernumerary hair cells by roscovitine and by other kinase inhibitors*

Cochlear explants from E19 rat embryos developed a normal sensory epithelium after 5 days in culture with a single row of inner hair cells and three rows of outer hair cells, both being specifically stained with myosin VIIa (Figure 2 A, D). Inner and outer HCs are supported, respectively, by one row of inner phalangeal cells and three rows of Deiters' cells, both being specifically stained with anti-jagged1 antibodies as previously described (Zine *et al.*, 2000) (Figure 1, Figure 2 B, E). In contrast, cultures exposed to a medium containing 10  $\mu$ M roscovitine developed a significantly greater number of supernumerary HCs and corresponding SCs than control (Figure 2G-L). The supernumerary regions were characterized by four to nine rows of outer HCs, two to three rows of inner HCs and six to twelve rows of the corresponding SCs. As in the normal regions, all the supernumerary HCs were separated from each other by intervening supporting cells. The production of supernumerary HCs was confirmed with photonic microscopy of sections through the organ of Corti and with scanning microscopic studies (Figure 3). In the presence of roscovitine for 5 DIV, the production of supernumerary HCs organized in rows was observed within the sensory epithelium.

To rule out a possible rearrangement of the HCs in the organ of Corti by compression of the explant or by migration of the sensory cells, the numbers of HCs per surface unit and length unit of control and roscovitine-treated explants were compared (Figure 4). The results show that the number of HCs per surface unit in roscovitine-treated explants remained identical to the surface density of HCs in control explants. In contrast, the number of HCs per length unit was significantly increased in roscovitine-treated vs. control explants (Figure 4A and 4B). These data clearly demonstrate that supernumerary HCs arise from an actual increase in number rather than from a rearrangement of the existing HCs.

To confirm that the roscovitine effect is potentially due to a specific inhibition of kinases, we tested a series of chemically related and unrelated CDK inhibitors (Table 1). The 2,6,9-tri-substituted purines were all able to induce the appearance of supernumerary HCs. Their efficiency in inducing this effect on isolated organs of Corti correlated with their potency in inhibiting CDKs (aminopurvalanol > roscovitine > olomoucine). The kinase inactive analogues, methylaminopurvalanol (Chang *et al.*, 1999; Knockaert *et al.*, 2000) and iso-olomoucine (Vesely *et al.*, 1994) had no effect on the isolated organs of Corti (Table 1). Other CDK inhibitors such as indirubin-3'-monoxime (Hoessel *et al.*, 1999) and alsterpaullone (Schultz *et al.*, 1999) also induced the appearance of supernumerary HCs while the CDK4 inhibitor, fascaplysin (Soni *et al.*, 2000) and the Erk1/2 MAPK pathway inhibitor, U0126 (Favata *et al.*, 1998) had no effect as compared to control cultures.

*Roscovitine effect: dose-response, kinetics and developmental stage specificity*

The area containing supernumerary HCs increased as the concentration of roscovitine was raised (Figure 5A). At 10  $\mu\text{M}$  roscovitine, there was an average of  $52.9\% \pm 4.3$  of supernumerary zones. At higher concentrations (30 and 100  $\mu\text{M}$ ) roscovitine was found to be toxic to all cells in the organ of Corti (data not shown).

The effect of roscovitine on the development of supernumerary HCs was directly related to the duration of treatment (Figure 5B). The number of supernumerary zones in the E19 rat organ of Corti explants maintained in the presence of 10  $\mu\text{M}$  roscovitine increased progressively with time in culture and reached a maximum after 5 or 6 DIV.

The effect of roscovitine was also related to the age of the organ of Corti. There was a gradual and dramatic decline in the number of supernumerary zones induced by roscovitine with explants from E17, E19, P0, P2 and P4 rats (Figure 5C). Addition of 10  $\mu\text{M}$  roscovitine to E19 organ of Corti explants resulted in  $42.9\% \pm 4.3$  of supernumerary zones, while addition of the same concentration of roscovitine to P0 organ of Corti explants resulted in only  $8.3\% \pm 1.5$  of region containing supernumerary HCs. Addition of roscovitine on P2 or P4 did not result in the appearance of supernumerary cells.

*Effects of roscovitine on proliferation and cell death in the organ of Corti*

Roscovitine, like other CDK inhibitors, has potent anti-mitotic properties (Meijer *et al.*, 1997; Alessi *et al.*, 1998; Mgbonyebi *et al.*, 1999; Keezer and Gilbert, 2002) reviews in (Buolamwini, 2000; Knockaert *et al.*, 2002b). Therefore it is quite unlikely that the appearance of supernumerary HCs and SCs required the induction of mitosis. To definitively rule out this eventuality we investigated the cell cycle in explants treated with roscovitine. Explants were incubated for either 2 or 5 DIV in the presence of 10  $\mu\text{M}$  BrdU. No epithelial cells were labeled with BrdU in the area of HCs and SCs (Figure 6). Furthermore, semi-thin sections of E19 organ of Corti explants after 2 and 5 DIV were carefully examined for the presence of mitotic figures in epithelial cells. Not a single mitotic figure was observed within the sensory epithelium ( $> 60$  non-consecutive sections examined per culture condition), in particular in the region of the SC types, in areas containing either a normal number of HCs and corresponding SCs or numerous rows of supernumerary HCs and SCs. Mitotic figures were however frequently observed in adjacent connective tissues of mesenchymal origin, confirming the BrdU labeling. Production of supernumerary HCs and Deiters' cells in the absence of any evidence of cell division strongly supports the direct differentiation of pre-existing stem cells into both HCs and corresponding supporting cells.

To determine whether apoptosis was implicated in HCs and SCs differentiation, E19 rat organ of Corti explants were double-stained for DNA fragmentation (TUNEL positive) and for f-actin in the stereocilia bundles and cuticular plate. After 1, 2 or 5 DIV no TUNEL positive nuclei were identified either in control or roscovitine treated cultures (data not shown). Again, this result is in favour of a direct differentiation of progenitor cells in HCs and SCs.

### *Expression of potential targets of roscovitine in the organ of Corti*

The observation that roscovitine induced supernumerary cells in E19 organs of Corti in culture, suggest that roscovitine's specific targets should be implied in that phenomena. To test this, the expression of CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 and Erk1/2 was studied by immunolocalisation (Figure 7A-S) and Western blotting using E19 or P0 rat organ of Corti (Figure 7T).

The distribution of CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 and Erk1/2 was studied by immunocytochemistry using sections obtained from E19 rat organ of Corti (Figure 7A-S). CDK1, CDK5, CDK7 and ERK1/2 were shown to be ubiquitously distributed throughout the organ of Corti, including the HCs. Interestingly, CDK2 was found to be specifically present in tectal cells, Hensen's cells and to a lesser extend in pillar cells in E19 ex vivo organs of Corti (Figure 7D-F). The specific expression pattern of CDK2 persisted throughout the early postnatal period (data not shown). It is important to emphasize that cells positive for myosin VIIA, i.e. HCs, or for jagged1, i.e. Deiters' cells, were never immunoreactive for CDK2. Omission of primary antibodies resulted in a complete loss of immunostaining (Figure 7P-R).

We next investigated the expression of CDKs and Erks following affinity purification (Figure 7T). E19 and P0 rat organs of Corti were dissected, lysed and purified by affinity chromatography on p9<sup>CKShs1</sup> beads, the mammalian homologue of CKS1 from *Saccharomyces cerevisiae* and p13<sup>suc1</sup> from *Schizosaccharomyces pombe*, to purify CDK1, CDK2 and their associated proteins in non-denaturing conditions as previously described (Borgne and Meijer, 1996; Chang *et al.*, 1999). The expression of CDK1 and CDK2 was evaluated by immunoblotting analysis using PSTAIRE specific antibody. As shown in Figure 7T, the expression of CDK1/2 diminished between E19 and P0. We also used affinity chromatography on immobilized purvalanol which allows the recovery of at least CDK1, CDK2, CDK5, Erk1 and Erk2, the specific targets of the 2,6,9-trisubstituted purines (Knockaert *et al.*, 2000; Knockaert *et al.*, 2002a). Only active, Thr14, Tyr15-dephosphorylated CDKs bind to the resin. Inactive, phosphorylated CDKs do not, most probably because the two phosphorylated residues, located at the margin of the ATP-binding pocket hinder interaction with purines (Gray *et al.*, 1999; Knockaert *et al.*, 2000). As shown in Figure 7T, the expression of active CDK1/2 (detected with the anti-PSTAIRE antibodies) decreased between E19 and P0 while CDK5 and Erk1/2 expression remained stable. In contrast, CDK7 expression increased between E19 and P0.

### *Expression of CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 and Erk1/2 in cultured rat organs of Corti following roscovitine treatment*

We next examined the changes in intracellular targets of roscovitine in cultured organs of Corti (Figure 8A). After 5 DIV, CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 and Erk1/2 are all expressed in E19 and P0 cultured organs of Corti. In the presence of roscovitine at 10  $\mu$ M, CDK1/2 expression is diminished as compare to control cultures, while CDK5 and Erk1/2 remain stable.

*Changes in CDK1/2 activities in E19 and P0 rat organs of Corti following roscovitine treatment*

We next examined the changes in CDK1/2 activities in lysates of E19 and P0 organs of Corti during roscovitine-induced HCs and SCs differentiation (roscovitine 10  $\mu$ M) (Figure 8B). p9<sup>CKShs1</sup>-sepharose affinity purified lysates were assayed for their ability to phosphorylate histone H1. As shown in Figure 8B, a decline in kinase activity of the starting levels in control cultures was detected in E19 cultured rat organs of Corti in the presence of 10  $\mu$ M roscovitine. In parallel, no detectable level of kinase activity was found in P0 cultured rat organs of Corti. Indeed, in P0 rat organs of Corti, roscovitine was unable to induce supernumerary HCs and SCs.

## **DISCUSSION** (en cours de rédaction)

The mammalian organ of Corti has one of the most highly organized pattern of cells of any sensory epithelium, with HCs and SCs arranged in a precise alternative pattern. Studies of how their production is controlled during development are crucial towards understanding the causes of deafness or to attempt to induce HC regeneration. In mice, auditory HCs and SCs precursors have their terminal mitosis between E13-E15 (Ruben, 1967) corresponding to E15-E17 in rats. However, a production of supernumerary HCs has been shown to occur after the ontogenesis of the sensory cells, in various circumstances. Previous studies report that supernumerary HCs can be produced in embryonic cochlear explant cultures either following retinoic acid treatment (Kelley *et al.*, 1993) or in normal serum-free medium (Abdouh *et al.*, 1993; Lefebvre *et al.*, 2000), or in mice in which a specific gene is deleted (Chen and Segil, 1999; Lowenheim *et al.*, 1999; Lanford *et al.*, 1999; Zine *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2000). The results presented here provide clear evidence that pharmacological inhibitors of protein kinases induce the production of a large number of supernumerary HCs and Deiters' cells in E19 rat organs of Corti. A rapid decline in the formation of supernumerary HCs and Deiters' cells in response to roscovitine is observed between E19 and P0. This lack of responsiveness to roscovitine is contemporary with the decline of the CDK1/2 enzymatic activity while the expression of the CDK2 proteins remains constant. This may be due to the expression of endogenous inhibitors or to post-translational modifications. In addition, we noticed that although the level of CDK5 does not seem to vary between E19 and P0, its electrophoretic mobility changes, indicative of major post-translational (phosphorylation?) modifications. At this point we do not know which specific CDK needs to be inhibited by roscovitine to lead to the induction of supernumerary HCs. In addition we have not ruled out another unidentified target of roscovitine.

The activity of CDKs critically contributes in the molecular switch between cell proliferation and differentiation. Roscovitine has been described to induce cell differentiation through its inhibition of cell cycle progression leading to an arrest of proliferation (Alessi *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999). Such mechanism is not involved in the production of supernumerary HCs because no cell proliferation is ever observed in cultured intact sensory epithelium taken from E19 rats. Only a few mitotic figures are observed in the mesenchymal tissue under the basilar membrane. Furthermore, when roscovitine is added to the culture medium, no modification of proliferation is observed. Roscovitine has been described as a pro-apoptotic agent in undifferentiated cells mostly by blocking the cell cycle (Edamatsu *et al.*, 2000; Ljungman and Paulsen, 2001) or anti-apoptotic agent on differentiated cells such as neurons (Park *et al.*, 1996; Maas *et al.*, 1998). TUNEL study reveals no apoptotic cells within the sensory epithelium of the 5 DIV cultures, both in control or roscovitine treated conditions excluding an interference with the apoptotic pathways as a mechanism leading to the production of supernumerary HCs and Deiters' cells. The absence of proliferative and of apoptotic mechanisms in the production of supernumerary cells in the organ of Corti argues in favor of a direct phenotypic conversion of pre-existing cells induced by roscovitine. Cell conversion has been observed in

amphibian lateral line organ after laser ablation of HCs (Jones and Corwin, 1996), in amphibian vestibular sensory epithelium after aminoglycoside-induced HC damage (Baird *et al.*, 2000), in avian basilar papilla after noise trauma (Adler and Raphael, 1996) or aminoglycoside damage (Adler *et al.*, 1997), and in utricular macula of mature guinea-pigs following gentamicin-induced HC death (Forge *et al.*, 1998; Kopke *et al.*, 2001). Roscovitine probably induces the differentiation of already existing cells in the organ of Corti into either hair cells or Deiters' cells.

Roscovitine is a pharmacological agent that has been tested on over 25 kinases and shows high specificity for CDKs and Erk MAP kinases (Meijer *et al.*, 1997). Despite this remarkable selectivity, one question remains to be answered: what are the possible targets of roscovitine, whose inhibition is responsible for the induction of supernumerary HCs? Since the MAPK pathway inhibitor U0126 (Favata *et al.*, 1998) does not induce supernumerary HCs and since no major changes in Erk1/2 are observed in organs of Corti from E19 and P0 rat, Erk1 and Erk2 are unlikely to be roscovitine targets responsible for this effect. Similarly, as the CDK4/CDK6 inhibitor fascaplysin has no effect on the induction of supernumerary HCs, and since roscovitine does not inhibit CDK4 and CDK6 (Meijer *et al.*, 1997) these two CDKs can also be ruled out as roscovitine targets. In contrast, roscovitine significantly decreases the activity of CDK1 and CDK2, in cultures of organs of Corti, thus suggesting that they are potential targets, responsible for the observed cellular effect. In addition, CDK5 is also a good candidate since it is efficiently inhibited by roscovitine *in vitro* and that its activity has been reported to be necessary for *in vitro* differentiation process in several models (Chen *et al.*, 2001; Nikolic *et al.*, 1996). Taken together, the results suggest that CDK1, CDK2 and CDK5 are three potential intracellular targets of roscovitine, the inhibition of which induces supernumerary HCs, but at this point, we can not rule out another unidentified target. Further investigations would be necessary to determine precisely between these potential targets which is the relevant one (the effect can also be mediated by a combination of inhibitions of these kinases). Since no chemical inhibitor selective for just one of these CDKs has been reported, the pharmacological approach will not be appropriate to answer this question. However, we assume that the use of interference RNA technology directed against one kinase at a time could be very helpful to address this question.

There is compelling evidence from both mammals and non-mammals that HCs and SCs share a common progenitor (Kelley *et al.*, 1995; Fekete *et al.*, 1998; Lang and Fekete, 2001; Malgrange *et al.*, 2002a). These models suggest that uncommitted cells within developing sensory epithelia essentially compete to become committed to the HC phenotype. Once an individual cell has become committed to differentiate as a HC, that cell then exerts a form of lateral inhibition on any neighboring cells that it contacts, so that the immediate neighbors of HCs are prevented from differentiating as HCs. Those inhibited cells are constrained to differentiate as Deiters cells. Indeed, in all *in vitro* and *in vivo* models, the appearance of supernumerary HCs is frequently accompanied by the production of supernumerary Deiters' cells or pillar cells while no overproduction of Hensen's cells have been described (Kelley *et al.*, 1993; Lanford *et al.*, 1999; Chen and Segil, 1999).

Since roscovitine induces the differentiation of a progenitor cell into either HCs or Deiters' cells, the possible enzymatic targets of this inhibition, that is CDK1, CDK2 and CDK5 have to be expressed in the progenitors...[\(En cours de redaction\)](#)

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Schematic representation of the structure of the organ of Corti.** Cross-sectional (A) and surface (B) views of the sensory epithelium at the E19 developmental stage. **IHC**, inner hair cell; **O1-O3**, outer hair cells; **d1-d3**, Deiters' cells; **t1-t2**, tectal cells; **h1-h4**, Hensen's cells; **ut**, undertectal cells; **p**, pillar cells; **ipc**, inner phalangeal cells; **bc**, border cells.

**Figure 2. Hair cells and Deiters' cells development in E19 rat organs of Corti following 5 days of culture in control medium (A-F) or in the presence of 10  $\mu$ M roscovitine (G-L).** The expression patterns of Myosin VIIA (A,D,G,J) and Jagged1 (B,E,H,K) in control (A-F) and roscovitine treated (G-L) E19 rat organs of Corti in culture for 5DIV was investigated by immunolabeling and confocal microscopy. Scale: Bar = X  $\mu$ M.

**Figure 3. Roscovitine triggers the appearance of supernumerary Hair cells.** Organs of Corti from E19 rat embryos were cultured for 5 days in the absence (A, C) or presence (B, D) of 10  $\mu$ M roscovitine. They were analysed by photonic microscopy of toluidine blue -stained semi-thin sections (A, B) or by scanning electron microscopy (C, D). In controls (C) hair cells are arranged in three orderly rows for outer hair cells and a single row for inner hair cells, showing uniform orientation of their stereociliary bundles. In roscovitine-treated explants (D) many extra outer hair cells can be seen while the inner hair cells are barely visible due to regrowth of a tectorial membrane. Scale: Bar = X  $\mu$ M.

**Figure 4. Quantification of roscovitine-induced hair cell differentiation.** The numbers of HCs in control and roscovitine-treated E19 rat organs of Corti were counted and their density was calculated either per cochlear length unit (A) or per surface unit (B). **IHC**, inner hair cell; **OHC**, outer hair cells.

**Figure 5. Roscovitine effects: dose-response (A), kinetics (B) and developmental stage specificity (C).** (A), dose-response curve for roscovitine induced supernumerary HCs. Each data bar represents the mean number of HCs for a minimum of 4 explants per experiment. (B), the number of supernumerary HCs induced by 10  $\mu$ M roscovitine was calculated as a function of time of culture of E19 rat organ of Corti explants. (C), Developmental stage dependence of the roscovitine effect. 10  $\mu$ M roscovitine was added to rat organ of Corti explants dissected at stage E17, E19, P0, P2 and P4. The density of supernumerary HCs was monitored after 5 days of ex vivo culture.

**Figure 6. Roscovitine does not interfere with cell proliferation in the organ of Corti.** Confocal images of the expression pattern of Myosin VIIA (A,C), jagged1 (E,G) and CDK2 (I,K) double labeled with BrdU (B, F and J) in whole-mount cell surface preparations of E19 cochleas after 5DIV showing

that none of these markers stain BrdU positive cells. (D,H,L): corresponding diagrams of the immunostainings in a cross-sectional view of the E19 organ of Corti. Scale: Bar = X  $\mu\text{M}$  for all panels.

**Figure 7. Detection of CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 and ERK1/2 in ex vivo E19 rat organs of Corti.**

(A-R) :E19 rat organ of Corti sections immunostained with CDK1 (A,C) CDK2 (D,F) CDK5 (G,I) CDK7 (J,L), ERK1/2 (M,O) and phalloidin-TRITC (B,C,E,F,H,I,K,L,N,O,Q,R). Recapitulative table of immunopositive cells for each antibody is represented in S. (T): CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 and ERK1/2 Western immunoblot analysis of ex vivo E19 and P0 organs of Corti after affinity purification on p9<sup>CKShs1</sup> or aminopurvalanol (95) beads. Scale:Bar = 10  $\mu\text{M}$ .

**Figure 8. kinases expression and activity in E19 and P0 cultured organs of Corti.**

(A) Organs of Corti were dissected from E19 and P0 rats and cultured for 5DIV in presence or absence of 10  $\mu\text{M}$  roscovitine. Extracts were then lysed in homogenisation buffer followed by affinity purification on p9<sup>CKShs1</sup> or aminopurvalanol (95) beads and bound proteins were resolved on 10% SDS-PAGE. Expression of CDK1, CDK2, CDK5, CD7 and ERK1/2 was performed by immunoblotting with specific antibodies. (B) CDK1/2 activity in E19 and P0 organs of Corti. Kinase assays were performed using histone H1 as a substrate in the presence of 15  $\mu\text{M}$  ATP. Reactions were stopped by addition of 40  $\mu\text{l}$  of Laemmli sample buffer. Samples were boiled and separated by 10% SDS-PAGE. Gel was dried and subjected to autoradiography.

**Table 1. Induction of supernumerary HCs by various CDK inhibitors.** Compounds were tested at various concentrations for their ability to induce supernumerary HCs in isolated organs of Corti. The lowest concentration inducing maximum effect is presented. For inactive compounds the highest concentration tested is shown in parentheses. In addition to CDK inhibitors, the MAP kinase kinase inhibitor U0126 was also tested. The IC<sub>50</sub> values of all compounds for CDK1/cyclin B inhibition is also provided.

	<b>Concentration inducing maximum supernumerary HCs differentiation (μM)</b>	<b>CDK1 inhibition (IC<sub>50</sub>, μM)</b>
<b>olomoucine</b>	30	7
<b>roscovitine</b>	10	0.45
<b>aminopurvalanol</b>	5	0.033
<b>iso-olomoucine</b>	no effect (100 μM)	> 500
<b>N6-methyl-aminopurvalanol</b>	no effect (100 μM)	> 100
<b>alsterpallone</b>	5	0.035
<b>Indirubin-3'-monoxime</b>	10	0.18
<b>fascaplysin</b>	no effect (100 μM)	no effect
<b>U0126</b>	no effect (100 μM)	no effect
<b>Actinomycin D</b>	0,1 nM	??
<b>DRB</b>	10 nM	??

## REFERENCE LIST

1. Abdouh A, Despres G, Romand R (1993) Hair cell overproduction in the developing mammalian cochlea in culture. *NeuroReport* 5: 33-36.
2. Adler HJ, Komeda M, Raphael Y (1997) Further evidence for supporting cell conversion in the damaged avian basilar papilla. *Int J Dev Neurosci* 15: 375-385.
3. Adler HJ, Raphael Y (1996) New hair cells arise from supporting cell conversion in the acoustically damaged chick inner ear. *Neurosci Lett* 205: 17-20.
4. Alessi F, Quarta S, Savio M, Riva F, Rossi L, Stivala LA, Scovassi AI, Meijer L, Prosperi E (1998) The cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine and roscovitine arrest human fibroblasts in G1 phase by specific inhibition of CDK2 kinase activity. *Exp Cell Res* 245: 8-18.
5. Baird RA, Burton MD, Fashena DS, Naeger RA (2000) Hair cell recovery in mitotically blocked cultures of the bullfrog saccule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11722-11729.
6. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G (1993) Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 7: 812-821.
7. Bermingham NA, Hassan BA, Price SD, Vollrath MA, Ben Arie N, Eatock RA, Bellen HJ, Lysakowski A, Zoghbi HY (1999) *Math1*: An essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 284: 1837-1841.
8. Borgne A, Meijer L (1996) Sequential dephosphorylation of p34(cdc2) on Thr-14 and Tyr-15 at the prophase/metaphase transition. *J Biol Chem* 271: 27847-27854.
9. Buolamwini JK (2000) Cell cycle molecular targets in novel anticancer drug discovery. *Curr Pharm Des* 6: 379-392.
10. Chang YT, Gray NS, Rosania GR, Sutherlin DP, Kwon S, Norman TC, Sarohia R, Leost M, Meijer L, Schultz PG (1999) Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors. *Chem Biol* 6: 361-375.
11. Chen F, Studzinski G. P. (2001) Expression of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 activator p35Nck5a in human monocytic cells is associated with differentiation. *Blood* 97(12), 3763-7.
12. Chen P, Johnson JE, Zoghbi HY, Segil N (2002) The role of *Math1* in inner ear development: Uncoupling the establishment of the sensory primordium from hair cell fate determination. *Development* 129: 2495-2505.
13. Chen P, Segil N (1999) p27<sup>Kip1</sup> links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti. *Development* 126: 1581-1590.
14. Corwin JT (1985) Perpetual production of hair cells and maturational changes in hair cell ultrastructure accompany postembryonic growth in an amphibian ear. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 82: 3911-3915.
15. Corwin JT, Cotanche DA (1988) Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science* 240: 1772-1774.

16. Dobashi Y, Kudoh T, Matsumine A, Toyoshima K, Akiyama T (1995) Constitutive overexpression of CDK2 inhibits neuronal differentiation of rat pheochromocytoma PC12 cells. *J Biol Chem* 270: 23031-23037.
17. Dobashi Y, Kudoh T, Toyoshima K, Akiyama T (1996) Persistent activation of CDK4 during neuronal differentiation of rat pheochromocytoma PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 221: 351-355.
18. Dobashi Y, Shoji M, Kitagawa M, Noguchi T, Kameya T (2000) Simultaneous suppression of *cdc2* and *cdk2* activities induces neuronal differentiation of PC12 cells. *J Biol Chem* 275: 12572-12580.
19. Dulic V, Lees E, Reed SI (1992) Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* 257: 1958-1961.
20. Durand B, Gao FB, Raff M (1997) Accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and the timing of oligodendrocyte differentiation. *EMBO J* 16: 306-317.
21. Edamatsu H, Gau CL, Nemoto T, Guo L, Tamanoi F (2000) Cdk inhibitors, roscovitine and olomoucine, synergize with farnesyltransferase inhibitor (FTI) to induce efficient apoptosis of human cancer cell lines. *Oncogene* 19: 3059-3068.
22. Ekholm SV, Reed SI (2000) Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 12: 676-684.
23. Erhardt JA, Pittman RN (1998) Ectopic p21(WAF1) expression induces differentiation-specific cell cycle changes in PC12 cells characteristic of nerve growth factor treatment. *J Biol Chem* 273: 23517-23523.
24. Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van D, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273: 18623-18632.
25. Fekete DM, Muthukumar S, Karagogeos D (1998) Hair cells and supporting cells share a common progenitor in the avian inner ear. *J Neurosci* 18: 7811-7821.
26. Forge A, Li L, Nevill G (1998) Hair cell recovery in the vestibular sensory epithelia of mature guinea pigs. *J Comp Neurol* 397: 69-88.
27. Franklin DS, Xiong Y (1996) Induction of p18INK4c and its predominant association with CDK4 and CDK6 during myogenic differentiation. *Mol Biol Cell* 7: 1587-1599.
28. Gray N, Detivaud L, Doerig C, Meijer L (1999) ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Curr Med Chem* 6: 859-875.
29. Hoessel R, Leclerc S, Endicott JA, Nobel ME, Lawrie A, Tunnah P, Leost M, Damiens E, Marie D, Marko D, Niederberger E, Tang W, Eisenbrand G, Meijer L (1999) Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol* 1: 60-67.

30. Jones JE, Corwin JT (1996) Regeneration of sensory cells after laser ablation in the lateral line system: hair cell lineage and macrophage behavior revealed by time-lapse video microscopy. *J Neurosci* 16: 649-662.
31. Jorgensen JM, Mathiesen C (1988) The avian inner ear. Continuous production of hair cells in vestibular sensory organs, but not in the auditory papilla. *Naturwissenschaften* 75: 319-320.
32. Keezer SM, Gilbert DM (2002) Sensitivity of the origin decision point to specific inhibitors of cellular signaling and metabolism. *Exp Cell Res* 273: 54-64.
33. Kelley MW, Talreja DR, Corwin JT (1995) Replacement of hair cells after laser microbeam irradiation in cultured organs of Corti from embryonic and neonatal mice. *J Neurosci* 4: 3013-3026.
34. Kelley MW, Xu XM, Wagner MA, Warchol ME, Corwin JT (1993) The developing organ of Corti contains retinoic acid and forms supernumerary hair cells in response to exogenous retinoic acid in culture. *Development* 119: 1041-1053.
35. Knockaert M, Gray N, Damiens E, Chang YT, Grellier P, Grant K, Fergusson D, Mottram J, Soete M, Dubremetz JF, Le Roch K, Doerig C, Schultz P, Meijer L (2000) Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors. *Chem Biol* 7: 411-422.
36. Knockaert M, Wieking K, Schmitt S, Leost M, Grant KM, Mottram JC, Kunick C, Meijer L (2002a) Intracellular Targets of Paullones. Identification following affinity purification on immobilized inhibitor. *J Biol Chem* 277: 25493-25501.
37. Knockaert M, Greengard P, Meijer L (2002b) Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol Sci* 23: 417-425.
38. Kopke RD, Jackson RL, Li G, Rasmussen MD, Hoffer ME, Frenz DA, Costello M, Schultheiss P, Van De Water TR (2001) Growth factor treatment enhances vestibular hair cell renewal and results in improved vestibular function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5886-5891.
39. Lanford PJ, Lan Y, Jiang RL, Lindsell C, Weinmaster G, Gridley T, Kelley MW (1999) Notch signalling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nat Genet* 21: 289-292.
40. Lang H, Fekete DM (2001) Lineage analysis in the chicken inner ear shows differences in clonal dispersion for epithelial, neuronal, and mesenchymal cells. *Dev Biol* 234: 120-137.
41. Lee HR, Chang TH, Tebalt MJ, III, Senderowicz AM, Szabo E (1999) Induction of differentiation accompanies inhibition of Cdk2 in a non-small cell lung cancer cell line. *Int J Oncol* 15: 161-166.
42. Lefebvre PP, Malgrange B, Thiry M, Van De Water TR, Moonen G (2000) Epidermal growth factor upregulates production of supernumerary hair cells in neonatal rat organ of Corti explants. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 120: 142-145.

43. Ljungman M, Paulsen MT (2001) The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits RNA synthesis and triggers nuclear accumulation of p53 that is unmodified at Ser15 and Lys382. *Mol Pharmacol* 60: 785-789.
44. Lowenheim H, Furness DN, Kil J, Zinn C, Gultig K, Fero ML, Frost D, Gummer AW, Roberts JM, Rubel EW, Hackney CM, Zenner HP (1999) Gene disruption of p27<sup>Kip1</sup> allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of Corti. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 96: 4084-4088.
45. Maas JW, Horstmann S, Borasio GD, Anneser JM, Shooter EM, Kahle PJ (1998) Apoptosis of central and peripheral neurons can be prevented with cyclin-dependent kinase/mitogen-activated protein kinase inhibitors. *J Neurochem* 70: 1401-1410.
46. Malgrange B, Belachew S, Thiry M, Nguyen L, Rogister B, Alvarez ML, Rigo JM, Van De Water TR, Moonen G, Lefebvre PP (2002a) Proliferative generation of mammalian auditory hair cells in culture. *Mech Dev* 112: 79-88.
47. Malgrange B., Thiry M., Van De Water, T. R., Nguyen, L., Moonen, G., and Lefebvre, P. P. Epithelial supporting cells can differentiate into outer hair cells and Deiters' cells in the cultured organ of Corti. *Celular and Molecular Life Science* . 2002b. Ref Type: In Press
48. Matsushime H, Ewen ME, Strom DK, Kato JY, Hanks SK, Roussel MF, Sherr CJ (1992) Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34<sup>PSK</sup>- J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* 71: 323-334.
49. Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong JP, Blow JJ, Inagaki N, Inagaki M, Delcros JG, Moulinoux JP (1997) Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 243: 527-536.
50. Mgbonyebi OP, Russo J, Russo IH (1999) Roscovitine induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* 59: 1903-1910.
51. Nikolic M, Dudek, H, Kwon, YT, Ramos, Y F & Tsai, LH (1996) The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev* 10(7), 816-25.
52. Ohnuma S, Philpott A, Harris WA (2001) Cell cycle and cell fate in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 11: 66-73.
53. Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G (1992) Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J* 11: 961-971.
54. Park DS, Farinelli SE, Greene LA (1996) Inhibitors of cyclin-dependent kinases promote survival of post-mitotic neuronally differentiated PC12 cells and sympathetic neurons. *J Biol Chem* 271: 8161-8169.
55. Roberson DF, Weisleder P, Bohrer PS, Rubel EW (1992) Ongoing production of sensory cells in the vestibular epithelium of the chick. *Hear Res* 57: 166-174.
56. Rosania GR, Merlie J, Jr., Gray N, Chang YT, Schultz PG, Heald R (1999) A cyclin-dependent kinase inhibitor inducing cancer cell differentiation: biochemical identification using *Xenopus* egg extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4797-4802.

57. Ruben RJ (1967) Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitoses. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 220 Suppl.: 1-44.
58. Ryals BM, Rubel EW (1988) Hair cell regeneration after acoustic trauma in adult coturnix quail. *Science* 240: 1774-1776.
59. Schultz C, Link A, Leost M, Zaharevitz DW, Gussio R, Sausville EA, Meijer L, Kunick C (1999) Paullones, a series of cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis, evaluation of CDK1/cyclin B inhibition, and in vitro antitumor activity. *J Med Chem* 42: 2909-2919.
60. Sherr CJ, Roberts JM (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9: 1149-1163.
61. Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13: 1501-1512.
62. Soni R, Muller L, Furet P, Schoepfer J, Stephan C, Zumstein M, Fretz H, Chaudhuri B (2000) Inhibition of cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) by fascaplysin, a marine natural product. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 877-884.
63. Tang XM, Strocchi P, Cambi F (1998) Changes in the activity of cdk2 and cdk5 accompany differentiation of rat primary oligodendrocytes. *J Cell Biochem* 68: 128-137.
64. Urashima M, DeCaprio JA, Chauhan D, Teoh G, Ogata A, Treon SP, Hoshi Y, Anderson KC (1997) p16INK4A promotes differentiation and inhibits apoptosis of JKB acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 90: 4106-4115.
65. Vesely J, Havlicek L, Strnad M, Blow JJ, Donella-Deana A, Pinna L, Letham DS, Kato J, Detivaud L, Leclerc S, Meijer L (1994) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem* 224: 771-786.
66. Xiong W, Pestell R, Rosner MR (1997) Role of cyclins in neuronal differentiation of immortalized hippocampal cells. *Mol Cell Biol* 17: 6585-6597.
67. Zheng JL, Shou J, Guillemot F, Kageyama R, Gao W (2000) Hes1 is a negative regulator of inner ear hair cell differentiation. *Development* 127: 4551-4560.
68. Zine A, Van De Water TR, de Ribaupierre F (2000) Notch signaling regulates the pattern of auditory hair cell differentiation in mammals. *Development* 127: 3373-3383.

# CONCLUSIONS-PERSPECTIVES

### CONCLUSIONS-PERSPECTIVES

Ce chapitre de conclusions-perspectives s'articule autour de trois points.

Dans le premier point, nous reviendrons sur les **principaux résultats obtenus dans le cadre de cette thèse**, en nous attardant sur les données les plus marquantes.

La seconde partie consistera en une **réflexion plus générale sur la technique de chromatographie d'affinité pour identifier les cibles intracellulaires d'un composé**. Nous envisagerons à la fois les avantages et les limites de cette technique et quelques exemples de travaux ayant utilisé cette approche seront présentés.

Enfin, dans la troisième partie, nous nous interrogerons sur la **notion de sélectivité des inhibiteurs de CDKs**, en réfléchissant sur la pertinence des efforts mis en œuvre pour mettre au point des composés de plus en plus sélectifs.

### 1- Conclusions générales sur les résultats obtenus

Les recherches effectuées dans le cadre de cette thèse ont porté sur l'étude de la sélectivité *in vivo* de trois inhibiteurs de CDKs. En utilisant une approche de chromatographie d'affinité, nous avons caractérisé les cibles intracellulaires du **purvalanol**, de la **kenpaullone** et de l'**indirubine-3'-monoxime** dans un grand nombre de modèles.

#### A) Cibles intracellulaires du purvalanol

Notre étude a débuté par l'identification des cibles intracellulaires du purvalanol. Pour cet inhibiteur, l'interprétation des résultats de chromatographie d'affinité a été facilitée par le fait que nous disposions d'un excellent contrôle négatif, le méthyl-purvalanol (95M). Ce composé présente l'avantage d'être très proche du purvalanol (il n'en diffère que par un groupement méthyle), mais de ne posséder aucune activité inhibitrice sur les kinases. En effet, le groupement méthyle est fixé à un endroit de la molécule qui forme normalement une liaison hydrogène avec un acide aminé de CDK2 (Gray *et al.*, 1998). Ainsi, l'utilisation systématique de la matrice de 95M a permis de mettre en évidence, très rapidement, ce qui relevait de la fixation aspécifique sur la matrice.

L'analyse, dans un grand nombre de types cellulaires, des protéines retenues spécifiquement sur la matrice de purvalanol a permis de mettre en évidence une forte interaction entre ce composé et les cibles sur lesquelles il semblait être le plus efficace à l'issue des tests de sélectivité *in vitro* : CDK1, CDK2 et CDK5. Néanmoins, dans les cellules de mammifères, l'approche de chromatographie d'affinité a également permis de révéler que p42 et p44/MAPK étaient des cibles majoritaires du purvalanol. Ce résultat inattendu pose un certain nombre de questions. Pourquoi ces kinases, pourtant beaucoup moins sensibles au purvalanol que les CDKs, sont-elles retrouvées sur la matrice dans des proportions si

importantes ? En effet, il existe presque un facteur 1000 entre les  $IC_{50}$  du purvalanol sur CDK1, 2 et 5 (6 nM) et sur p42 et p44/MAPK (1 et 3.3  $\mu$ M, respectivement) (**Figure 6B**, sélectivité du purvalanol B). Est-ce que l'affinité plus modérée du purvalanol pour ces kinases est compensée dans la cellule par une plus grande abondance ? Une autre explication pourrait être que l'efficacité du purvalanol diffère entre les kinases recombinantes utilisées pour les tests de sélectivité *in vitro* et les kinases cellulaires natives. Un défaut de repliement ou de modifications post-traductionnelles lors de la production des kinases recombinantes pourrait conduire à une diminution de l'activité d'une partie d'entre elles, qui conserverait néanmoins la possibilité de fixer l'inhibiteur, ce qui aurait pour conséquence une augmentation apparente de l' $IC_{50}$ . Cette hypothèse a été testée en mesurant l'efficacité du purvalanol sur les kinases natives CDK1, CDK2, p42MAPK et p44MAPK, purifiées à partir de cellules en culture. Les résultats montrent que les  $IC_{50}$  mesurées sur les kinases natives sont les mêmes à peu de chose près que celles initialement mesurées sur les kinases recombinantes. L'interaction entre les MAPKs et le purvalanol a également été validée par une étude réalisée en système cellulaire, dans la lignée de fibroblastes de hamster CCL39. Les résultats confirment ceux obtenus par chromatographie d'affinité et montrent qu'un traitement avec le purvalanol inhibe à la fois les CDKs et les MAPKs dans la cellule.

En outre, une même protéine kinase, la caséine kinase 1 (CK1), a été retrouvée chez les quatre parasites unicellulaires testés (*Plasmodium falciparum*, *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma cruzi* et *Toxoplasma gondii*) après passage sur les billes de purvalanol. Puisque la CK1 n'a été détectée dans aucun des autres modèles, nous nous sommes interrogés sur l'origine de cette différence. Une des raisons possibles pourrait être une différence au niveau de la sensibilité au purvalanol des CK1 parasitaires et des CK1 des autres modèles. En effet, le purvalanol inhibe la CK1 de mammifère avec une  $IC_{50}$  de 3.3  $\mu$ M (**Figure 6**, sélectivité du purvalanol B), et des expériences préliminaires montrent qu'il est environ dix fois plus efficace sur la CK1 de *Plasmodium falciparum* ( $IC_{50}$  : 0.3  $\mu$ M) (Le Roch & Doerig, données non publiées). La détermination des  $IC_{50}$  du purvalanol sur les CK1 des

trois autres parasites testés et leur comparaison avec celle obtenue sur la CK1 de mammifère devrait permettre d'apporter des éléments supplémentaires pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. L'élucidation des cibles du purvalanol dans ces parasites est d'autant plus intéressante que des études actuellement en cours tendent à montrer que le purvalanol et ses dérivés inhibent la prolifération de ces parasites unicellulaires humains *in vitro* (Harmse *et al.*, 2001 et données non publiées).

### **B) Cibles intracellulaires des paullones**

L'analyse des cibles intracellulaires de la kenpaullone a été réalisée grâce aux billes de gwennpaullone. Les résultats des tests de sélectivité effectués pour la kenpaullone avaient permis de montrer que ce composé ainsi que les autres membres de la famille des paullones sont sélectifs de CDK1, CDK2 et CDK5 ( $IC_{50}$  comprises entre 400 et 850 nM) (Zaharevitz *et al.*, 1999) mais également de GSK-3 ( $IC_{50}$  : 23 nM) (Leost *et al.*, 2000) (**Figure 7B**). En outre, une étude réalisée avec l'alsterpaullone avait mis en évidence que ce composé était capable d'inhiber GSK-3 et CDK5 dans un contexte cellulaire (Leost *et al.*, 2000). Nous nous attendions donc à retrouver ces kinases sur la matrice de gwennpaullone. GSK-3  $\alpha$  et  $\beta$  ont été mises en évidence dans de nombreux modèles (cerveau de porc, lignée cellulaire PC12, organes de rat). En revanche, la présence de CDKs n'a pu être détectée dans aucun des modèles testés, même ceux d'entre eux (cerveau de porc, oursin, étoile de mer) qui contiennent des CDKs en quantité suffisante pour avoir été purifiées sur les billes de purvalanol. Si les CDKs sont présentes dans l'extrait mais pas sur les billes, d'où provient cette absence de fixation ? Dans un premier temps, nous avons vérifié qu'elle n'était pas due à un encombrement de la matrice par la GSK-3. Pour cela, des extraits de cerveaux de porc préalablement déplétés de GSK-3 à l'aide de billes d'axine (Primot *et al.*, 2000) ont été chargés sur les billes de gwennpaullone. Les résultats montrent que même en

l'absence de GSK-3 dans l'extrait, aucune fixation de CDK5 n'est observée. Nous avons ensuite tenté de fixer CDK5 et CDK1 purifiées sur la matrice de gwennpaullone, mais là encore, aucune fixation n'a pu être détectée (résultats non montrés), alors que la gwennpaullone libre est capable d'inhiber l'activité de ces deux kinases. Une des hypothèses alors émises pour tenter d'expliquer cette absence de fixation est que les CDKs pourraient être gênées par une trop grande proximité de la bille. L'utilisation d'une chaîne latérale plus longue pourrait peut-être permettre de s'affranchir de ce problème d'encombrement stérique et être plus favorable à la fixation des CDKs.

De manière assez surprenante, l'analyse des protéines retenues sur les billes de gwennpaullone a aussi permis de révéler que la malate déshydrogénase mitochondriale (MDH) est une cible majoritaire des paullones dans de nombreux modèles cellulaires. Dans l'œuf d'oursin et l'ovocyte de xénope, elle est même la seule protéine spécifiquement retenue sur les billes. Les bases moléculaires de l'interaction entre la MDH mitochondriale et les paullones ont été étudiées et les résultats suggèrent que l'activité de cette enzyme est sensible aux paullones ( $IC_{50}$  de l'ordre du micromolaire) et que l'inhibition par les paullones est compétitive de la fixation du  $NAD^+$  sur l'enzyme. Dans la cellule, la MDH joue un rôle dans de nombreuses voies métaboliques parmi lesquelles le cycle de Krebs et la gluconéogenèse où elle catalyse l'oxydation du malate en oxalo-acétate, ainsi que la réaction inverse (revues par Goward & Nicholls, 1994; Musrati *et al.*, 1998). Nous ne savons pas si les paullones sont capables d'inhiber la MDH mitochondriale dans un contexte cellulaire, ni quelles pourraient être les conséquences de l'inhibition (partielle ou totale) de cette enzyme dans la cellule. Néanmoins, répondre à cette question pourrait permettre de mieux comprendre les effets cellulaires des paullones, de mieux appréhender leurs éventuels effets secondaires, dans le cadre d'une utilisation en thérapeutique de cette famille de composés.

### C) Cibles intracellulaires de l'indirubine

Enfin, nous avons récemment débuté une étude pour identifier les cibles intracellulaires de l'indirubine-3'-monoxime par la même approche de chromatographie d'affinité. Pour cette partie, nous ne disposons que de résultats préliminaires et ce chapitre de conclusions-perspectives consistera moins à discuter les résultats obtenus qu'à présenter les expériences que nous envisageons de réaliser pour compléter cette étude.

Les résultats des études de sélectivité qui avaient été conduites avaient permis de montrer que les indirubines sont relativement sélectives de CDK1, CDK2, CDK5 (Hoessel *et al.*, 1999) et GSK-3  $\alpha/\beta$  (Leclerc *et al.*, 2001) (**Figure 9B**). Nous avons étudié les cibles intracellulaires de l'indirubine-3'-monoxime dans deux modèles cellulaires, la lignée cellulaire CCL39 et le cerveau de porc. L'analyse par coloration à l'argent de l'ensemble des protéines retenues sur les billes montre qu'un très grand nombre de protéines interagit avec la matrice dans ces deux modèles. Guidés par les données de sélectivité *in vitro*, nous avons cherché à détecter parmi ces protéines la présence de CDK1/2, CDK5 et GSK-3  $\alpha/\beta$  en Western blot. CDK1/2 est détectée après passage de lysats de cellules CCL39 et CDK5 et GSK-3  $\alpha/\beta$  après passage de lysats de cerveau de porc. Néanmoins, la quantité de CDK1/2 et de CDK5 retenue sur les billes d'indirubine dans ces deux modèles, est bien plus faible que celle retenue sur les billes de purvalanol, à quantités de protéines égales chargées sur les matrices (résultats non montrés). Le très grand nombre de protéines retrouvées sur les billes d'indirubine par rapport aux billes de purvalanol est peut-être à l'origine d'une saturation de la matrice, ce qui pourrait expliquer cette différence.

Dans le cerveau de porc, une protéine de poids moléculaire apparent 37 kDa a été excisée du gel et microséquencée. La séquence peptidique obtenue possède 100% d'identité avec la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) de porc (*Sus scrofa*). Les résultats préliminaires des tests d'activité enzymatique réalisés avec de la

## Conclusions-Perspectives

---

GAPDH de source commerciale (purifiée à partir de muscle de lapin) révèlent que l'indirubine-3'-monoxime inhibe cette enzyme, mais à de fortes doses. Nous suspectons que cette inhibition pourrait être compétitive vis à vis du  $\text{NAD}^+$  mais des expériences d'enzymologie classique vont être conduites pour le démontrer de manière certaine.

Nous souhaitons compléter les résultats préliminaires obtenus avec la matrice d'indirubine par des expériences supplémentaires. Tout d'abord, dans les deux modèles que nous avons testés, nous avons été frappés par le très grand nombre de protéines retenues sur la matrice d'indirubine. A notre sens, deux explications sont possibles pour interpréter ce résultat : soit l'indirubine n'est pas un produit très sélectif et ses effets cellulaires passent réellement par l'interaction avec toutes ces cibles, soit la position choisie pour fixer la chaîne latérale n'est pas tout à fait optimale et favorise la fixation de protéines de manière aspécifique. Pour le vérifier, nous envisageons d'une part de tester d'autres orientations pour attacher l'indirubine-3'-monoxime sur la matrice, et d'autre part d'immobiliser un composé très proche de l'indirubine, mais inactif sur les kinases (la 1-méthyl-indirubine-3'-monoxime) qui constituerait un meilleur contrôle négatif que les billes sans inhibiteur utilisées jusqu'à présent pour cette étude. Nous attendons beaucoup des billes orientées différemment et des billes contrôle négatif, car pour l'instant, le nombre trop important de protéines retenues et donc leur mauvaise séparation sur gel de polyacrylamide est un réel obstacle à leur identification par microséquençage. D'autre part, nous envisageons de poursuivre l'analyse des cibles intracellulaires de l'indirubine dans d'autres modèles, comme cela a déjà été réalisé avec les autres matrices. Ensuite, afin de vérifier que l'interaction entre l'indirubine-3'-monoxime et la GAPDH n'est pas spécifique du cerveau de porc, nous souhaitons tester sa présence dans d'autres modèles, par Western blot à l'aide d'anticorps spécifiques. Si cette interaction est mise en évidence dans d'autres modèles, et en particulier dans les lignées cellulaires humaines, il nous faudra alors vérifier si la GAPDH est inhibée en réponse à un traitement à l'indirubine-3'-monoxime dans la cellule. Si c'est le cas, nous tenterons d'évaluer comment cette inhibition participe aux effets cellulaires antiprolifératifs de ce composé

(Damiens *et al.*, 2001; Hoessel *et al.*, 1999; Marko *et al.*, 2001). La GAPDH catalyse la réaction d'oxydation du glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3-diphosphoglycérate, ainsi que la réaction inverse. A ce titre, elle joue un rôle clé dans la glycolyse et donc dans la production d'énergie. Néanmoins, des études récentes ont permis de montrer que la GAPDH de mammifère est impliquée dans d'autres processus cellulaires indépendamment de ses fonctions dans la glycolyse ainsi que dans certaines pathologies (Sirover, 1999). Parmi ces nombreuses fonctions "annexes" exercées par la GAPDH, son implication dans l'apoptose nous semble particulièrement intéressante. En effet, dans certaines formes d'apoptose, une augmentation du niveau de GAPDH ainsi qu'une accumulation nucléaire de la protéine a été observée (Carlile *et al.*, 2000). De plus, l'utilisation d'ARN antisens et d'approches pharmacologiques contre cette protéine ont permis de montrer qu'elle est nécessaire au déclenchement de l'apoptose (Carlile *et al.*, 2000). Ces résultats posent un certain nombre de questions : si l'indirubine inhibe la GAPDH dans la cellule, est-elle capable de protéger de l'apoptose induite par la GAPDH? Si c'est le cas, nous serions en présence d'un composé capable d'inhiber CDK5, GSK-3 et GAPDH, trois enzymes jouant un rôle dans l'apoptose (Carlile *et al.*, 2000; Frame & Cohen, 2001; Sandal *et al.*, 2002). Cette triple inhibition pourrait être extrêmement favorable à la neuroprotection et laisser envisager un avenir très prometteur pour l'indirubine dans le traitement des maladies neurodégénératives.

### **D) Réflexions générales**

En résumé, la technique de chromatographie d'affinité sur inhibiteur immobilisé a permis de retrouver (à une exception près) les cibles attendues des composés, c'est à dire celles sur lesquelles ils ont été optimisés. Mais cette approche a également permis de mettre en évidence des cibles inattendues, dont l'existence n'aurait pu être déduite des études classiques de sélectivité. Pour chacune des nouvelles cibles (p42/p44MAPK, MDH et GAPDH), les bases moléculaires de l'interaction avec l'inhibiteur ont été examinées en

testant leur sensibilité au composé libre. L'interaction avec les cibles attendues ainsi que la sensibilité des nouvelles cibles aux composés sont deux arguments solides pour valider cette approche.

D'une manière générale, des inhibiteurs que nous pensions être très sélectifs se révèlent avoir dans la cellule plus de cibles que nous anticipions initialement. Par conséquent, l'interprétation des effets cellulaires de ces composés doit prendre en compte l'existence de ces cibles additionnelles, quelle que soit leur utilisation (en thérapeutique ou comme outil en biologie cellulaire).

### **2- Possibilités de la technique**

L'utilisation de la chromatographie d'affinité sur inhibiteur immobilisé pour évaluer la sélectivité *in vivo* des composés présente de nombreux avantages. En effet, une fois la résine synthétisée, c'est une approche très rapide (30 minutes) et simple à mettre en œuvre (chromatographie en batch). Par rapport à l'approche consistant à tester le composé sur un panel de kinases purifiées, elle présente l'avantage d'évaluer le comportement de l'inhibiteur dans un contexte beaucoup plus proche de celui de la cellule. L'inhibiteur est mis en présence d'un extrait cellulaire contenant des kinases natives (et non recombinantes), présentes dans des proportions proches de celles de la cellule. De plus, cette approche d'affinité permet de détecter l'interaction avec d'autres cibles que les kinases, comme nous l'avons observé avec les trois inhibiteurs que nous avons testés.

De manière plus large, cette approche peut être utilisée pour identifier les cibles intracellulaires de composés variés, inhibiteurs de kinases ou autres, possédant un effet biologique avéré, mais dont le mécanisme d'action n'est pas connu. Dans la littérature, de nombreux exemples témoignent des potentialités de cette approche d'affinité.

## Conclusions-Perspectives

---

Ainsi, un autre inhibiteur de CDK, le flavopiridol, a été immobilisé pour analyser ses cibles intracellulaires. Outre les CDKs, la glycogène phosphorylase et l'aldéhyde déshydrogénase interagissent avec la matrice (Kaiser *et al.*, 2001; Schnier *et al.*, 1999). Des expériences d'enzymologie classique ainsi que la cristallisation du flavopiridol avec la glycogène phosphorylase ont permis de caractériser cette interaction et de mettre en évidence que le flavopiridol inhibe cette enzyme (Oikonomakos *et al.*, 2000).

Le (R)-deprenyl est une drogue actuellement utilisée pour le traitement de la maladie de Parkinson. Ce produit possède des propriétés neuroprotectrices et anti-apoptotiques dans de nombreux modèles, mais son mécanisme d'action cellulaire n'est pas connu. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action du (R)-deprenyl, Kratgen et coll. ont entrepris d'identifier les cibles intracellulaires de l'un de ses analogues, le CGP 3466, qui exerce les mêmes effets cellulaires (Kragten *et al.*, 1998). Les résultats de chromatographie montrent une forte interaction entre le produit et une enzyme, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Cette interaction est confirmée par deux approches complémentaires : le marquage par affinité et la technologie BIAcore®.

La didemnine B est un produit d'origine marine, capable d'inhiber la synthèse protéique et possédant des propriétés antiprolifératives (arrêt en phase G1 du cycle cellulaire) et immunosuppressives. Dans le cadre d'études visant à comprendre son mécanisme d'action intracellulaire, une approche de chromatographie d'affinité a été entreprise pour identifier les protéines interagissant avec ce produit. Les résultats montrent que le facteur d'élongation de la traduction EF-1 $\alpha$  est une des protéines majeures interagissant avec ce produit dans la cellule (Crews *et al.*, 1994). Cette interaction est très probablement à l'origine de l'inhibition de la synthèse protéique observée après un traitement par ce composé. En outre, la palmitoyl thioestérase a également été mise en évidence sur la matrice de didemnine B après passage de lysats de cerveau de bovin (Crews *et al.*, 1996). Pour connaître la nature de cette interaction et les effets possibles de la didemnine B sur

l'activité de cette enzyme, une étude utilisant la palmitoyl thioesterase recombinante humaine a été conduite. Elle montre que la didemnine B inhibe cette enzyme de manière non compétitive (Meng *et al.*, 1998).

Selon le même principe, une variante de cette méthode permettant le marquage des protéines cibles d'une molécule donnée a également été utilisée. La molécule dont on veut étudier les interactions est biotinylée et incubée sur des cellules en culture. Les cellules sont ensuite lysées et les lysats chargés sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Les protéines chargées sur le gel sont transférées sur une membrane et révélées à l'aide d'un conjugué streptavidine-hrp. A la différence de la technique de chromatographie d'affinité précédemment décrite, cette approche permet de détecter les protéines avec lesquelles la molécule forme des liaisons covalentes. Le choix de la position la plus appropriée pour greffer la biotine se fait en fonction des résultats des études structure-activité disponibles, de manière à ce que le composé conserve son activité biologique. Cette approche a été employée pour étudier les cibles intracellulaires de deux composés à activité anti-angiogénique, le TNP-470 et l'eponemycine (Sin *et al.*, 1998; Sin *et al.*, 1997). Les résultats montrent que le dérivé biotinylé du TNP-470 interagit et forme une liaison covalente avec une protéine majoritaire, la méthionine aminopeptidase 2 (MetAP2). Des tests réalisés dans un système cellulaire (chez *S. cerevisiae*) ont permis de mettre en évidence que le composé libre inhibait cette enzyme, permettant ainsi de valider les résultats obtenus par cette technique.

Les travaux cités dans ce paragraphe constituent des exemples d'utilisation avec succès de l'approche d'affinité (classique ou par marquage) pour identifier les protéines cibles de composés. Pour chacun des produits, ces travaux ont conduit à l'identification de cibles nouvelles, non suspectées a priori, et ces nouvelles données fournissent des éléments pour mieux comprendre le mode d'action des composés. Cependant, un des problèmes majeurs rencontrés lors de l'étude des cibles intracellulaires d'un produit par ce type

d'approche est la difficulté de l'identification des protéines retenues sur la matrice. En effet, certaines protéines sont trop instables, trop peu abondantes ou pas suffisamment pures pour une identification certaine par microséquençage. Pour s'affranchir de ces problèmes, des méthodes alternatives ont été développées. Toujours basées sur l'affinité entre un produit et une protéine, elles permettent un accès plus aisé à la séquence codant pour la protéine cible et donc une identification de celle-ci plus facile. Ces méthodes sont par exemple le triple hybride (Licitra & Liu, 1996), le mRNA display (McPherson *et al.*, 2002) ou encore le drug Western (Tanaka *et al.*, 1999). Il convient de rappeler que chaque méthode comporte ses avantages et ses limites et qu'une bonne connaissance des caractéristiques de chacune d'entre elles permet à l'expérimentateur de faire le meilleur choix, en fonction du problème posé, de la sensibilité qu'il désire apporter au travail et du déroulement des expériences.

### **3- Sélectivité des inhibiteurs de CDKs**

Il est clair que plus on étudie la sélectivité des composés, moins ils semblent être sélectifs. En d'autres termes, l'idée que l'on se fait de la sélectivité des inhibiteurs dépend directement des moyens mis en œuvre pour la mesurer. Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse illustrent très clairement ce propos. Initialement, les tests de sélectivité classiques effectués sur un panel de 25-30 kinases purifiées suggéraient que ces composés étaient très sélectifs des CDKs (purvalanol) ou des CDKs et de GSK-3 (paullones et indirubine). L'analyse de chromatographie d'affinité conduite remet en cause cette bonne sélectivité, en mettant en évidence un certain nombre de cibles additionnelles, dont l'inhibition participe très certainement aux effets cellulaires de ces composés. Pour nuancer ce propos, il convient de remarquer que certaines familles d'inhibiteurs apparaissent tout de même plus sélectives que d'autres. Ainsi, si l'on met de côté l'hypothèse que l'orientation choisie pour les billes d'indirubine n'est pas optimale et génère de la fixation aspécifique, on

remarque que le nombre de protéines retenues sur les billes de purvalanol ou de paullones est bien plus faible que celui des protéines retenues sur les billes d'indirubine. Cette observation aurait tendance à suggérer que les indirubines sont moins sélectives que les paullones ou les purvalanols, et cette tendance se dégageait déjà à l'issue des tests de sélectivité classique.

Même s'ils sont moins sélectifs que nous l'anticipions initialement, ces inhibiteurs de CDKs possèdent tout de même des propriétés cellulaires très prometteuses qui ont encouragé leur évaluation comme anticancéreux par des études pré-cliniques et cliniques (Damien & Meijer, 2000; Senderowicz & Sausville, 2000; Zhai *et al.*, 2002). Le moins sélectif des trois, l'indirubine-3'-monoxime, est même utilisé chez l'homme par la médecine traditionnelle chinoise pour soigner les leucémies myéloïdes chroniques. Ces observations conduisent à nous interroger sur la nécessité de mettre au point des composés toujours plus sélectifs. Etant donné que l'indirubine, un composé apparemment peu sélectif, possède une efficacité et une innocuité suffisantes pour être utilisé chez l'homme, pourquoi toujours tenter de mettre au point des composés plus sélectifs ? Les résultats encourageants des tests cliniques engagés pour évaluer le potentiel anticancéreux d'un autre inhibiteur de CDK relativement peu sélectif, le flavopiridol, contribuent également à soulever cette interrogation. Quel degré de sélectivité est-il possible d'atteindre ? La sélectivité absolue existe-t-elle ? En d'autres termes, est-il possible de mettre en évidence un inhibiteur chimique qui n'ait qu'une seule cible dans la cellule ? Du point de vue des inhibiteurs chimiques de CDKs sur lesquels nous avons travaillé, qui agissent de manière compétitive vis à vis de la fixation de l'ATP au niveau de l'enzyme, il est assez improbable qu'un tel composé soit un jour mis en évidence. Etant donné le grand nombre de protéines interagissant avec l'ATP dans la cellule, la sélectivité absolue paraît difficile à obtenir. Par ailleurs, si un tel inhibiteur existait, il ne constituerait peut-être pas la meilleure réponse pour soigner les désordres hyperprolifératifs, dans lesquels de multiples voies sont dérégulées. Il serait tentant de penser que par le principe même de leur fonctionnement, des approches comme les inhibiteurs peptidiques

(mimant les inhibiteurs naturels de CDKs ou empêchant la liaison CDK/cycline) (revue par Garrett & Fattaey, 1999), les stratégies ARN antisens ou ARN interférence (Jacque *et al.*, 2002; revue par Hannon, 2002) dirigées contre les CDKs sont plus à même de permettre une inhibition sélective que les inhibiteurs compétitifs de l'ATP. Mais en l'absence de démonstration claire de cette sélectivité, la prudence reste de mise.

Ces réflexions suggèrent alors que c'est moins la sélectivité que la connaissance de celle-ci qui importe, dans l'optique de l'utilisation d'un inhibiteur en thérapeutique. La connaissance précise des cibles intracellulaires d'un composé présentant une activité biologique va permettre d'améliorer son efficacité :

- i. en fournissant des paramètres de criblage supplémentaires (autres cibles) permettant d'optimiser d'autres analogues.
- ii. en fournissant une information sur l'ensemble des cibles qui doivent être touchées pour obtenir l'effet cellulaire désiré (la recherche d'une combinaison d'effets enzymatiques semble plus favorable que celle d'un effet isolé, plus susceptible d'engendrer un phénomène de résistance).
- iii. en fournissant des informations sur les cibles qu'il ne faut pas toucher, permettant ainsi d'éviter les éventuels effets secondaires.

Evidemment, comme outil de recherche en biologie cellulaire, un inhibiteur possédant une sélectivité absolue serait extrêmement utile. Il permettrait, en complément des approches génétiques, d'inactiver spécifiquement, mais de manière temporaire et réversible une kinase pour comprendre les rôles qu'elle exerce dans la cellule. Même s'ils n'atteignent pas ce degré de sélectivité, les inhibiteurs de kinases actuellement disponibles peuvent être très informatifs, tant que l'on interprète les résultats en parfaite connaissance de leurs cibles intracellulaires réelles.

## Conclusions-Perspectives

---

Pour apporter des éléments de réponse à la question du mécanisme d'action des inhibiteurs de CDKs dans la cellule, le travail effectué au cours de cette thèse s'est focalisé sur une question unique : l'identification des cibles intracellulaires des inhibiteurs de CDKs. Les informations obtenues pour chacun des composés ont été mises à profit pour mieux comprendre et expliquer leurs effets cellulaires. Pour compléter ces données et ainsi contribuer à une meilleure connaissance du mode d'action de ces composés dans la cellule de nombreuses autres études auraient également pu être réalisées : l'étude de la localisation intracellulaire des inhibiteurs de CDKs à l'aide de composés fluorescents, leur métabolisme une fois rentrés dans la cellule, leurs effets sur l'expression de gènes.

Enfin, les informations obtenues pour chaque inhibiteur nous paraissent également très intéressantes si on les envisage non plus individuellement, mais de manière globale. Le recoupement et la confrontation des données disponibles sur des inhibiteurs de CDKs appartenant à des classes chimiques différentes pourraient être mis à profit pour mieux connaître et comprendre leurs mécanismes d'action. En effet, la comparaison des effets cellulaires, de la sélectivité *in vitro* et de la sélectivité *in vivo* va faire apparaître des similitudes entre certains composés, mais aussi des particularités propres à un seul inhibiteur. L'analyse de celles-ci pourrait permettre de commencer à dessiner un schéma général (cible qu'il faut atteindre pour obtenir tel effet, cible qu'il ne faut pas atteindre pour tel autre effet etc.), très utile pour la mise au point de nouveaux composés.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Adachi, S., Ito, H., Tamamori Adachi, M., Ono, Y., Nozato, T., Abe, S., Ikeda, M., Marumo, F. & Hiroe, M. (2001). Cyclin A/cdk2 activation is involved in hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Circulation Research* **88**(4), 408-414.
- Advani, S. J., Brandimarti, R., Weichselbaum, R. R. & Roizman, B. (2000). The disappearance of cyclins A and B and the increase in activity of the G(2)/M-phase cellular kinase cdc2 in herpes simplex virus 1- infected cells require expression of the alpha22/U(S)1.5 and U(L)13 viral genes. *J Virol* **74**(1), 8-15.
- Akoulitchev, S., Chuikov, S. & Reinberg, D. (2000). TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* **407**(6800), 102-6.
- Arellano, M. & Moreno, S. (1997). Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol* **29**(4), 559-73.
- Bagella, L., MacLachlan, T. K., Buono, R. J., Pisano, M. M., Giordano, A. & De Luca, A. (1998). Cloning of murine CDK9/PITALRE and its tissue-specific expression in development. *J Cell Physiol* **177**(2), 206-13.
- Baumann, K., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Piwnicka-Worms, H. & Mandelkow, E. (1993). Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin- dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett* **336**(3), 417-24.
- Beach, D., Durkacz, B. & Nurse, P. (1982). Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* **300**(5894), 706-9.
- Bibb, J. A., Snyder, G. L., Nishi, A., Yan, Z., Meijer, L., Fienberg, A. A., Tsai, L. H., Kwon, Y. T., Girault, J. A., Czernik, A. J., Haganir, R. L., Hemmings, H. C., Jr., Nairn, A. C. & Greengard, P. (1999). Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature* **402**(6762), 669-71.

## Références bibliographiques

---

- Borgne, A. & Golsteyn, R. M. (2002). The role of cyclin-dependent kinases in apoptosis. *Prog Cell Cycle Res* **5**, in press.
- Borgne, A. & Meijer, L. (1996). Sequential dephosphorylation of p34(cdc2) on Thr-14 and Tyr-15 at the prophase/metaphase transition. *J Biol Chem* **271**(44), 27847-54.
- Borgne, A. & Meijer, L. (1999). Inhibiteurs chimiques des kinases dépendantes des cyclines: recherche et applications thérapeutiques potentielles. *Med Sci* **15**, 496-503.
- Bresnahan, W. A., Boldogh, I., Chi, P., Thompson, E. A. & Albrecht, T. (1997). Inhibition of cellular Cdk2 activity blocks human cytomegalovirus replication. *Virology* **231**(2), 239-47.
- Bresnahan, W. A., Boldogh, I., Thompson, E. A. & Albrecht, T. (1996). Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1. *Virology* **224**(1), 150-60.
- Brooks, E. E., Gray, N. S., Joly, A., Kerwar, S. S., Lum, R., Mackman, R. L., Norman, T. C., Rosete, J., Rowe, M., Schow, S. R., Schultz, P. G., Wang, X., Wick, M. M. & Shiffman, D. (1997). CVT-313, a specific and potent inhibitor of CDK2 that prevents neointimal proliferation. *J Biol Chem* **272**(46), 29207-11.
- Carlile, G. W., Chalmers-Redman, R. M., Tatton, N. A., Pong, A., Borden, K. E. & Tatton, W. G. (2000). Reduced apoptosis after nerve growth factor and serum withdrawal: conversion of tetrameric glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to a dimer. *Mol Pharmacol* **57**(1), 2-12.
- Chae, T., Kwon, Y. T., Bronson, R., Dikkes, P., Li, E. & Tsai, L. H. (1997). Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron* **18**(1), 29-42.
- Chang, Y. T., Gray, N. S., Rosania, G. R., Sutherlin, D. P., Kwon, S., Norman, T. C., Sarohia, R., Leost, M., Meijer, L. & Schultz, P. G. (1999). Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors. *Chem Biol* **6**(6), 361-75.

## Références bibliographiques

---

- Chao, S. H., Fujinaga, K., Marion, J. E., Taube, R., Sausville, E. A., Senderowicz, A. M., Peterlin, B. M. & Price, D. H. (2000). Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication. *J Biol Chem* **275**(37), 28345-8.
- Chen, F. & Studzinski, G. P. (2001). Expression of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 activator p35Nck5a in human monocytic cells is associated with differentiation. *Blood* **97**(12), 3763-7.
- Clough, J. (2002). CDK inhibitor shows promise for inflammatory kidney disease. *Drug Discov Today* **7**(15), 789-790.
- Crews, C. M., Collins, J. L., Lane, W. S., Snapper, M. L. & Schreiber, S. L. (1994). GTP-dependent binding of the antiproliferative agent didemnin to elongation factor 1 alpha. *J Biol Chem* **269**(22), 15411-4.
- Crews, C. M., Lane, W. S. & Schreiber, S. L. (1996). Didemnin binds to the protein palmitoyl thioesterase responsible for infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(9), 4316-9.
- Dahmus, M. E. (1995). Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Biochim Biophys Acta* **1261**(2), 171-82.
- Damiens, E., Baratte, B., Marie, D., Eisenbrand, G. & Meijer, L. (2001). Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest. *Oncogene* **20**(29), 3786-3797.
- Damiens, E. & Meijer, L. (2000). [Chemical inhibitors of cyclic-dependent kinases: preclinical and clinical study]. *Pathol Biol (Paris)* **48**(3), 340-51.
- Davies, T. G., Tunnah, P., Meijer, L., Marko, D., Eisenbrand, G., Endicott, J. A. & Noble, M. E. (2001). Inhibitor binding to active and inactive CDK2: the crystal structure of CDK2-cyclin A/indirubin-5-sulphonate. *Structure (Camb)* **9**(5), 389-97.
- Davis, S. T., Benson, B. G., Bramson, H. N., Chapman, D. E., Dickerson, S. H., Dold, K. M., Eberwein, D. J., Edelstein, M., Frye, S. V., Gampe Jr, R. T., Griffin, R. J., Harris, P.

## Références bibliographiques

---

- A., Hassell, A. M., Holmes, W. D., Hunter, R. N., Knick, V. B., Lackey, K., Lovejoy, B., Luzzio, M. J., Murray, D., Parker, P., Rocque, W. J., Shewchuk, L., Veal, J. M., Walker, D. H. & Kuyper, L. F. (2001). Prevention of chemotherapy-induced alopecia in rats by CDK inhibitors. *Science* **291**(5501), 134-7.
- De Azevedo, W. F., Leclerc, S., Meijer, L., Havlicek, L., Strnad, M. & Kim, S. H. (1997). Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem* **243**(1-2), 518-26.
- Dhavan, R. & Tsai, L. H. (2001). A decade of CDK5. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**(10), 749-759.
- Doerig, C., Meijer, L. & Mottram, J. (2002). Protein kinases as drug targets in parasitic protozoa. *Trends Parasitol* **18**(8), 366-371.
- Dranovsky, A., Vincent, I., Gregori, L., Schwarzman, A., Colflesh, D., Enghild, J., Strittmatter, W., Davies, P. & Goldgaber, D. (2001). Cdc2 phosphorylation of nucleolin demarcates mitotic stages and Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Aging* **22**(4), 517-28.
- Edamatsu, H., Gau, C. L., Nemoto, T., Guo, L. & Tamanoi, F. (2000). Cdk inhibitors, roscovitine and olomoucine, synergize with farnesyltransferase inhibitor (FTI) to induce efficient apoptosis of human cancer cell lines. *Oncogene* **19**(27), 3059-68.
- Egly, J. M. (2001). The 14th Datta Lecture. TFIIF: from transcription to clinic. *FEBS Lett* **498**(2-3), 124-8.
- Fischer, P. M. & Lane, D. P. (2000). Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-cancer therapeutics. *Curr Med Chem* **7**(12), 1213-45.
- Flores, O., Lee, G., Kessler, J., Miller, M., Schlieff, W., Tomassini, J. & Hazuda, D. (1999). Host-cell positive transcription elongation factor b kinase activity is essential and limiting for HIV type 1 replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13), 7208-13.

## Références bibliographiques

---

- Frame, S. & Cohen, P. (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* **359**(Pt 1), 1-16.
- Garrett, M. D. & Fattaey, A. (1999). CDK inhibition and cancer therapy. *Curr Opin Genet Dev* **9**(1), 104-11.
- Gibbons, J., Arat, S., Rzucidlo, J., Miyoshi, K., Waltenburg, R., Respess, D., Venable, A. & Stice, S. (2002). Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biology of Reproduction* **66**(4), 895-900.
- Gil-Gomez, G., Berns, A. & Brady, H. J. (1998). A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulate Cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *Embo J* **17**(24), 7209-18.
- Goward, C. R. & Nicholls, D. J. (1994). Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Sci* **3**(10), 1883-8.
- Gray, N., Detivaud, L., Doerig, C. & Meijer, L. (1999). ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Curr Med Chem* **6**(9), 859-75.
- Gray, N. S., Wodicka, L., Thunnissen, A. M., Norman, T. C., Kwon, S., Espinoza, F. H., Morgan, D. O., Barnes, G., LeClerc, S., Meijer, L., Kim, S. H., Lockhart, D. J. & Schultz, P. G. (1998). Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science* **281**(5376), 533-8.
- Guo, K. & Walsh, K. (1997). Inhibition of myogenesis by multiple cyclin-Cdk complexes. Coordinate regulation of myogenesis and cell cycle activity at the level of E2F. *J Biol Chem* **272**(2), 791-7.
- Gussio, R., Zaharevitz, D. W., McGrath, C. F., Pattabiraman, N., Kellogg, G. E., Schultz, C., Link, A., Kunick, C., Leost, M., Meijer, L. & Sausville, E. A. (2000). Structure-based design modifications of the paullone molecular scaffold for cyclin-dependent kinase inhibition. *Anticancer Drug Des* **15**(1), 53-66.

## Références bibliographiques

---

- Hakem, A., Sasaki, T., Kozieradzki, I. & Penninger, J. M. (1999). The cyclin-dependent kinase Cdk2 regulates thymocyte apoptosis. *J Exp Med* **189**(6), 957-68.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M. & Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**(4861), 42-52.
- Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature* **418**(6894), 244-51.
- Hardcastle, I. R., Golding, B. T. & Griffin, R. J. (2002). Designing inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **42**, 325-348.
- Harmse, L., van Zyl, R., Gray, N., Schultz, P., Leclerc, S., Meijer, L., Doerig, C. & Havlik, I. (2001). Structure-activity relationships and inhibitory effects of various purine derivatives on the in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol* **62**(3), 341-8.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**(6805), 770-6.
- Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J. A., Nobel, M. E., Lawrie, A., Tunnah, P., Leost, M., Damiens, E., Marie, D., Marko, D., Niederberger, E., Tang, W., Eisenbrand, G. & Meijer, L. (1999). Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol* **1**(1), 60-7.
- Hossain, A., Holt, T., Ciacci-Zanella, J. & Jones, C. (1997). Analysis of cyclin-dependent kinase activity after herpes simplex virus type 2 infection. *J Gen Virol* **78**(Pt 12), 3341-8.
- Jacque, J. M., Triques, K. & Stevenson, M. (2002). Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* **418**(6896), 435-8.
- Jault, F. M., Jault, J. M., Ruchti, F., Fortunato, E. A., Clark, C., Corbeil, J., Richman, D. D. & Spector, D. H. (1995). Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J Virol* **69**(11), 6697-704.

## Références bibliographiques

---

- Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J. & Pavletich, N. P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**(6538), 313-20.
- Jordan, R., Schang, L. & Schaffer, P. A. (1999). Transactivation of herpes simplex virus type 1 immediate-early gene expression by virion-associated factors is blocked by an inhibitor of cyclin-dependent protein kinases. *J Virol* **73**(10), 8843-7.
- Kaiser, A., Nishi, K., Gorin, F. A., Walsh, D. A., Bradbury, E. M. & Schnier, J. B. (2001). The cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase. *Arch Biochem Biophys* **386**(2), 179-87.
- Kamb, A. (1998). Cyclin-dependent kinase inhibitors and human cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* **227**, 139-48.
- Karp, J. E. & Broder, S. (1995). Molecular foundations of cancer: new targets for intervention. *Nat Med* **1**(4), 309-20.
- Kaubisch, A. & Schwartz, G. K. (2000). Cyclin-dependent kinase and protein kinase C inhibitors: a novel class of antineoplastic agents in clinical development. *Cancer J* **6**(4), 192-212.
- Keyomarsi, K., O'Leary, N., Molnar, G., Lees, E., Fingert, H. J. & Pardee, A. B. (1994). Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res* **54**(2), 380-5.
- Keyomarsi, K. & Pardee, A. B. (1993). Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(3), 1112-6.
- Kitagawa, M., Okabe, T., Ogino, H., Matsumoto, H., Suzuki-Takahashi, I., Kokubo, T., Higashi, H., Saitoh, S., Taya, Y., Yasuda, H. & et al. (1993). Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase. *Oncogene* **8**(9), 2425-32.
- Knockaert, M., Greengard, P. & Meijer, L. (2002). Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol Sci* **23**(9), 417.

## Références bibliographiques

---

- Ko, J., Humbert, S., Bronson, R. T., Takahashi, S., Kulkarni, A. B., Li, E. & Tsai, L. H. (2001). p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J Neurosci* **21**(17), 6758-71.
- Kobayashi, S., Ishiguro, K., Omori, A., Takamatsu, M., Arioka, M., Imahori, K. & Uchida, T. (1993). A cdc2-related kinase PSSALRE/cdk5 is homologous with the 30 kDa subunit of tau protein kinase II, a proline-directed protein kinase associated with microtubule. *FEBS Lett* **335**(2), 171-5.
- Kohzato, N., Dong, Y. Y., Sui, L., Masaki, T., Nagahata, S., Nishioka, M., Konishi, R. & Tokuda, M. (2001). Overexpression of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 is correlated with development of hepatocellular carcinomas. *Hepatology Research* **21**(1), 27-39.
- Kragten, E., Lalande, I., Zimmermann, K., Roggo, S., Schindler, P., Muller, D., van Oostrum, J., Waldmeier, P. & Furst, P. (1998). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, the putative target of the antiapoptotic compounds CGP 3466 and R(-)-deprenyl. *J Biol Chem* **273**(10), 5821-8.
- Kusakawa, G., Saito, T., Onuki, R., Ishiguro, K., Kishimoto, T. & Hisanaga, S. (2000). Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J Biol Chem* **275**(22), 17166-72.
- Leclerc, S., Garnier, M., Hoessel, R., Marko, D., Bibb, J. A., Snyder, G. L., Greengard, P., Biernat, J., Wu, Y. Z., Mandelkow, E. M., Eisenbrand, G. & Meijer, L. (2001). Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *J Biol Chem* **276**(1), 251-60.
- Lee, M. G. & Nurse, P. (1987). Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2. *Nature* **327**(6117), 31-5.

## Références bibliographiques

---

- Lenormand, P., Brondello, J. M., Brunet, A. & Pouyssegur, J. (1998). Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *J Cell Biol* **142**(3), 625-33.
- Leost, M., Schultz, C., Link, A., Wu, Y. Z., Biernat, J., Mandelkow, E. M., Bibb, J. A., Snyder, G. L., Greengard, P., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Kunick, C. & Meijer, L. (2000). Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta and cyclin-dependent kinase 5/p25. *Eur J Biochem* **267**(19), 5983-94.
- Lew, J., Huang, Q. Q., Qi, Z., Winkfein, R. J., Aebersold, R., Hunt, T. & Wang, J. H. (1994). A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* **371**(6496), 423-6.
- Licitra, E. J. & Liu, J. O. (1996). A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(23), 12817-21.
- Malgrange, B., Lefèbre, P. & Moonen, G. (1998). Biologie cellulaire de la prévention et du traitement des surdités neurosensorielles. *Med/Sci* **14**, 588-94.
- Malumbres, M. & Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* **1**(3), 222-31.
- Mancebo, H. S., Lee, G., Flygare, J., Tomassini, J., Luu, P., Zhu, Y., Peng, J., Blau, C., Hazuda, D., Price, D. & Flores, O. (1997). P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro. *Genes Dev* **11**(20), 2633-44.
- Mani, S., Wang, C., Wu, K., Francis, R. & Pestell, R. (2000). Cyclin-dependent kinase inhibitors: novel anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs* **9**(8), 1849-70.
- Marko, D., Schatzle, S., Friedel, A., Genzlinger, A., Zankl, H., Meijer, L. & Eisenbrand, G. (2001). Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells. *British Journal of Cancer* **84**(2), 283-289.

## Références bibliographiques

---

- Marshall, N. F., Peng, J., Xie, Z. & Price, D. H. (1996). Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J Biol Chem* **271**(43), 27176-83.
- Matushansky, I., Radparvar, F. & Skoultchi, A. I. (2000). Reprogramming leukemic cells to terminal differentiation by inhibiting specific cyclin-dependent kinases in G(1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(26), 14317-14322.
- McPherson, M., Yang, Y., Hammond, P. W. & Kreider, B. L. (2002). Drug receptor identification from multiple tissues using cellular-derived mRNA display libraries. *Chem Biol* **9**(6), 691-8.
- Meijer, L. (2000). Cyclin-dependent kinases inhibitors as potential anticancer, antineurodegenerative, antiviral and antiparasitic agents. *Drug Resist Updat* **3**(2), 83-88.
- Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J. P., Blow, J. J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J. G. & Moulinoux, J. P. (1997). Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* **243**(1-2), 527-36.
- Meijer, L. & Pondaven, P. (1988). Cyclic activation of histone H1 kinase during sea urchin egg mitotic divisions. *Exp Cell Res* **174**(1), 116-29.
- Meikrantz, W. & Schlegel, R. (1996). Suppression of apoptosis by dominant negative mutants of cyclin-dependent protein kinases. *J Biol Chem* **271**(17), 10205-9.
- Meng, L., Sin, N. & Crews, C. M. (1998). The antiproliferative agent didemnin B uncompetitively inhibits palmitoyl protein thioesterase. *Biochemistry* **37**(29), 10488-92.
- Mermillod, P., Tomanek, M., Marchal, R. & Meijer, L. (2000). High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. *Mol Reprod Dev* **55**(1), 89-95.

## Références bibliographiques

---

- Meyerson, M., Enders, G. H., Wu, C. L., Su, L. K., Gorka, C., Nelson, C., Harlow, E. & Tsai, L. H. (1992). A family of human cdc2-related protein kinases. *Embo J* **11**(8), 2909-17.
- Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* **374**(6518), 131-4.
- Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 261-91.
- Musrati, R. A., Kollarova, M., Mernik, N. & Mikulasova, D. (1998). Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. *Gen Physiol Biophys* **17**(3), 193-210.
- Neant, I. & Guerrier, P. (1988). 6-Dimethylaminopurine blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity. *Exp Cell Res* **176**(1), 68-79.
- Nelson, P. J., Gelman, I. H. & Klotman, P. E. (2001). Suppression of HIV-1 expression by inhibitors of cyclin-dependent kinases promotes differentiation of infected podocytes. *J Am Soc Nephrol* **12**(12), 2827-31.
- Nguyen, M. D., Lariviere, R. C. & Julien, J. P. (2001). Deregulation of Cdk5 in a mouse model of ALS: toxicity alleviated by perikaryal neurofilament inclusions. *Neuron* **30**(1), 135-47.
- Nikolic, M., Dudek, H., Kwon, Y. T., Ramos, Y. F. & Tsai, L. H. (1996). The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev* **10**(7), 816-25.
- Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344**(6266), 503-8.
- Nurse, P. & Bissett, Y. (1981). Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature* **292**(5823), 558-60.
- Obaya, A. J. & Sedivy, J. M. (2002). Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* **59**(1), 126-42.

## Références bibliographiques

---

- O'Connor, D. S., Grossman, D., Plescia, J., Li, F., Zhang, H., Villa, A., Tognin, S., Marchisio, P. C. & Altieri, D. C. (2000). Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24), 13103-7.
- O'Connor, D. S., Wall, N. R., Porter, A. C. & Altieri, D. C. (2002). A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell* **2**(1), 43-54.
- Oelgeschlager, T. (2002). Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control. *J Cell Physiol* **190**(2), 160-9.
- Ohshima, T., Ward, J. M., Huh, C. G., Longenecker, G., Veeranna, Pant, H. C., Brady, R. O., Martin, L. J. & Kulkarni, A. B. (1996). Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20), 11173-8.
- Oikonomakos, N. G., Schnier, J. B., Zographos, S. E., Skamnaki, V. T., Tsitsanou, K. E. & Johnson, L. N. (2000). Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site. *J Biol Chem* **275**(44), 34566-73.
- Ongkeko, W., Ferguson, D. J., Harris, A. L. & Norbury, C. (1995). Inactivation of Cdc2 increases the level of apoptosis induced by DNA damage. *J Cell Sci* **108**(Pt 8), 2897-904.
- Orphanides, G., Lagrange, T. & Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* **10**(21), 2657-83.
- Padmanabhan, J., Park, D. S., Greene, L. A. & Shelanski, M. L. (1999). Role of cell cycle regulatory proteins in cerebellar granule neuron apoptosis. *J Neurosci* **19**(20), 8747-56.
- Park, D. S., Farinelli, S. E. & Greene, L. A. (1996). Inhibitors of cyclin-dependent kinases promote survival of post-mitotic neuronally differentiated PC12 cells and sympathetic neurons. *J Biol Chem* **271**(14), 8161-9.

## Références bibliographiques

---

- Park, D. S., Morris, E. J., Greene, L. A. & Geller, H. M. (1997). G1/S cell cycle blockers and inhibitors of cyclin-dependent kinases suppress camptothecin-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci* **17**(4), 1256-70.
- Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P. & Tsai, L. H. (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* **402**(6762), 615-22.
- Patzke, H. & Tsai, L. H. (2002). Cdk5 sinks into ALS. *Trends Neurosci* **25**(1), 8-10.
- Paull, K. D., Lin, C. M., Malspeis, L. & Hamel, E. (1992). Identification of novel antimetabolic agents acting at the tubulin level by computer-assisted evaluation of differential cytotoxicity data. *Cancer Res* **52**(14), 3892-900.
- Pavletich, N. P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* **287**(5), 821-8.
- Peng, J., Marshall, N. F. & Price, D. H. (1998). Identification of a cyclin subunit required for the function of Drosophila P-TEFb. *J Biol Chem* **273**(22), 13855-60.
- Pippin, J. W., Qu, Q., Meijer, L. & Shankland, S. J. (1997). Direct in vivo inhibition of the nuclear cell cycle cascade in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis with Roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase antagonist. *J Clin Invest* **100**(10), 2512-20.
- Ponderato, N., Crotti, G., Turini, P., Duchi, R., Galli, C. & Lazzari, G. (2002). Embryonic and foetal development of bovine oocytes treated with a combination of butyrolactone I and roscovitine in an enriched medium prior to IVM and IVF. *Mol Reprod Dev* **62**(4), 513-8.
- Price, D. H. (2000). P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **20**(8), 2629-34.

## Références bibliographiques

---

- Primot, A., Baratte, B., Gompel, M., Borgne, A., Liabeuf, S., Romette, J. L., Jho, E. H., Costantini, F. & Meijer, L. (2000). Purification of GSK-3 by affinity chromatography on immobilized axin. *Protein Expr Purif* **20**(3), 394-404.
- Rialet, V. & Meijer, L. (1991). A new screening test for antimitotic compounds using the universal M phase-specific protein kinase, p34cdc2/cyclin Bcdc13, affinity-immobilized on p13suc1-coated microtitration plates. *Anticancer Res* **11**(4), 1581-90.
- Rickert, P., Seghezzi, W., Shanahan, F., Cho, H. & Lees, E. (1996). Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II. *Oncogene* **12**(12), 2631-40.
- Rosania, G. R. & Chang, Y. T. (2000). Targeting hyperproliferative disorders with cyclin-dependent kinase inhibitors. *Exp. Opin. Ther. Patents* **10**, 1-16.
- Rosania, G. R., Merlie, J., Jr., Gray, N., Chang, Y. T., Schultz, P. G. & Heald, R. (1999). A cyclin-dependent kinase inhibitor inducing cancer cell differentiation: biochemical identification using *Xenopus* egg extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9), 4797-802.
- Roy, R., Adamczewski, J. P., Seroz, T., Vermeulen, W., Tassan, J. P., Schaeffer, L., Nigg, E. A., Hoeijmakers, J. H. & Egly, J. M. (1994). The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription- DNA repair factor. *Cell* **79**(6), 1093-101.
- Sandal, T., Stapnes, C., Kleivdal, H., Hedin, L. & Doskeland, S. O. (2002). A novel, extraneuronal role for cyclin-dependent protein kinase 5 (CDK5): modulation of cAMP-induced apoptosis in rat leukemia cells. *J Biol Chem* **277**(23), 20783-93.
- Sausville, E. A. (2002). Complexities in the development of cyclin-dependent kinase inhibitor drugs. *Trends Mol Med* **8**(4(Suppl)), S32-7.
- Scatena, C. D., Stewart, Z. A., Mays, D., Tang, L. J., Keefer, C. J., Leach, S. D. & Pietsenpol, J. A. (1998). Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and Taxol-induced growth arrest. *J Biol Chem* **273**(46), 30777-84.

## Références bibliographiques

---

- Schang, L. M. (2001). Cellular proteins (cyclin dependent kinases) as potential targets for antiviral drugs. *Antivir Chem Chemother* **12**(Suppl 1), 157-78.
- Schang, L. M., Bantly, A., Knockaert, M., Shaheen, F., Meijer, L., Malim, M. H., Gray, N. S. & Schaffer, P. A. (2002). Pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors inhibit replication of wild-type and drug-resistant strains of herpes simplex virus and human immunodeficiency virus type 1 by targeting cellular, not viral, proteins. *J Virol* **76**(15), 7874-82.
- Schang, L. M., Phillips, J. & Schaffer, P. A. (1998). Requirement for cellular cyclin-dependent kinases in herpes simplex virus replication and transcription. *J Virol* **72**(7), 5626-37.
- Schang, L. M., Rosenberg, A. & Schaffer, P. A. (1999). Transcription of herpes simplex virus immediate-early and early genes is inhibited by roscovitine, an inhibitor specific for cellular cyclin- dependent kinases. *J Virol* **73**(3), 2161-72.
- Schang, L. M., Rosenberg, A. & Schaffer, P. A. (2000). Roscovitine, a specific inhibitor of cellular cyclin-dependent kinases, inhibits herpes simplex virus DNA synthesis in the presence of viral early proteins. *J Virol* **74**(5), 2107-20.
- Schnier, J. B., Kaur, G., Kaiser, A., Stinson, S. F., Sausville, E. A., Gardner, J., Nishi, K., Bradbury, E. M. & Senderowicz, A. M. (1999). Identification of cytosolic aldehyde dehydrogenase 1 from non-small cell lung carcinomas as a flavopiridol-binding protein. *FEBS Lett* **454**(1-2), 100-4.
- Schultz, C., Link, A., Leost, M., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Sausville, E. A., Meijer, L. & Kunick, C. (1999). Paullones, a series of cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis, evaluation of CDK1/cyclin B inhibition, and in vitro antitumor activity. *J Med Chem* **42**(15), 2909-19.
- Senderowicz, A. M. & Sausville, E. A. (2000). Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *J Natl Cancer Inst* **92**(5), 376-87.

## Références bibliographiques

---

- Serizawa, H., Makela, T. P., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Weinberg, R. A. & Young, R. A. (1995). Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIIH. *Nature* **374**(6519), 280-2.
- Sherr, C. J. & Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**(12), 1501-12.
- Shi, L., Nishioka, W. K., Th'ng, J., Bradbury, E. M., Litchfield, D. W. & Greenberg, A. H. (1994). Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* **263**(5150), 1143-5.
- Shiekhattar, R., Mermelstein, F., Fisher, R. P., Drapkin, R., Dynlacht, B., Wessling, H. C., Morgan, D. O. & Reinberg, D. (1995). Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TFIIH. *Nature* **374**(6519), 283-7.
- Sielecki, T. M., Boylan, J. F., Benfield, P. A. & Trainor, G. L. (2000). Cyclin-dependent kinase inhibitors: useful targets in cell cycle regulation. *J Med Chem* **43**(1), 1-18.
- Sin, N., Meng, L., Auth, H. & Crews, C. M. (1998). Eponemycin analogues: syntheses and use as probes of angiogenesis. *Bioorg Med Chem* **6**(8), 1209-17.
- Sin, N., Meng, L., Wang, M. Q., Wen, J. J., Bornmann, W. G. & Crews, C. M. (1997). The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(12), 6099-103.
- Sirover, M. A. (1999). New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* **1432**(2), 159-84.
- Smith, D. S. & Tsai, L. H. (2002). Cdk5 behind the wheel: a role in trafficking and transport? *Trends Cell Biol* **12**(1), 28-36.
- Sun, D., Leung, C. L. & Liem, R. K. (1996). Phosphorylation of the high molecular weight neurofilament protein (NF-H) by Cdk5 and p35. *J Biol Chem* **271**(24), 14245-51.

## Références bibliographiques

---

- Tanaka, H., Ohshima, N. & Hidaka, H. (1999). Isolation of cDNAs encoding cellular drug-binding proteins using a novel expression cloning procedure: drug-western. *Mol Pharmacol* **55**(2), 356-63.
- Tassan, J. P., Jaquenoud, M., Leopold, P., Schultz, S. J. & Nigg, E. A. (1995). Identification of human cyclin-dependent kinase 8, a putative protein kinase partner for cyclin C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(19), 8871-5.
- Tintignac, L. A., Leibovitch, M. P., Kitzmann, M., Fernandez, A., Ducommun, B., Meijer, L. & Leibovitch, S. A. (2000). Cyclin E-cdk2 phosphorylation promotes late G1-phase degradation of MyoD in muscle cells. *Exp Cell Res* **259**(1), 300-7.
- Toogood, P. L. (2001). Cyclin-dependent kinase inhibitors for treating cancer. *Med Res Rev* **21**(6), 487-98.
- Tsai, L. H., Takahashi, T., Caviness, V. S., Jr. & Harlow, E. (1993). Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system. *Development* **119**(4), 1029-40.
- Tsihlias, J., Kapusta, L. & Slingerland, J. (1999). The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med* **50**, 401-23.
- van den Heuvel, S. & Harlow, E. (1993). Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* **262**(5142), 2050-4.
- Vesely, J., Havlicek, L., Strnad, M., Blow, J. J., Donella-Deana, A., Pinna, L., Letham, D. S., Kato, J., Detivaud, L., Leclerc, S. & et al. (1994). Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem* **224**(2), 771-86.
- Villerbu, N., Gaben, A. M., Redeuilh, G. & Mester, J. (2002). Cellular effects of purvalanol A: a specific inhibitor of cyclin-dependent kinase activities. *Int J Cancer* **97**(6), 761-9.
- Wang, D., de la Fuente, C., Deng, L. W., Wang, L., Zilberman, I., Eadie, C., Healey, M., Stein, D., Denny, T., Harrison, L. E., Meijer, L. & Kashanchi, F. (2001). Inhibition of

## Références bibliographiques

---

- human immunodeficiency virus type 1 transcription by chemical cyclin-dependent kinase inhibitors. *Journal of Virology* **75**(16), 7266-7279.
- Wei, P., Garber, M. E., Fang, S. M., Fischer, W. H. & Jones, K. A. (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* **92**(4), 451-62.
- Wolowiec, D. & Ffrench, M. (1996). Kinases dépendantes des cyclines: rôle biologique et implications dans la pathologie humaine. *Med Sci* **12**, 165-173.
- Ye, K., Zhou, J., Landen, J. W., Bradbury, E. M. & Joshi, H. C. (2001a). Sustained activation of p34cdc2 is required for noscapine-induced apoptosis. *J Biol Chem* **276**(50), 46697-700.
- Ye, X., Zhu, C. & Harper, J. W. (2001b). A premature-termination mutation in the *Mus musculus* cyclin-dependent kinase 3 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4), 1682-6.
- Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Leost, M., Senderowicz, A. M., Lahusen, T., Kunick, C., Meijer, L. & Sausville, E. A. (1999). Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Cancer Res* **59**(11), 2566-9.
- Zhai, S., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A. & Figg, W. D. (2002). Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in clinical development. *Ann Pharmacother* **36**(5), 905-11.
- Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M. B. & Price, D. H. (1997). Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev* **11**(20), 2622-32.

# ANNEXES

## ANNEXES

### Publication n° 6

Meijer, L., **Knockaert, M.** and E. Damiens (2001). Prévention, par les inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes, de l'alopécie induite par la chimiothérapie. **Bull. Cancer** **88**, 347-350.

### Publication n° 7

**Knockaert, M.** and Meijer, L. (2002). Identifying in vivo targets of cyclin-dependent kinase inhibitors by affinity chromatography. **Biochem. Pharmacol.** **64**, 819-825.

### Publication n° 8

**Knockaert, M.**, Greengard, P. and Meijer, L. (2002). Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. **Trends Pharmacol. Sci.** (invited review) **23**(9), 417-425.

### Publication n° 9

Wieking, K., **Knockaert, M.**, Leost, M., Zaharevitz, D.W., Meijer, L. and Kunick, C. (2002). Synthesis of paullones with aminoalkyl side chains. **Arch Pharm (Weinheim)** **335**(7), 311-317.

## Article 6:

Meijer, L., **Knockaert, M.** and E. Damiens (2001). Prévention, par les inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes, de l'alopecie induite par la chimiotherapie. **Bull. Cancer 88**, 347-350.

### ABSTRACT

La famille des kinases cycline-dépendantes (CDK) est largement impliquée dans le contrôle du cycle de division cellulaire. L'existence d'un grand nombre d'altérations de CDK, de cyclines, de leurs régulateurs et de leurs substrats dans les tumeurs humaines a fortement stimulé la recherche d'inhibiteurs chimiques de ces kinases. L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de CDK en chimiothérapie du cancer fait l'objet de nombreuses études. Un groupe de chercheurs de Glaxo Wellcome a récemment mis en évidence une nouvelle possibilité d'utilisation des inhibiteurs de CDK dans la prévention de l'alopecie induite par les chimiothérapies classiques. Ces propriétés cytoprotectrices pourraient être étendues à d'autres tissus endommagés par la chimiothérapie.

## Article 7:

**Knockaert, M.** and Meijer, L. (2002). Identifying in vivo targets of cyclin-dependent kinase inhibitors by affinity chromatography. **Biochem. Pharmacol.** **64**, 819-825.

### ABSTRACT

Cyclin-dependent kinases (CDKs) regulate the cell division cycle, apoptosis, transcription, differentiation and many functions in the nervous system. The frequent deregulation of CDKs in cancers and in numerous other pathologies justifies the active search for chemical inhibitors capable of reversibly and selectively inhibiting this class of enzymes. Intensive screening of collections of natural and synthetic compounds has led to the identification of several families of ATP competitive CDK inhibitors. As the therapeutic potential of the most promising compounds is currently being evaluated in preclinical and clinical trials, their mechanism of action is still unclear. In particular, the real spectrum of their intracellular targets remains largely unknown. Determination of the selectivity of the compounds and identification of their intracellular targets constitute a prerequisite to understand their cellular effects and to improve their efficiency on a rational basis. The classical method for the determination of a compound's selectivity consists in testing the compound in a panel of purified kinases. However, the selectivity study is then restricted to the panel's enzymes. As a consequence, many, if not most other potential targets are not evaluated. As an alternative way to investigate the range of true targets of CDK inhibitors, we propose an affinity chromatography approach based on immobilised inhibitors. Briefly, the inhibitor is covalently bound to a resin and cellular extracts are batch loaded on this inhibitor matrix. After extensive washing, the bound proteins are resolved by SDS-PAGE and identified by microsequencing. In addition to confirming the interaction of CDK inhibitors with CDKs, this method has led to the identification of additional, sometimes unexpected, targets. We here illustrate the potential of this technique through a few examples.

## Article 8:

**Knockaert, M.**, Greengard, P. and Meijer, L. (2002). Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. **Trends Pharmacol. Sci.** (invited review) **23**(9), 417-425.

### ABSTRACT

Cyclin-dependent kinases (CDKs) regulate the cell division cycle, apoptosis, transcription, differentiation, as well as functions in the nervous system. Deregulation of CDKs in various diseases has stimulated an intensive search for selective pharmacological inhibitors. More than 50 inhibitors have been identified among which more than 20 have been co-crystallized with CDK2. These inhibitors all target the ATP-binding pocket of the catalytic site of the kinase. The actual selectivity of most compounds, and thus the underlying mechanism of their cellular effects, is poorly known. Pharmacological inhibitors of CDKs are currently being evaluated for therapeutic use against cancer, alopecia, neurodegenerative disorders (e.g. Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis and stroke), cardiovascular disorders (e.g. atherosclerosis, restenosis), glomerulonephritis, viral infections (e.g. HCMV, HIV and HSV) and parasitic protozoa (*Plasmodium* sp. and *Leishmania* sp.).

## **Article 9:**

Wieking, K., **Knockaert, M.**, Leost, M., Zaharevitz, D.W., Meijer, L. and Kunick, C. (2002). Synthesis of paullones with aminoalkyl side chains. **Arch Pharm (Weinheim)** **335**(7), 311-317.

### **ABSTRACT**

Paullones 3 and 4 with aminoalkyl side chains in 2- or 3-position were synthesized as derivatives of kenpaullone 1. Both 3 and 4 showed the characteristic CDK1-inhibitory activity of the paullones and a modest antiproliferative activity on cultured human tumor cell lines. Hence, 3 and 4 appear to be suitable tools for affinity studies directed to find additional intracellular paullone targets.

## ABSTRACT

Among the estimated 850 human protein kinases, the family of cyclin-dependent kinases (CDK) has been extensively studied because of its essential cellular functions. CDKs play a key role in cell cycle control, transcription, differentiation, apoptosis and in neuronal cell functions. The observation that CDKs are frequently deregulated in cancers has stimulated an active search for chemical inhibitors of this class of kinases. So far, more than 50 compounds have been identified, on the basis of their ability to inhibit *in vitro* purified CDK activity. These compounds display antiproliferative, anti-neurodegenerative, anti-viral and anti-parasitic properties. The anticancer potential of the most promising compounds is currently evaluated in pre-clinical and clinical trials.

The aim of this study is to understand the intracellular mechanism of action of CDK inhibitors. We chose to approach this question by investigating their *in vivo* selectivity, i.e. the scope of their real intracellular targets. Indeed, CDK inhibitors have been identified on their ability to inhibit purified CDKs *in vitro* but their actual intracellular targets remain unverified. To address this question, we developed an affinity chromatography approach allowing to purify, from cellular extracts, the intracellular targets of the inhibitor. This technique was used to study the selectivity of three CDK inhibitors belonging to different chemical classes: the purine purvalanol, paullones and indirubin-3'-monoxime. For each compound, the expected targets were recovered from the matrix. However this approach has also allowed the identification of several unexpected interactions between CDK inhibitors and other enzymes, kinases (p42/p44 MAPKs with purvalanol) or other (malate dehydrogenase with paullones and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with indirubin). In each case, the molecular basis of the interaction between the inhibitor and its new target was investigated by testing the *in vitro* sensitivity of the target enzyme to the compound. Based on these results, we next investigated more in detail how the interaction between MAPKs and purvalanol participated to the cellular effects of the drug. Lastly, this affinity chromatography approach was used to understand two particular cellular effects of purvalanol: its antiviral activity against herpes simplex virus (HSV-1) and the induction of supernumerary hair cells in Organs of Corti of rat embryos.

In conclusion, this affinity approach has confirmed the strong interactions between CDK inhibitors and the enzymatic targets they have been optimised on. In addition, this technique has allowed the identification of several unexpected targets for CDK inhibitors, the identity of which could not be deduced from *in vitro* classical selectivity studies, and the inhibition of which may participate to the observed cellular effects of the compounds.