THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé CBS2

Unité de recherche : Institut des Biomolécules Max Mousseron

Caractérisation du mécanisme d'action de modulateurs allostériques de CDK5 dans le cancer du poumon

Présentée par Arthur LAURE

Le 12 Novembre 2021

Sous la direction du Dr May C. MORRIS

Devant le jury composé de

Madame May C. MORRIS, DR2, IBMM, UMR5247 CNRS	Directrice de thèse
Monsieur Frédéric BIHEL, DR2, LIT, UMR7200 CNRS	Rapporteur
Madame Amandine HURBIN, CR1, IAB, UMR5309 CNRS	Rapporteuse
Monsieur Christophe BLANQUART, CR1, CRCINA, UMR1232 INSERM	Examinateur
Monsieur John DE VOS, Pr, IRMB, U1183 INSERM	Président du jury
Madame Céline GONGORA, DR2, IRCM, U1194 INSERM	Examinatrice

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Gouvernement Princier de Monaco d'avoir accepté de financer ces trois années de thèse.

J'aimerai remercier le Professeur Pascal Dumy de m'avoir accueilli au sein de l'IBMM.

Je remercie le Dr Frédéric Bihel et le Dr Amandine Hurbin de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie également les Drs Christophe Blanquart et Céline Gongora ainsi que le Pr John De Vos d'avoir accepté d'examiner ce travail.

A ma directrice de thèse, le Dr May Morris, je te remercie de m'avoir fait confiance pendant ces trois années où j'ai pu découvrir le monde de la recherche. Tes conseils et tes enseignements m'ont été précieux dans la formation de mon esprit scientifique mais également tout au long de la thèse jusqu'à la rédaction de ce manuscrit.

Je souhaite remercier toutes les personnes que j'ai croisé au labo depuis le début ou j'ai commencé ma thèse. En commençant par Sébastien, qui m'a permis de rencontrer May et de démarrer cette aventure. Le labo est moins bruyant depuis ton départ. Morgan, que j'ai trop souvent chambré sur son équipe de « foot ». Vous finirez bien par remporter un trophée un jour. Sabrina, qui nous a fait rêver avec ses photos de pâtisseries mais qu'on n'a jamais eu la chance de goûter. Lisae, tu nous as bien fait rire avec toutes tes expressions sorties de nulle part. Mais sans oublier Jessica, Lennard et puis Chloé et Ameni qui auront la chance de ne plus avoir à me supporter.

Je remercie aussi la plateforme MRI du CRBM et plus particulièrement Benoît, Leslie et Sylvain qui m'ont permis de faire de la microscopie même dans les situations les plus désespérées.

Un grand merci à Alice et Jean avec qui on peut se faire une bonne raclette qu'importe la saison, bientôt on repartira se faire un petit tour à la Salvetat !

Merci à Joël, Lucie, Morgane, Cléa et tous ceux du MMDM avec qui j'ai passé trop de temps au Broc.

A tous mes amis qui sont toujours présents malgré la distance et le temps qui passe, merci pour votre soutien et tous les moments passés et plus important encore, ceux à venir.

Je remercie mes parents, qui m'ont toujours poussés à donner le meilleur de moi-même et qui ont toujours crus en moi. Merci à ma sœur, Amélie, c'est toi qui m'a donné l'envie de faire de la science. Le silence est souvent bien plus éloquent que la parole.

Je remercie également toute ma famille et tous ceux qui le sont devenus, j'ai de la chance d'être si bien entouré.

Je ne peux terminer sans te remercier Camille. Merci de m'avoir apporté le bonheur au quotidien, une page se tourne et nous allons écrire le prochain chapitre ensemble.

ABREVIATIONS **1**

INTRODUCTION **4**

I. LES KINASES CYCLINES-DEPENDANTES (CDKS) 5
1. La phosphorylation *5*
a. Historique 5
b. Fonctions de la phosphorylation 6
c. Les Sérine/Thréonine kinases 7
2. Les CDKs/Cyclines *9*
a. Découverte des CDKs 9
b. Rôles physiologiques des CDKs 10
c. Structure et régulation des CDKs/Cyclines 15
d. CDKs/Cyclines et cancers 18
II. CDK5 20
1. Découverte de CDK5 ..... *20*
a. Historique 20
b. Fonctions neuronales de CDK5 21
2. Régulation de CDK5 ..... *25*
a. Les partenaires de CDK5 25
i. P35 et p39 25
ii. P25 et p29 28
iii. Cyclines partenaires de CDK5 29
b. Mécanisme d'activation de CDK5 32
3. Fonctions non neuronales de CDK5 ..... *36*
a. Réponse immunitaire 36
b. Régulation de l'insuline 36
c. Autres fonctions 37
4. Rôles pathologiques de CDK5 ..... *39*
a. Maladies neurodégénératives 39
b. Cancers neuronaux 43
c. Cancers non neuronaux 45
i. Migration et invasion 45
ii. Angiogenèse 46
iii. Mutations génétiques et réparation de l'ADN 47
iv. Inflammation tumorale et inhibition du système immunitaire 48
v. Résistance à la mort cellulaire 49
d. CDK5 dans le cancer du poumon 50
e. Autres 52
III. INHIBITEURS ET CRIBLAGE DE MOLECULES THERAPEUTIQUES 52
1. Inhibiteurs des CDKs/cyclines *52*
a. ATP-compétitif 53
b. Non-ATP-compétitif 56
i. Inhibiteurs ciblant l'interface protéine/protéine (PPI) 57
ii. Petites molécules allostériques 58
2. Inhibiteurs de CDK5 ..... *59*
a. ATP-compétitif 59
i. Roscovitine 60
ii. Dinaciclib 61
iii. AT7519 62
b. Non-ATP-compétitif 62
3. CDKCONF5 et criblage de molécules allostériques *63*

OBJECTIFS **66**

RESULTATS **69**

I. CARACTERISATION DE L'INTERACTION *IN VITRO* ENTRE CDK5 RECOMBINANTE ET UN SUBSTRAT PEPTIDIQUE 70
1. Concept *70*
2. Peptide Tau et couplage avec TP-2Rho *71*
3. Purification de GST-CDK5 ..... *72*
4. Mesure de l'interaction in vitro *74*
II. CARACTERISATION DES MODULATEURS ALLOSTERIQUES DE CDK5 DANS LES U87, UNE LIGNEE DERIVEE DU GLIOBLASTOME 78
1. Caractérisation des complexes macromoléculaires contenant CDK5 dans des extraits d'U87 ..... *78*
a. Concept 78
b. Calibration de la colonne Superose 6 10/300GL 80
c. Identification des complexes macromoléculaires au sein des extraits d'U87 83
2. Caractérisation des modulateurs allostériques de CDK5 sur la prolifération cellulaire des U87 89
III. CARACTERISATION DES MODULATEURS ALLOSTERIQUES DE CDK5 SUR LA PROLIFERATION DANS DES LIGNEES CELLULAIRES ISSUES DE DIFFERENTS CANCERS 92
IV. CARACTERISATION DES MODULATEURS ALLOSTERIQUES DE CDK5 DANS LES A549, UNE LIGNEE DERIVEE DU CANCER DU POUMON 95
1. Effets de l'éthavérine et de la papavérine sur la prolifération cellulaire des A549 ..... *95*
a. Détermination de l'IC_{50} 95
b. Stratégie d'inhibition par combinaison des composés allostériques avec la Roscovitine, inhibiteur ATP-compétitif. 96
i. Combinaison Roscovitine-Ethavérine 97
ii. Combinaison Roscovitine-Papavérine 100
c. Stratégie d'inhibition par traitements séquentiels 104
i. Inhibition 24h après traitements 104
ii. Inhibition 48h après traitements 107
iii. Inhibition 72h après traitements 108
2. Etudes de morphologie cellulaire des A549 et localisation subcellulaire de CDK5 ..... *111*
3. Effets des inhibiteurs de CDK5 sur la division cellulaire des A549 ..... *113*
a. Comportement cellulaire visualisé par vidéomicroscopie à contraste de phase 114
i. Phase 0h-24h 114
ii. Phase 24h-48h 118
b. Inhibition du nombre de divisions cellulaires 122
4. Effets des inhibiteurs de CDK5 sur la migration cellulaire des A549 ..... *125*
5. Etudes de stabilité et de thermodénaturation de la protéine CDK5 dans les A549 ..... *131*
a. Stabilité de CDK5 131
b. Profilage thermique de CDK5 132
i. Concept 132
ii. Calibration de l'expérience 133
iii. Profils de thermodénaturation de CDK5 selon les traitements 134
V. ETUDES SUR D'AUTRES LIGNEES DERIVEES DE CANCERS DU POUMON 137
1. Prolifération H1299 ..... *138*
2. Prolifération PC9 ..... *140*

DISCUSSION & PERSPECTIVES **143**

I. STRATEGIE D'IDENTIFICATION D'INHIBITEURS ALLOSTERIQUES DE CDK5 144
1. Les limites de l'inhibition par la poche ATP *144*
2. Identification d'inhibiteurs allostériques de CDK5 et repositionnement de composés *145*

II. MECANISMES MOLECULAIRES DES INHIBITEURS ALLOSTERIQUES DE CDK5 147
1. Impact sur l'interaction in vitro de CDK5 avec le peptide Tau 147
2. Engagement de la cible des inhibiteurs allostériques 149
3. Impact des inhibiteurs allostériques sur la forme monomérique ou dimérique de CDK5 . 154
III. CARACTERISATION DES INHIBITEURS DANS DIFFERENTES LIGNEES CANCEREUSES 155
IV. CARACTERISATION DANS LE CANCER DU POUMON 155
1. Inhibition de la prolifération cellulaire et stratégie combinatoire 156
2 . Traitements séquentiels 158
2. Cinétique d'inhibition de la division et la migration cellulaire 159
V. INFLUENCE DE P53 SUR L'INHIBITION ALLOSTERIQUE DE CDK5 160
VI. PERSPECTIVES 162

MATERIELS ET METHODES 164

I. PRODUCTION ET PURIFICATION DE PROTEINES RECOMBINANTES 165
1. Préparation de E.coli BL21 DEA3 compétentes 165
2. Transformation bactérienne 165
3. Induction de la protéine recombinante GST-CDK5 165
4. Purification de la protéine recombinante GST-CDK5 166
II. BIOCHIMIE 167
1. Préparation des échantillons 167
2. GELS SDS-PAGE 167
3. Western Blotting 167
a. Préparation des échantillons 167
b. SDS-PAGE 168
c. Transfert des protéines sur membrane 168
d. Saturation de la membrane 168
e. Anticorps primaire 168
f. Anticorps secondaire 169
g. Détection 169
4. Expériences de titration fluorescentes 169
a. Peptide Tau et couplage avec la sonde TP-2Rho 169
b. Interaction Protéine-Substrat 170
III. BIOLOGIE CELLULAIRE 173
1. Lignée cellulaire et milieu de culture 173
2. Préparation des extraits cellulaires 173
3. Test de prolifération cellulaire (Crystal Violet) 174
4. Thermodénaturation 175
IV. MICROSCOPIE 176
1. Immunofluorescence 176
a. Fixation cellulaire et coloration de Hoechst 176
2. Expérience de vidéomicroscopie (time-lapse) 176
3. Expérience de migration cellulaire 176
V. STATISTIQUES 177

ANNEXE A 178

ANNEXE B 181

ANNEXE C 183

ANNEXE D 187

REFERENCES 189

ARTICLE 225

ABREVIATIONS

Abl : Abelson murine leukemia oncogene homolog

ADN : Acide Désoxyribonucéique

APP : Amyloid Precursor Protein

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adenosine Tri-Phosphate

BRET : Bioluminescence Resonance Energy Transfer

CAK : CDK-Activating Kinase

CAMK : Calmodulin/Calcium dependent protein Kinases

CDK : Cyclin-Dependent Kinase

CKI : CDK Inhibitor

CKs : Cyclin-dependent Kinase regulatory Subunit

EMA : European Medicines Agency

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

FDA : Food and Drug Administration

GLUT4 : Glucose Transporter Type 4

GTP : Guanosine Tri-Phosphate

MAP : Mitogen- Activated Protein

MB : Médulloblastome

MITF : Microphthalmia-associated Transcription Factor

NLS : Nuclear Localization Sequence

NSCLC : Non-Small Cell Lung Cancer

PAABD : Phospho Amino Acid Binding Domain

PAX3 : Paired Box 3

PBD : Polo Box Domain

PDB : Protein Data Bank

PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1

pRB : Retinoblastoma protein

SNC : Système nerveux central

TK : Tyrosine Kinase

TKL : Tyrosine Kinase-Like

INTRODUCTION

I. Les Kinases Cyclines-Dépendantes (CDKs)

1. La phosphorylation

a. *Historique*

En 1906 fut identifié pour la première fois la présence de phosphate dans la vitelline (Levene and Alsberg, 1906). Cependant, le processus enzymatique de phosphorylation des protéines n'a été décrit qu'en 1954 et a été définit comme un transfert catalytique d'un phosphate provenant d'une adénosine triphosphate (ATP) vers une protéine substrat (Burnett and Kennedy, 1954). Sur la base de ces travaux fondamentaux, Fischer et Krebs ont démontré que l'activité des protéines était contrôlée par les mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation. Leurs études réalisées sur la protéine kinase A (Fischer and Krebs, 1955; Walsh, Perkins and Krebs, 1968), leur ont permis de recevoir le prix Nobel en 1992 pour leurs découvertes concernant la réversibilité de la phosphorylation des protéines en tant que mécanisme de régulation biologique.

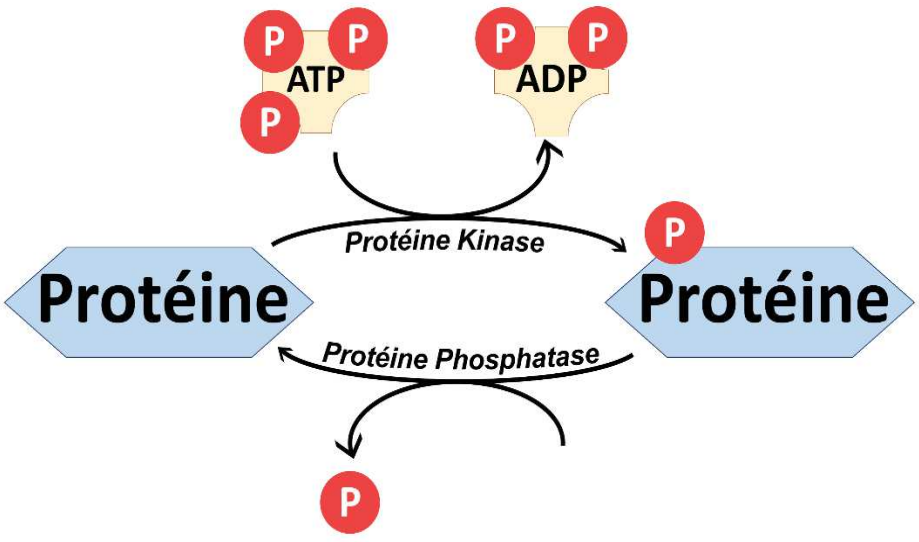


Figure 1. Représentation schématique du mécanisme de phosphorylation. La phosphorylation est catalysée par des enzymes nommées protéine kinases qui vont transférer un groupement phosphate d'une molécule d'ATP vers une protéine cible nommée substrat. La réaction inverse, nommée déphosphorylation, est catalysée par des protéine phosphatases.

b. Fonctions de la phosphorylation

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle réversible d'une protéine au cours de laquelle un acide aminé (Sérine, Thréonine, Tyrosine, Histidine), va subir une estérification de sa chaîne latérale par addition d'un ou plusieurs groupements phosphates.

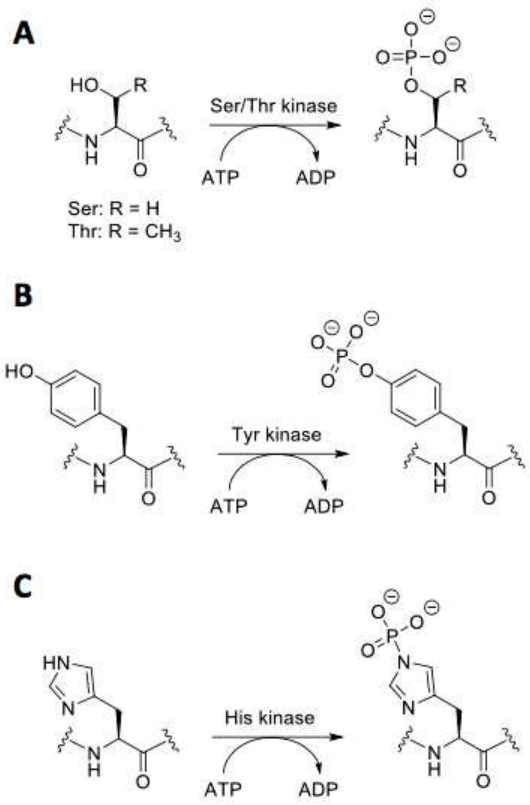


Figure 2. Schéma du mécanisme de phosphorylation sur la Sérine/Thréonine (A), Tyrosine (B) et l'Histidine (C) (Thèse Marion Peyressatre, 2016)**.**

Près d'un tiers des protéines subissent des phosphorylations, aussi bien dans les cellules procaryotes qu'eucaryotes. Ce mécanisme de régulation est essentiel pour la communication entre les cellules et la signalisation cellulaire (Cohen, 2002). Cela permet de régir des processus cellulaires basiques tels que la croissance, la division, la prolifération, la différentiation et également l'apoptose. La phosphorylation joue aussi un rôle dans la réponse cellulaire impliquée dans le métabolisme, la réplication d'ADN, la dégradation protéique et la réponse immunitaire.

La régulation des protéines par la phosphorylation provoque d'importants effets sur différentes fonctions des protéines. La stabilité, la localisation subcellulaire, les interactions protéine-

protéine, l'activité enzymatique et même la conformation de la protéine peuvent être affectées suite à la phosphorylation. Le transfert des phosphates sur des protéines est catalysé par une large variété d'enzymes dans la cellule que l'on nomme les protéines kinases (Cohen, 2002). Le génome humain contient 518 gènes codant pour autant de protéines kinases qui sont regroupées en 7 sous-familles (Manning *et al.*, 2002). La réaction inverse est catalysée par des enzymes nommées phosphatases, qui sont capables de retirer le groupement phosphate d'une protéine. Il existe dans le protéome humain près de 150 phosphatases démontrant des spécificités de résidus et de mécanismes d'actions distincts (Jackson and Denu, 2001; Walsh, Garneau-Tsodikova and Gatto, 2005).

Une protéine kinase peut alterner entre une forme active ou forme inactive mais peut adopter plusieurs intermédiaires conformationnels (Xie *et al.*, 2020). Ce changement conformationnel des protéines kinases est finement régulé. Les différents mécanismes mis en jeu pour réguler la forme active ou inactive de la kinase sont divers et variés, ils jouent un rôle dans le contrôle de l'accès au substrat. Cela peut être une phosphorylation activatrice ou inhibitrice, une régulation allostérique, une liaison avec un activateur ou un inhibiteur incluant un cofacteur, d'autres partenaires protéiques, des gènes promoteurs (Huse and Kuriyan, 2002).

c. Les Sérine/Thréonine kinases

Près de 75% des kinases font partie de la famille des sérine/thréonine kinases, le reste se divisant en tyrosine kinases (17%) et en kinases atypiques (8%) (Endicott, Noble and Johnson, 2012).

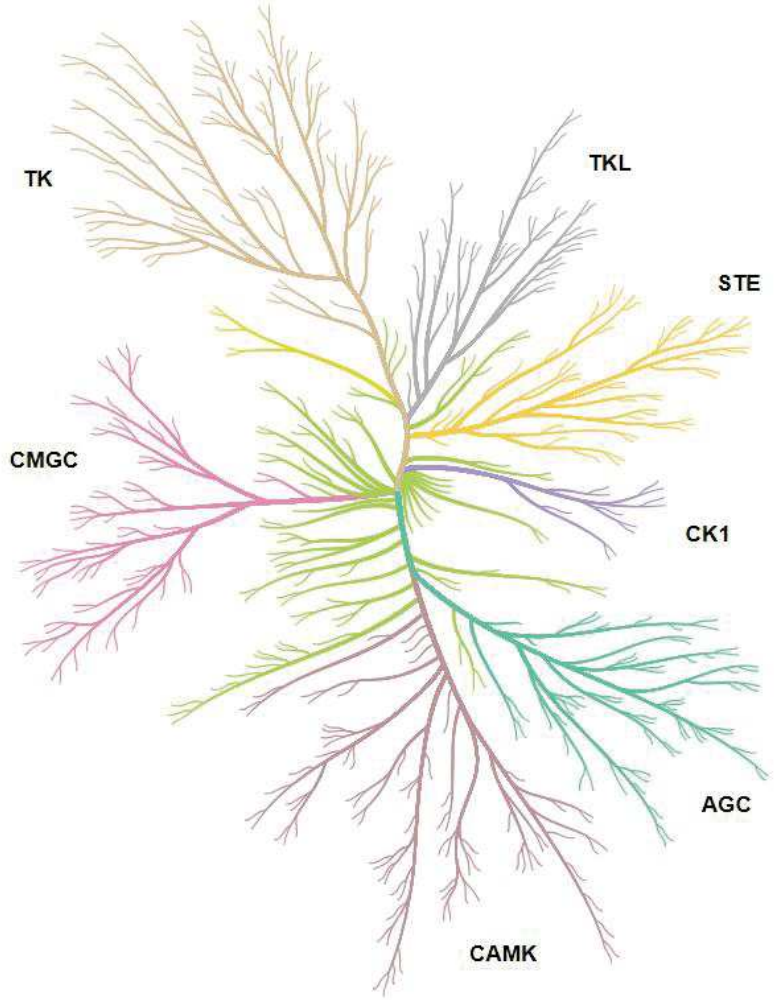


Figure 3. Le kinome humain (réalisé avec l'outil en ligne : http://phanstiel-lab.med.unc.edu/CORAL/ (Berginski *et al.*, 2021), la figure originale est reproduite avec l'aimable autorisation de Cell Signaling Technology, Inc.). Les 7 sous-familles constituant l'ensemble des protéines kinases sont définies de la manière suivante : **TKL** (Tyrosine Kinase-Like), **STE** (Homologs of yeast Steril 7, Steril 11, Steril 20 kinases), **CK1** (Casein kinase 1), **AGC** (contenant les familles PKA, PKG et PKC), **CAMK** (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase), **CMGC** (contenant les familles CDK, MAPK, GSK3 et CLK) et **TK** (Tyrosine kinase).

Le mécanisme de phosphorylation catalysé par ces enzymes est commun à l'ensemble des Sérine/Thréonine kinases. Ces kinases sont constituées d'un sillon catalytique, composé d'environ 290 résidus, qui est pris en tenaille entre le lobe N-terminal et le lobe C-terminal qui est plus grand. Les deux lobes sont connectés par un « linker » et sont composés différemment. Le lobe N-terminal est composé de feuillets-β et d'une unique hélice-α, alors que le lobe C-terminal est essentiellement composé d' hélices-α. Le lobe C-terminal contient une boucle d'activité ou d'activation (20-35 résidus), situé entre un motif DFG (Asp-Phe-Gly)

très conservé et un motif APE (Ala-Pro-Glu) moins conservé. Lorsque la kinase est inactive le résidu Phénylalanine du motif DFG est dirigé vers le site de liaison à l'ATP.

Quand la kinase est active, le résidu Aspartate du motif DFG va chélater un ion magnésium permettant le positionnement correct de l'ATP pour le transfert et la catalyse du groupement phosphate vers le substrat. La boucle d'activation va adopter une conformation permettant au substrat de se lier correctement. Le substrat est orienté de manière à ce que son groupement hydroxyle phosphorylable interagisse directement avec le résidu Asp166 dans la boucle d'activation. Le résidu Lys168 va stabiliser le groupement phosphate-γ de l'ATP, qui sera correctement positionné pour être catalysé et transféré vers le substrat (Endicott, Noble and Johnson, 2012).

Malgré une similarité structurelle, les kinases reconnaissent spécifiquement leurs substrats à phosphoryler. Les kinases se distinguent au niveau de quelques résidus clés situés autour du site de phosphorylation mais également des sites d'interactions plus distaux afin de conférer une spécificité de liaison adéquate à leurs substrats (Taylor, Radzio-Andzelm and Hunter, 1995; Schulman, Lindstrom and Harlow, 1998; Reményi, Good and Lim, 2006; Abramczyk *et al.*, 2007; Endicott, Noble and Johnson, 2012). Les kinases sont des protéines très flexibles mais qui possèdent des éléments hautement conservés qui sont impliqués dans l'activation de la kinase à travers des changements conformationnels. Ces éléments sont notamment la poche de liaison à l'ATP et la boucle d'activation (Huse and Kuriyan, 2002; Nolen, Taylor and Ghosh, 2004; Alexandr P. Kornev *et al.*, 2006).

2. Les CDKs/Cyclines

a. Découverte des CDKs

Des travaux chez la levure ont permis de mettre en évidence le rôle clé de certains gènes sur la régulation du cycle cellulaire et ont été baptisés « *cdc* » (Hartwell *et al.*, 1974). Sir Paul Nurse a démontré qu'un gène spécifique *cdc9-50* (renommé plus tard *wee1*) joue un rôle primordial dans différentes phases du cycle de division des levures (Nurse, 1975). Ses travaux

ont permis d'identifier $p34^{CDC2}$, une protéine kinase de la levure ayant un rôle clé de régulateur du cycle cellulaire. Cette protéine étant conservée chez l'humain, elle fut d'abord nommée CDC2, puis CDK1 (Labbe *et al.*, 1988). Les travaux de Tim Hunt sur des ovocytes de xénope et d'oursin ont permis d'identifier les cyclines comme des partenaires des CDKs et des protéines essentielles pour la régulation de la division cellulaire (Evans *et al.*, 1983; Minshull, Blow and Hunt, 1989; Poon *et al.*, 1993).

En 2001, Paul Nurse, Leland Hartwell et Tim Hunt reçurent le prix Nobel pour leurs travaux. Le cycle cellulaire est un processus biologique essentiel pour le développement des organismes pluricellulaires. C'est un ensemble de mécanismes moléculaires finement régulés et hautement conservés chez les eucaryotes permettant à une cellule mère de répliquer son génome et de se diviser en deux cellules filles génétiquement identiques.

b. Rôles physiologiques des CDKs

A l'heure actuelle 20 CDKs ont été identifiées ainsi que 29 cyclines, cependant le rôle de certaines de ces kinases demeurent toujours peu connu (Malumbres and Barbacid, 2009; Lim and Kaldis, 2013; Malumbres, 2014). Les CDKs sont des Ser/Thr kinases de faible poids moléculaire (34 à 40 kDa), formant un complexe hétérodimérique en s'assemblant avec une cycline. La CDK constitue la sous-unité catalytique du complexe alors que la cycline est la sous-unité régulatrice. C'est l'association CDK/cycline qui confère l'activité kinase au complexe.

Ces kinases font partie de la famille des CMGC, elles se lient et phosphorylent de manière préférentielle des substrats ayant une séquence consensus (S/T)-P-X-(K/R), où S/T représente une sérine ou une thréonine, P est un résidu proline, X est n'importe quel acide aminé, K est une lysine et R est une arginine. La séquence au sein du substrat lie la poche hydrophobe se situant proche du sillon catalytique.

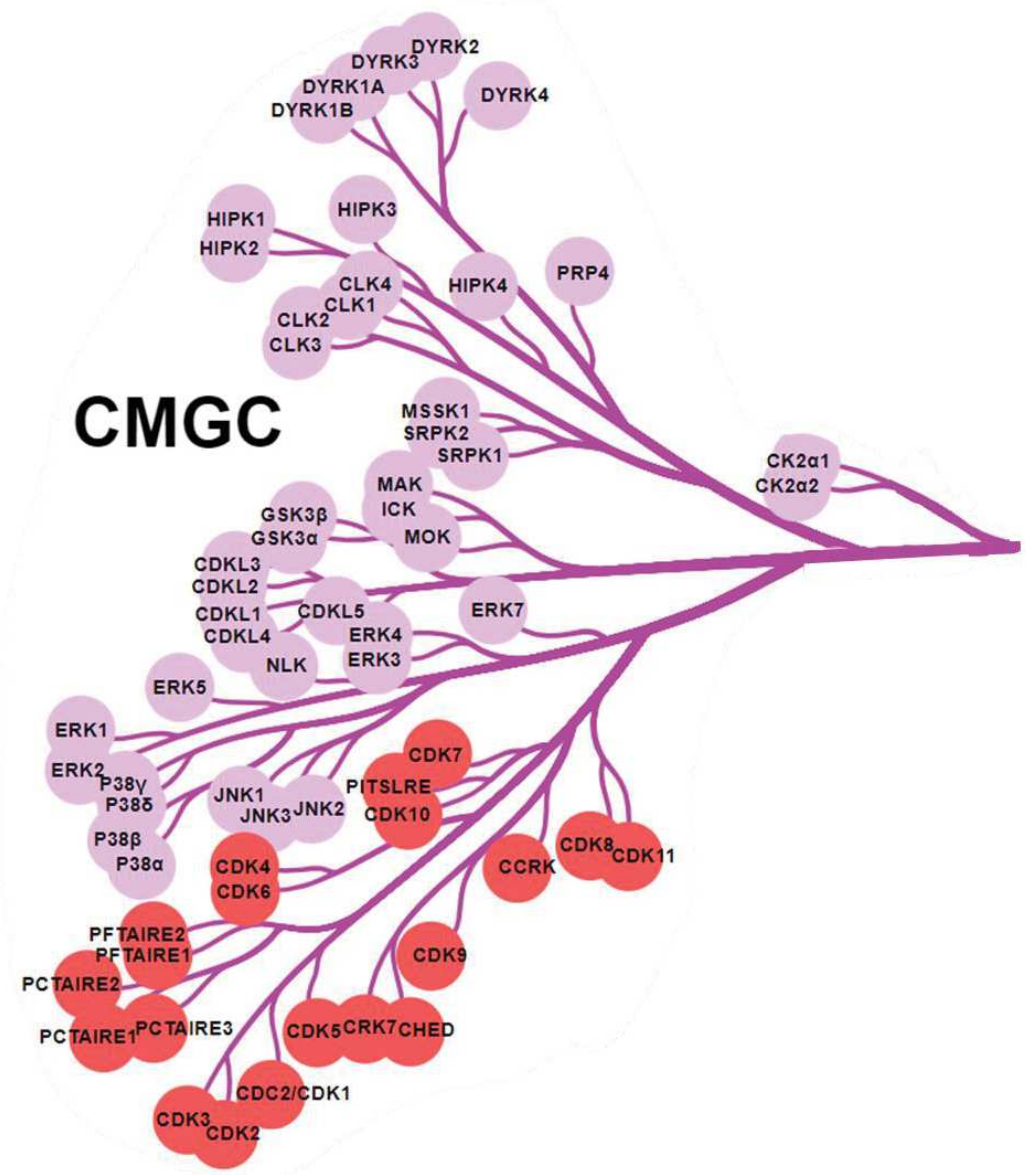


Figure 4. La famille des CMGC (réalisé avec l'outil en ligne : http://phanstiel-lab.med.unc.edu/CORAL/ (Berginski *et al.*, 2021), la figure originale est reproduite avec l'aimable autorisation de Cell Signaling Technology, Inc.). La famille des CMGC est composée des MAPK, GSK3, CLK (représentées en violet), et des CDKs (représentées en rouge).

Le cycle cellulaire est nécessaire pour la croissance ainsi que la division cellulaire. Ce rythme est propre à chaque organisme et varie selon les différents types cellulaires. Au sein des cellules eucaryotes, le cycle cellulaire est spécifiquement régulé par des enzymes impliquées dans de multiples voies de signalisation. Le cycle cellulaire comprend une succession de 4 phases différentes : G1, S, G2 (interphase) et M (mitose) (Nurse, 1975; Morgan, 1995, 1997). Au cours des phases G1, S et G2, la cellule grandit et accumule les éléments nécessaires afin

de synthétiser l'ADN pour qu'elle puisse se diviser en deux cellules filles au cours de la phase M. Plusieurs complexes CDK/cyclines sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, CDK4-6/Cycline D est nécessaire au déroulement de la phase G1, puis CDK2/Cycline E coordonne la transition G1/S. A la suite, CDK2/Cycline A régule la phase S, puis CDK1/Cycline A intervient à la transition G2/M. Au final, CDK1/Cycline B régule la mitose des cellules. Ces complexes hétérodimériques doivent être phosphorylés au niveau de leur boucle d'activation afin de pouvoir pleinement remplir leur rôle de kinase. La phosphorylation dans la boucle d'activation se fait sur un résidu hautement conservé à travers les CDK en position 160. Elle est réalisée par le complexe CDK7/Cycline H/ Mat1 nommé CAK.

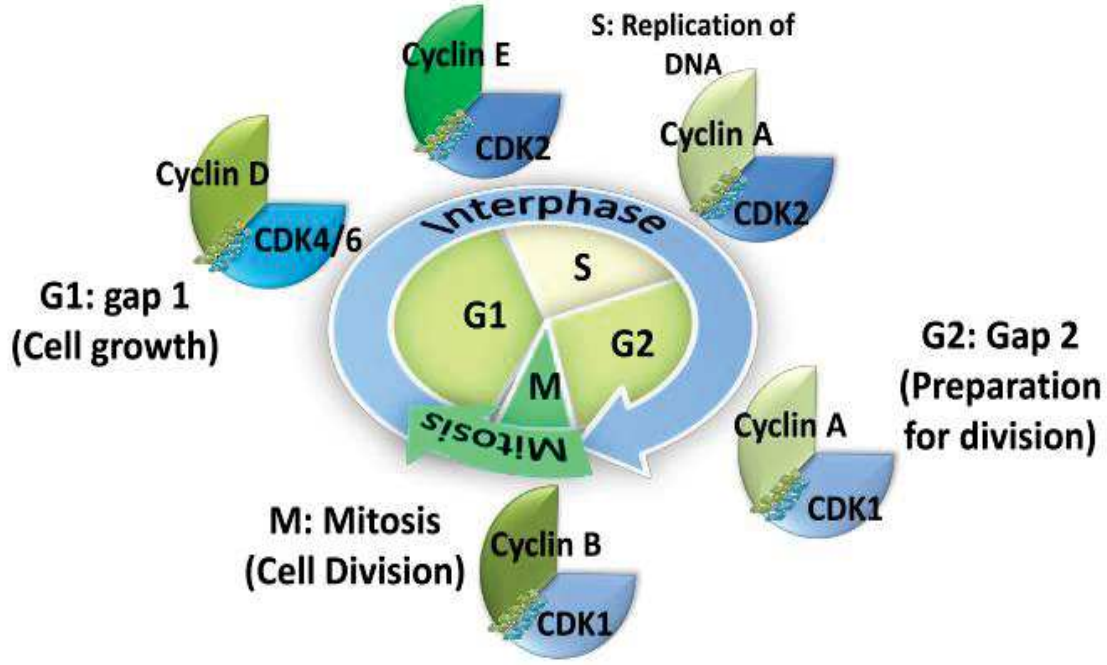


Figure 5. Régulation du cycle cellulaire par les CDK/Cyclines (Peyressatre *et al.,* 2015)**.**

Les complexes CDK/Cycline n'ont pas seulement un rôle dans le cycle cellulaire, ils sont également impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques dont certaines encore mal définies (Lim and Kaldis, 2013). Ils régulent, de manière non exhaustive, la synthèse d'ADN, la réparation d'ADN, la spermatogenèse, l'angiogenèse, la différentiation neuronale, etc. Certaines CDKs telles que CDK15 et CDK17 n'ont pas de fonctions encore connues à ce jour

Kinases	Partenaires	Fonctions	Références
CDK1	Cycline A, B	• Mitose • Réparation de l'ADN • Régulation épigénétique	(Jackman *et al.*, 2003; Santamaría *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; Marais *et al.*, 2010; Michowski *et al.*, 2020)
CDK2	Cycline A, E	• Phase G1/S • Régulation épigénétique	(Matsumoto, Hayashi and Nishida, 1999; Ortega *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2010; Marais *et al.*, 2010)
CDK3	Cycline C	• Transition G1/S • Réparation de l'ADN	(Ren and Rollins, 2004; Zheng *et al.*, 2008; Tomashevski *et al.*, 2010)
CDK4	Cycline D	• Transition G1/S • Régulation épigénétique • Métabolisme	(Ho and Dowdy, 2002; Blanchet, Annicotte and Fajas, 2009; Malumbres and Barbacid, 2009; Fajas, 2013; Narasimha *et al.*, 2014)
CDK5	p25/p35	• Fonctions neuronales • Réponse immunitaire • Sécrétion d'insuline	(Dhavan and Tsai, 2001; Sharma and Sicinski, 2020)
CDK6	Cycline D	• Transition G1/S • Hématopoïèse • Régulation lymphocytes T • Prolifération cellules β-pancréatiques • Métabolisme • Angiogenèse	(Malumbres *et al.*, 2004; Kozar and Sicinski, 2005; Fiaschi-Taesch *et al.*, 2010; Kollmann *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017)
CDK7	Cycline H	• Kinase activatrice des CDKs (CAK)	(Martinez *et al.*, 1997; Fisher, 2005)

CDK8	Cycline C	• Régulation transcriptionnelle • Régulation voie Wnt/β-caténine	(Firestein *et al.*, 2008; Szilagyi and Gustafsson, 2013; Nemet *et al.*, 2014)
CDK9	Cycline T, K	• Régulation transcriptionnelle • Réparation de l'ADN	(Fu *et al.*, 1999; Marshall and Grana, 2006; Wang and Fischer, 2008; Yu *et al.*, 2010)
CDK10	Cycline M	• Transition G2/M	(Iorns *et al.*, 2008; Guen *et al.*, 2017)
CDK11	Cycline L	• Régulation transcription et épissage de l'ARN • Autophagie • Apoptose	(Hu *et al.*, 2003; Trembley *et al.*, 2004; Loyer *et al.*, 2008; Ferreira dos Santos Paparidis and Canduri, 2018)
CDK12	Cycline K, L	• Réparation ADN • Régulation épissage • Régulation transcriptionnelle	(Chen, Wang and Fann, 2006; Blazek *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016)
CDK13	Cycline L	• Régulation transcription et épissage ARN	(Chen *et al.*, 2007; Kohoutek and Blazek, 2012; Liang *et al.*, 2015)
CDK14	Cycline Y	• Régulation voie Wnt/β-caténine	(Davidson and Niehrs, 2010)
CDK15			
CDK16	Cycline Y	• Spermatogenèse • Traffic et remodelage synaptique	(Ou *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2011; Mikolcevic *et al.*, 2012)
CDK17			
CDK18	Cycline A	• Régulation stabilité génomique • Migration et adhésion cellulaire	(Matsuda *et al.*, 2014, 2017; Barone *et al.*, 2016)

CDK19	Cycline C	• Paralogue de CDK8 • Régulation transcriptionnelle	(Dannappel *et al.*, 2019; Fant and Taatjes, 2019)
CDK20	Cycline H	• Régulation cycle cellulaire • Survie cellulaire	(Lai, Shin and Qiu, 2020)

Tableau 1. Rôles physiologiques des CDKs.

c. Structure et régulation des CDKs/Cyclines

Les CDKs partagent une structure monomérique qui est hautement conservée. Comme décrit précédemment (cf. I.1.c Les Sérine/Thréonine kinases), les CDKs sont composées d'un lobe N-terminal constitué de 5 feuillets-β et d'une unique hélice-α (Hélice-C), qui est essentielle à l'activation des CDKs. Le lobe C-terminal est plus large et constitué uniquement d' hélices-α. La poche de liaison à l'ATP se situe au niveau du lobe N-terminal, proche du sillon catalytique.

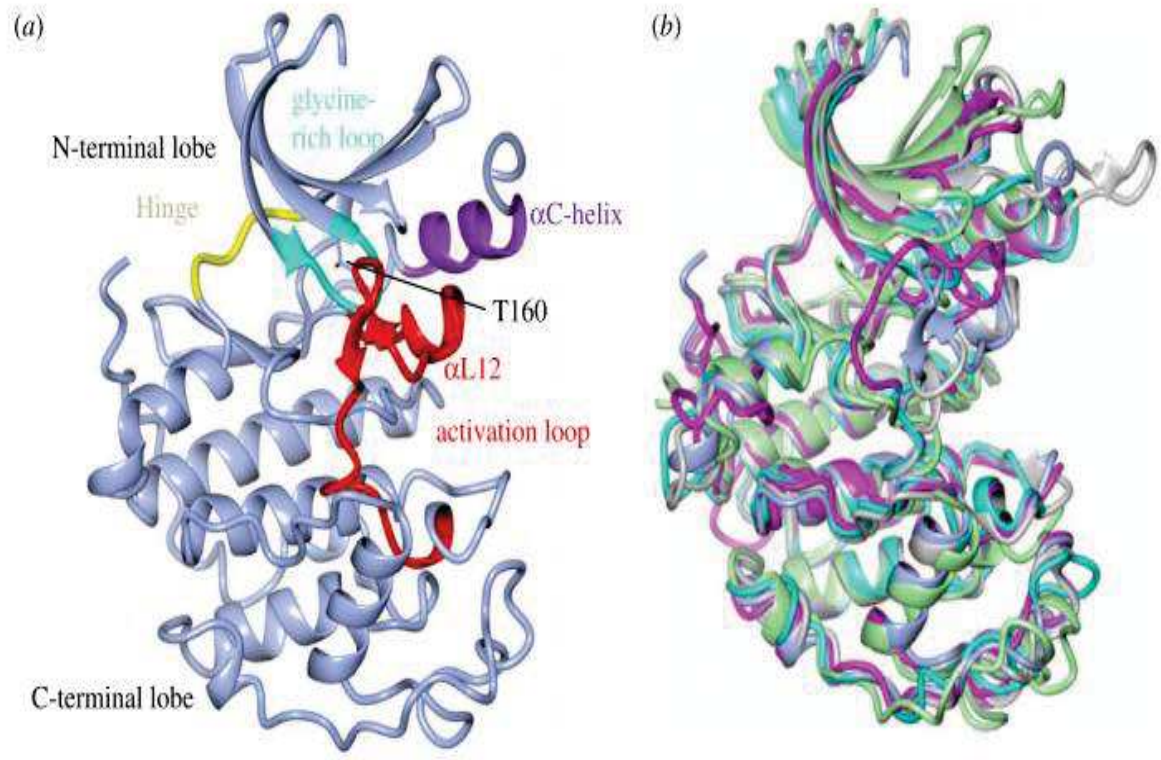


Figure 6. La structure monomérique des CDKs (Wood and Endicott, 2018)**. (a)** Structure monomérique de CDK2 (PDB : 1HCK). **(b)** Structures monomériques superposées de CDK1 (PDB : 4YC6 ; gris clair), CDK2 (PDB : 1HCK ; bleu clair), CDK6 (PDB : 5L2S ; cyan), CDK7 (PDB : 1UA2 ; magenta) et CDK16 (PDB : 5G6V, vert clair).

Sous forme monomérique les CDKs n'ont aucune activité catalytique et sont donc inactives, la liaison avec la cycline adéquate est nécessaire afin de former un complexe hétérodimérique actif. Une fois le complexe assemblé, il pourra phosphoryler de manière réversible un substrat cible dont les propriétés physicochimiques et les fonctions physiologiques seront affectées (Morgan, 1995, 1997).

Les CDKs peuvent être phosphorylées sur deux résidus spécifiques, la Thr14 et la Tyr15, par des kinases inhibitrices nommées Wee1 et Myt1 ayant pour effet d'affecter la liaison de l'ATP. Elles sont activées suite à la phosphorylation de la Thr161 par CDK7/cycline H, la kinase activatrice de CDK (CAK), et la déphosphorylation conjointe de Thr14 et Tyr15 par des phosphatases de la famille Cdc25.

De plus, les CDKs sont régulées à travers des interactions avec différentes famille de protéines dont les CKIs et les CKS. Les CKIs sont des inhibiteurs structuraux des CDKs qui comprennent deux familles : les protéines INK4 (p16, p15, p18) qui lient CDK4/6 afin d'empêcher la liaison avec leurs cyclines ; et les protéines CIP/KIP (p21, p27) qui se lient aux les complexes CDKs/cyclines, les maintenant dans une conformation inactive (Sherr and Roberts, 1999) . Les CKS sont des protéines n'ayant pas d'activité enzymatique mais qui se lient au niveau du C-Terminal des CDKs afin de permettre la stimulation de l'assemblage des CDKs/cyclines mais aussi le le recrutement de leurs substrats (Bourne *et al.*, 1996; Pines, 1996; Patra *et al.*, 1999; McGrath *et al.*, 2013).

Le mécanisme de liaison entre la CDK et la cycline a été largement étudié et décrit pour CDK2/cycline A (Jeffrey *et al.*, 1995; Russo, Jeffrey and Pavletich, 1996; Morris *et al.*, 2002). Ces études ont permis de mieux appréhender les mécanismes moléculaires d'activation des divers complexes CDKs/cyclines. En effet les CDKs partagent des séquences assez homologues entre elles et possèdent des structures tertiaires amplement similaires. Elles sont composées d'une poche de liaison à l'ATP située proche de la fente catalytique entourées par les lobes N et C terminaux. Les cyclines possèdent des séquences moins similaires entre elles en comparaison avec les CDKs. Néanmoins elles sont proches structurellement possédant deux parties constituées de cinq hélices chacune. Les résidus présents à la surface des CDKs

différent, conférant une spécificité pour la liaison avec une cycline ainsi qu'avec le substrat. La liaison entre les CDKs et leurs cyclines spécifiques se fait en deux étapes. La première est l'association de l'hélice PSTAIRE (ou hélice-C) située sur lobe N-terminale de CDK2 et l'hélice α5 de la cycline A. Cette interaction va entrainer chez la CDK une réorientation de la poche de liaison de l'ATP l'alignant ainsi avec la fente catalytique. La kinase pourra ainsi réaliser une attaque nucléophile pour hydrolyser l'ATP fixé dans la poche, puis transférer le phosphate sur le substrat (Morris *et al.*, 2002; A. P. Kornev *et al.*, 2006). La seconde étape est un changement conformationnel de la boucle d'activation (ou boucle T) par isomérisation lente, qui sera ensuite phosphorylée par CAK, favorisant ainsi la liaison du substrat, en créant un pont salin entre la charge négative du phosphate et une charge positive dans le substrat (Morris et al. 2002 ; Brown et al.1999).

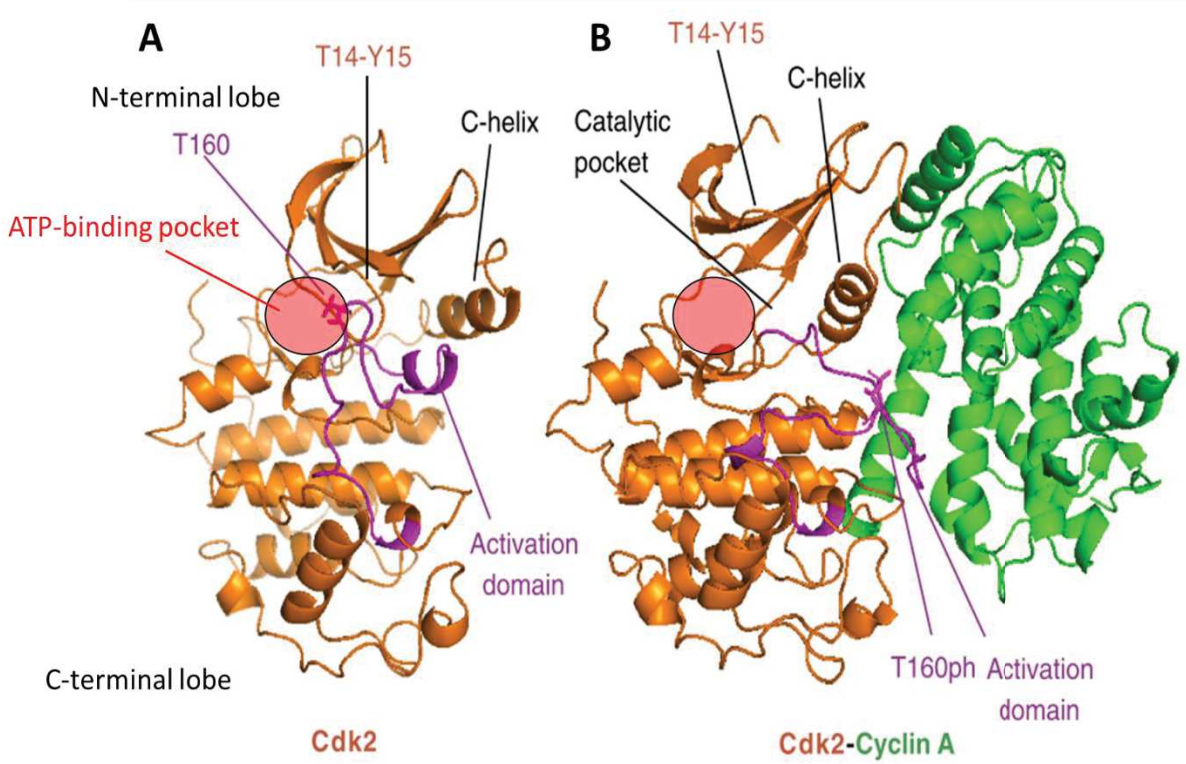


Figure 7. Modifications structurales lors de l'activation de CDK2 par liaison avec la cycline A (Malumbres, 2014)**. (A)** Sous forme monomérique CDK2 est inactive, l'hélice-C en N-terminale est proche du domaine d'activation rendant inaccessible l'accès à la poche catalytique pour le substrat (PDB : 1HCL). **(B)** Sous l'effet de la liaison entre l'hélice-α5 de la cycline A et l'hélice-C de CDK2, une rotation du lobe N-terminale va entrainer une réorientation de la poche ATP qui sera aligné avec la poche catalytique rendant l'accès au substrat possible. L'ATP peut ainsi être hydrolysé par CDK2 et transférer un groupement phosphate au substrat. La boucle d'activation (« activation domain » en violet) va adoptée une position « ouverte » permettant de stabiliser la poche de liaison du substrat (PDB : 1JST).

d. CDKs/Cyclines et cancers

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé le cancer ou tumeur est un terme général regroupant diverses maladies impactant l'organisme (**https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer**). Il est caractérisé par une prolifération rapide et incontrôlé de cellules anomales pouvant se déplacer et envahir d'autres organes formant ainsi des métastases. En 2000 Hanahan et Weinberg ont défini six capacités distinctives afin de définir les cellules tumorales (Hanahan and Weinberg, 2000) :

- Autosuffisance pour les signaux de croissance
- Insensibilité aux signaux empêchant inhibiteurs de croissance
- Éviter l'apoptose
- Capacité de se répliquer indéfiniment
- Induction de l'angiogenèse
- Formation de métastases

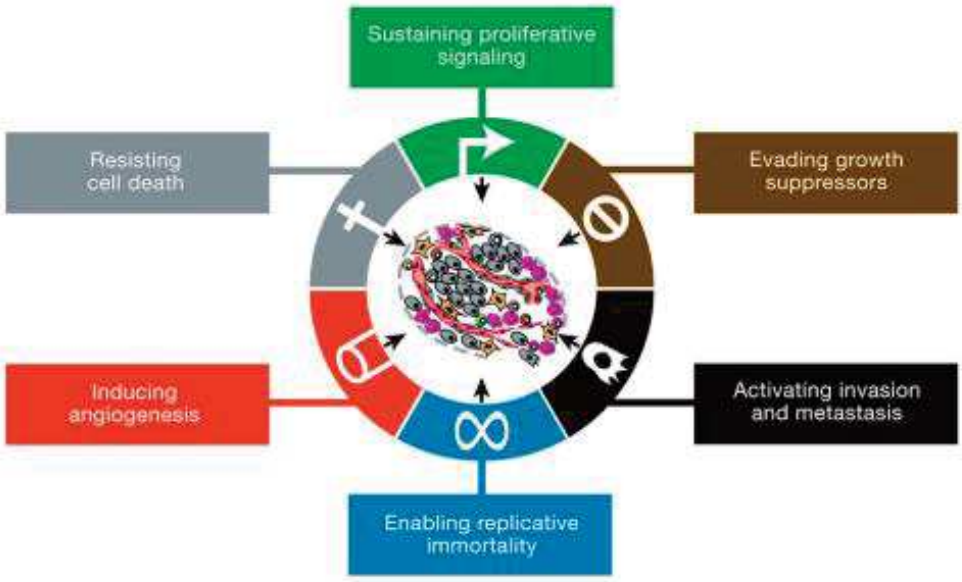


Figure 8. Capacités distinctives du cancer (Hanahan and Weinberg, 2000)**.**

En 2011 ils identifient deux nouvelles capacités des cellules tumorales (Hanahan and Weinberg, 2011) :

- Dérégulation du métabolisme énergétique
- Éviter la destruction par le système immunitaire

Ils vont également déterminer deux caractéristiques favorisant les cancers qui sont l'inflammation et l'instabilité des mutations du génome. Ces deux caractéristiques n'étant pas considérées par les auteurs comme des capacités distinctives des cellules tumorales.

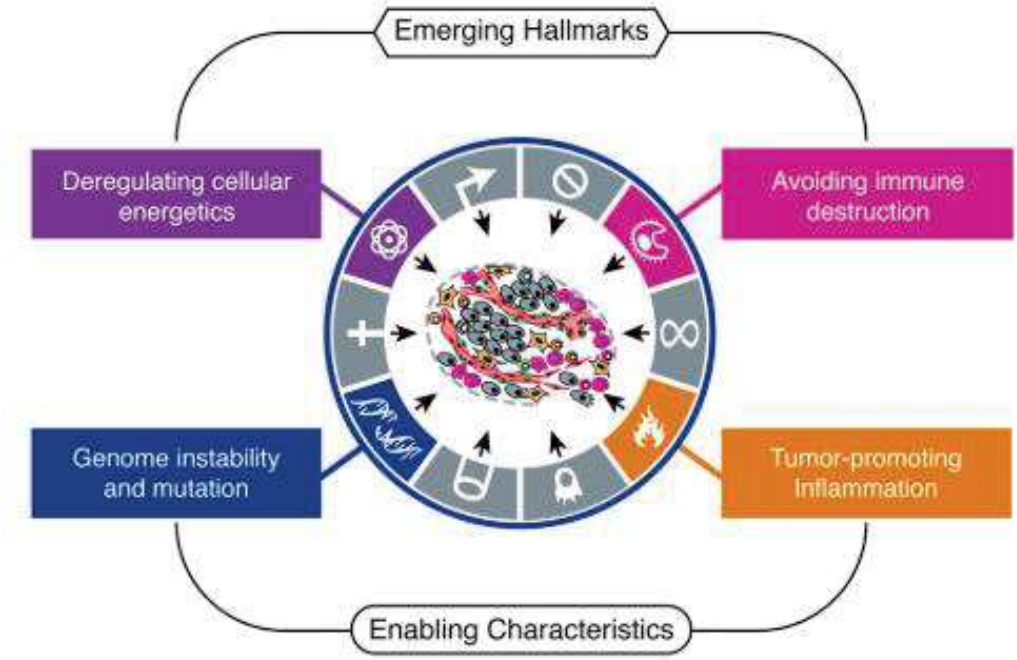


Figure 9.Nouvelles caractéristiques du cancer (Hanahan and Weinberg, 2011)**.**

Le développement du cancer est dû à l'accumulation d'altérations génomique impliquant mutations, surexpression de protéines et amplification de gènes. Au fil des mutations, les cellules tumorales vont passer d'une forme bégnine à maligne. Ces dérégulations affectent majoritairement deux types de gènes qui seront définis tels des gènes « drivers » de par leur capacité à favoriser le développement des tumeurs et des « suppresseurs de tumeurs » (Vogelstein *et al.*, 2013). Le premier type de gène sont les proto-oncogènes qui physiologiquement stimulent la croissance cellulaire. Ils regroupent des facteurs de croissance, des récepteurs membranaires de facteurs de croissance ou des protéines G. La mutation d'un proto-oncogène aboutit à la formation d'un oncogène et est suffisante pour induire la formation d'une tumeur. Le second type de gène sont les gènes suppresseurs de tumeurs tel que p53, dont leur principal rôle est d'inhiber la croissance des tumeurs. Ces gènes sont une protection pour l'organisme régulant l'expression de gènes essentiels à la réparation de l'ADN (Lane, 1992). En cas de mutation de ces gènes, leurs fonctions peuvent être réduite

voire totalement perdue favorisant ainsi le développement d'un cancer. Plusieurs gènes et protéines altérés ont été identifiés pour leur implication dans le développement de certains cancers (Vogelstein *et al.*, 2013; Weinstein *et al.*, 2013).

II. CDK5

1. Découverte de CDK5

a. Historique

CDK5 est une Ser/Thr kinase atypique de 34 kDa appartenant à la famille des CDKs. Elle a été découverte en 1992 suite à une purification issue de cerveau bovin (Lew *et al.*, 1992). Parallèlement plusieurs études ont identifié CDK5 à partir de criblage d'homologies de séquence de cdc2 (levure), CDK2 (Homme), CDK1 (rat) (Lew *et al.*, 1992; Meyerson *et al.*, 1992). Elle fut initialement nommée cdc2-like kinase (nclk), brain proline-directed proline kinase (bpdk) ou PSSALRE. Chez l'Homme CDK5 partage 56% et 60% d'homologies de séquences avec respectivement CDK1 et CDK2. Néanmoins, cette homologie partagée avec des CDKs impliquées dans la régulation du cycle cellulaire ne permet pas d'identifier CDK5 comme un régulateur du cycle cellulaire. Elle est exprimée de façon ubiquitaire mais majoritairement dans les cellules neuronales post-mitotiques (Hellmich *et al.*, 1992; Ishiguro *et al.*, 1992; Lew *et al.*, 1992; Meyerson *et al.*, 1992; Xiong, Zhang and Beach, 1992; Tsai *et al.*, 1993).

Historiquement CDK5 a été découverte dans le système nerveux central (SNC) où elle y est majoritairement exprimée (Hellmich *et al.*, 1992), c'est une kinase dite neurospécifique. Cependant nous savons aujourd'hui que cette kinase est exprimée de manière ubiquitaire et exerce des fonctions non-neuronales dans d'autres types cellulaires (Contreras-Vallejos, Utreras and Gonzalez-Billault, 2012).

```
Q00535|CDK5_HUMAN  MQKYEKLEKIGEGTYGTVFKAKNRETHEIVALKRVRLDDDDEGVPSSALREICLLKELKH   60

Q00535|CDK5_HUMAN  KNIVRLHDVLHSDKKLTLVFEFCDQDLKKYFDSCNGDLDPEIVKSFLFQLLKGLGFCHSR   120

Q00535|CDK5_HUMAN  NVLHRDLKPQNLLINRNGELKLADFGLARAFGIPVRCYSAEVVTLWYRPPDVLFGAKLYS   180

Q00535|CDK5_HUMAN  TSIDMWSAGCIFAELANAGRPLFPGNDVDDQLKRIFRLLGTPTEEQWPSMTKLPDYKPYP   240

Q00535|CDK5_HUMAN  MYPATTSLVNVVPKLNATGRDLLQNLLKCNPVQRISAEEALQHPYFSDFCPP          292
```

Figure 10. Séquence de CDK5 (source : www.uniprot.org). Les résidus surlignés en vert correspondent au site de liaison de l'ATP, en magenta les sites de phosphorylation inhibiteurs (Thr14 et Tyr15), en cyan l'hélice-C (PSSALRE) contenant la Ser47 de CDK5 et l'Ile153 impliqués dans la liaison avec p25/35, en jaune le début et la fin de la boucle d'activation (T-loop), et en rouge le site de phosphorylation par les CAKs, aussi impliqué dans la liaison avec p25/p35 (Ser159) (adaptée de Lim and Kaldis, 2013).

b. Fonctions neuronales de CDK5

CDK5 est nécessaire pour la régulation de nombreuses fonctions neuronales telles que la migration neuronale, la formation des synapses ou la différenciation. CDK5 est donc impliquée dans l'architecture du SNC, elle est également impliquée dans la plasticité neuronale (Dhavan and Tsai, 2001).

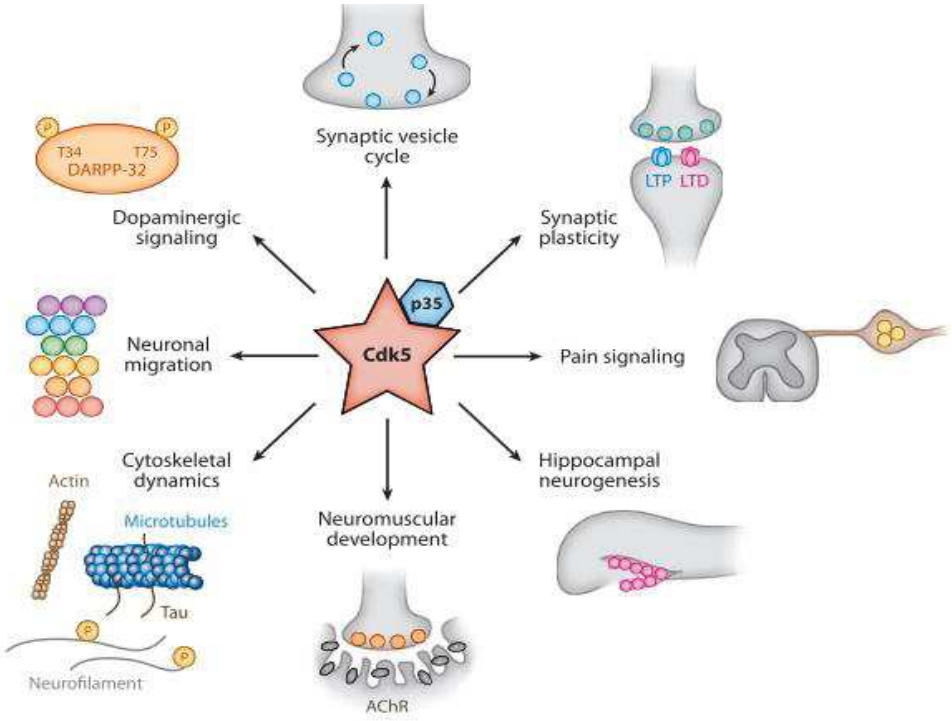


Figure 11. Rôles de CDK5 dans la régulation de l'activité neuronale (Su and Tsai, 2011).

La présence et l'activité physiologique de CDK5 est nécessaire au développement puisqu'il a été montré chez la souris déficiente en CDK5 qu'elles mourraient juste avant ou après la naissance (Ohshima *et al.*, 1996, 1999; Gilmore *et al.*, 1998). L'absence de CDK5 a des conséquences sur la structure du cerveau dont le développement est perturbé. Ceci est traduit par des déficiences au niveau du cortex cérébral, du cervelet, de l'hippocampe ou du bulbe olfactif dont les couches neuronales sont inversées. Néanmoins l'absence de p35-p39 n'est pas létale, les souris vont présenter des perturbations structurales de l'hippocampe mais pas du cervelet. En plus de leur viabilité, les souris sont fertiles mais sont sujettes à des crises d'épilepsie. Malgré tout, une absence de p35-p39 couplée à une déficience de CDK5 va entrainer une inhibition de la migration neuronale. L'implication de CDK5 dans la migration neuronale est capitale (Ohshima *et al.*, 1999; Kawauchi *et al.*, 2006; Jessberger *et al.*, 2009). Il a été démontré qu'une réduction ou suppression de l'activité kinase de CDK5 inhibe la croissance des neurites mais réduit également l'élongation des axones. CDK5 est impliquée dans la régulation du cytosquelette, de l'adhésion cellulaire et du transport intracellulaire (Su and Tsai, 2011). Ces régulations sont modulées par la phosphorylation des protéines associées aux microtubules (MAPs) telles que MAP1B et Tau . Les MAPs sont essentielles à la régulation des microtubules en modulant leur stabilisation ou déstabilisation via la phosphorylation (Baumann *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 1993; Pigino *et al.*, 1997; Paglini *et al.*, 1998).

Les microtubules et les neurofilaments sont également des substrats importants de CDK5.
Le cytosquelette est composé de filaments d'actine, de microtubules et de neurofilaments dont l'assemblage permet de déterminer la fonction des neurones. Cela est finement régulé par des mécanismes moléculaires dont CDK5 est le chef d'orchestre (K. Shah & DK. Lahiri, 2017; Shah and Rossie, 2017). L'actine est régulée par des GTPases de la famille Rho dont Rac et RhoA font partie. CDK5 phosphoryle un nombre important de régulateurs et d'effecteurs de ces Rho GTPases renforçant ainsi son rôle essentiel dans les diverses fonctions neuronales

qu'elle régule. CDK5 induit l'hyperphosphorylation de PAK1 à travers la voie RAC, permettant la migration neuronale ainsi la croissance des neurites (Nikolic *et al.*, 1998).

CDK5 est également impliquée dans la régulation des fonctions synaptiques, où son implication est cruciale pour la formation des synapses, la plasticité neuronale mais aussi dans les fonctions d'apprentissage et de la mémoire. La phosphorylation de la synapsin 1, MUNC18 et de l'amphiphysin 1 permettent les transmissions synaptiques en régulant les neurosécrétions et l'endocytose (Matsubara *et al.*, 1996; Fletcher *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 2007). L'activité de CDK5 est notamment essentielle pour contrôler l'apprentissage et la mémoire en régulant la signalisation de l'AMPc et la dégradation du récepteur NMDAR au sein de l'Hippocampe (Fischer *et al.*, 2002; Hawasli *et al.*, 2007; Guan *et al.*, 2011).

Substrats	**Fonctions**	**Références**
β-Catenine	• Adhésion cellulaire	(Kwon *et al.*, 2000; Kesavapany *et al.*, 2001)
P27 (kip1)	• Organisation de l'actine et migration neuronale	(Kawauchi *et al.*, 2006)
NUDEL	• Régulation de la dynéine et du transport axonal	(Niethammer *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2000)
Cables	• Interaction avec c-Abl et régulation de la croissance des neurites	(Zukerberg *et al.*, 2000)
Src	• Adhésion cellulaire et régulation de l'actine	(Kato and Maeda, 1999)
Tau	• Régulation de l'interaction et de la nucléation des microtubules • Elongation axonale	(Hisanaga *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 2003)
MAP1B	• Régulation de la stabilité des microtubules	(Pigino *et al.*, 1997; Paglini *et al.*, 1998; González-Billault *et al.*, 2005)

PAK1	• Polymérisation de l'actine, réorganisation du cytosquelette et migration	(Nikolic *et al.*, 1998; Rashid, Banerjee and Nikolic, 2001)
P39	• Polymérisation de l'actine pour l'organisation du cytosquelette	(Humbert, Dhavan and Tsai, 2000)
Synapsin 1	• Régulation des transmissions synaptiques	(Matsubara *et al.*, 1996)
MUNC18	• Régulation des neurosécrétion	(Shuang *et al.*, 1998; Fletcher *et al.*, 1999; Bhaskar *et al.*, 2004)
Amphiphysin 1	• Régulation de l'endocytose synaptique	(Flute *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2007)
δ-Catenin	• Morphogenèse des dendrites et activité synaptique	(Poore *et al.*, 2010)
NF-H/NF-M	• Régulation de la structure axonale	(Sharma, Sharma and Pant, 1999; Grant, Sharma and Pant, 2001)
pRB	• Différenciation neuronale et survie cellulaire	(Lee *et al.*, 1997; Futatsugi *et al.*, 2012)
CASK	• Synaptogenèse	(Samuels *et al.*, 2007)
DARPP-32	• Signalisation dopaminergique	(Bibb *et al.*, 1999)
Bcl-2	• Survie neuronale	(Cheung, Gong and Ip, 2008)
ErbB4	• Migration tangentielle des interneurones corticaux	(Rakić *et al.*, 2015)
Drebrin	• Migration neuronale	(Worth *et al.*, 2013)
DISC1	• Migration neuronale	(Ishizuka *et al.*, 2011)
Kinesin-5	• Croissance neuronale	(Kahn *et al.*, 2015)

Tableau 2. Liste non exhaustive des principaux substrats de CDK5 régulant l'activité physiologique du SNC (adapté de Su and Tsai, 2011)**.**

2. Régulation de CDK5

a. Les partenaires de CDK5

Les CDKs sont activées par association avec leurs cyclines spécifiques, néanmoins une particularité de CDK5 est d'avoir comme partenaire spécifique une protéine nommée p35. CDK5 peut également interagir avec d'autres cyclines, régulant ainsi d'autres processus biologiques.

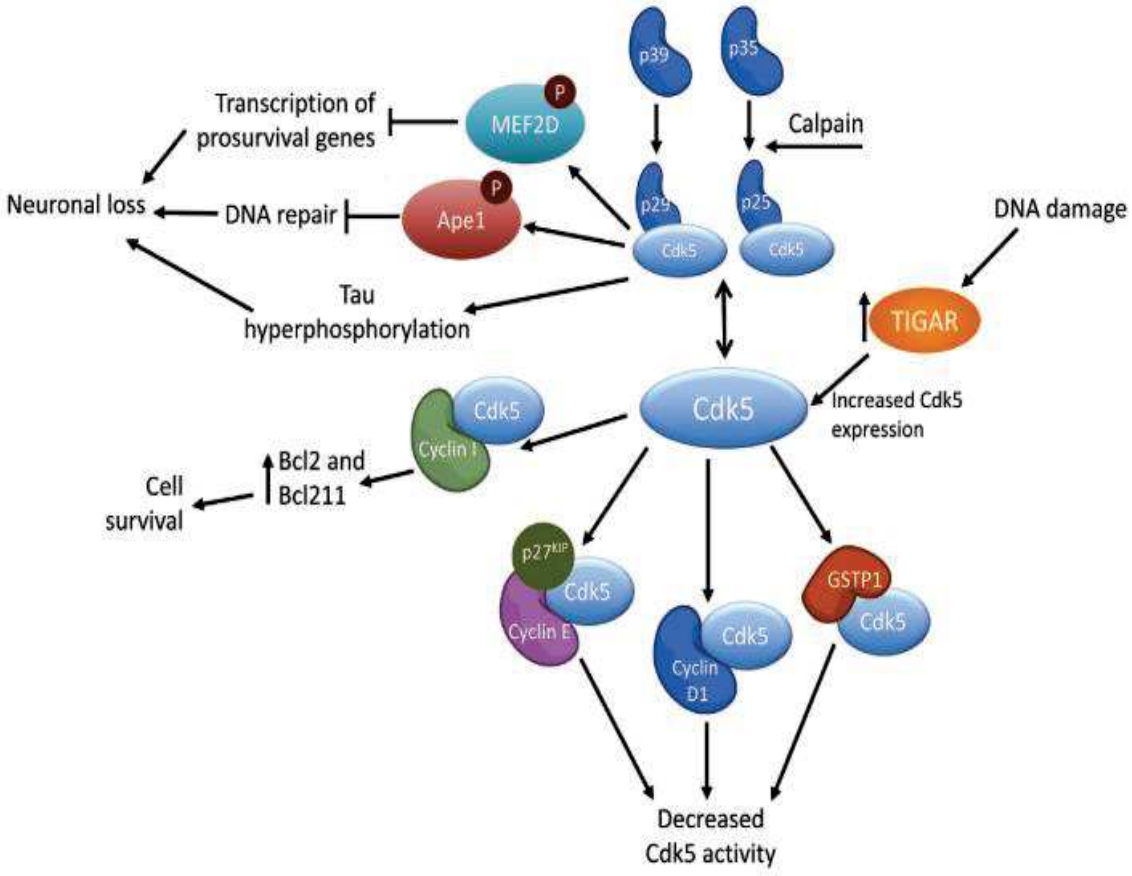


Figure 12. Régulation de CDK5 par ses différents partenaires (Shupp, Casimiro and Pestell, 2017)**.**

i. <u>P35 et p39</u>

P35 est le premier partenaire régulateur de CDK5 ayant été décrit et fut considéré comme étant neurospécifique (Tsai et al., 1994). Sa séquence primaire n'est pas homologue à celles des cyclines (Tang et al., 1997), cependant la structure tertiaire prédictive du complexe CDK5-p35 est similaire à celle de CDK2-cycline A (Brown et al., 1995; Tarricone et al., 2001). P39

est une protéine isoforme de p35 majoritairement présente dans les neurones et ayant également un rôle d'activateur spécifique de CDK5 (Zheng, Leung and Liem, 1998; Ko et al., 2001; Jeong et al., 2003). Tout comme p35, elle ne partage pas d'homologie avec les cyclines mais sa séquence protéique est identique à 57% avec p35. Les fonctions et la régulation de p39 sont largement similaires à celles de p35 mais quelques études attribuent des fonctions spécifiques à p39 notamment au niveau des oligodendrocytes ou p39 régule leurs maturation et remyélinisation (Bankston *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2016).

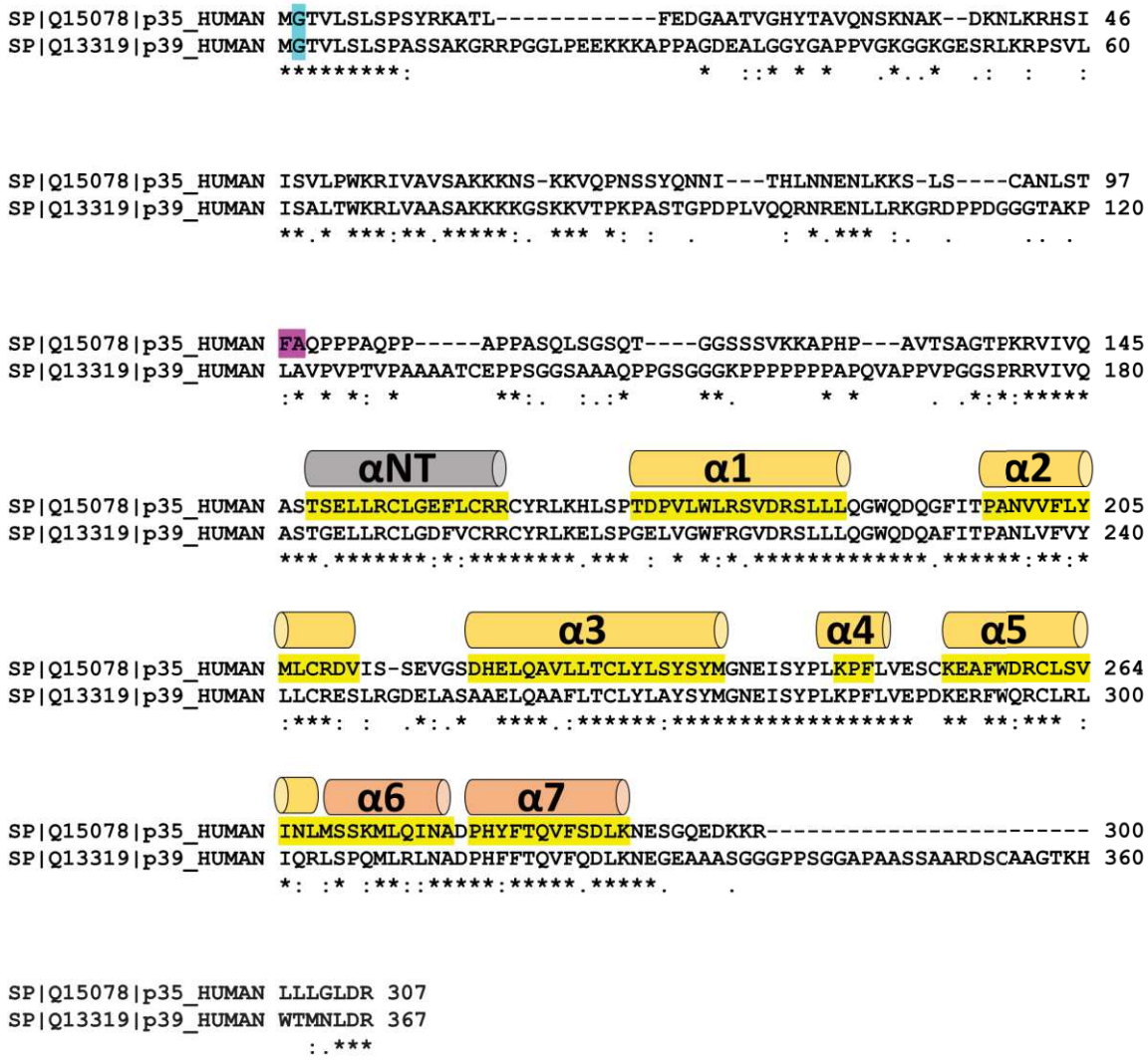


Figure 13. Alignement des séquences entre p35 et p39 (source : www.uniprot.org). (*) représente les résidus identiques, (:) les résidus conservés partageant des propriétés similaires et (.) les résidus conservés partageant des propriétés faiblement similaires. Les résidus surlignés en cyan correspondent au site de myristoylation, en magenta le site de clivage de p35 en p25 par la calpaïne et en jaune l'emplacement des hélices α (adaptée de Tarricone *et al.*, 2001).

P35 et p39 sont composées d'une partie N-terminale et C-terminale séparées par une région enrichie en proline. La partie N-terminale est nommée p10 et la région C-terminale contient p25/p29 dont la fonction est décrite ultérieurement. La région p10 est essentielle car elle permet l'ancrage de p35/p39 à la membrane par myristoylation du résidu Gly2 (Asada *et al.*, 2008), ainsi CDK5/p35 et CDK5/p39 ont une localisation à la membrane interne des cellules. Cette région N-terminale (p10) possède également une région riche en résidus lysines conférant un signal de localisation nucléaire (NLS) permettant à p35/p39 d'être importée dans le noyau (Fu *et al.*, 2006). En effet, lorsque Gly2 n'est pas myristoylée p35/p39 peuvent se relocaliser dans le noyau avec une plus forte activité pour p39 (Asada *et al.*, 2008). La spécificité de p39 est de pouvoir être phosphorylée sur son résidu Thr84 par CDK5 permettant une relocalisation nucléaire du complexe CDK5/p39 (Asada *et al.*, 2008; Asada, Saito and Hisanaga, 2012). Néanmoins la concentration nucléaire de p35/p39 reste relativement faible et le rôle physiologique de CDK5/p35 et CDK5/p39 au sein du noyau demeure peu connu (Ouyang *et al.*, 2020). De plus, p10 possède un signal de dégradation par le protéasome faisant de p35 une protéine instable, avec une demi-vie faible d'environ 20-30 minutes (Patrick *et al.*, 1998; Takasugi *et al.*, 2016). Plus récemment, un rôle neuroprotecteur de p10 face à une hyperactivité de CDK5/p25 a été décrit (Zhang *et al.*, 2012).

Les résidus Ser8 (p35/p39) et Thr138 (p35) sont des sites de régulation importants soumis à la phosphorylation de CDK5 (Kamei *et al.*, 2007; Asada, Saito and Hisanaga, 2012). La phosphorylation de ces résidus par CDK5 limite le clivage de p35/p39 en p25/p29 par la calpaïne et régule la localisation cytoplasmique, périnucléaire et même nucléaire du complexe CDK5/p35 et CDK5/p39 mais aussi la dégradation par le protéasome (Saito *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2005; Kamei *et al.*, 2007; Asada, Saito and Hisanaga, 2012). La phosphorylation de la Ser8 altérerait l'interaction de p35/p39 avec les phospholipides composant la membrane, permettant à p35/p39 d'être plus mobile jusqu'à sa diffusion à travers tout le cytoplasme (Asada, Saito and Hisanaga, 2012). La phosphorylation du résidu Ser8 n'est pas constante et est modifiée avec l'âge (Hosokawa *et al.*, 2010). La relocalisation cytoplasmique du complexe

CDK5/p35 permet la régulation du recyclage des endosomes et du trafic membranaire (Paglini *et al.*, 2001; Takano *et al.*, 2010).

Ces mécanismes permettent donc à CDK5 d'autoréguler son activité et sa localisation subcellulaire par la phosphorylation de son partenaire p35/p39.

ii. *P25 et p29*

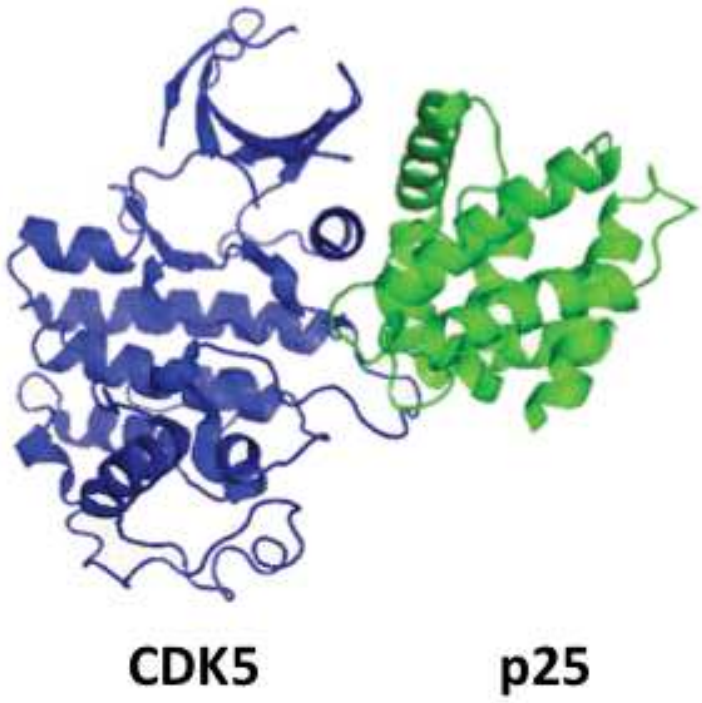


Figure 14. Structure protéique de CDK5 en complexe avec son co-activateur p25 (PDB : 1h4l).

P25 et p29 sont des protéines résultant du clivage de p35/p39 en p25/p29 et p10 par une calpaïne activée suite à un afflux de calcium (Kusakawa *et al.*, 2000; Patzke and Tsai, 2002). p25 est également un activateur spécifique de CDK5, plus stable son temps de demi-vie est 5 à 10 fois plus élevé que p35 (Patrick *et al.*, 1999). Ce clivage permet la formation du complexe CDK5-p25 qui va être relocalisé dans le cytoplasme et peut éventuellement entrer dans le noyau (Kusakawa *et al.*, 2000; Tarricone *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2007). Le mécanisme de translocation de p25 dans le noyau n'est pas connu puisque le NLS est contenu dans p10. Toutefois la présence du complexe CDK5/p25 au sein du noyau est généralement un indicateur de pathologie neurodégénérative (Patrick *et al.*, 1999; O'Hare *et al.*, 2005). P25 est

décrite comme neurotoxique car en plus de pouvoir activer CDK5 (Qi *et al.*, 1995; Poon, Lew and Hunter, 1997), elle va permettre au complexe CDK5/p25 d'être plus stable et d'exercer son activité au sein de toute la cellule (Patrick *et al.*, 1999; Kusakawa *et al.*, 2000). Cette dérégulation de la localisation et de l'activité de CDK5 entraîne l'hyperphosphorylation de substrats tels que Tau menant au développement de pathologies neurodégénératives (Patrick *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000a; Tseng *et al.*, 2002; Cruz *et al.*, 2006). Concernant p29, il n'existe aucune étude ayant décrit son rôle.

iii. Cyclines partenaires de CDK5

Plus récemment différentes équipes ont identifié d'autres partenaires de CDK5, comme les cyclines E, I ou D. La régulation de CDK5 par ces différentes cyclines a été l'objet d'études plus ou moins approfondies.

La capacité de CDK5 à former un complexe avec la cycline I a été mise en évidence dans différentes études. Ce complexe est capable de se relocaliser dans le noyau et d'exercer un rôle crucial dans la survie cellulaire (Brinkkoetter *et al.*, 2009; Taniguchi *et al.*, 2012; Hagmann *et al.*, 2015). Au sein des neurones post-mitotiques, CDK5/cycline I régule l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL en activant la voie MEK/ERK (Brinkkoetter *et al.*, 2009; Brinkkoetter, Pippin and Shankland, 2010). Comme CDK5/p35, CDK5/cycline I est capable de phosphoryler Tau et de manière moindre l'histone H1 (Ref).

Plus récemment la cycline-I like (CCNI2), qui est homologue à la cycline I, a été identifiée comme un partenaire régulateur de CDK5 (C. Liu *et al.*, 2017). L'interaction avec CCNI2 va activer l'activité catalytique de CDK5 et la retenir dans le cytoplasme ou à la membrane cellulaire. Ce complexe aurait un rôle dans la régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire et également dans la prolifération cellulaire, mais de plus amples études sont nécessaires pour en identifier les mécanismes moléculaires.

CDK5 est capable de s'associer avec la cycline E dans les neurones (Miyajima, Nornes and Neuman, 1995). CDK5/cycline E aurait un rôle essentiel dans la mémoire et la régulation de la plasticité synaptique (Odajima *et al.*, 2011). CDK5/cycline E est fonctionnellement inactif et ne peut plus phosphoryler les substrats connus de CDK5/p35 tels que la synapsine I, un régulateur essentiel de la fonction synaptique. La cycline E va s'associer avec CDK5 et empêcher la formation d'un complexe CDK5/p35 catalytiquement actif. Cette régulation de l'activité de CDK5 par la cycline E est essentielle à la formation des synapses. En effet, l'absence de cycline E entraîne une diminution des dendrites et des synapses dans les neurones qui sont nécessaires dans le développement de la mémoire. Cette étude a uniquement permis d'observer de manière *in vitro* que CDK5/p35 ne phosphoryler pas la synapsine I. Néanmoins, dans notre laboratoire nous avons caractérisé l'activité kinase *in vitro* de CDK5/cycline E recombinante grâce à un biosenseur d'activité et montré que le complexe était capable de phosphoryler un substrat peptidique spécifique de CDK5 (Thèse Marion Peyressatre).

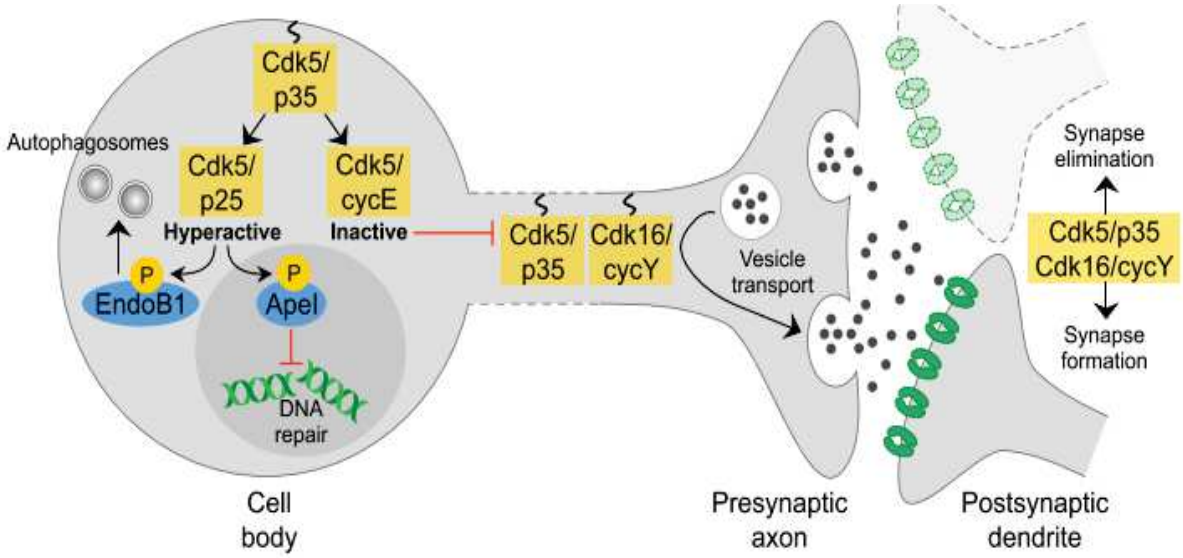


Figure 15. Partenaires régulateurs de CDK5 pour le contrôle de son activité neuronale (Lim and Kaldis, 2013)

CDK5 peut former un complexe avec les cyclines D1 et D3 mais ces complexes ne régulent pas l'activité de CDK5 (Xiong, Zhang and Beach, 1992). En revanche la cycline D2 interagit

avec CDK5 dans les neurones post-mitotiques, entrainant une diminution de l'activité de CDK5/p35 (Guidato *et al.*, 1998).

Une étude plus récente a mis en évidence le rôle inhibiteur de cycline D1 sur l'activité de CDK5 (Modi *et al.*, 2012). Au sein de neurones ayant subi des signaux neurotoxiques, le niveau de cycline D1 va augmenter entrainant une compétition avec p35, mais pas avec p25, pour l'association à CDK5. Le complexe CDK5/p35 ne peut plus se former car CDK5 va lier préférentiellement la cycline D1, mais l'activité de CDK5/p25 n'est pas impactée. L'inhibition de l'activité de CDK5/p35 induit une augmentation de la voie MEK/ERK, permettant aux neurones d'entrer à nouveau dans le cycle cellulaire et à terme conduit à l'apoptose neuronale (Modi *et al.*, 2012). Cette perte neuronale est à l'origine du développement de certaines pathologies dégénératives.

Il a également été observé au sein de cellules cancéreuses du poumon et du colon une surexpression de la cycline G1 qui va être propice à la formation du complexe CDK5/cycline G1 pouvant phosphoryler c-Myc sur la Ser62 (Seo *et al.*, 2006, 2008). La phosphorylation du proto-oncogène c-Myc, qui est surexprimé dans plusieurs cancers (Miller et al. 2012, va promouvoir l'expression et l'activation de la cycline B1, un régulateur essentiel du cycle cellulaire.

A l'instar des cyclines, la glutathione-S-transferase pi 1 (GSTP1) est également un régulateur de CDK5 (Sun *et al.*, 2011). La formation du complexe CDK5/GSTP1 va inhiber l'activité de CDK5 qui ne pourra pas s'associer avec p25/p35. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, l'inhibition de CDK5 par GSTP1 va indirectement réduire le stress oxydatif et donc avoir un effet neuroprotecteur.

b. Mécanisme d'activation de CDK5

L'activation des CDKs est un processus finement régulé par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation, débutant par l'interaction avec la sous-unité régulatrice qu'est la cycline conduisant à un changement conformationnel de la kinase (Jeffrey *et al.*, 1995; Morgan, 1995; Russo, Jeffrey and Pavletich, 1996; Morris *et al.*, 2002). La boucle d'activation, nommée boucle T, va changer de conformation permettant un accès complet au substrat. Les résidus Ser159 et Ile153 se situent au sein de la boucle T de CDK5 et jouent un rôle essentiel pour la liaison avec p35/p25 et permettent de stabiliser le complexe dans une forme « ouverte » laissant l'accès libre pour le substrat (Tarricone *et al.*, 2001).

Communément à toutes les CDKs, CDK5 possède trois sites de phosphorylation régulant son activité qui sont la Thr14, la Tyr15 et la Ser159. En prenant l'exemple de CDK2, la phosphorylation de ses résidus Thr14 et Tyr15 par les kinases Wee1 et Myt inhibent son activité. A l'inverse la phosphorylation de la Thr160 chez CDK2, l'équivalent de la Ser159 de CDK5, par CDK7/cycline H (CAK), stabilise le complexe dans une forme ouverte qui favorise la liaison avec le substrat (pont salin entre le phosphate et un résidu positivement chargé du substrat (Brown *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 2002). Cependant l'activation de CDK5 diffère légèrement des autres CDKs. En effet la phosphorylation de CDK5 sur la Thr14, par une kinase non identifiée, a été démontrée *in vitro* comme inhibant son activité (Matsuura and Wang, 1996). Néanmoins cela reste à confirmer *in vivo*, contrairement à la phosphorylation de la Tyr15 qui a été observée dans les deux cas (Zukerberg *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2002). Alors que la phosphorylation de Tyr15 est inhibitrice chez les autres CDKs, elle apparaît comme exerçant le rôle inverse chez CDK5. Les kinases c-Abl et Fyn, appartenant à la famille des tyrosines kinases Src, peuvent phosphoryler la Tyr15 de CDK5 qui l'active et joue un rôle dans la migration neuronale, la formation de synapse ou la croissance des neurites. La Tyr15 peut être phosphorylée par c-Abl sur la forme monomérique de CDK5 alors que Fyn et Src peuvent phosphoryler Tyr15 sur CDk5 en complexe avec p35 (Zukerberg *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2002). Il a même été observé que la phosphorylation de la Tyr15 peut hyperactiver

CDK5 favorisant ainsi la dégénérescence neuronale (Lin, Lin and Juang, 2007; Cancino *et al.*, 2011). Cependant une étude a démontré que la phosphorylation de la Tyr15 était inhibée par les activateurs de CDK5 et qu'elle n'affectait pas la liaison de CDK5 avec p35. Fyn augmentait l'expression de p35, permettant la liaison et l'activation de CDK5. L'interaction avec p35 inhibait la phosphorylation de Tyr15. Les auteurs ont conclu que la phosphorylation du résidu Tyr15 n'active pas le complexe CDK5-p35 (Kobayashi *et al.*, 2014).

Une autre particularité de CDK5 concerne la phosphorylation de la Ser159 se situant sur la boucle T. La phosphorylation de ce résidu par CAK permet aux CDKs d'adopter une forme pleinement active. Or celle-ci ne serait pas capable de phosphoryler CDK5 (Poon, Lew and Hunter, 1997). Des études *in vitro* ont indiqué que la phosphorylation de Ser159 ne serait pas nécessaire à l'activation de CDK5, qui adopte une conformation active grâce à sa liaison avec p35 (Tarricone *et al.*, 2001; Amin, Albers and Pant, 2002). Au cours de l'étude structurale de CDK5/p25, un mutant phosphomimétique de la Ser159 de CDK5 (S159E) a été généré et s'est révélé incapable de lier p25. Les auteurs ont suggéré que la phosphorylation de ce résidu avait un effet inhibiteur sur l'activité de CDK5 (Tarricone *et al.*, 2001). Néanmoins certaines études ont observé la nécessité de la phosphorylation de la Ser159 afin que CDK5 soit pleinement active (Sharma *et al.*, 1999; Rosales, Han and Lee, 2003). Rosales et al. ont notamment démontré dans des cerveaux de bovins et de souris que CDK7/cycline H (CAK) est capable de phosphoryler CDK5 sur son résidu Ser159 et permettait d'augmenter l'activité de CDK5/p25 (Rosales, Han and Lee, 2003).

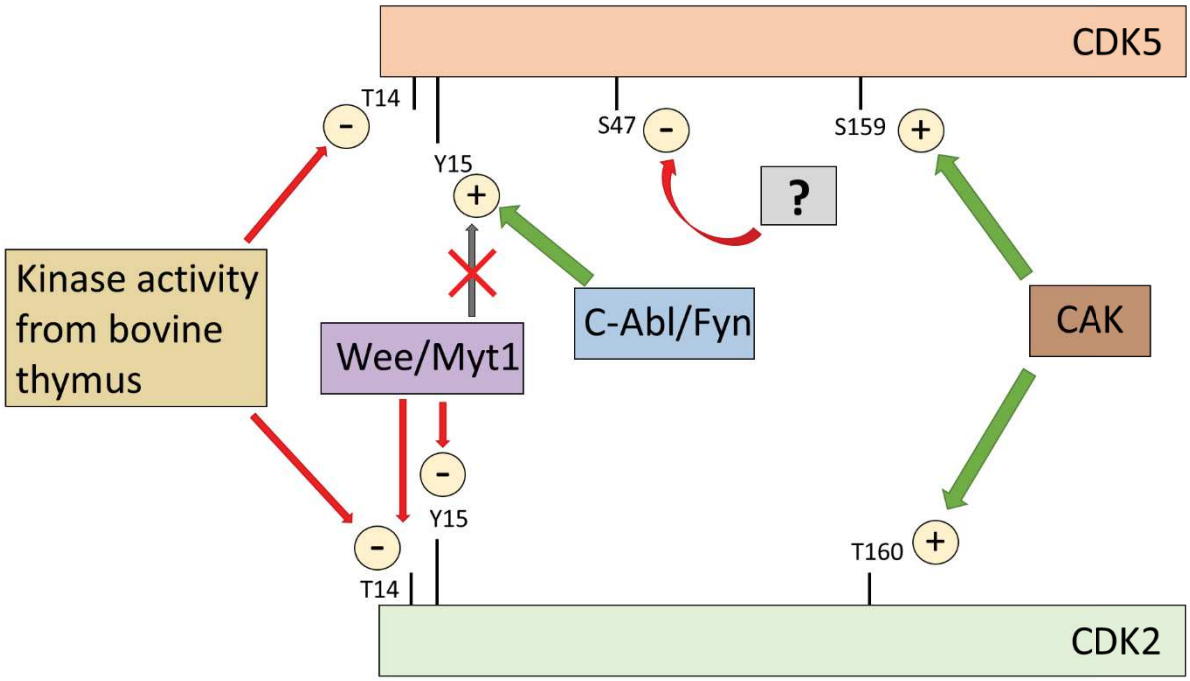


Figure 16. Régulation de CDK5 et CDK2 par la phosphorylation (adapté de Dhavan and Tsai, 2001)**.**

Plus récemment une étude a identifié la Ser47 comme site de phosphorylation régulant l'activité de CDK5 (Roach *et al.*, 2018). Ce résidu se situe dans l'hélice-C de CDK5 qui est impliquée dans l'association avec son partenaire avec p35, notamment à travers des liaisons hydrogènes avec le résidu Ile241 (Tarricone *et al.*, 2001). L'étude de Roach et al. a montré que les mutants mimant la phosphorylation de la Ser47 (S47D), rendait CDK5 inactive du fait qu'elle ne pouvait plus se lier avec p35. De plus, la migration cellulaire des mutants S47D était inhibée à l'inverse de la prolifération qui s'accentuait sous l'effet de la phosphorylation de Ser47 de CDK5. L'identification de ce nouveau site ouvre la voie vers la compréhension de la régulation de la l'activité de CDK5 qui diffère de celle des autres CDKs.

Comme il a été décrit précédemment (II. 2. a. i. et ii.), p25/p35 est partenaire coactivateur de CDK5 ayant une structure similaire aux cyclines malgré une séquence non homologue à celles-ci (Tarricone *et al.*, 2001). Les résidus 147 à 293 de p25 se replient en un domaine globulaire ressemblant à la cycline A lorsqu'elle interagit avec CDK2 (Jeffrey *et al.*, 1995). P25

est composée de 8 hélices (nommées αNT et α1 à α7), dont les hélices α1 à α5 adoptent une structure de type « cyclin-box » qui est commune à toutes les cyclines (Gibson *et al.*, 1994; Noble *et al.*, 1997).

Des interactions importantes ont lieu entre la boucle d'activation (boucle-T) de CDK5 et les boucles formées entre les α1-α2 et α3-α4 de p25. La Ser159 situé dans la boucle-T forme des liaisons de Van der Waals avec les résidus Asn239 et Ile241 de p25. Le résidu Ile153, également situé dans la boucle-T, interagit avec plusieurs résidus de p25 (Ala199, Met237, Ile275, Ala277, Pro279 et Phe282). En plus d'un rôle dans de liaison, les interactions permises par l'Ile153 interviennent dans la sélectivité de la liaison entre CDK5 et p25.

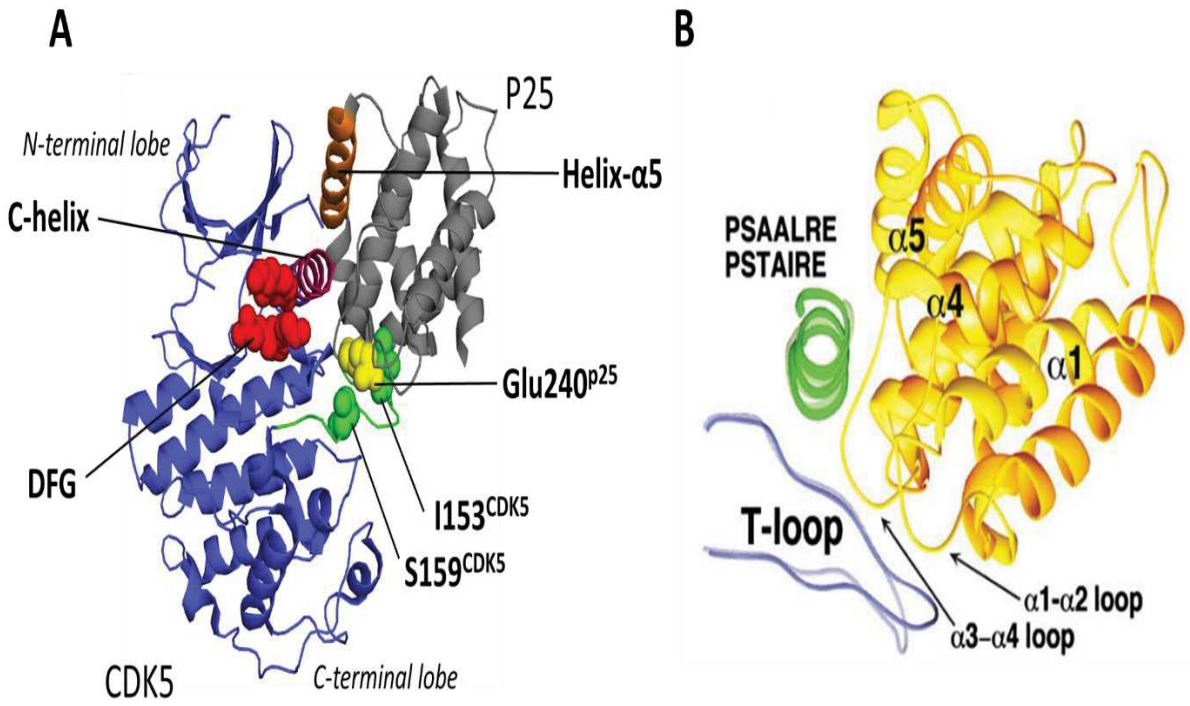


Figure 17. Sites d'interactions entre CDK5 et p25. (A) Structure cristallographique de CDK5 (bleu) en interaction avec p25 (gris). Les sites importants d'interaction CDK5/p25 sont indiqués, l'hélice-C (violet), les résidus Ile153 et Ser159 de CDK5 dans la boucle d'activation (vert), l'hélice α-5 de p25 (orange) et le résidu Glu240 (jaune) interagissant avec la boucle d'activation. Le motif DFG (rouge) est situé dans la poche ATP ou se déroule l'activité catalytique de la kinase (PDB : 1H4L). **(B)** Interaction entre la boucle d'activation de CDK5 et les boucles formées entre les hélices α1-α2 et α3-α4 de p25 (Tarricone *et al.*, 2001).

3. Fonctions non neuronales de CDK5

Les premières études de CDK5 se sont principalement intéressées à son rôle dans le SNC étant donné qu'elle avait été définie comme une kinase neurospécifique (Kobayashi *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 1993; Zheng, Leung and Liem, 1998) . Récemment de plus en plus d'auteurs ont souligné le rôle de CDK5 dans d'autres organes, régulant aussi des fonctions autres que celles liées aux neurones. Sachant qu'elle est exprimée de manière ubiquitaire, des études ont défini ses différents rôles dans la régulation de diverses fonctions biologiques (Arif, 2012; Contreras-Vallejos, Utreras and Gonzalez-Billault, 2012; Sharma and Sicinski, 2020).

a. Réponse immunitaire

Certains substrats de CDK5 identifiés sont impliqués dans plusieurs fonctions de la réponse inflammatoire (Lee *et al.*, 2012; Na *et al.*, 2015; Askew *et al.*, 2017). La phosphorylation de Ser56 de la vimentine par CDK5 va permettre de réguler la sécrétion de cytokines par les neutrophiles en réponse à une infection (Lee *et al.*, 2012). CDK5 est aussi impliquée dans l'inhibition de la production d'une cytokine anti-inflammatoire, l'interleukine 10, dans les macrophages (Na *et al.*, 2015). CDK5 joue un rôle dans l'activation des lymphocytes T en régulant la polymérisation de l'actine permettant la survie et la motilité des lymphocytes T. De plus, CDK5 va empêcher la répression de la transcription de l'interleukine 2 favorisant ainsi sa production par les lymphocytes T (Pareek *et al.*, 2010).

b. Régulation de l'insuline

Plusieurs études ont également souligné le rôle important de CDK5 dans la régulation de la sécrétion d'insuline. CDK5 est directement impliquée dans la phosphorylation de substrats comme PLD2 ou β2-syntrophin dans les cellules β-pancréatiques qui permettent la sécrétion ou le stockage de l'insuline (Lee *et al.*, 2008; Schubert *et al.*, 2010). CDK5 joue aussi un rôle

essentiel dans le transport du glucose en phosphorylant des substrats impliqués dans la translocation de GLUT4 (Okada *et al.*, 2008; Lalioti *et al.*, 2009).

c. Autres fonctions

CDK5 a aussi été décrite dans la régulation d'autres fonctions biologiques telles que l'angiogenèse, la myogenèse, le développement de l'épiderme ou le transport vésiculaire (Contreras-Vallejos, Utreras and Gonzalez-Billault, 2012; Sharma and Sicinski, 2020).

Les travaux de Liebl et al. ont démontré le rôle prépondérant de CDK5 dans la migration des cellules endothéliales et l'angiogenèse en régulant l'activité de la GTPase Rac1, mais également dans le développement des vaisseaux lymphatiques par la phosphorylation de Foxc2 (Liebl *et al.*, 2010, 2015).

CDK5 apparaît aussi comme un régulateur de la myogenèse en favorisant le développement des muscles, notamment en phosphorylant la titine ou la nestine qui sont essentielles dans l'assemblage et la structure des sarcomères et des filaments intermédiaires (Lazaro *et al.*, 1997; Sahlgren *et al.*, 2003; Fernando *et al.*, 2009; Thonel *et al.*, 2010).

Finalement d'autres études proposent des rôles divers pour CDK5, en l'occurrence dans la mélanogenèse et le développement de l'épiderme en régulant MITF et PAX3 ou dans le recyclage des endosomes par phosphorylation d'AATYK1(Tsutsumi *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2017). Il ne fait aucun doute que CDK5 est impliquée dans la régulation d'autres fonctions physiologiques qui n'ont pas encore été décrites et que de nouveaux substrats de cette kinase seront découverts.

Substrats	Cellules/Tissus	Fonctions	Références
EPRS	Macrophages	• Traduction	(Arif *et al.*, 2011)
HMGB1	Toutes les cellules eucaryotes	• Traduction	(Ugrinova, Pashev and Pasheva, 2011)

Titin	Muscle	• Assemblage sarcomères	(Fernando *et al.*, 2009)
AATYK1a	Cos7, CHO-K1, PC12D	• Traffic vésiculaire • Recyclage endosome	(Takano *et al.*, 2010; Tsutsumi *et al.*, 2010)
E-syt1	Adipocytes	• Transport du glucose	(Lalioti *et al.*, 2009)
TC10α	Adipocytes	• Transport du glucose	(Okada *et al.*, 2008)
PLD2	Cellules β-pancréatiques	• Sécrétion insuline	(Lee *et al.*, 2008)
β2-syntrophin	Cellules β-pancréatiques	• Sécrétion insuline	(Schubert *et al.*, 2010)
Fak	Cellules β-pancréatiques	• Survie cellulaire	(Daval *et al.*, 2011)
PPARγ	Adipose tissu	• Sensibilité insuline	(J. H. Choi *et al.*, 2010)
Vimentin	Neutrophiles	• Sécrétion	(Lee *et al.*, 2012)
Coronin 1a	Cellules T	• Dynamique Actine	(Pareek *et al.*, 2010)
eNos	Cellules endothéliales	• Activité eNos	(Cho *et al.*, 2010)
ERBb	Muscle	• Régulation neureguline à la jonction neuromusculaire	(Fu *et al.*, 2001)
Sds3	Fibroblastes	• Transcription	(Li *et al.*, 2004)
Nestin	Myoblastes	• Développement muscle	(Sahlgren *et al.*, 2003)

TonEBP/OREBP	Cellules rénales	• Transcription	(Gallazzini *et al.*, 2011)
Src	Cellules épithéliales du cristallin	• Ubiquitination et dégradation	(Pan *et al.*, 2011)
Foxc2	Vaisseaux lymphatiques	• Angiogenèse	(Liebl *et al.*, 2015)

Tableau 3. Liste non exhaustive des principaux substrats non neuronaux de CDK5 régulant l'activité physiologique de plusieurs fonctions (adapté de Arif, 2012)

4. Rôles pathologiques de CDK5

a. Maladies neurodégénératives

Plusieurs études ont mis en évidence qu'une dérégulation du complexe CDK5/p25 abouti au développement de pathologies neurodégénératives (Cheung and Ip, 2012). Une surexpression de p25 a des conséquences multiples, hyperphosphorylation de Tau, dégénération axonale, activation de la microglie, atrophie cérébrale. Les différentes conséquences d'une surexpression de p25 aboutissent toutes à une perte neuronale et une déficience cognitive (Lopes and Agostinho, 2011; Park *et al.*, 2015; Cortés *et al.*, 2019).

La maladie d'Alzheimer est une maladie multifactorielle qui est dans 90% des cas développée chez les personnes âgées. Le premier facteur de risque est l'âge qui caractérise cette maladie du vieillissement, mais des problèmes cardiovasculaires, métaboliques ou l'alcoolisme restent des facteurs aggravants propices d'augmenter le risque de développer la maladie. Dans 10% des cas, elle est due à une mutation génétique et se développe tôt dans la vie. Le gène précurseur du peptide amyloïde (APP) ou ceux impliquées dans sa genèse (préséniline 1 et 2) sont les cibles des mutations responsables du développement de la maladie d'Alzheimer. Cette pathologie est caractérisée par des lésions du tissu nerveux entraînant progressivement de manière irréversible la perte des neurones. A terme, les troubles cognitifs sont sévères et les patients décèdent. Le processus biologique du développement de la maladie est le résultat

de l'accumulation de plaques séniles et d'agrégats de protéine Tau hyperphosphorylée. Les plaques séniles sont formées par accumulation de peptide amyloïde (Aβ) résultant du clivage d'APP (Migliore and Coppedè, 2009).

Il a été montré une accumulation neuronale de p25 entrainant une hyperactivité de CDK5 dans les cas d'Alzheimer (Tseng *et al.*, 2002). La dérégulation du complexe CDK5/p25 joue un rôle dans l'augmentation de la production et d'accumulation d'Aβ démontré *in vivo* (Cruz *et al.*, 2006). Tau est un substrat de CDK5 jouant un rôle essentiel dans le cytosquelette des axones, sa phosphorylation permet de stabiliser les microtubules (Kimura, Ishiguro and Hisanaga, 2014). Dans le cas pathologique, une hyperphosphorylation de TAU par CDK5 entraine une accumulation d'agrégats formant des neurofibrilles ne pouvant plus être dégradées (Ahlijanian *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000b; Noble *et al.*, 2003). Une étude a prouvé qu'en inhibant l'expression de CDK5 chez des souris atteintes de la maladie, la phosphorylation de TAU et de ce fait les neurofibrilles étaient réduites (Piedrahita *et al.*, 2010).

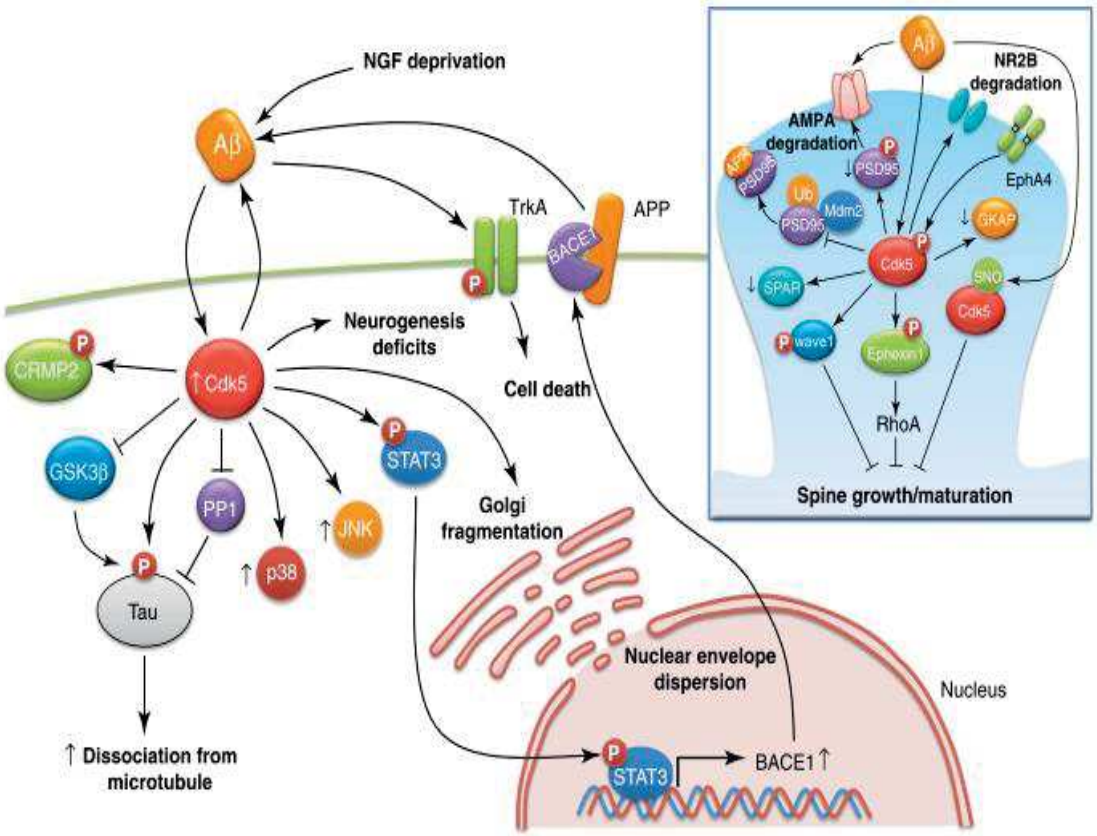


Figure 18. Implication de CDK5 dans le développement de la maladie d'Alzheimer (Cheung and Ip, 2012)**.**

La maladie de Parkinson est également une maladie du vieillissement dont certains facteurs environnementaux tel que l'exposition aux pesticides augmenterait le risque de développer la pathologie (Migliore and Coppedè, 2009). Il existe également des formes génétiques, de 10% à 30%, dont les mutations affectent les gènes α-synucleine, parkine, LRRK2, PINK1, ou DJ-1 (Shulman, De Jager and Feany, 2011).

Les fonctions motrices et cognitives sont affectées dues à une perte de neurones dopaminergiques dans la substantia nigra pars compacta. Cette dégénérescence du système dopaminergique est le résultat de dysfonctionnement mitochondrial couplé au stress oxydatif et une dérégulation de l'autophagie avec la formation de corps de Lewy. Au sein de cerveaux post-mortem du à Parkinson, le taux de CDK5/p25 est élevée. Chez les animaux la maladie peut être déclenchée par l'administration de MPTP ou MPP^+, ce qui a pour effet d'augmenter l'expression de CDK5/p25 (Smith *et al.*, 2003). La peroxiredoxine 2 (Prx2) est une enzyme

antioxydante ayant un effet protecteur sur les neurones. Cependant la phosphorylation de Thr89 de la Prx2 par CDK5 va inhiber l'activité et donc l'effet antioxydant de Prx2 entrainant une augmentation du stress oxydatif (Qu *et al.*, 2007). CDK5 est également impliquée dans la phosphorylation de la parkine, essentielle pour la régulation de la mitochondrie. Ces phosphorylations joueraient un rôle dans la dérégulation de la parkine inhibant ainsi ses fonctions physiologiques et favorisant son agrégation (Avraham *et al.*, 2007; de la Torre *et al.*, 2009).

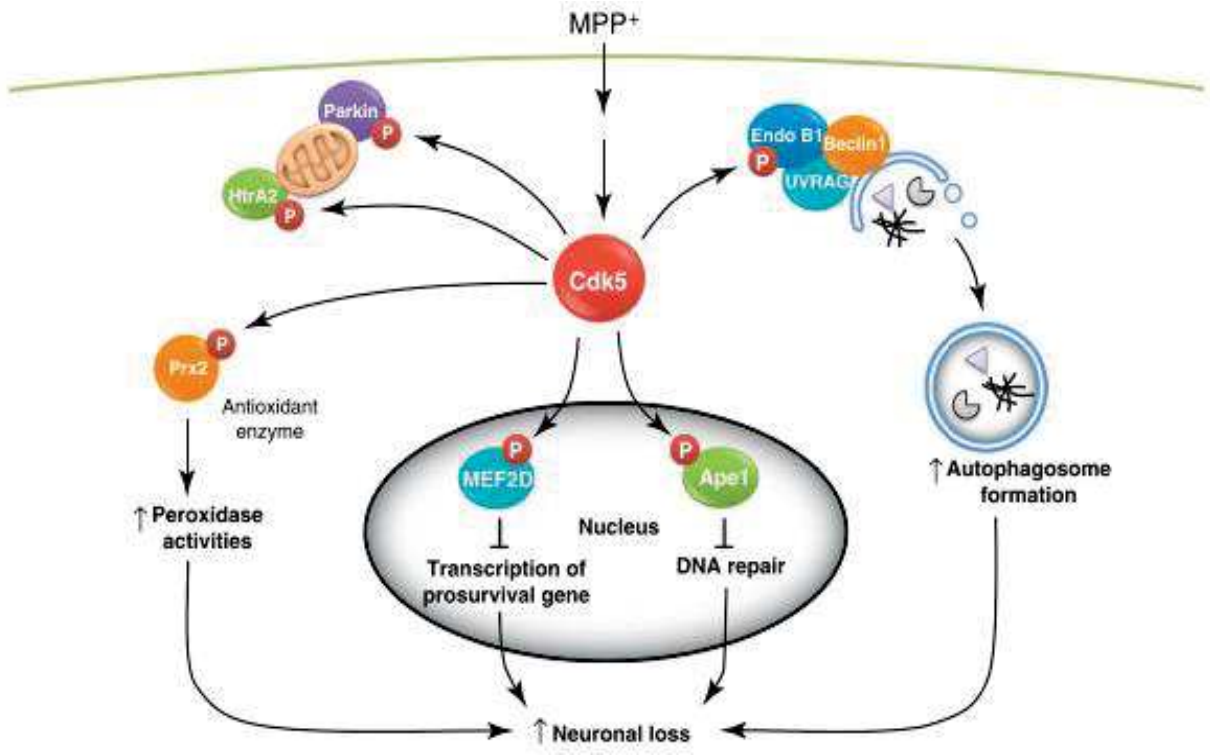


Figure 19. Implication de CDK5 dans le développement de la maladie de Parkinson (Cheung and Ip, 2012).

Inversement aux pathologies décrites précédemment, CDK5 aurait un rôle protecteur et empêcherait le développement de la maladie d'Huntington. Cette maladie héréditaire rare est due à la formation d'agrégat d'huntingtine (htt) devenant toxique pour la cellule conduisant à des troubles moteurs et cognitifs importants jusqu'à provoquer la mort des patients. Il a été démontré que l'activité de CDK5 est diminuée dans la maladie. En phosphorylant la htt sur le résidu Ser434, CDK5 inhibe l'agrégation d'htt réduisant ainsi son clivage par les caspases qui

est toxique pour les neurones (Luo *et al.*, 2005; Anne, Saudou and Humbert, 2007). En plus de son pouvoir protecteur en phosphorylant htt, CDK5 jouerait un rôle sur le réseau microtubulaire en le déstabilisant inhibant ainsi l'agrégation d'htt (Kaminosono *et al.*, 2008). Ces résultats démontrent l'importance de l'activité de CDK5 comme effet protecteur de cette pathologie.

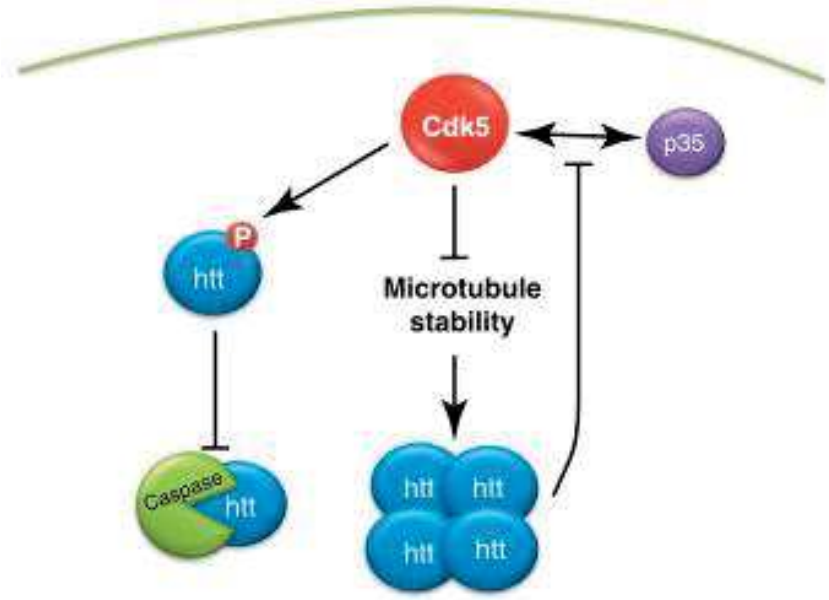


Figure 20. Implication de CDK5 dans le développement de la maladie de Huntington (Cheung and Ip, 2012).

b. Cancers neuronaux

Outre les pathologies neurodégénératives, il a été démontré que CDK5 était surexprimée et hyperactive dans les des cellules de glioblastome humain apoptotiques (Catania *et al.*, 2001). CDK5 régule le facteur promoteur de tumeur PIKE-A, en phosphorylant son résidu Ser279 et va permettre la migration des cellules de glioblastomes (Liu *et al.*, 2008). Mais CDK5 est impliquée dans les tumeurs cérébrales en régulant l'activité mitochondriale des cellules cancéreuses (Xie *et al.*, 2015). CDK5 phosphoryle et active DRP1 qui permet la fission mitochondriale responsable de la croissance tumorale. Xie et al. ont démontré que l'inhibition de DRP1 permettait d'induire l'apoptose des cellules initiatrices de tumeurs cérébrale et réduisait la croissance tumorale.

Plus récemment, l'implication de CDK5 dans la voie DYRK1A-CDK5-SOX2 a été démontrée dans la maintenance et la différenciation des cellules souches de glioblastome (Chen *et al.*, 2021). L'étude a démontré que l'inhibition de DYRK1A permettait l'activation de CDK5 pouvant ainsi induire l'augmentation de l'expression de SOX2. SOX2 permet la reprogrammation des cellules du gliomes différenciées en cellules souches de glioblastome et renouvelle ainsi le stock de cellules permettant la prolifération des cellules tumorales (Suvà *et al.*, 2014).

L'expression de CDK5 a été mesurée dans différents gliomes et a démontré qu'elle était significativement plus élevée que dans des tissus cérébraux normaux (Yushan *et al.*, 2015). Les résultats issus d'expériences d'immunohistochimies ont permis d'observer une corrélation entre l'expression de CDK5 et le grade du gliome (Fig. 21).

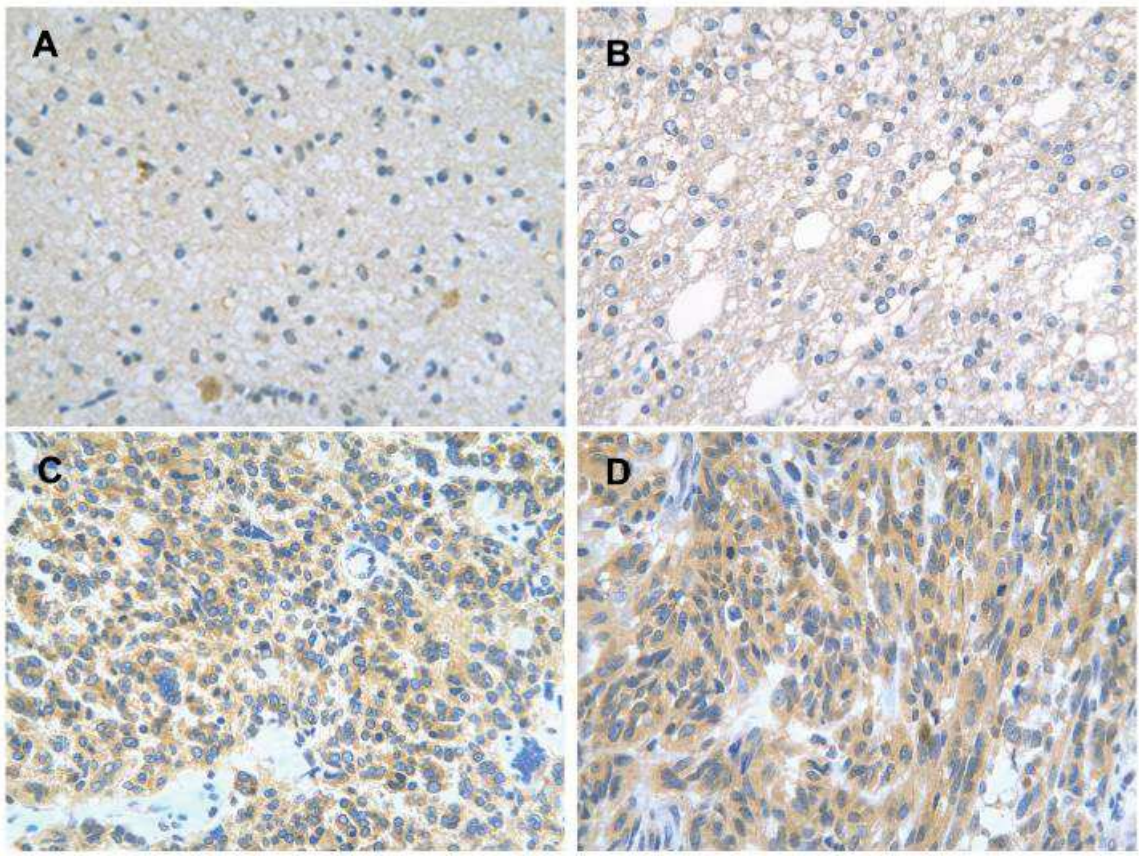


Figure 21. Clichés d'immunohistochimie représentant l'expression de CDK5 (violet) dans les différents grades de gliomes (Yushan *et al.*, 2015). **(A)** Gliome de grade I avec une expression de CDK5 de 34.8%. **(B)** Gliome de grade II avec une expression de CDK5 de 44.5%. **(C)** Gliome de grade III avec une expression de CDK5 de 62.5%. **(A)** Gliome de grade IV avec une expression de CDK5 de 82.8%.

c. *Cancers non neuronaux*

Alors que l'implication de CDK5 dans les pathologies neurodégénératives a été largement décrit dans la littérature, CDK5 apparaît comme responsable du développement de certains cancers. Récemment, une expression et activité dérégulées de CDK5 dans divers cancers tel que poumon, colorectal, pancréas ou cerveau ont été observés (Lockwood *et al.*, 2008; Eggers *et al.*, 2011a; Yushan *et al.*, 2015; Zhuang *et al.*, 2016). Plusieurs mécanismes tumoraux tels que la prolifération, migration et l'angiogenèse seraient liés à une dérégulation de l'activité de CDK5 (Liebl *et al.*, 2011; Pozo and Bibb, 2016; Lenjisa *et al.*, 2017; Sharma and Sicinski, 2020).

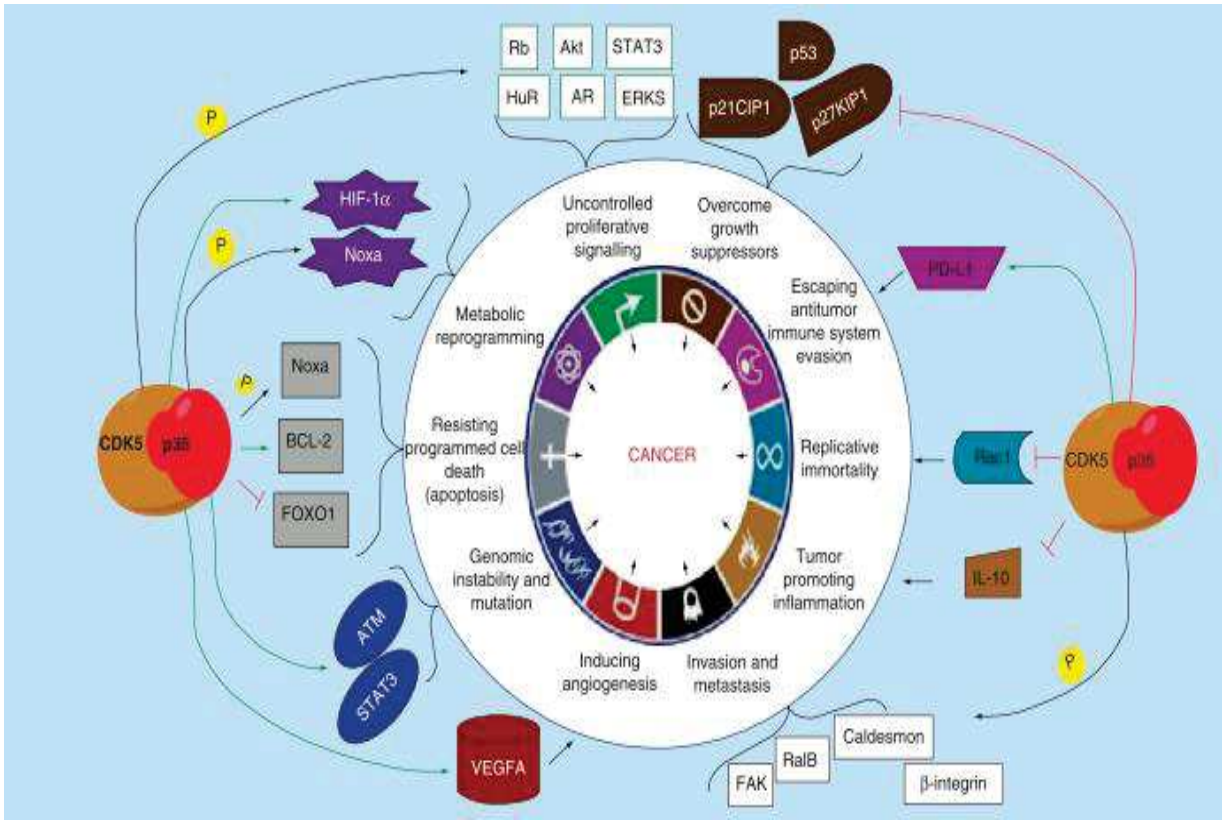


Figure 22. Implication de CDK5 dans le développement de cancers non neuronaux (Lenjisa *et al.*, 2017)**.**

i. *Migration et invasion*

La capacité des cellules tumorales à pouvoir se déplacer dans le corps humain et coloniser de nouveaux sites distaux est la cause principale des décès des personnes atteintes du

cancer. Les cellules cancéreuses acquièrent la capacité de migrer d'abord dans le sang puis vers d'autres organes ou elles formeront une nouvelle tumeur sans contact direct avec la tumeur primitive. Diverses études ont démontré le rôle de CDK5 dans la régulation de la migration et l'invasion tumorale de différents cancers (Liu *et al.*, 2008; Demelash *et al.*, 2012). Une étude réalisée sur des cellules cancéreuses de poumon NSCLC ont démontré que ASH1, une protéine impliquée dans la régulation transcriptionnelle, stimulait la migration des cellules tumorales. L'étude a démontré que p35 était une cible direct d'ASH1 et qu'elle augmentait l'activité de CDK5/p35 (Demelash *et al.*, 2012). Une autre étude impliquant la lignée cellulaire A549, également des cellules NSCLC, a démontré que l'inhibition de CDK5 par la Roscovitine ou la réduction de son expression par des siRNA permettait d'inhiber la prolifération et la migration tumorales. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* par une réduction significative des tumeurs chez la souris (Liu *et al.*, 2015).

Concernant le cancer pancréatique, K-Ras favorise le clivage de p35 en p25 provoquant une hyperactivité du complexe CDK5-p25. Cela induit des modifications cellulaires morphologiques permettant la migration (Eggers *et al.*, 2011a). A travers la phosphorylation de certains substrats tels que la taline ou PIPKIγ90 impliqués dans la migration et l'adhésion cellulaire, CDK5 favorise le développement de métastases (Huang *et al.*, 2009; Bisht *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2019). De plus, CDK5 va moduler la régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse qui est un processus utilisé par les cellules cancéreuses afin d'acquérir des capacités de motilité et d'invasion cellulaire (Liang *et al.*, 2013a). La Focal Adhesion Kinase (FAK) est phosphorylée sur la Ser732 par CDK5 favorisant ainsi la formation et la migration des tumeurs.

ii. Angiogenèse

Les cellules tumorales sont capables de former de nouveaux vaisseaux sanguins afin de leur permettre un apport constant de nutriments et d'oxygène nécessaire à leur survie et prolifération. Le rôle de CDK5 dans l'angiogenèse tumorale a été observé dans plusieurs études. Physiologiquement, CDK5 a été identifiée comme un régulateur de l'angiogenèse en

agissant sur la prolifération, l'apoptose mais également la migration, via la régulation de Rac1, des cellules endothéliales (Sharma, Tuszynski and Sharma, 2004; Liebl *et al.*, 2010, 2015). Dans le cas du carcinome hépatocellulaire (CHC), CDK5 régule le facteur de transcription HIF1α en le stabilisant par phosphorylation du résidu Ser687. HIF1α contrôle l'expression de certains gènes (VEGFA, VEGFR1, EphrinA1) impliqués dans l'angiogenèse tumorale (Herzog *et al.*, 2016). A partir de ces résultats, des études sur l'inhibition de CDK5 dans les cellules endothéliales, notamment via la voie Dll4-Notch, ont permis d'identifier CDK5 comme une cible intéressante pour le développement de thérapies anti-angiogéniques (Ehrlich *et al.*, 2015; Merk *et al.*, 2016).

iii. Mutations génétiques et réparation de l'ADN

L'exposition à certains facteurs environnementaux comme les UVs ou l'irradiation induisent des dégâts génomiques importants car l'ADN est endommagé. Des mécanismes de réparation de l'ADN existent mais atteignent leurs limites quand l'exposition est trop intense et continue, provoquant la formation de cellules cancéreuses. L'activité de CDK5 est élevée dans des cellules cancéreuses ayant subi certains stress comme l'exposition à des radiations ionisantes ou des agents génotoxiques (Ehrlich *et al.*, 2015). Sous l'induction d'ERK, le facteur de transcription Egr1 va augmenter l'expression de p35 et donc de la formation p25 qui va contribuer à l'hyperactivité de Cdk5 (Lee and Kim, 2007). Deux principaux mécanismes moléculaires impliquant CDK5 ont été identifiés pour son rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN (W. Liu *et al.*, 2017). La phosphorylation par CDK5 de la Ser794 d'ATM, une kinase impliquée dans la réponse à l'endommagement de l'ADN, permet l'activation d'une voie de signalisation dite « checkpoint » permettant de réparer les dommages pour assurer la survie cellulaire avant de poursuivre son cycle cellulaire (Tian, Yang and Mao, 2009; Yu *et al.*, 2015). L'activité de CDK5 est également augmentée afin de réparer l'ADN en phosphorylant la Ser727 de STAT3 permettant son activation (Courapied *et al.*, 2010). STAT3 activée va réguler l'expression du gène Eme1 qui est impliqué dans la réparation de l'ADN (Vigneron, Gamelin and Coqueret, 2008). Il a également été observé que CDK5 va activer, en phosphorylant sur

de multiples sites, RPA32 qui est nécessaire dans la régulation du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (Chiker *et al.*, 2015).

L'implication de CDK5 dans la réparation de l'ADN à travers divers mécanismes font de la kinase un régulateur intéressant à inhiber dans le traitement de certains cancers (Turner *et al.*, 2008; Ehrlich *et al.*, 2015).

iv. Inflammation tumorale et inhibition du système immunitaire

Un nombre croissant d'études ont mis en évidence la capacité des cellules tumorales à échapper au système immunitaire en induisant l'inflammation. Une corrélation a été établie entre l'augmentation de l'expression de PD-L1 à la surface des tumeurs avec leur capacité à éviter la reconnaissance et la destruction par les cellules du système immunitaire (Grinberg-Bleyer and Ghosh, 2016). PD-L1 est normalement exprimée à la surface des macrophages et d'autres cellules immunitaires et se lie à son récepteur PD-1 qui est exprimé à la surface des lymphocytes T (Pardoll, 2012). La reconnaissance de PD-L1 par PD-1 permet d'éviter aux macrophages d'être éliminés par les lymphocytes T lors d'une réaction d'inflammation. Néanmoins les cellules tumorales peuvent acquérir la capacité d'exprimer PD-L1 pour échapper à la réponse immunitaire (Han, Liu and Li, 2020). Récemment il a été démontré qu'au sein des médulloblastomes (MB) sous l'induction de l'interféron-γ, CDK5 permet la surexpression de PD-L1 à la surface des MB. Pour cela, CDK5 inhibe IRF2 et IRF2BP2 qui sont des facteurs de transcription réprimant l'expression de PD-L1. Néanmoins, l'inhibition de CDK5 permet la phosphorylation d'IRF2BP2 et l'expression d'IRF2 qui vont diminuer l'expression de PD-L1 permettant aux lymphocytes T $CD4^+$ de rejeter la tumeur (Dorand *et al.*, 2016). CDK5 inhibe également la production de l'interleukine 10 qui est une cytokine anti-inflammatoire produite par les macrophages. Cela a pour effet de favoriser l'inflammation pro-tumorale (Na *et al.*, 2015).

v. *Résistance à la mort cellulaire*

La capacité des cellules tumorales à échapper à la mort cellulaire en inhibant l'apoptose et la senescence leurs permettent de continuer à se développer. La protéine du rétinoblastome (pRB) joue le rôle de suppresseur de tumeur et est essentielle à la régulation du cycle cellulaire. La perte de fonction de pRB par phosphorylation ou mutation est l'un des facteurs conduisant au développement de cellules tumorales qui vont pouvoir passer outre les mécanismes de surveillance du cycle cellulaire et donc proliférer (Giacinti and Giordano, 2006). pRB a la capacité d'induire un phénotype sénescent aux cellules, cela est permit par l'augmentation de l'activité de CDK5 par son partenaire p35 (Mao and Hinds, 2010). CDK5 induit la senescence en réprimant l'activité de Rac1 et augmentant celle d'Ezrin (Alexander, Yang and Hinds, 2004). CDK5 apparaitrait donc comme un suppresseur de tumeur induisant la senescence des tumeurs. Néanmoins certaines études indiquent que les cellules sénescentes peuvent induire l'oncogenèse sont dans certains cas (Zeng, Shen and Liu, 2018). CDK5 a également été identifié comme promouvant la survie cellulaire et notamment des neurones (Roufayel and Murshid, 2019). La formation du complexe CDK5 avec la cycline I va induire la phosphorylation Bcl-2 et Bcl-xL qui sont des protéines anti-apoptotiques qui vont promouvoir la survie cellulaire (Cheung, Gong and Ip, 2008; Brinkkoetter *et al.*, 2009). Dans le cas du cancer du col de l'utérus CDK5/cycline I va induire une résistance des cellules tumorales en leur évitant l'apoptose (Li *et al.*, 2015). CDK5 intervient également dans l'expression des protéines pro-apoptotiques Noxa et Bim en les inhibant ce qui favorise la résistance des cellules tumorales à l'apoptose (Lowman *et al.*, 2010; Morey *et al.*, 2015; Mandl *et al.*, 2017). Néanmoins l'inhibition de CDK5 permet à ces protéines d'être exprimées correctement afin d'altérer la formation des tumeurs. A l'inverse certaines études ont mis en évidence le rôle de CDK5 dans l'induction de l'apoptose au seins de certaines cellules tumorales. En phosphorylant p53 sur divers sites, CDK5 va stabiliser p53 qui ne pourra pas être dégradé par le protéasome (Lee *et al.*, 2007; Ajay *et al.*, 2010; Hao *et al.*, 2018). Cela va induire l'expression de gènes pro-apoptotiques inhibant la progression tumorale.

L'implication de CDK5 dans la mort cellulaire a donc été démontrée à de multiples reprises, cependant son rôle en tant qu'activateur ou inhibiteur de l'apoptose est encore sujet à débat. Ces études suggèrent tout de même que CDK5 est une cible thérapeutique intéressante pour développer de nouveaux traitements contre certains cancers.

d. CDK5 dans le cancer du poumon

CDK5 a été identifiée pour son rôle dans la régulation de certains cancers, notamment pancréatiques ou du sein où son implication y a été largement décrite (Feldmann *et al.*, 2010; Eggers *et al.*, 2011b; Liang *et al.*, 2013b; Pozo and Bibb, 2016). CDK5 a été décrite comme un régulateur important dans le développement du cancer du poumon en y exerçant un rôle majeur dans la prolifération et la migration des cellules tumorales (Liu *et al.*, 2011, 2015; Demelash *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2018). Malgré le fait que ces études aient montré que l'inhibition de CDK5 réduisait significativement le développement des NSCLC, il existe peu d'études sur le sujet et les voies de régulation impliquant CDK5 dans le cancer du poumon demeurent inconnues.

L'expression de CDK5/p35 a été mesurée chez des patients atteints du cancer du poumon NSCLC et comparée à celle de patients atteints de troubles pulmonaires bénins (Liu *et al.*, 2011). Les résultats de cette étude ont permis d'observer une corrélation entre l'expression positive de CDK5/p35 et les patients atteints du cancer du poumon de type NSCLC. Il a également été démontré que les patients NSCLC exprimant CDK5/p35 présentaient un taux de survie deux fois moins important que ceux n'exprimant pas CDK5/p35. Une étude similaire s'est intéressée à l'expression de CDK5 dans des échantillons de tissus pulmonaires sains ou contenant des tumeurs de types NSCLC ou SCLC (Wei *et al.*, 2016). CDK5 est surexprimée de manière significative dans les échantillons de cancer du poumon. Parmi les tissus de poumon sains, CDK5 y est exprimée dans 20% des échantillons, contre 51.5% des échantillons issus de cancer pulmonaire. De plus, l'expression de CDK5 dans les NSCLC était

corrélée au stade de la tumeur. CDK5 était moins exprimée dans les premiers stades (25.6 % pour le stade I et 42.4% pour le stade II), que pour les stades plus avancés (66.2% pour le stade III). Ces études ont permis d'identifier CDK5/p35 comme un biomarqueur potentiel pour le pronostic de patients ayant développé un cancer du poumon.

Récemment, une étude a permis de décrire CDK5 comme un promoteur de tumeur dans le cancer du poumon (Zeng *et al.*, 2018). Ils ont observé, comme Liu et al. en 2011, qu'une surexpression de CDK5 était associée à un taux de survie plus faible, et favorisait également la prolifération et le développement de métastases dans le cancer du poumon. Des études *in vitro*, sur les lignées cellulaires NSCLC A549 et PC9, ont démontré que la migration cellulaire était inhibée après traitement à la Roscovitine ou à l'aide de siRNA ciblant CDK5. Ces résultats confirment ceux observés par Liu et al. en 2015 qui avaient également observé une inhibition de la prolifération de la migration des cellules tumorales A549 après un traitement à la Roscovitine ou au SiRNA (Liu *et al.*, 2015). Ces résultats ont également été confirmés *in vivo*, en observant une réduction des tumeurs dans un modèle murin.

Ces différentes études ont démontré que CDK5 pouvait constituer un biomarqueur dans le cancer du poumon et que son inhibition réduisait la prolifération et la migration des cellules tumorales, notamment des NSCLC. Cependant les voies de régulation par lesquelles CDK5 influence le développement des cellules tumorales du poumon demeurent inconnues.

Zeng et al. ont observé que CDK5 phosphoryle CAP1 (Cyclase-associated protein 1), une protéine régulant l'actine du cytosquelette mais aussi l'adhésion cellulaire, et que l'inhibition de CDK5 réduisait la phosphorylation de CAP1 dans les A549 parallèlement à l'inhibition de la prolifération et la migration cellulaire (Zhang *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2018).

Une autre voie de régulation de CDK5 dans le cancer du poumon a été explorée à travers la stimulation de la migration des NSCLC par ASH1 (Demelash *et al.*, 2012). L'activité du complexe CDK5/p35 est augmentée par ASH1 qui permet aux cellules cancéreuses de migrer.

e. Autres

CDK5 a également été identifiée dans d'autres pathologies telles que le diabète, l'addiction la douleur ou l'épilepsie (Daval *et al.*, 2011; K. Shah & DK. Lahiri, 2017; Liu *et al.*, 2020).

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de CDK5 dans la régulation de l'insuline au sein des cellules β-pancréatiques (Okada *et al.*, 2008; Lalioti *et al.*, 2009). Il apparaît donc logique qu'un dysfonctionnement de cette kinase soit lié au développement d'un diabète de type II, notamment à travers PPARγ (J. Choi *et al.*, 2010; Banks *et al.*, 2015).

De plus CDK5 est un régulateur essentiel du SNC, comme cela a été décrit précédemment une activité aberrante de CDK5 peut conduire à certaines pathologies neurodégénératives. Néanmoins d'autres troubles neuronaux peuvent apparaître à la suite d'une dérégulation de CDK5. Cela a été observé dans les phénomènes d'addiction au drogue, de douleurs neuropathiques mais également de crise d'épilepsie (Chae *et al.*, 1997; Bibb *et al.*, 2001; Jessberger *et al.*, 2009; Brinkkoetter, Pippin and Shankland, 2010; Moutal *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020).

III. Inhibiteurs et criblage de molécules thérapeutiques

1. Inhibiteurs des CDKs/cyclines

Il y a eu un intérêt croissant au cours des dernières années pour le développement d'inhibiteurs des CDKs. La dérégulation de ces kinases dans plusieurs cancers a été abondamment décrit (Asghar *et al.*, 2015a; Sánchez-Martínez *et al.*, 2015; Whittaker *et al.*, 2017). La dérégulation des CDKs contribue au développement de caractéristiques des cellules cancéreuses telles que l'hyperprolifération et la migration cellulaire ou la résistance à l'apoptose. L'hyperactivité des CDKs/cyclines résultant d'une surexpression ou d'une mutation génétique ont fait de ces kinases des cibles thérapeutiques intéressantes. Différentes stratégies ont été expérimentées dans le développement d'inhibiteurs. Des molécules visant la poche de liaison à l'ATP, l'interface entre la CDK et la cycline ou des sites allostériques ont

été mises au point (Cirillo, Pentimalli and Giordano, 2011; Peyressatre *et al.*, 2015). Certaines ont été mises sur le marché afin d'être utilisées cliniquement, mais d'autres ont été abandonnées lors des tests cliniques car elles se sont révélées peu efficaces voire toxiques.

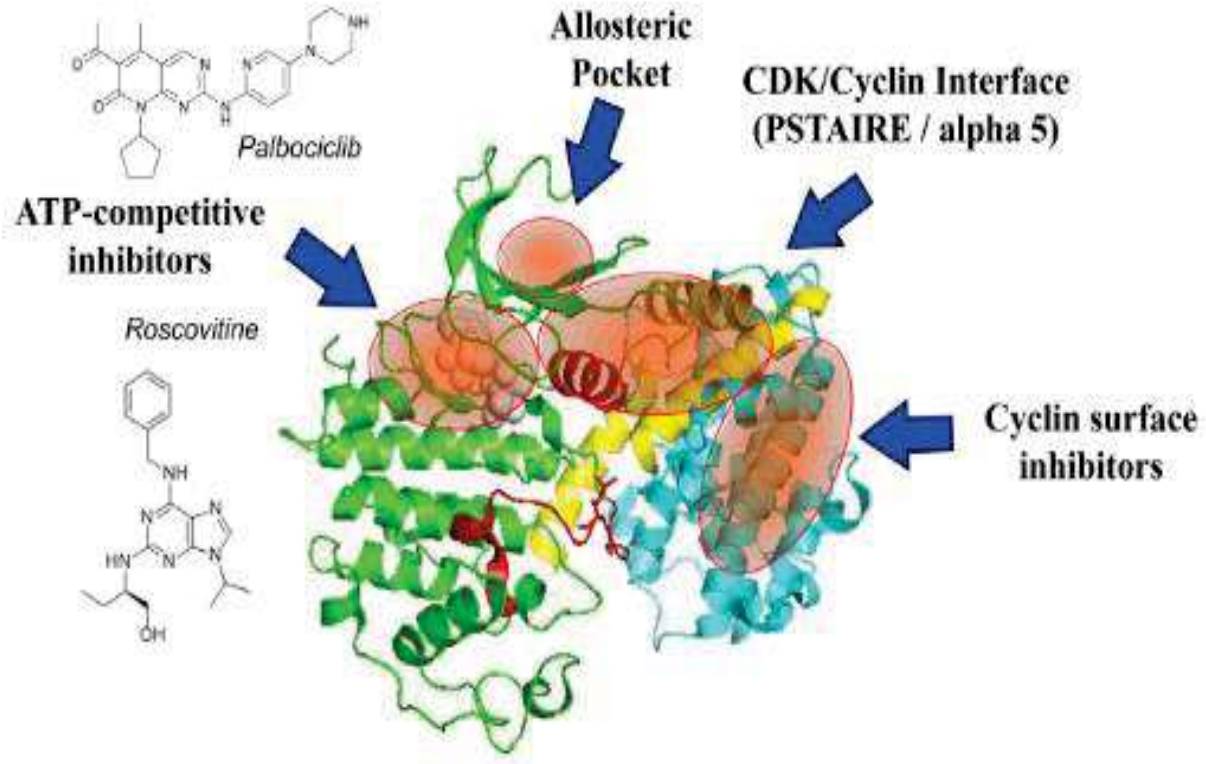


Figure 23. Stratégies d'inhibition des CDKs (Prével *et al.*, 2014)**.**

a. ATP-compétitif

La première génération d'inhibiteurs des CDKs/cyclines comprenait des molécules orthostériques visant le site de liaison de l'ATP des CDKs. Elles sont définies en tant qu'ATP-compétitives puisqu'elles ont la capacité de se lier dans la poche de liaison à l'ATP en compétant avec celui-ci et d'inhiber l'activité kinase des CDKs. Ces molécules sont considérées comme des inhibiteurs pan-CDK à cause de leur large spectre d'inhibition. La poche de liaison de l'ATP étant un site hautement conservé à travers les différentes kinases, ces inhibiteurs ne sont pas spécifiques. Cela représente un inconvénient majeur puisqu'ils vont également inhiber plusieurs kinases, induisant des effets secondaires importants mais aussi de la toxicité. Les composés issus de la première génération d'inhibiteurs pan-CDK tels

l'olomoucine, le flavopiridol ou la R-Roscovitine n'ont pas révélés des résultats probants lors des essais cliniques, montrant une faible activité et une toxicité élevée. Certains de ces inhibiteurs ont initialement été purifiés à partir de sources naturelles telles les bactéries, champignons ou des plantes (Mann, 2002; Prével *et al.*, 2014; Peyressatre *et al.*, 2015). L'étude structurelle de ces composés, majoritairement des purines et des pyrimidines, a permis de développer des analogues synthétiques afin de mieux comprendre leur mécanisme d'action (Noble *et al.*, 2005).

Une seconde génération d'inhibiteurs ATP-compétitifs a été développée à partir de la première. Ces nouvelles molécules ont été conçues dans le but d'améliorer l'efficacité et la sélectivité. Des inhibiteurs issus de cette seconde génération sont utilisés en association avec d'autres composés dans le cadre d'études cliniques et précliniques (Malumbres *et al.*, 2007; Sharma, Sharma and Tyagi, 2008). Depuis 2015 le Palbociclib a été approuvé par la FDA, et en 2016 il a reçu une autorisation de mise sur le marché en Europe pour le traitement de cancer du sein métastasique hormono-dépendant RH+/HER2- en association avec le létrozole, un inhibiteur de l'aromatase (Beaver *et al.*, 2015).

Inhibiteur	**Cible**	**Références**
Staurosporine	CDK1, CDK2, CDK4	(Tamaoki *et al.*, 1986; Gadbois *et al.*, 1992)
Butyrolactone I	CDK1, CDK2	(Kitagawa *et al.*, 1993)
Flavopiridol	CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7, CDK9	(König *et al.*, 1997; Patel *et al.*, 1998; Shapiro, 2004; Baumli *et al.*, 2008; Itchaki and Brown, 2017)
Olomoucine	CDK1, CDK2, CDK5	(Glab *et al.*, 1994; Veselý *et al.*, 1994)

Roscovitine	CDK1, CDK2, CDK5, CDK7, CDK9	(De Azevedo *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1999; Bach *et al.*, 2005; Bettayeb *et al.*, 2008; Demange *et al.*, 2013)
Indirubin-5	CDK1, CDK2, CDK5	(Hoessel *et al.*, 1999)
Palbociclib	CDK4, CDK6	(Fry *et al.*, 2004)
Dinaciclib	CDK1, CDK2, CDK5, CDK9	(Parry *et al.*, 2010; Paruch *et al.*, 2010)
AT7519	CDK2, CDK5, CDK9	(Wyatt *et al.*, 2008; Squires *et al.*, 2009, 2010; Santo *et al.*, 2010)
Abemaciclib	CDK4, CDK6	(Gelbert *et al.*, 2014; Patnaik *et al.*, 2016)

Tableau 4. Liste non exhaustive des principaux inhibiteurs de CDK ATP-compétitifs

Des tests de criblage à haut débit ainsi des approches *in silico* ont permis d'identifier une large variété d'inhibiteurs ATP-compétitifs des CDKs (Lapenna and Giordano, 2009; Bruyère and Meijer, 2013; Asghar *et al.*, 2015a). Malgré le succès de certaines de ces molécules l'émergence de résistance est inévitable. A plus ou moins long terme, les inhibiteurs vont engendrer une pression de sélection sur les cellules cancéreuses qui vont devenir insensibles aux traitements thérapeutiques. Plusieurs mécanismes de résistance ont été identifiés, qui débutent en général par des mutations et des phénomènes de compensations des kinases inhibées (Longacre, Snyder and Sarkar, 2014; Herrera-Abreu *et al.*, 2016; Ramirez *et al.*, 2016; De Leeuw *et al.*, 2018; Haines *et al.*, 2018; Pandey *et al.*, 2019). La perte du suppresseur de tumeur Rb, la régulation négative de l'expression de p16, la surexpression de E2F ainsi que d'autres mécanismes ont été décrits pour leurs implications dans l'émergence de résistance des cellules cancéreuses aux traitements de composés ATP-compétitifs. Il est donc

nécessaire de développer une nouvelle génération d'inhibiteurs de CDKs dont le mécanisme d'action n'implique pas le ciblage de la poche ATP (Liu and Gray, 2006; Eglen and Reisine, 2010, 2011; Abate *et al.*, 2013; Fang, Grütter and Rauh, 2013; Wu, Nielsen and Clausen, 2016).

b. Non-ATP-compétitif

Une stratégie alternative pour le développement d'inhibiteurs des CDKs/cyclines a été de cibler des zones autres que la poche de liaison à l'ATP afin d'augmenter la spécificité et donc de réduire les phénomènes de résistance (Cirillo, Pentimalli and Giordano, 2011; Abate *et al.*, 2013; Peyressatre *et al.*, 2015). Des petites molécules ainsi que des peptides ont été conçus pour inhiber l'activité kinase des CDKs (Cirillo, Pentimalli and Giordano, 2011; Abate *et al.*, 2013; Peyressatre *et al.*, 2015). Les cibles de ce nouveau type d'inhibiteur sont la surface d'interaction protéine-protéine entre la CDK et la cycline, les transitions conformationnelles ou des sites allostériques pouvant empêcher l'activation de la kinase ou la maintenir dans une conformation catalytiquement inactive (Arkin and Wells, 2004; Gondeau *et al.*, 2005; Wilson, 2009; Morelli, Bourgeas and Roche, 2011; Sánchez-Martínez *et al.*, 2019; Bouclier *et al.*, 2020).

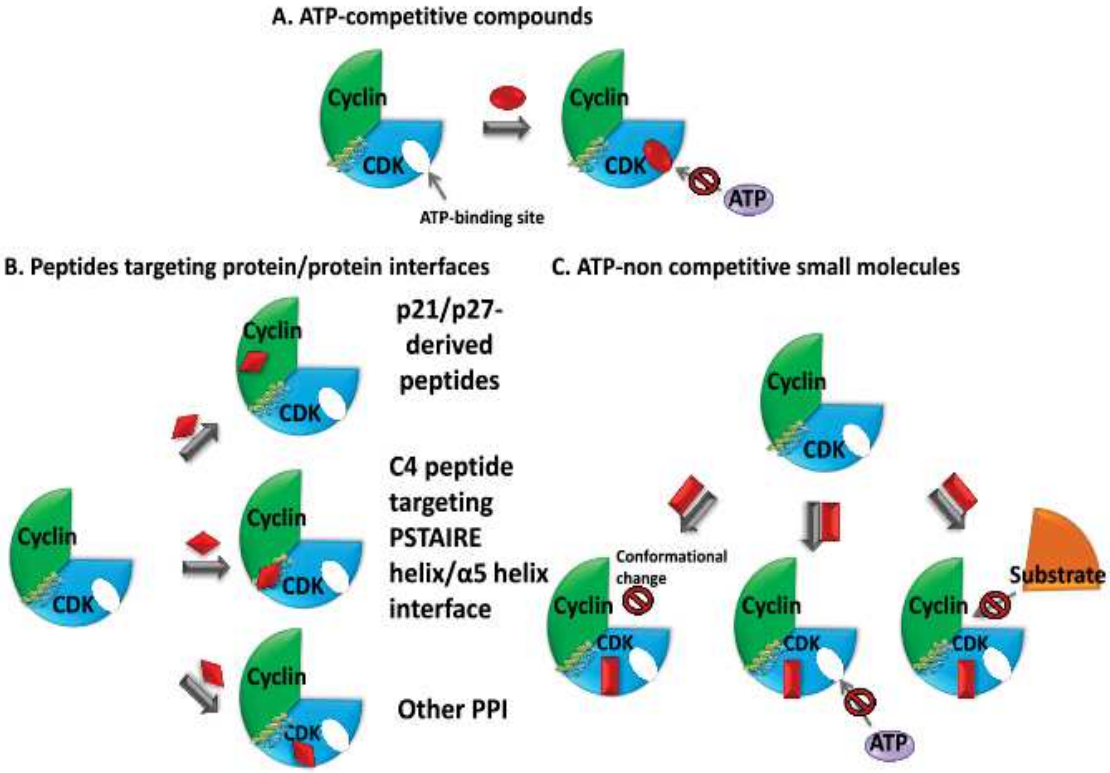


Figure 24. Stratégies d'inhibition des CDKs (Peyressatre *et al.*, 2015). **(A)** Utilisation de molécules ATP-compétitives se liant la poche ATP. **(B)** Les peptides ciblant l'interface d'interaction protéine-protéine permettent d'inhiber la formation du complexe CDK/cycline. **(C)** Les inhibiteurs allostériques sont des petites molécules ciblant spécifiquement une CDK et induire un changement conformationnel qui va affecter la fonction kinase de la CDK en inhibant l'interaction avec l'ATP, le substrat ou le partenaire activateur.

i. Inhibiteurs ciblant l'interface protéine/protéine (PPI)

L'interaction entre la CDK et son partenaire cycline est essentielle pour rendre le complexe CDK/cycline actif et conférer son rôle de kinase. Altérer l'interaction entre ces deux partenaires est donc un moyen efficace pour inhiber l'activité des CDKs/cyclines. Plusieurs peptides ciblant les PPIs entre les CDKs et les cyclines ou les CDKs et les substrats ont été développés dans le but d'inhiber ces diverses interactions.

Inhibiteur	Cible	Références
Spa310	CDK2/Cycline A	(Bagella *et al.*, 2007; Giordano *et al.*, 2007)

C4	CDK2/Cycline A	(Gondeau *et al.*, 2005)
NBI1	CDK2/Cycline A	(Canela *et al.*, 2006)
RXL	CDK2/Cycline A	(Mendoza *et al.*, 2003)
Cdk4 derived cterm hexapeptide	CDK4/Cycline D	(Warenius *et al.*, 2011)
P2short	CDK4/Cycline D	(Bouclier *et al.*, 2020)
Peptides dérivés de p21	CDK2, CDK4	(Ball *et al.*, 1997; Bonfanti *et al.*, 1997; Zheleva *et al.*, 2002; Kontopidis *et al.*, 2009)
Peptides dérivés de p27	CDK2, CDK4	(Andrews *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2013)
Peptides dérivés de p35	CDK5/p35	(Chin *et al.*, 1999a; Zheng *et al.*, 2010a; Sundaram *et al.*, 2013; Seo *et al.*, 2020; Tabouret *et al.*, 2020)

Tableau 5. Liste non exhaustive des principaux peptides inhibiteurs ciblant la PPI des CDKs (adapté de Peyressatre *et al.,* 2015).

ii. Petites molécules allostériques

Le développement de petites molécules ne ciblant la poche de liaison à l'ATP des CDKs mais d'autres sites est une méthode alternative pour inhiber les CDKs/cyclines. Ces inhibiteurs sont considérés comme allostériques car ils ne ciblent pas la poche ATP mais des sites non conservés à travers les kinases permettant ainsi d'augmenter leur spécificité. Ces sites allostériques sont accessibles dans des conformations intermédiaires inactives de la kinase. L'interaction de ces petites molécules au cours d'un changement conformationnel de la CDK permet de la maintenir dans une forme inactive.

Inhibiteur	Cible	Références
CPD1	CDK5/p25	(Corbel *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011)
Tamoxifen	CDK5/p25	(Corbel *et al.*, 2015)
Composés NSC	CDK2/Cyclin A/p27	(Corsino *et al.*, 2009)
Composé 69407	CDK2, CDK4	(Liu *et al.*, 2013)

Tableau 6. Liste non exhaustive des principaux inhibiteurs allostériques des CDKs (adapté de Peyressatre *et al.,* 2015).

2. Inhibiteurs de CDK5

CDK5 a longtemps été considérée comme une cible pharmacologique intéressante pour le traitement des pathologies neurodégénératives (Cheung and Ip, 2012; Park *et al.*, 2015). Mais les récentes études soulignant le rôle de CDK5 dans certains cancers font de CDK5 une cible prometteuse dans le développement de nouvelles thérapies conte le cancer (Pozo and Bibb, 2016; Shupp, Casimiro and Pestell, 2017; Sharma and Sicinski, 2020).

a. ATP-compétitif

Actuellement aucun composé thérapeutique n'est approuvé par la FDA pour le ciblage de CDK5 et peu de molécules ont été développées pour le traitement de pathologies liées à une hyperactivation de CDK5/p25. La majorité des inhibiteurs de CDK5 conçus comme l'AT7519, la R-Roscovitine ou le Dinaciclib se fixent dans la poche ATP (Peyressatre *et al.*, 2015).

i. Roscovitine

La Roscovitine, également nommée R-Roscovitine, CYC202 ou Seliciclib est une molécule de 354,458 g.mol^{-1}. Cette molécule a été développée à partir de l'olomoucine, un inhibiteur pan-CDK de la première génération (Meijer *et al.*, 1997). Des études biochimiques ont permis de montrer que la Roscovitine inhibe préférentiellement CDK5. Néanmoins celle-ci n'est pas spécifique car elle inhibe d'autres CDKs ainsi que d'autres kinases telles que ERK1 ouERK2.

Cible	IC_{50} (µM)	Références
CDK1/Cycline B	0.65	(Meijer *et al.*, 1997)
CDK2/Cycline A	0.70	(Meijer *et al.*, 1997)
CDK2/Cycline E	0.70	(Meijer *et al.*, 1997)
CDK4/Cycline D1	>100	(Meijer *et al.*, 1997)
CDK5/p35	0.16	(Meijer *et al.*, 1997)
CDK6/Cycline D3	>100	(Meijer *et al.*, 1997)
CDK7/Cycline H	0.46	(De Azevedo *et al.*, 1997)
CDK8/Cycline C	>100	(Schang *et al.*, 2002)
CDK9/Cycline T1	0.60	(Schang *et al.*, 2002)
Erk1	34	(Meijer *et al.*, 1997)
Erk2	14	(Meijer *et al.*, 1997)

Tableau 7. Liste non exhaustive des kinases inhibées par la Roscovitine avec leurs IC_{50} respectifs mesurés.

La résolution structurale de CDK5/p25 en interaction avec la Roscovitine a permis d'identifier comment l'inhibiteur se lie dans la poche de liaison à l'ATP de CDK5 (Mapelli *et al.*, 2005). La Roscovitine interagit avec la boucle N-terminale de CDK5 riche en résidus glycine. Des

interactions hydrophobes ont lieu entre les résidus Ile10, Gly11, Glu12, Val18 et la Roscovitine, ainsi qu'une liaison hydrogène avec Gln130. Ces interactions permettent à la Roscovitine de s'insérer entre la fente catalytique et l'hélice PSSALRE et de former d'autres liaisons hydrogènes avec les résidus Lys33 et Glu51 qui sont essentiels pour la réaction de catalyse. Cette étude a également montré que la Roscovitine n'empêche pas la phosphorylation de la Tyr15, une étape essentielle pour l'activation de CDK5. L'inhibition par la Roscovitine ne permet donc pas d'inactiver CDK5 mais inhibe son activité catalytique

La Roscovitine a été l'objet de 6 études cliniques (dont 1 qui est toujours en cours) pour le traitement de cancer du poumon, de tumeurs solides, de fibrose kystique ou le syndrome de Cushing (https://clinicaltrials.gov/). Cependant elle n'est toujours pas utilisée dans le cadre de traitement approuvé par la FDA ou de l'EMA à cause de résultats peu prometteur.

ii. Dinaciclib

Le Dinaciclib est un inhibiteur ATP-compétitif ayant été identifié au cours d'un criblage *in vivo* sur un modèle murin de xénogreffe de carcinome ovarien (Parry *et al.*, 2010). Le criblage a été réalisé en comparant l'efficacité des composés à celui du flavopiridol. Le Dinaciclib s'est révélé être un inhibiteur très efficace de l'activité in vitro de CDK1 (IC_{50} : 3nM), CDK2 (IC_{50} : 1nM), CDK5 (IC_{50} : 1nM) et CDK9 (IC_{50} : 4nM). Cependant cet inhibiteur n'est pas sélectif de CDK5 et présente un risque potentiel d'effets indésirables en ciblant des CDKs non dérégulées.

Le Dinaciclib a été l'objet de 18 études cliniques (dont 4 qui sont toujours en cours) en utilisation seule ou en combinaison avec d'autres composés pour le traitement de cancer du poumon, du sein, du pancréas (https://clinicaltrials.gov/). Cette molécule est prometteuse car elle a atteint la phase clinique II pour le traitement du mélanome, mais ne dispose toujours d'une autorisation de mise sur le marché de la part de la FDA ou de l'EMA.

iii. AT7519

AT7519 a été identifié comme un inhibiteur CDKs à partir d'un criblage par fragments pour découvrir des inhibiteurs de CDKs. La caractérisation de l'AT7519 a permis d'observer que c'était un inhibiteur efficace des CDKs et plus particulièrement de CDK5. Les IC_{50} mesurés à la suite de tests d'activités enzymatiques ont été de 47nM pour CDK2/Cycline A, 100nM pour CDK4/Cycline D1, 13 nM pour CDK5/p35 et <10nM pour CDK9/Cycline T (Squires *et al.*, 2009). Ces résultats montrent que l'AT7519 n'est malheureusement pas spécifique de CDK5. Cet inhibiteur a tout de même montré des preuves d'efficacité pour l'inhibition de cellules tumorales (Xi *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2020).

AT7519 a été l'objet de 5 études cliniques (dont 1 toujours en cours) en utilisation seule ou en combinaison avec d'autres composés pour le traitement de la leucémie lymphoïde chronique (LLC), du myélome ou du lymphome (https://clinicaltrials.gov/). Cette molécule e a atteint les phases cliniques II pour le traitement du lymphome et du LLC, mais ne dispose pas d'autorisation de mise sur le marché de la part de la FDA ou de l'EMA.

b. Non-ATP-compétitif

Les limites des inhibiteurs ATP-compétitifs sont multiples, leur faible sélectivité vis à vis des autres kinases nécessite le développement de stratégies alternatives dans le but d'identifier des molécules ne ciblant pas la poche ATP (Cirillo, Pentimalli and Giordano, 2011; Abate *et al.*, 2013; Bruyère and Meijer, 2013; Asghar *et al.*, 2015a).

Certains peptides ont été conçus ciblant l'interface d'interaction entre CDK5 et son régulateur coactivateur p25/p35 afin d'empêcher la formation du complexe catalytiquement actif. Plusieurs peptides dérivés de p25/p35 ont été développées avec succès afin de cibler CDK5/p25 avec une forte spécificité et une faible toxicité, diminuant ainsi l'hyperactivité de CDK5 et l'hyperphosphorylation de Tau responsables de la dégénération neuronale dans des

modèles de souris exprimant le maladie d'Alzheimer (Chin *et al.*, 1999b; Zheng *et al.*, 2002, 2010b; Sundaram *et al.*, 2013; Shukla *et al.*, 2017; Tabouret *et al.*, 2020). Plus récemment, un peptide dérivé la boucle d'activation de CDK5 a été développé par Tsai et Seo avec la capacité d'inhiber sélectivement l'interaction entre CDK5 et p25/p35 sans affecter l'activité physiologique de CDK5 (https://patentscope.wipo.int/ brevet N° WO/2019/055236). Alors que ces peptides représentent des thérapies prometteuses, leur utilisation en traitement clinique demeure problématique à cause de leur faible solubilité, perméabilité membranaire et biodisponibilité (La Manna *et al.*, 2018).

Une stratégie alternative est d'identifier des petites molécules ciblant des sites allostériques de la kinase au lieu de la poche de liaison à l'ATP. Ces modulateurs allostériques perturberaient les transitions conformationnelles conduisant à l'activation de CDK5. Plusieurs études combinant des techniques de criblage *in silico* et de BRET ont permis d'identifier des molécules, dont le Tamoxifène, comme des inhibiteurs de l'interface d'interaction entre CDK5 et p25 sans se lier à la poche ATP (Corbel *et al.*, 2011, 2015; Zhang *et al.*, 2011). Plus récemment notre équipe a développé un biosenseur conformationnel de CDK2 et de CDK5 permettant d'identifier des modulateurs allostériques de ces kinases (Pellerano *et al.*, 2017; Peyressatre, Arama, *et al.*, 2020). Ces nouvelles stratégies de criblage offrent des perspectives prometteuses pour le développement de nouveaux composés ciblant l'interface d'interaction protéine-protéine

3. CDKCONF5 et criblage de molécules allostériques

L'altération de la dynamique de la boucle T pourrait être un moyen sélectif d'inhiber l'activation des CDKs en empêchant le changement conformationnel et ainsi la liaison du substrat. Au sein de l'équipe du Dr. May Morris, une technologie de biosenseurs fluorescents dits conformationnels a été développée permettant de cribler des banques de petites molécules pour identifier des inhibiteurs allostériques de CDKs. Une preuve de concept de cette

technologie a été réalisée pour CDK2 qui a permis d'identifier des inhibiteurs allostériques de CDK2/cycline A visant la boucle d'activation (Pellerano et al., 2017). Cela est également le cas pour CDK4, conduisant à l'identification d'un puissant inhibiteur allostérique caractérisé dans le cancer du poumon NSCLC (brevet déposé et projet de maturation préclinique soutenu par la SATT et Prix MATWIN 2019 Dr. Morris & Dr Bihel). Plus récemment, CDKCONF5, un biosenseur conformationnel dérivé de la protéine de CDK5 a été développé (Thèse Peyressatre, 2016; Peyressatre *et al.*, 2020). Dans l'ingénierie du biosenseur CDKCONF5 des sondes fluorescentes sont introduites à des sites spécifiques dans le lobe C-terminal de CDK5 permettant d'identifier des molécules liant ou modulant la boucle T mais pas la poche de liaison à l'ATP (Prével *et al.*, 2014). Cela permet le criblage de molécules allostériques et discrimine contre des composés qui se lient dans la poche ATP tels que la Roscovitine.

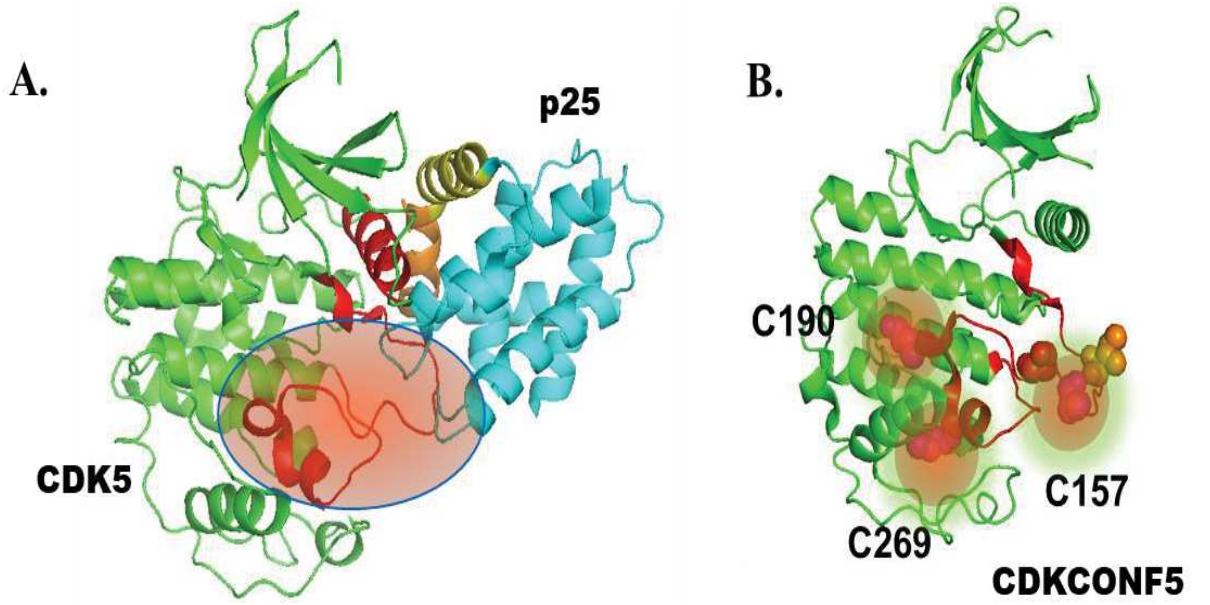


Figure 25. Conception de CDKCONF5 pour la détection de changement conformationnel de CDK5 (Peyressatre, Arama, *et al.*, 2020)**. (A)** Structure de CDK5/p25 avec la boucle d'activation (surlignée en rouge) dans une position ouverte afin de permettre l'accès au site de liaison du substrat (PDB : 1H4L). **(B)** Biosenseur CDKCONF5 dérivé de la structure de CDK5, les résidus C157, C190 et C269 ont été couplés avec la sonde Cy3 afin de détecter les changements de fluorescence dus à une modification de la conformation de la zone proche de la boucle d'activation (les autres cystéines natives de CDK5 C53, C83, C94, C117 et C290 ont été mutés en sérine).

Lors de la conception de CDKCONF5, les résidus cystéines présents dans CDK5 ont été mutés en sérine, exceptés celles en position 157, 190 et 269. Le positionnement de ces trois

cystéines est intéressant pour détecter des changements de conformation dans la région de la boucle d'activation de la kinase. L'identification de ces résidus clés provient d'une étude par mutagenèse dirigée réalisée par le Dr Morris sur les différentes cystéines présentes dans CDK2 afin d'identifier les résidus sensibles aux changements conformationnels de CDK2 lors de sa liaison à la cycline, dans le but de développer le premier biosenseur conformationnel CDKCONF (Pellerano *et al.*, 2017).

A la suite de l'optimisation du biosenseur, CDKCONF5 a été utilisé au cours de la thèse de Marion Peyressatre pour le criblage de petites molécules provenant de trois chimiothèques :

- La chimiothèque nationale (CN) : 640 composés
- La chimiothèque de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM, faculté de pharmacie Montpellier) : 221 composés
- La chimiothèque de la faculté de pharmacie de Strasbourg (collaboration avec le Dr. Frédéric Bihel) : 640 composés

Les composés dans ces 3 chimiothèques ont été choisis selon des critères adaptés au développement d'un médicament à usage clinique. Ces molécules recouvrent une diversité structural importante mais avec des caractéristiques communes. Elles présentent des structures hétérocycliques non planes, respectant les règles de Lipinski (poids moléculaires d'environ 450 Da, logP < 4,5, etc.) et sont donc « druggables ». L'identification des meilleurs composés modulateurs allostériques de CDK5, nommé « hits », a été réalisé selon trois critères. Les hits ont été testés sur leur capacité à inhiber l'activité catalytique de CDK5 d'une part et leur potentiel inhibiteur de la prolifération cellulaire sur la lignée de cellules glioblastome U87, d'autre part (Thèse de Marion Peyressatre, 2016). Les molécules retenues suite à ces études possèdent des caractéristiques structurales intéressantes et présentent un potentiel inhibiteur de la prolifération cellulaire. Les composés testés n'étant pas brevetés, il est nécessaire de garder confidentiel leurs structures. Néanmoins certains composés analogues des quinazolinones ont été identifiés comme des inhibiteurs allostériques de CDK5 affectant l'activité de la kinase mais également la prolifération de cellules issues de glioblastomes (Peyressatre, Arama, *et al.*, 2020).

OBJECTIFS

Il n'existe actuellement aucun médicament ciblant spécifiquement et efficacement CDK5 malgré son implication dans le développement de pathologies neurodégénératives mais également de certains cancers dont le cancer du poumon. Les seuls composés actuellement décrits comme inhibant CDK5 sont des molécules visant la poche de fixation de l'ATP, comme la Roscovitine qui sont peu efficaces et souffrent d'un manque de spécificité pouvant conduire à l'apparition d'effets secondaires importants chez les patients.

A la suite du crible de molécules réalisé dans le cadre de la thèse de Marion Peyressatre avec le biosenseur conformationnel CDKCONF5, plusieurs composés ont été identifiés comme des modulateurs allostériques de CDK5 possédant un potentiel inhibiteur de l'activité de CDK5 et de la prolifération cellulaire de la lignée U87 dérivée d'un glioblastome humain. Le crible a notamment permis d'identifier la papavérine, une substance naturelle extraite du latex du pavot, ainsi que son analogue l'éthavérine. Ces deux molécules ont déjà été décrites comme des inhibiteurs des phosphodiestérases et la papavérine est utilisée en clinique dans les troubles de l'érection ou cardiaques en agissant comme vasodilatateur.

Mon objectif a été de caractériser les hits issus du crible afin de mieux appréhender et de comprendre les mécanismes d'action de ces modulateurs allostériques et de plusieurs de leurs dérivés. Pour cela, j'ai d'abord réalisé des tests d'interaction de CDK5 recombinant avec un substrat peptidique. J'ai ensuite étudié leurs effets dans le glioblastome à travers des expériences de prolifération cellulaire sur la lignée U87, en comparaison avec l'inhibiteur ATP-compétitif de référence Roscovitine. Puis j'ai effectué des expériences de chromatographie d'exclusion stérique à partir d'extraits cellulaires de U87 afin de caractériser les interactions physiologiques de CDK5 avec d'autres partenaires protéiques.

CDK5 étant également décrite comme une cible pharmaceutique attractive pour le traitement de certains cancers, j'ai caractérisé les molécules les plus prometteuses en utilisant des lignées cellulaires dérivées de cancer du poumon en particulier la lignée A549. J'ai réalisé des expériences de prolifération, et de microscopie pour déterminer l'impact des molécules sur la division et la migration cellulaires. Dans un dernier temps, j'ai effectué des expériences de

thermodénaturation afin de valider CDK5 comme cible des modulateurs allostériques dans son environnement cellulaire natif.

RESULTATS

I. Caractérisation de l'interaction *in vitro* entre CDK5 recombinante et un substrat peptidique

1. Concept

Afin de déterminer si les modulateurs allostériques de CDK5 influencent sa capacité à lier un substrat, des mesures d'affinité entre CDK5 recombinante et un peptide dérivé de Tau ont été réalisées par spectrométrie de fluorescence. Le peptide Tau est couplé à une sonde sensible à l'environnement, dite solvatochromique, qui émet dans le rouge nommée TP-2Rho, dont la fluorescence est modifiée lorsque la polarité de son environnement local change (Lartia *et al.*, 2008; Dumat *et al.*, 2012, 2013). Notre équipe a déjà validé l'utilisation de Tp-2Rho pour étudier des interactions entre protéines et peptides (Pellerano *et al.*, 2016).

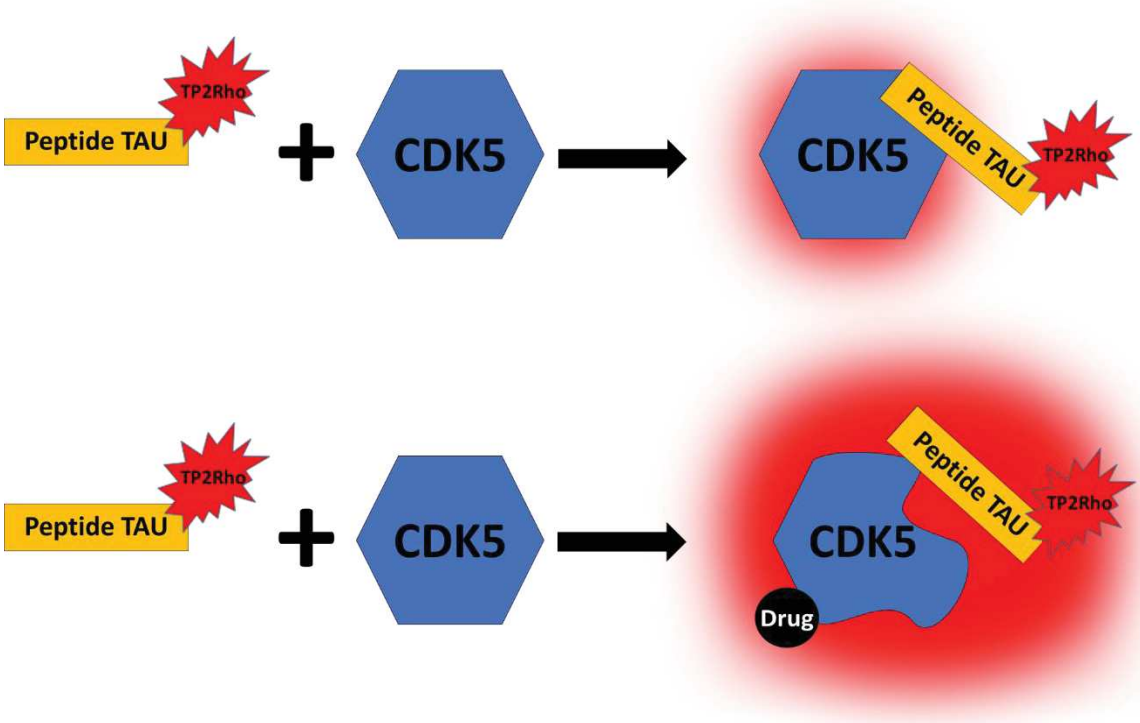


Figure 26. Représentation schématique des expériences de titration du peptide substrat couplé à TP-2Rho incubé avec GST-CDK5.

2. Peptide Tau et couplage avec TP-2Rho

La séquence du substrat peptidique Tau, ou peptide Tau, est dérivée des résidus 195-209 des isoformes 5 et 8 de la protéine Tau (Goedert *et al.*, 1989) : SGTSSPGSCSTPGSR. Le résidu Thr205 (rouge) a été décrit comme un site de phosphorylation par CDK5/p25 (Wada et al. 1998). Une cystéine (jaune) a été incorporée deux résidus en amont de la thréonine 205, afin de permettre le couplage avec la sonde TP-2Rho

Le substrat peptidique Tau est couplé avec la sonde solvatochromique TP-2Rho et incubé avec des concentrations croissantes de GST-CDK5 humaine exprimée chez *E. coli* et purifiée par chromatographie FPLC. L'interaction entre ces deux partenaires altère l'environnement physico-chimique de la sonde pouvant causer une exaltation ou une atténuation de la fluorescence. Dans nos expériences de titration, l'interaction entre GST-CDK5 et le peptide Tau entraine une exaltation de la fluorescence de Tp-2Rho. Ces expériences ont ensuite été réalisées avec les composés « hits » issus du crible allostérique (éthavérine, papavérine, LC05, LC08, LF03, LA05, LPS0103LG06, LB10, LPS0213LG06 et A08), ainsi que la Roscovitine afin d'observer leur influence sur l'interaction *in vitro* entre CDK5 et le peptide Tau. L'augmentation de fluorescence de la sonde Tp-2Rho couplée au peptide Tau associée à l'ajout de concentrations croissantes de GST-CDK5, peut être rapportée à la concentration de GST-CDK5. Cela permet de tracer une courbe passant par tous les points et de déterminer une constante de dissociation (Kd) grâce à une équation quadratique, décrivant l'interaction d'une protéine ligand avec un partenaire ou substrat associée à des changements de fluorescence du substrat (ici le peptide fluorescent dérivé de tau), intégrée dans le logiciel Grafit7 (Erithacus Software).

$$F = Fmin + (Fmax - Fmin) * \frac{Kd + L + p - \sqrt{(\sqrt{(Kd + L + p)^2} - 4 * p)}}{2 * p}$$

où F correspond à la fluorescence, Fmax la fluorescence maximale, Fmin la fluorescence minimale, Kd la constante de dissociation, p la concentration en peptide fluorescent et L la concentration en ligand (c'est-à-dire la protéine se liant au peptide).

Équation 1 Equation quadratique permettant de mesurer l'interaction entre GST-CDK5 et le peptide Tau (Heitz *et al.*, 1997)**.**

Les différentes expériences de titration de GST-CDK5 en présence du peptide Tau couplé à TP-2Rho sont réalisées en plaque 96 puits. L'émission de fluorescence du TP-2Rho est mesurée à 610nm après excitation à 514nm, grâce à un spectrofluoromètre CLARIOstar®
La concentration du peptide couplée à la sonde est fixée à 1 µM, elle est titrée avec la protéine recombinante qui est ajoutée de manière croissante dans un volume finale de 200 µl par puits. Les composés allostériques sont pré-incubés avec la GST-CDK5 30 min à température ambiante à une concentration 10 fois supérieure à celle en protéine recombinante.

3. Purification de GST-CDK5

La protéine CDK5 est exprimée sous forme de protéine de fusion avec la glutathione-S-Transferase (GST) par induction IPTG dans des bactéries *E. coli* BL21pLyS (cf. Matériels et Méthodes). La GST permet de purifier la protéine sur une colonne d'affinité GST-Trap par chromatographie FPLC. La fraction contenant GST-CDK5 est ensuite passée sur une colonne de dessalage afin de remplacer le tampon riche en glutathion (issu de l'élution de la colonne GST-Trap) par du tampon PBS sans glutathion, Après chaque étape, un échantillon de chaque fraction est récupéré pour vérifier la présence et la pureté de la protéine sur gel SDS-PAGE (Fig. 27).

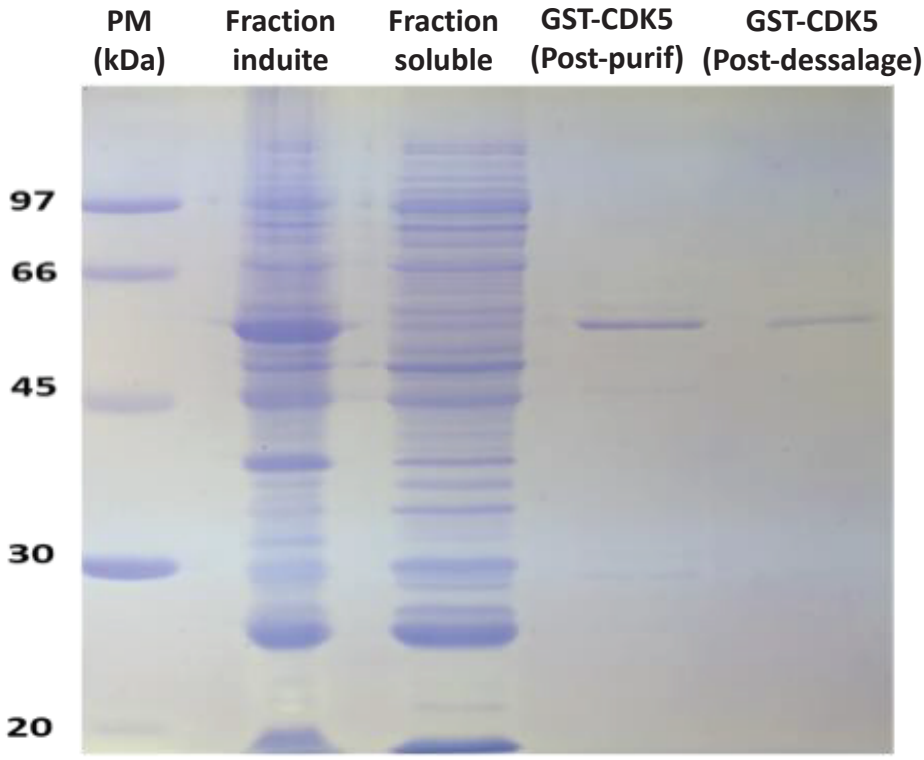


Figure 27. Gel SDS-PAGE 15% représentant l'expression et la purification de GST-CDK5. Le poids moléculaire de l'étiquette GST est de 26 kDa et celui de CDK5 est de 34 kDa, la protéine de fusion GST-CDK5 est donc de 60 kDa. La fraction induite correspond à un échantillon de culture bactérienne après induction par IPTG de la protéine recombinante GST-CDK5. Une large bande à 60 kDa permet de confirmer que l'induction s'est bien déroulée. La fraction soluble correspond à un échantillon du surnageant des culots bactériens après lyse et centrifugation. Le puit « GST-CDK5 (post-purif) », provient de l'échantillon contenant uniquement GST-CDK5 après élution sur colonne d'affinité. Le puit « GST-CDK5 (post-dessalage) » contient uniquement GST-CDK5 dans du PBS. Le glutathion nécessaire pour la purification de GST-CDK5 est éliminé en injectant la fraction éluée issue de la purification par affinité sur GST-Trap sur une colonne de dessalage.

4. Mesure de l'interaction *in vitro*

L'interaction de la GST-CDK5 avec le peptide Tau a été mesurée dans un premier temps puis les composés les plus intéressants issus du crible initial réalisé lors de la thèse de Marion Peyressatre ont été testées lors de ces expériences (cf. Tableau 8).

En guise de contrôle négatif nous avons vérifié que les composés seuls n'interagissent pas avec le peptide Tau couplé à TP2-Rho (Fig 28, cercles bleus). Les titrations correspondant à l'interaction entre GST-CDK5 et le peptide Tau sont représentées par les courbes rouges en absence ou en présence des modulateurs allostériques de CDK5 (Fig. 28). Chaque graphe de la figure 28 représente une courbe type obtenue dans ces expériences de titration. Les composés modulateurs allostériques ont été testés en comparaison avec la Roscovitine, inhibiteur de CDK5 ATP-compétitif utilisé comme référence dans l'ensemble des expériences (Meijer *et al.*, 1997; Bach *et al.*, 2005; Cicenas *et al.*, 2015).

La moyenne des Kds calculés pour l'interaction entre GST-CDK5 et le peptide Tau est de 140,8 nM $\pm$ 33 nM. La présence de Roscovitine affecte l'affinité de fixation du peptide-substrat sur la kinase (125,2 nM $\pm$ 24,9 nM). La diminution du Kd mesurée se traduit par un gain de 11% d'affinité induit par la Roscovitine. Cela permet de confirmer que la fixation de la Roscovitine dans la poche de liaison à l'ATP de CDK5 n'inhibe pas l'interaction de la kinase pour son substrat, et contribue même à en augmenter l'affinité légèrement.

Comme nous pouvons l'observer dans le tableau 8, les moyennes de Kd obtenues entre GST-CDK5 et le substrat peptidique dérivé de tau en présence des composés allostériques sont toutes supérieures à celle de GST-CDK5 seule. Les variations de Kd sont comprises dans une gamme allant de 14% (LC05 : Kd de 160,4 nM ± 29,5 nM) à 62% (LPS0213LG06 : Kd de 228,5nM ± 65,2 nM). D'une manière globale, les composés allostériques diminuent l'affinité de GST-CDK5 pour le peptide Tau. Les différences entre les Kds mesurées pourraient s'expliquer par le fait que ces modulateurs allostériques vont se lier à des sites différents de la kinase. Cela pourrait induire différents types de changements conformationnels de CDK5,

modifiant ainsi l'affinité de liaisons entre la kinase et son substrat de manière plus ou moins importante.

Il est possible que les composés comme le LC05 (160,4nM ± 29,5 nM), LF03 (163,8 nM ± 27,4 nM), l'éthavérine (167,5 nM ± 26,5 nM) ou la papavérine (165,9 nM ± 31,5 nM), vont légèrement altérer le site d'accès au substrat qui permettra au peptide Tau de toujours accéder aisément à la fente catalytique et interagir avec les résidus formant la poche catalytique.

A l'inverse, les composés qui engendrent une plus forte inhibition de l'affinité entre CDK5 et son substrat tels que le LB10 (197,2 nM ± 40,2 nM), LA05 (198,4 nM ± 50,6 nM), A08 (203,9 nM ± 57,9 nM) ou LPS0213LG06 (228,5 nM ± 65,2 nM), vont induire des changements conformationnels plus importants car le peptide Tau va toujours pouvoir lier CDK5 mais avec une affinité relativement plus faible

Molécules	*Kd (nM)*	*Variation du Kd (%)*	*n*
GST-Cdk5	140,8 ± 33		13
Roscovitine	125,2 ± 24,9	-11%	4
Ethavérine	167,5 ± 26,5	19%	3
Papavérine	165,9 ± 31,5	18%	3
LC05	160,4 ± 29,5	14%	3
LC08	170,4 ± 34,2	21%	3
LF03	163,8 ± 27,4	16%	3
LA05	198,4 ± 50,6	41%	2
LPS0103LG06	183,7 ± 60,6	30%	3
LB10	197,2 ± 40,2	40%	3
LPS0213LG06	228,5 ± 65,2	62%	5
A08	203,9 ± 57,9	45%	4

Tableau 8. Tableau récapitulatif de la moyenne des Kd obtenus lors des expériences de titration. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SD.

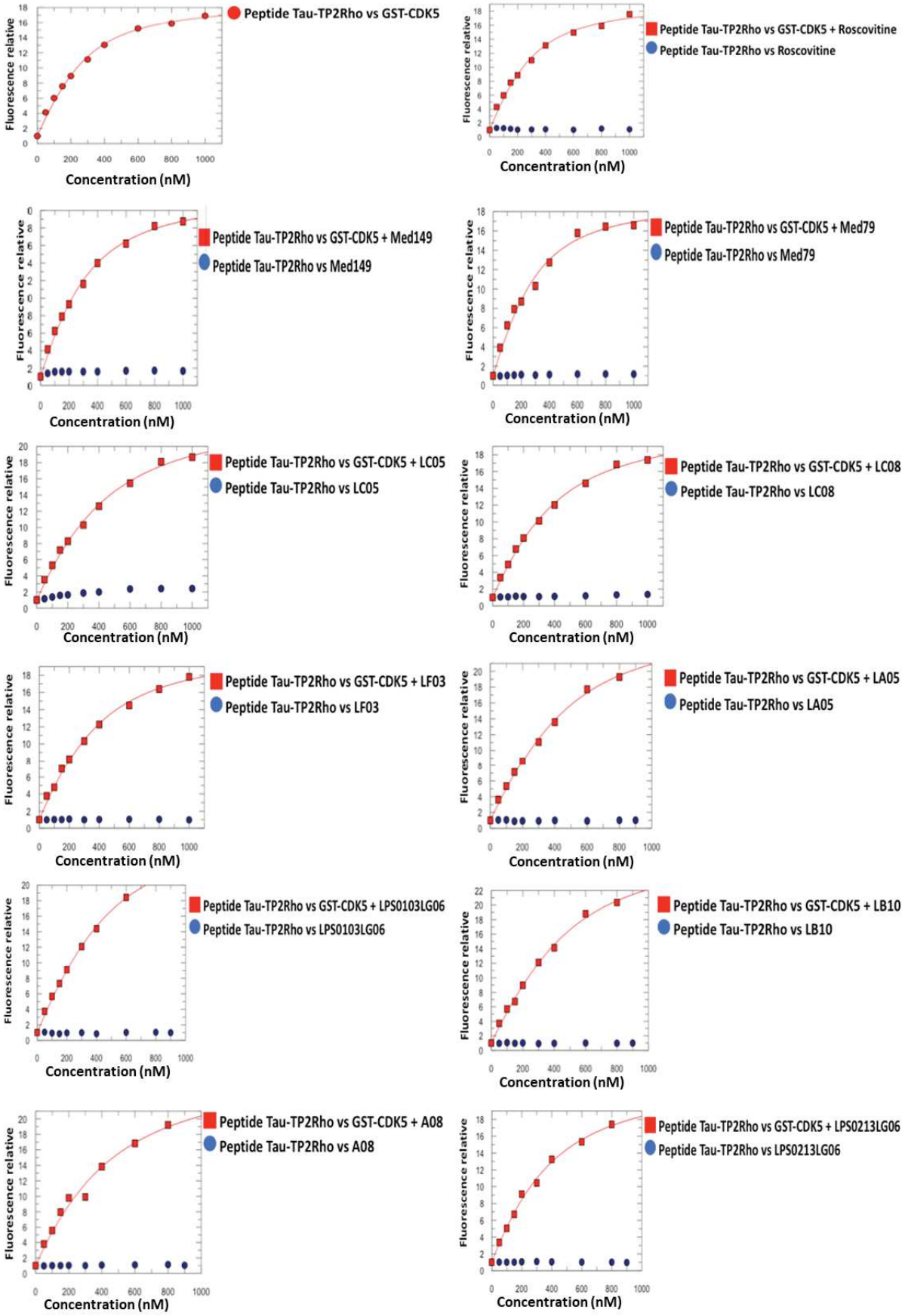


Figure 28. Courbes de titration du peptide dérivé de Tau avec des concentrations croissantes de GST-CDK5 en présence des différents modulateurs allostériques. L'éthavérine et la papavérine sont respectivement représentées sous les nomenclatures Med149 et Med79.

II. Caractérisation des modulateurs allostériques de CDK5 dans les U87, une lignée dérivée du glioblastome

1. Caractérisation des complexes macromoléculaires contenant CDK5 dans des extraits d'U87

a. Concept

Afin de caractériser le mécanisme d'action des inhibiteurs de CDK5, et plus précisément savoir s'ils pouvaient affecter les interactions de CDK5 avec des substrats ou d'autres de ses partenaires protéiques dans un contexte plus physiologique, j'ai effectué des chromatographies d'exclusion stérique (SEC) à partir de lysats de cellules U87 traitées avec les différents composés. Les lysats cellulaires, sont injectés dans une colonne de gel filtration (Superose 6 10/300 GL) afin de séparer les différents complexes macromoléculaires contenant CDK5 selon leurs poids moléculaires. Cette méthode non-dénaturante permet de déterminer si les inhibiteurs affectent les complexes macromoléculaires formés entre CDK5 et ses différents substrats ou partenaires. Les différentes fractions collectées à l'issu des SEC sont ensuite séparées sur SDS-PAGE puis analysées par Western-Blotting (WB).

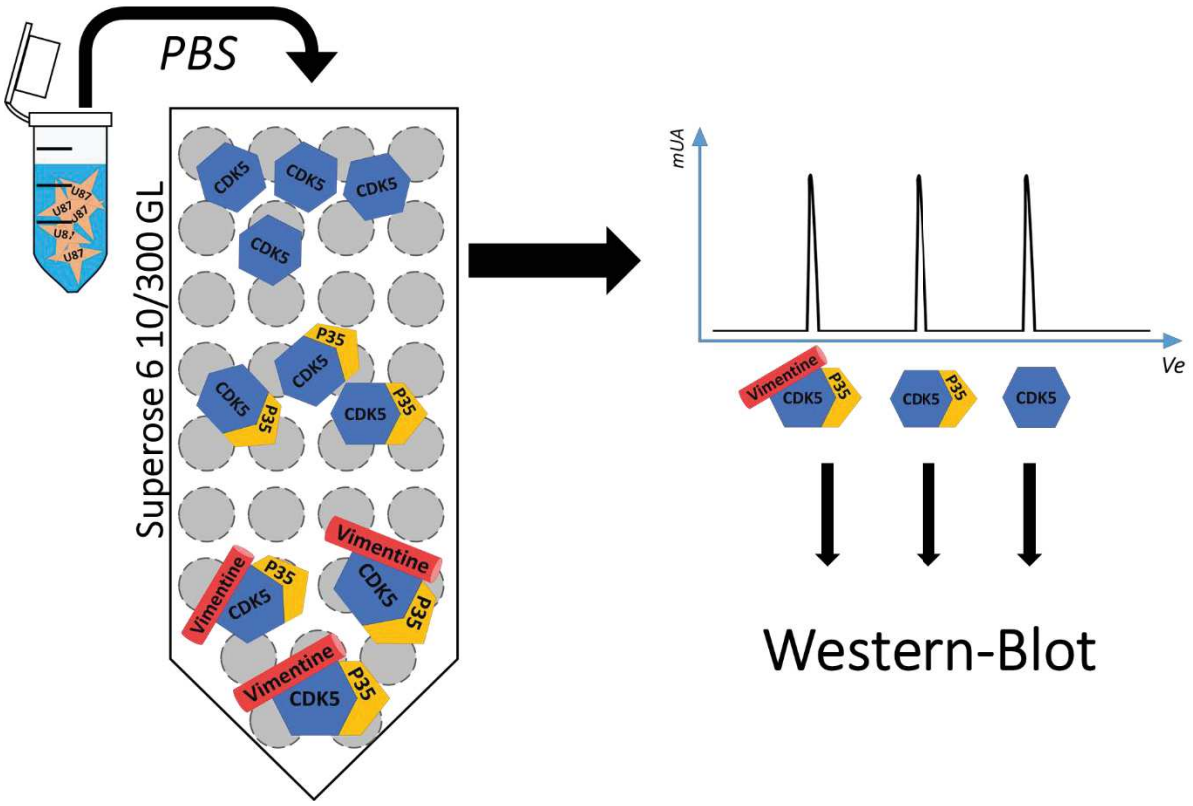


Figure 29. Représentation schématique des expériences de chromatographie d'exclusion stérique suivis des WB afin d'identifier les complexes macromoléculaires présents dans les fractions.

Des cellules U87 ont été cultivées puis traités avec les composés allostériques à 10µM pendant 24h ou 48h. Les cellules ont été récupérées et centrifugées, puis les culots cellulaires ont été lysés . La fraction des protéines solubles extraite a été injectée sur une colonne de gel filtration Superose 6 10/300 GL. Les différentes fractions ont ensuite été séparées par SDS-PAGE puis analysées par Western-Blotting afin de déterminer dans quels complexes macromoléculaires pouvaient se trouver CDK5. La présence des partenaires interagissant avec CDK5 (cycline E et vimentine) ont également été recherchées. p25/35 n'a pu être identifié dans les fractions par manque d'anticorps robuste α-p25/35. Différents anticorps α-p25/35 ont été testés au cours de la thèse et aucun n'a permis d'obtenir des résultats exploitables. La cycline E étant également un partenaire régulant l'activité de CDK5, nous avons donc fait le choix de tester sa présence dans le cadre de ces expériences (Odajima *et al.*, 2011). La vimentine est un substrat phosphorylé par CDK5 ayant un rôle crucial dans la formation de métastase de mélanomes (Sharma *et al.*, 2020).

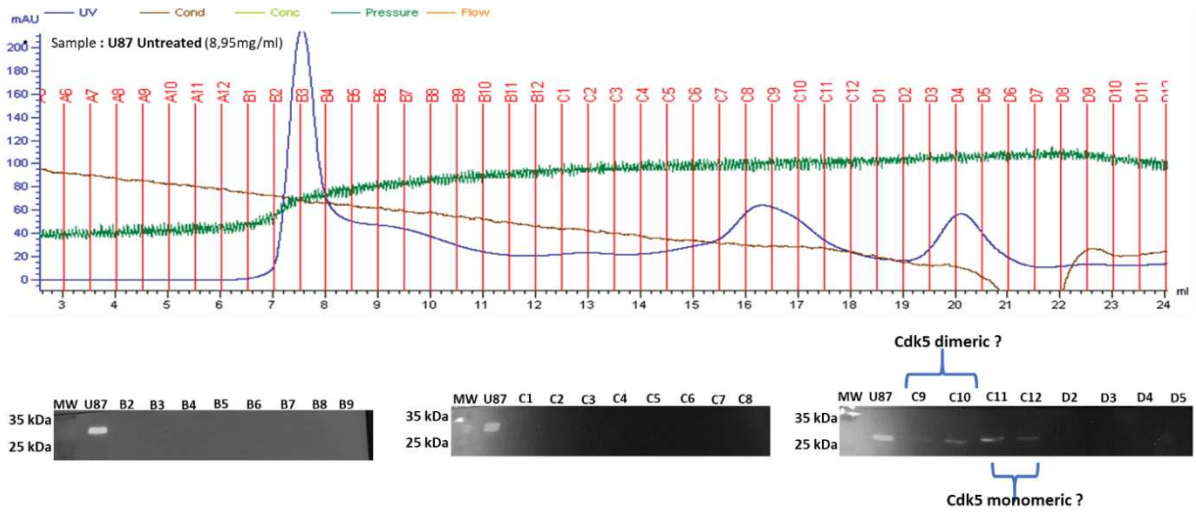


Figure 30. Chromatogramme représentatif obtenu après chromatographie d'exclusion stérique d'extrait d'U87 et Western-blots α-CDK5 correspondant aux fractions éluées.

L'objectif de cette expérience consistait à identifier la présence de CDK5 dans des extraits cellulaires d'U87 ayant été traités puis séparés par chromatographie d'exclusion stérique. Cette méthode non dénaturante associée au SDS-PAGE/Western blotting permet de déterminer la présence de CDK5 dans des fractions correspondant à des complexes macromoléculaires de différents poids moléculaires.

b. Calibration de la colonne Superose 6 10/300GL

Une calibration de la colonne de gel filtration a été initialement effectuée afin de corréler un poids moléculaire à une fraction éluée, avec trois protéines de référence. Le poids moléculaire de CDK5 monomérique (33 kDa) s'assimile à celui de l'anhydrase carbonique (29 kDa), alors que CDK5/p25 (58 kDa) ou CDK5/p35 (68 kDa) s'assimile au poids moléculaire de l'albumine de sérum bovin (BSA 67 kDa). L'aldolase (160 kDa) permet d'identifier la présence de CDK5 dans des complexes de plus haut poids moléculaires.

Volume d'élution (ml)	Fraction	Protéine de calibration
15-15,5	**C6**	Aldolase (160 kDa)
15,5-16	C7	
16-16,5	C8	
16,5-17	**C9**	BSA (67 kDa)
17-17,5	C10	
17,5-18	C11	
18-18,5	**C12**	Anhydrase carbonique (29 kDa)

Tableau 9. Calibration de la colonne de gel filtration Superose 6 10/300GL pour l'identification des complexes macromoléculaires dans les extraits d'U87.

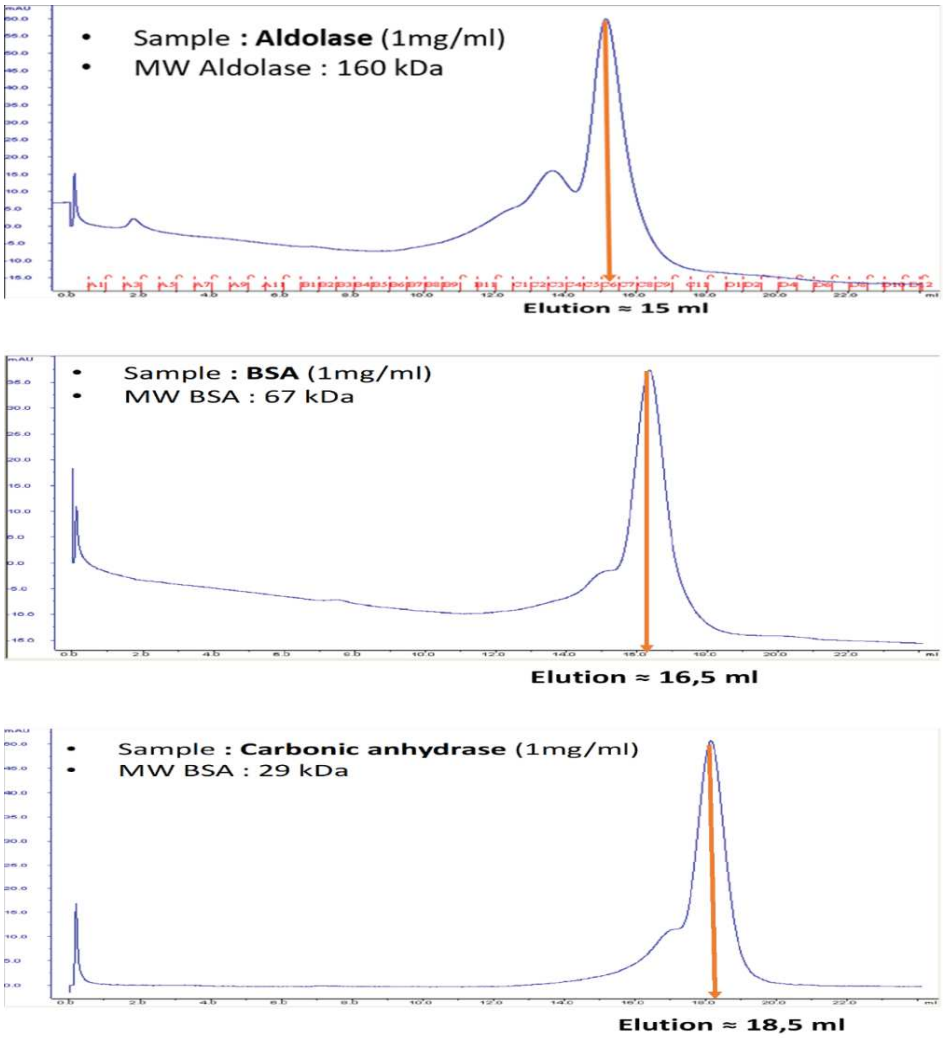


Figure 31. Chromatogrammes obtenus suite à la calibration de la colonne de gel filtration Superose 6 10/300GL.

Protéine	Poids moléculaire (kDa)	Fraction théorique d'élution
P25	25	C12
P35	35	C11/C12
CDK5	33	C11/C12
Cycline E	48	C10
Vimentine	54	C9/C10

Tableau 10. Protéines seules avec leurs poids moléculaires respectifs et les fractions théoriques d'élution

Complexes macromoléculaires	Poids moléculaire (kDa)	Fraction théorique d'élution
CDK5/p25	58	C9/C10
CDK5/p35	68	C9/C10
CDK5/Cycline E	81	C8
CDK5/Vimentine	87	C8

Tableau 11. Complexes macromoléculaires contenant CDK5 avec leurs poids moléculaires respectifs et les fractions théoriques d'élution.

c. *Identification des complexes macromoléculaires au sein des extraits d'U87*

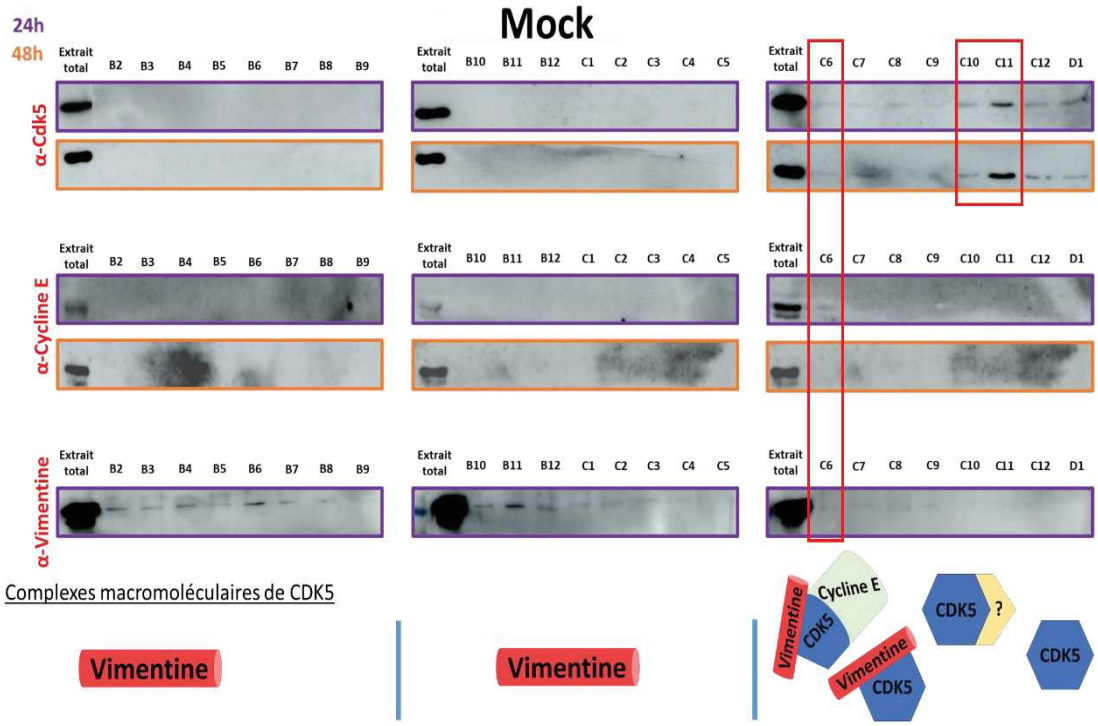


Figure 32. Western-blots issu des SECs avec des échantillon d'U87 non traitées. En violet sont encadrées les résultats de WB 24h après traitement au DMSO et en orange 48h après. Les schémas représentent les protéines identifiées et les complexes macromoléculaires possiblement formés dans les différentes fractions.

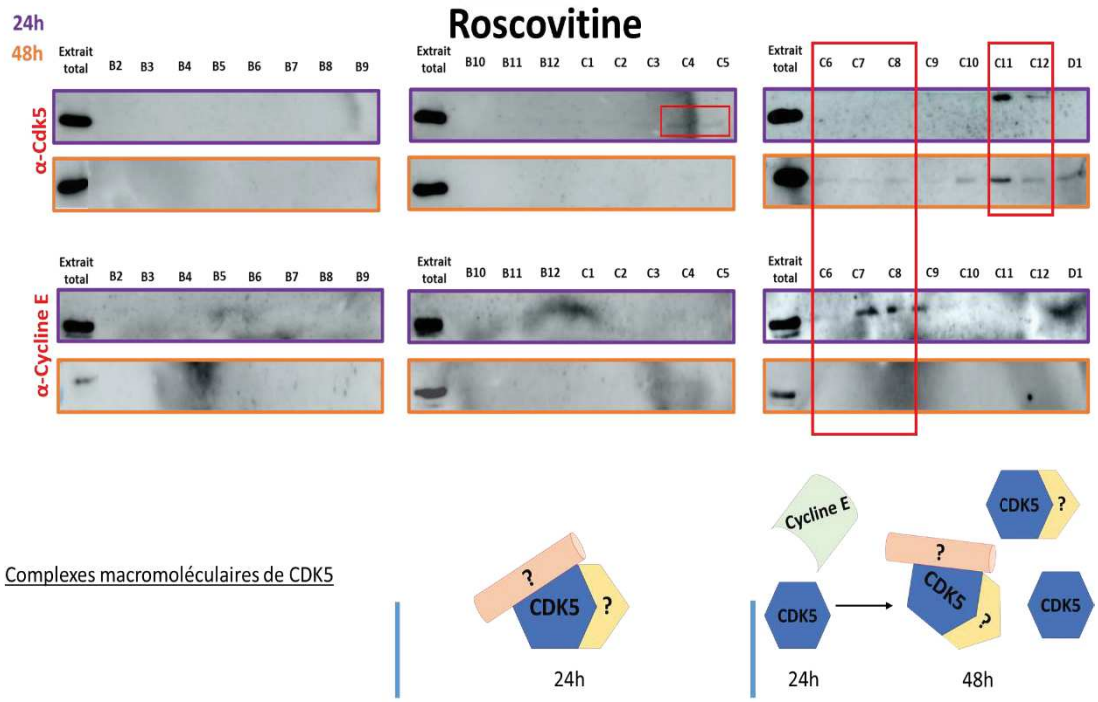


Figure 33. Western-blots issu des SECs avec des échantillon d'U87 traitées à la Roscovitine. En violet sont encadrées les résultats de WB 24h après traitement à la Roscovitine et en orange 48h après traitement. Les schémas représentent les protéines identifiées et les complexes macromoléculaires possiblement formés dans les différentes fractions.

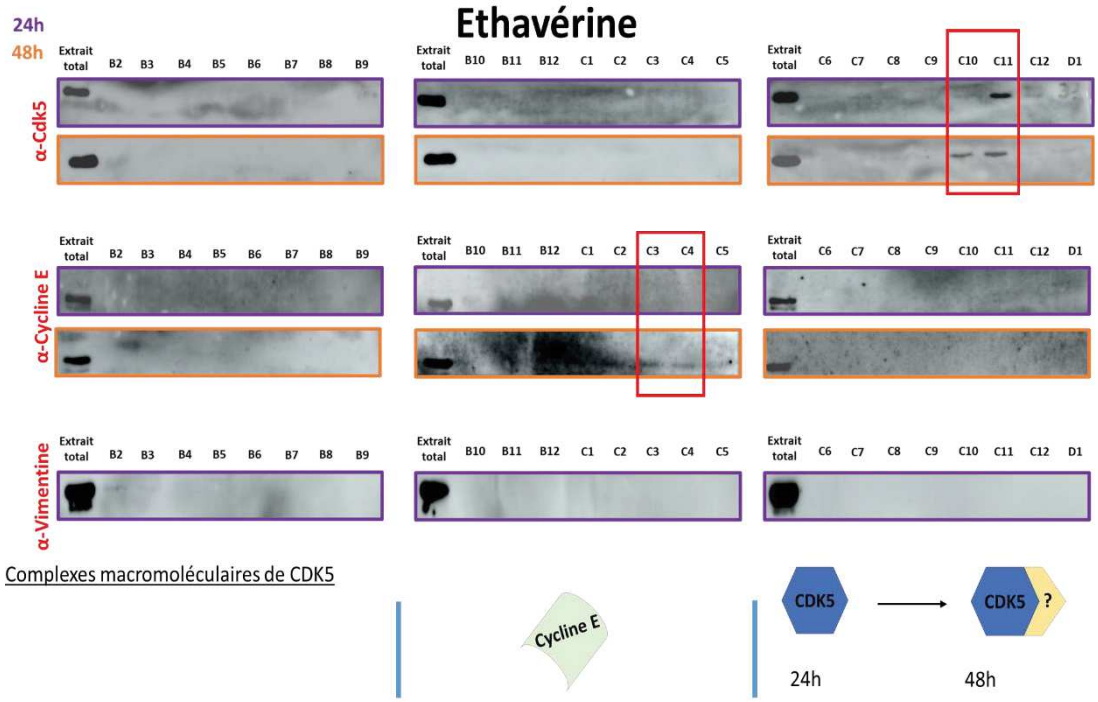


Figure 34. Western-blots issu des SECs avec des échantillon d'U87 traitées à l'éthavérine. En violet sont encadrées les résultats de WB 24h après traitement à l'éthavérine et en orange 48h après traitement. Les schémas représentent les protéines identifiées et les complexes macromoléculaires possiblement formés dans les différentes fractions.

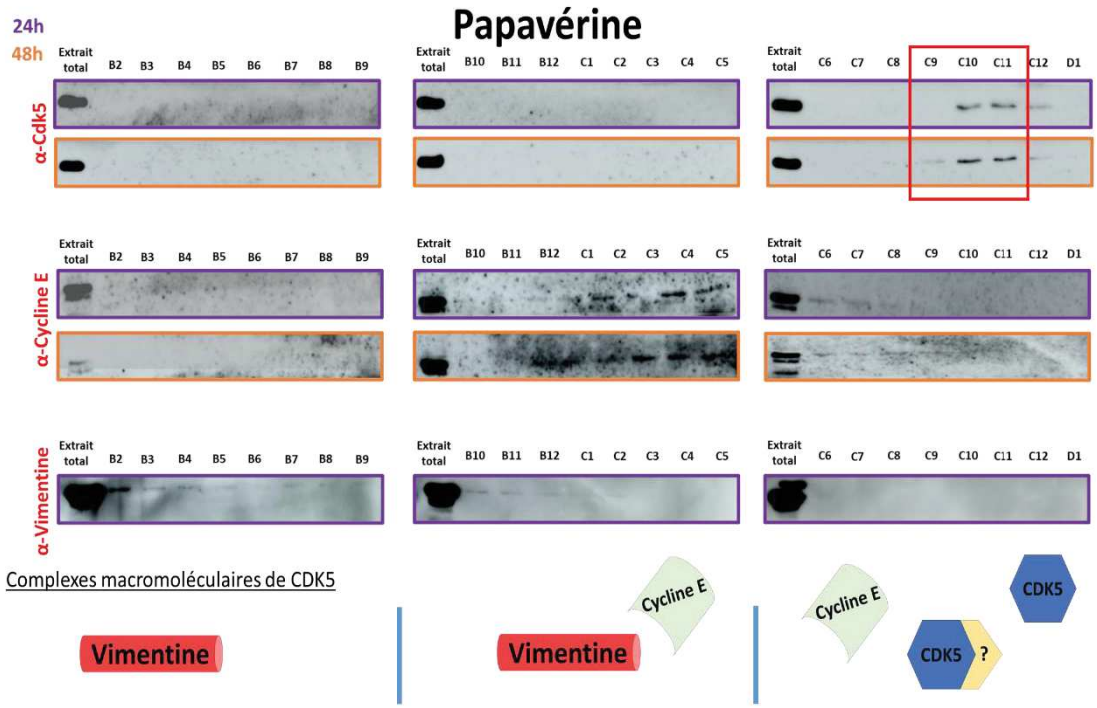


Figure 35. Western-blots issu des SECs avec des échantillon d'U87 traitées à la papavérine. En violet sont encadrées les résultats de WB 24h après traitement à la papavérine et en orange 48h après traitement. Les schémas représentent les protéines identifiées et les complexes macromoléculaires possiblement formés dans les différentes fractions.

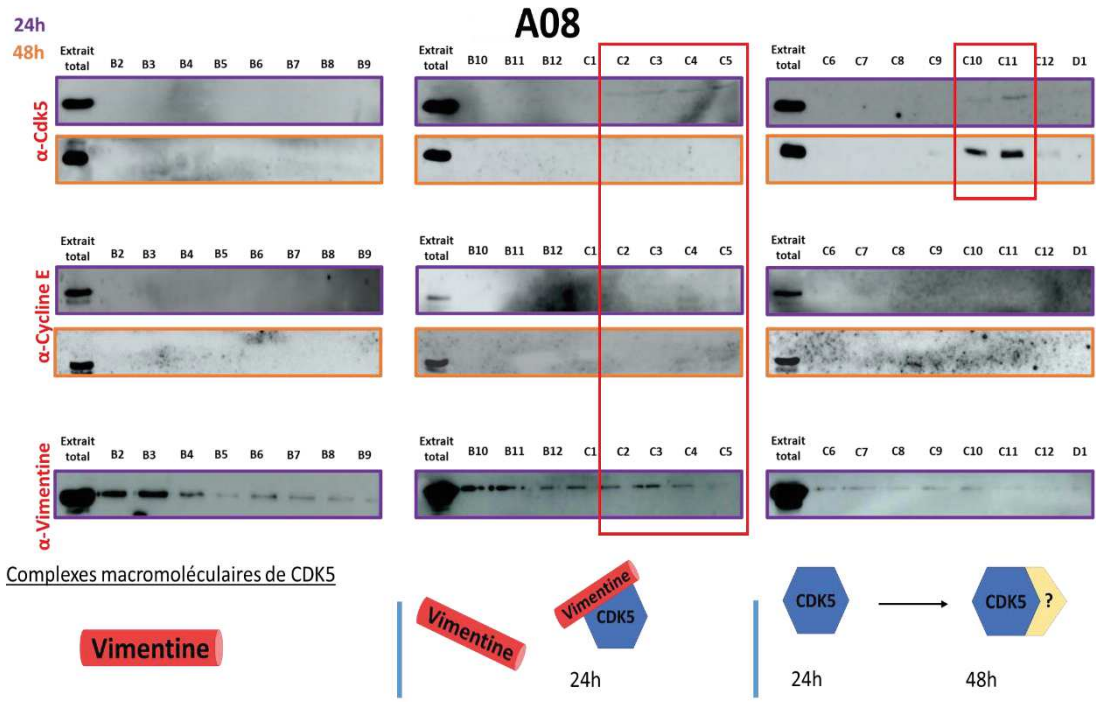


Figure 36. Western-blots issu des SECs avec des échantillon d'U87 traitées au A08. En violet sont encadrées les résultats de WB 24h après traitement au A08 et en orange 48h après traitement. Les schémas représentent les protéines identifiées et les complexes macromoléculaires possiblement formés dans les différentes fractions..

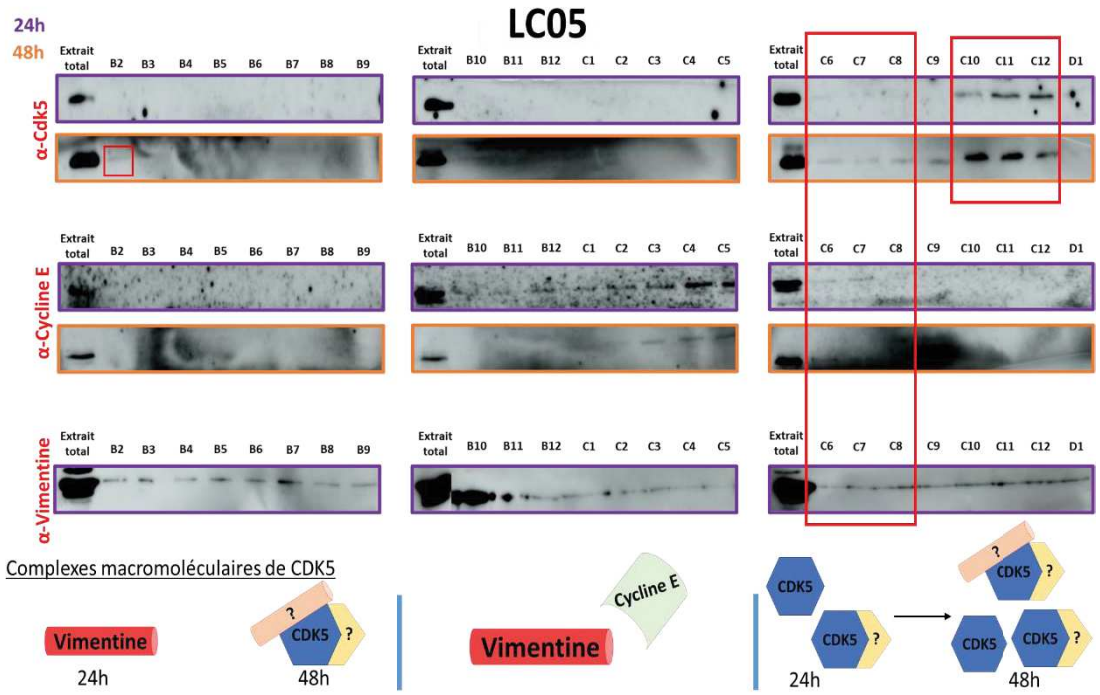


Figure 37. Western-blots issu des SECs avec des échantillon d'U87 traitées au LC05. En violet sont encadrées les résultats de WB 24h après traitement au LC05 et en orange 48h après traitement. Les schémas représentent les protéines identifiées et les complexes macromoléculaires possiblement formés dans les différentes fractions..

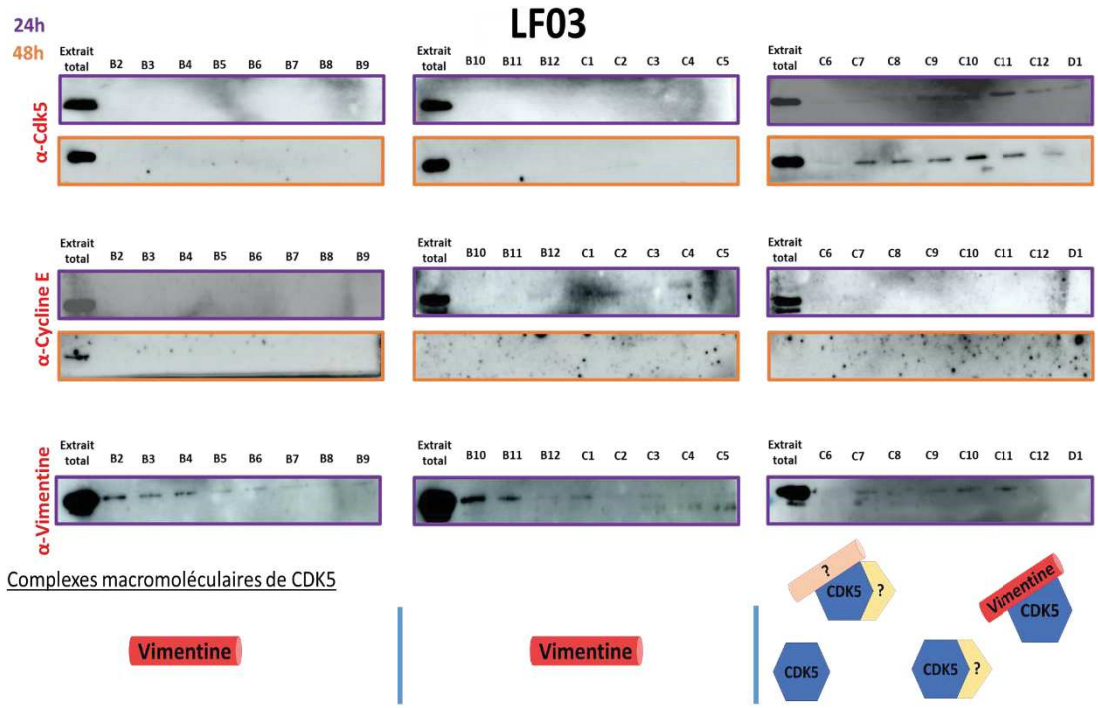


Figure 38. Western-blots issu des SECs avec des échantillon d'U87 traitées au LF03. En violet sont encadrées les résultats de WB 24h après traitement au LF03 et en orange 48h après traitement. Les schémas représentent les protéines identifiées et les complexes macromoléculaires possiblement formés dans les différentes fractions.

L'analyse des Western-Blots issus des multiples fractions d'extraits d'U87 permet d'observer des différences concernant la présence ou l'absence de CDK5 et de ses partenaires selon le traitement réalisé.

Dans le cas d'échantillons non traités, CDK5 est présente dans des fractions correspondant à une forme monomérique, dimérique (fraction C11) et légèrement visible dans fractions correspondant à des complexes de haut poids moléculaire.

Le traitement à la Roscovitine donne lieu à des différences sur la présence de CDK5 24h ou 48h après traitement dans les fractions éluées. Il est possible d'observer qu'à 24h de traitement, CDK5 est encore présente dans des fractions assimilées à une forme monomérique (C11-C12) mais surtout dans des fractions de très haut poids moléculaires (<160kDa). A 48h, CDK5 est uniquement présente dans les fractions C6 à D1 correspondant à une forme monomérique de la kinase mais également dimérique (C9-C10). Ce résultat permet de supposer que la Roscovitine affecte la formation du complexe dimérique CDK5/p25 ou CDK5/p35 au profit d'interactions avec des partenaires de haut poids moléculaire. Néanmoins l'inhibition de la formation du complexe CDK5 avec son coactivateur p25/35 est levée à 48h de traitement, indiquant une influence transitoire

Ce résultat est retrouvé de manière très marquée après traitement à l'éthavérine ou la papavérine. La présence de CDK5 dans la fraction C11 à 24h de traitement avec l'un ou l'autre de ces composés, démontre une stabilisation de CDK5 sous sa forme monomérique. A 48h CDK5 est présente dans les fractions C10 et C11, témoignant de la forme monomérique mais également dimérique de la kinase. L'éthavérine et la papavérine pourraient donc être responsables d'une inhibition de l'activation de CDK5 en la contraignant d'adopter une forme monomérique inactive. Cet état conformationnel est temporaire puisqu'il est possible d'observer la kinase dans une fraction correspondant à son poids moléculaire en complexe dimérique avec p25/35 à 48h de traitement. On remarque également l'absence de vimentine dans les différentes fractions d'échantillons traités avec la papavérine et l'éthavérine, alors que celle-ci est présente dans les échantillons non traités.

Le composé A08 affecte également la formation des complexes de CDK5 avec des partenaires protéiques. Nous pouvons observer à 24h de traitement la présence de CDK5 et de vimentine dans les fractions C2 à C5 alors que CDK5 n'est plus présente dans celles-ci à 48h. De plus, CDK5 est exprimée dans la fraction C11 et très faiblement en C10 laissant supposer la présence majoritaire d'une forme monomérique à 24h. Cela n'est plus le cas à 48h de traitement puisque CDK5 est présente en C10 et C11. Nous retrouvons un effet analogue à celui observé pour la papavérine et l'éthavérine, qui semblent induire une forme monomérique de CDK5 au cours des premières 24h de traitement qui reforme un dimère à 48h.
Les traitements réalisés avec les molécules LC05 et LF03 n'influent pas de manière significative sur l'élution deCDK5 et donc dans sa présence au sein de différents complexes macromoléculaires après 24h ou 48h de traitement.

A la suite de ces expériences nous pouvons conclure à des différences d'interaction de CDK5 avec ses partenaires (cycline E, vimentine) selon les molécules utilisées pour traiter les U87. A partir de ces résultats, nous pouvons déjà émettre quelques hypothèses sur le mécanisme d'action des modulateurs allostériques de CDK5.
Certains composés favorisent la présence de la forme monomérique de CDK5 inhibant temporairement la formation d'un complexe dimérique actif (Roscovitine, éthavérine, papavérine et A08). CDK5 est également présente dans des fractions de haut poids moléculaire, suggérant une interaction avec un ou plusieurs de ses partenaires cellulaires (substrat et/ou coactivateur). Dans le cas des extraits non traités, nous observons la présence dans la même fraction de CDK5, cycline E et de la vimentine. Il est possible qu'un complexe CDK5/cycline E soit formé et en interaction avec la vimentine. Nous pouvons aussi remarquer qu'à 24h de traitement avec le composé A08, CDK5 est principalement présente sous forme monomérique mais également détectable dans des fractions de haut poids contenant également de la vimentine, suggérant une interaction entre CDK5 et la vimentine. CDK5 phosphoryle la vimentine afin de réguler la sécrétion de neutrophiles mais pas dans le

mélanome où cette régulation permet la migration des cellules tumorales (Lee *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2020).

2. Caractérisation des modulateurs allostériques de CDK5 sur la prolifération cellulaire des U87

A la suite des expériences précédentes qui étaient axées sur la compréhension du mécanisme d'action des composés allostériques sur CDK5, nous avons décidés d'observer leurs effets sur la prolifération cellulaire d'U87. Etant donné le rôle majeur de CDK5 dans le développement des glioblastomes, nous avons émis l'hypothèse que les composés allostériques ciblant CDK5 devraient avoir un effet inhibiteur sur la prolifération des U87. Nous avons d'ailleurs pu observer une inhibition de la prolifération des U87 avec des composés analogues des quinazolinones identifiées par criblage avec un biosenseur conformationnel de CDK5, et ciblant donc des transitions conformationnelles associées à l'activation de CDK5 (Peyressatre, Arama, *et al.*, 2020).

Les composés ont été testés à une concentration de 10 μM pendant 24h et 48h sur des U87 cultivées dans des plaques 6-puits à une concentration de 15 000 cellules par puit. Les tests de prolifération ont été réalisées par la méthode du Crystal Violet permettant de quantifier la viabilité cellulaire (Gillies, Didier and Denton, 1986). Le Crystal Violet pénètre dans toutes les cellules, néanmoins les cellules mortes, à cause des traitements, ne sont plus adhérentes et sont donc éliminées par lavage avec du PBS. Le Crystal Violet présent dans les cellules adhérentes est précipité avec de l'acide acétique et l'absorbance est mesurée à 595 nm. La coloration au Crystal Violet est donc proportionnelle à la densité de cellules adhérentes que l'on peut considérer comme « viables ».

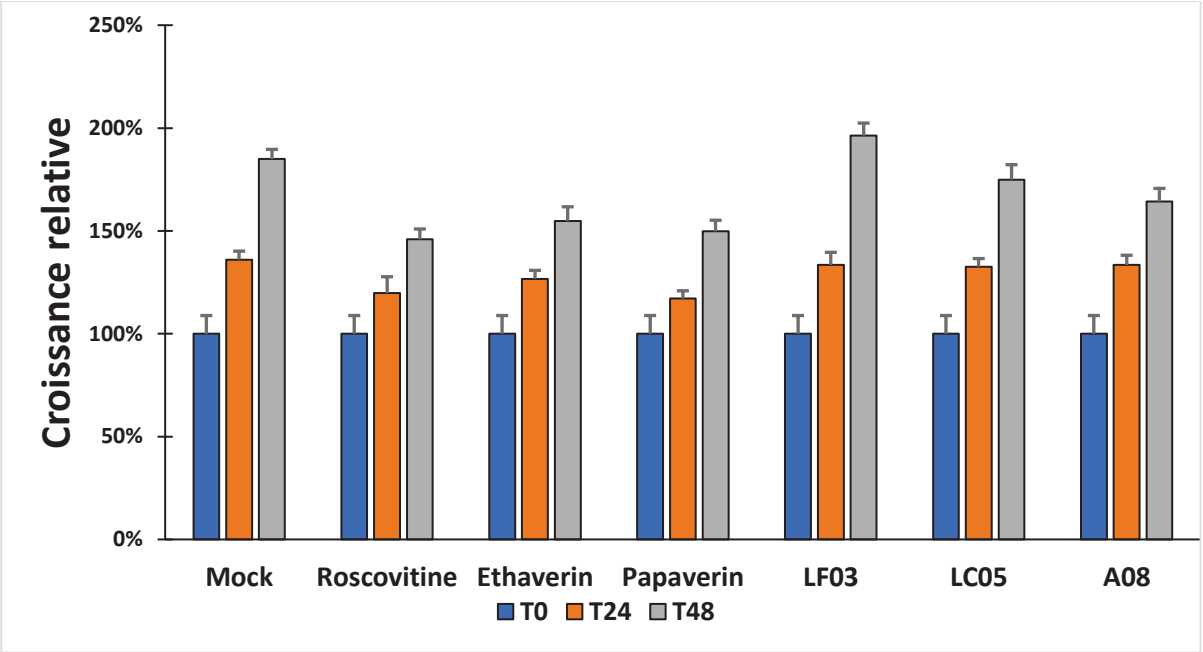


Figure 39. Expérience de prolifération des cellules U87 après traitement avec les composés à une concentration de 10µM.

Molécules	*24h Proliferation (%)*	*24h Inhibition (%)*	*48h Proliferation (%)*	*48h Inhibition (%)*
Mock	136,1 ± 4,1		184,9 ± 4,7	
Roscovitine	119,7 ± 126,7	12 ± 6,7	145,9 ± 5,0	21,1 ± 3,5
Ethavérine	126,7 ± 4,1	6,9 ± 3,3	154,8 ± 6,7	16,3 ± 4,5
Papavérine	117,1 ± 3,8	13,9 ± 3,2	149,8 ± 5,4	19 ± 3,6
LF03	133,5 ± 6,1	1,9 ± 4,6	196,3 ± 6,1	-6,1 ± 3,1
LC05	132,6 ± 3,9	2,5 ± 2,9	174,9 ± 7,2	5,4 ± 4,1
A08	133,5 ± 4,7	1,9 ± 3,5	164,3 ± 6,4	11,2 ± 3,9

Tableau 12. Pourcentage de prolifération et d'inhibition des U87 selon le traitement. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM.

La prolifération cellulaire des U87 est très peu impactée 24h après traitement avec les différents composés. Les molécules les plus efficaces sont la papavérine, Roscovitine et éthavérine dont les valeurs respectives d'inhibition à 24h sont de : 13,9% ± 3,2% ; 12% ± 6,7% et 6,9% ± 3,3%. Les 3 autres composés (LF03, LC05 et A08) n'atteignent même pas 3% d'inhibition.

Toutefois, 48h après les divers traitements, nous observons un effet inhibiteur plus marqué pour la Roscovitine (21,1% ± 3,5%), papavérine (19% ± 3,6%) et éthavérine (16,3% ± 4,5%). La molécule A08 est également plus efficace à 48h avec 11,2% ± 3,9% d'inhibition, mais le LC05 (5,4% ± 4,1%) n'a quasiment aucun effet antiprolifératif sur les U87. Etonnement le LF03 stimule légèrement la prolifération puisque la croissance relative à 48h des U87 est de 184,9% ± 4,7% pour les cellules non traitées contre 196,3% ± 6,1% pour le traitement au LF03.

Les résultats issus de ces expériences ont démontré que l'éthavérine et la papavérine ont un effet inhibiteur pratiquement aussi efficace que la Roscovitine sur la prolifération des U87. Les autres composés LF03 et A08 ont peu d'effet inhibiteur et inversement le LF03 stimule la prolifération cellulaire des U87.

III. Caractérisation des modulateurs allostériques de CDK5 sur la prolifération dans des lignées cellulaires issues de différents cancers

A la suite de ces expériences initiales exclusivement réalisées sur la lignée U87, l'ensemble des résultats obtenus ne permet pas de décrire un mécanisme d'action des composés allostériques ciblant CDK5. Les informations récoltées ne sont pas assez significatives pour apporter une conclusion concernant le mécanisme d'action de ces molécules. En outre, certains des composés testés ne sont pas assez efficaces pour poursuivre une démarche de développement thérapeutique.

L'éthavérine et la papavérine se sont révélées comme étant les deux composés les plus intéressants, démontrant une efficacité comparable à celle de la Roscovitine lors des précédents tests de SEC ou de prolifération sur la lignée dérivée de glioblastome. CDK5 ayant été identifiée comme une potentielle cible thérapeutique pour le traitement de certains cancers non neuronaux(Goodyear and Sharma, 2007; Contreras-Vallejos, Utreras and Gonzalez-Billault, 2012; Pozo and Bibb, 2016; Lenjisa *et al.*, 2017; W. Liu *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2018), nous avons émis l'hypothèse que ces modulateurs allostériques pouvaient présenter un potentiel inhibiteur dans d'autres lignées que les U87. L'efficacité de l'éthavérine et de la papavérine, a été testé sur diverses lignées cellulaires dont une lignée de mélanome (A375), une lignée de cancer du sein (MCF7) et une lignée dérivée d'un cancer du poumon (A549).

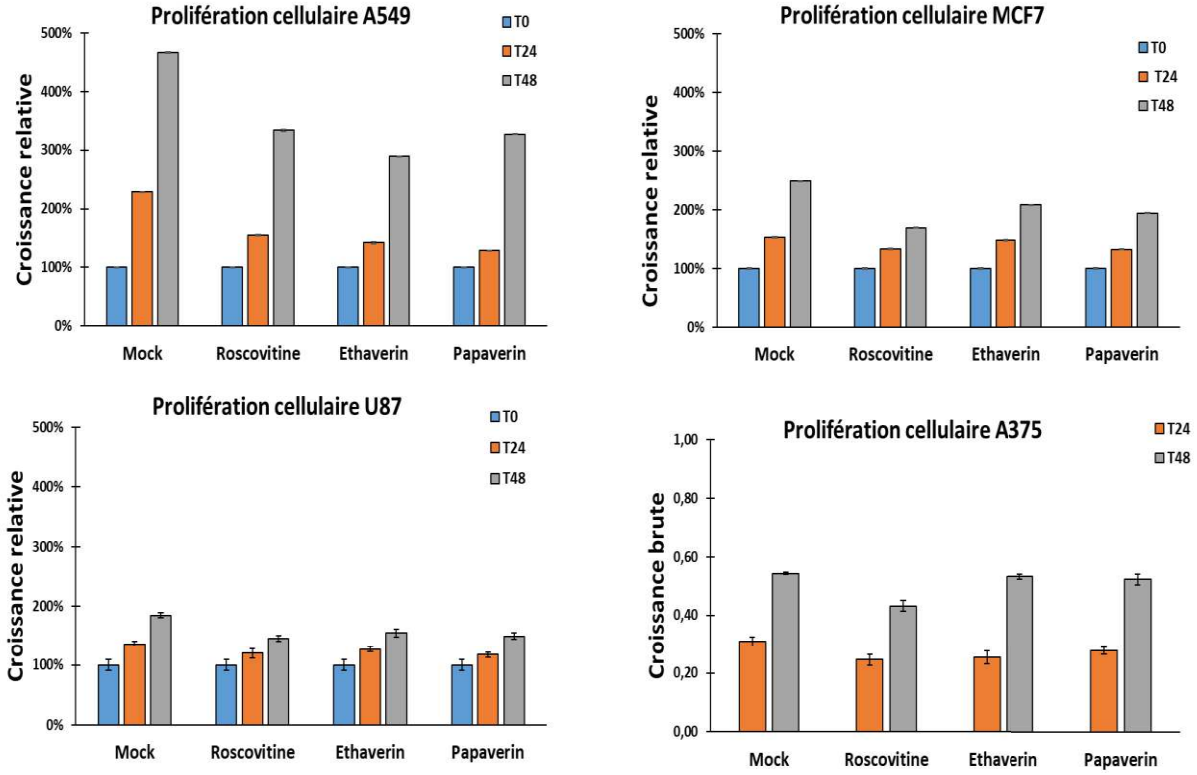


Figure 40. Prolifération cellulaire des lignées A549, MCF7, U87 et A375 après traitement à 10µM de Roscovitine, d'éthavérine ou de papavérine.

	24h Inhibition (%)			
	A549	*MCF7*	*U87*	*A375*
Roscovitine	32,4 ± 0,9	13,1 ± 1	12 ± 6,7	21 ± 7,5
Ethavérine	37,8 ± 1,2	3,5 ± 0,8	6,9 ± 3,3	18,5 ± 8,7
Papavérine	43,9 ± 0,9	13,5 ± 0,3	13,9 ± 3,2	9,3 ± 4,2

Tableau 13. Pourcentage d'inhibition de prolifération des U87 24h après traitement. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM.

	48h Inhibition (%)			
	A549	*MCF7*	*U87*	*A375*
Roscovitine	28,5 ± 0,5	32 ± 0,3	21,1± 3,4	20,6 ± 4,3
Ethavérine	37,9 ± 0,2	16,1 ± 0,1	16,3 ± 4,5	2,1 ± 1,6
Papavérine	29,9 ± 0,3	22 ± 0,3	19 ±3,6	3,8 ± 3,6

Tableau 14. Pourcentage d'inhibition de prolifération des U87 48h après traitement. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM.

La comparaison des résultats obtenus sur ces différentes lignées nous a conduit à choisir le modèle cellulaire le plus adapté pour la suite des expériences de caractérisation des modulateurs allostériques.

Les A549 issues d'une lignée cellulaire dérivée d'un cancer du poumon NSCLC montrent une réponse très marquée aux différents traitements avec les inhibiteurs. Le pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire, suite à un traitement de 10 µM avec les molécules, est le plus élevé dans les A549 par rapport aux lignées MCF7, U87 ou A375. De plus, l'implication de CDK5 dans le développement du cancer du poumon, fait de cette kinase une cible thérapeutique prometteuse (Liu *et al.*, 2011; Demelash *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2018). Outre une réponse nette aux traitements sur la prolifération cellulaire, la lignée A549 constitue un modèle très utilisé au sein de notre équipe. Notre laboratoire s'intéresse à la détection de biomarqueurs et au ciblage thérapeutique des CDKs dans les cancers et plus particulièrement au cancer du poumon (Pellerano *et al.*, 2019; Bouclier *et al.*, 2020).

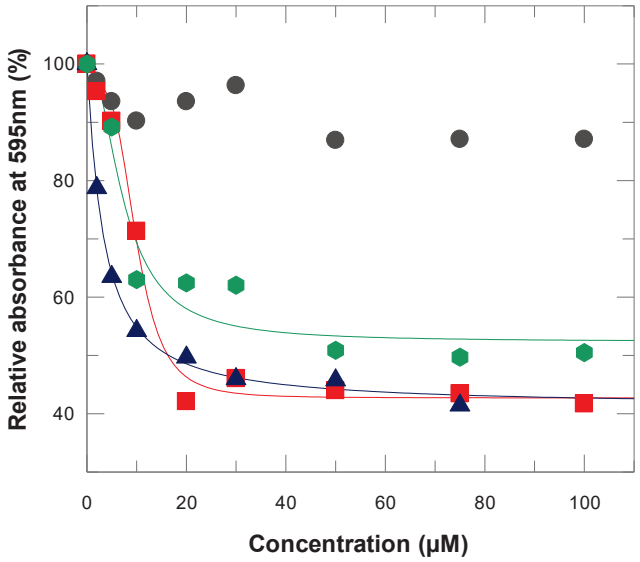
IV. Caractérisation des modulateurs allostériques de CDK5 dans les A549, une lignée dérivée du cancer du poumon

1. Effets de l'éthavérine et de la papavérine sur la prolifération cellulaire des A549

La deuxième partie des résultats s'est effectuée sur la lignée cellulaire A549 afin d'approfondir notre étude sur la caractérisation de l'éthavérine et de la papavérine identifiées comme modulateurs allostériques de CDK5.

a. Détermination de l'IC_{50}

Premièrement, l'IC_{50} des composés a été déterminé à partir d'un test de prolifération cellulaire par Crystal Violet sur la lignée cellulaire d'A549. Les cellules ont été cultivées en plaque 96-puits et traitées avec la Roscovitine, l'éthavérine, la papavérine à différentes concentrations de 0 à 100 µM pendant 24 heures.



Compound	*IC50 (µM)*
Roscovitine	9,10 ± 1,89
Ethaverin	10,62 ± 5,35
Papaverin	8,03 ± 3

Figure 41. Mesure de l'IC_{50} pour la Roscovitine, l'éthavérine et la papavérine.

La mesure de l'absorbance relative mesurée à 595 nm permet d'obtenir des points correspondant à la quantité de cellules vivantes après traitement à une concentration croissantes en inhibiteurs. A l'aide du logiciel Grafit7 (Erithacus Software), il est possible de tracer une courbe et de déterminer l'IC_{50} des composés à partir de l'équation suivante :

$$y = \frac{Range}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^{s}} + background$$

où « Range » correspond à l'absorbance maximale, x la concentration en inhibiteur, s le facteur de pente et « background » à la limite d'absorbance minimale.

Équation 2. Equation permettant de définir l'IC_{50} d'un composé.

Les mesures d'IC50 *in vitro* mesurées sur l'inhibition de la prolifération d'A549 pour la Roscovitine, l'éthavérine et la papavérine sont respectivement de 9,10µM ± 1,89µM, 10,62µM ± 5,35µM et 8,03µM ± 3µM. Ces valeurs ont été obtenues à partir de 3 expériences indépendantes. Les concentrations d'IC_{50} retenues pour la suite des expérimentations sont : 9 µM pour la Roscovitine, 11 µM pour l'éthavérine et 8 µM pour la papavérine.

b. Stratégie d'inhibition par combinaison des composés allostériques avec la Roscovitine, inhibiteur ATP-compétitif.

A la suite de cette première expérience, nous avons décidé d'étudier l'effet de traitement combinatoire. La combinaison de composés est une stratégie intéressante dans les traitements anti-cancéreux offrant des avantages que le mono-traitement ne peut atteindre. Le principal inconvénient des monothérapies pour le traitement des cancers est la capacité des cellules tumorales à développer une résistance face au traitement (Bhatia, Bhumika and Das, 2020). La combinaison de différents composés est une solution pour prévenir l'apparition de ce phénomène de résistance puisque les voies moléculaires ciblées peuvent être différentes (Mokhtari *et al.*, 2017). De plus, l'utilisation conjointe de deux composés conduit parfois à une synergie d'inhibition permettant de réduire les doses utilisées normalement lors des

monothérapies (Mokhtari *et al.*, 2017; Bhatia, Bhumika and Das, 2020). En effet, les traitements ciblant les CDKs actuellement utilisés contre le cancer sont des composés ciblant la poche de liaison à l'ATP. Ces composés présentent de nombreux inconvénients, d'où la nécessité de développer une stratégie nouvelle (Abate *et al.*, 2013; Asghar *et al.*, 2015b; Herrera-Abreu *et al.*, 2016; Haines *et al.*, 2018). Notre équipe a déjà développé avec succès une stratégie de ciblage double de CDK4 *in vivo* utilisant un inhibiteur ATP-compétitif (Abemaciclib), et un peptide dérivé de l'interface majeure de CDK4 avec son partenaire cycline D (Bouclier *et al.*, 2020).

La méthode de coloration au Crystal Violet a été utilisée comme lors des précédents tests de prolifération. Les cellules A549 ont été cultivées en plaque 96-puits, puis traitées avec différentes concentrations de composés allostériques. correspondant à ½ IC_{50}, l'IC_{50} ou 2 fois l'IC_{50} de l'éthavérine ou de la papavérine pour cette lignée cellulaire. Les traitements incluant de la Roscovitine ont été réalisés à une concentration égale à son IC_{50} (9 µM) déterminée sur la lignée A549.

i. Combinaison Roscovitine-Ethavérine

Nous pouvons remarquer que 72h après traitement à l'éthavérine, l'inhibition est 2 fois plus importante entre ½ IC_{50} et l'IC_{50} et 1,3 fois entre l'IC_{50} et 2 fois l'IC_{50}. Le traitement à 9 µM de Roscovitine (IC_{50}) montre une inhibition après 72h de 53% ± 2,1%, semblable à celle mesurée à 11 µM (IC_{50}) d'éthavérine (58,1% ± 2,5%). Les traitements combinatoires Roscovitine-Ethavérine présentent des taux d'inhibition très élevés dès 24h après traitement. Ils sont en moyenne 1,5 fois plus efficaces que les mono-traitements après 24h et 1,65 fois après 72h. 72h après traitement, l'inhibition dépasse les 90% pour les conditions associant la Roscovitine avec 9 µM ou 22 µM d'éthavérine. Il est également intéressant d'observer une similarité d'inhibition entre les trois conditions de traitement combinatoire.

Nous constatons un effet additif lors de la combinaison des deux composés puisque les valeurs d'inhibition observées en combinatoire sont équivalentes à la somme de celles en mono-traitement.

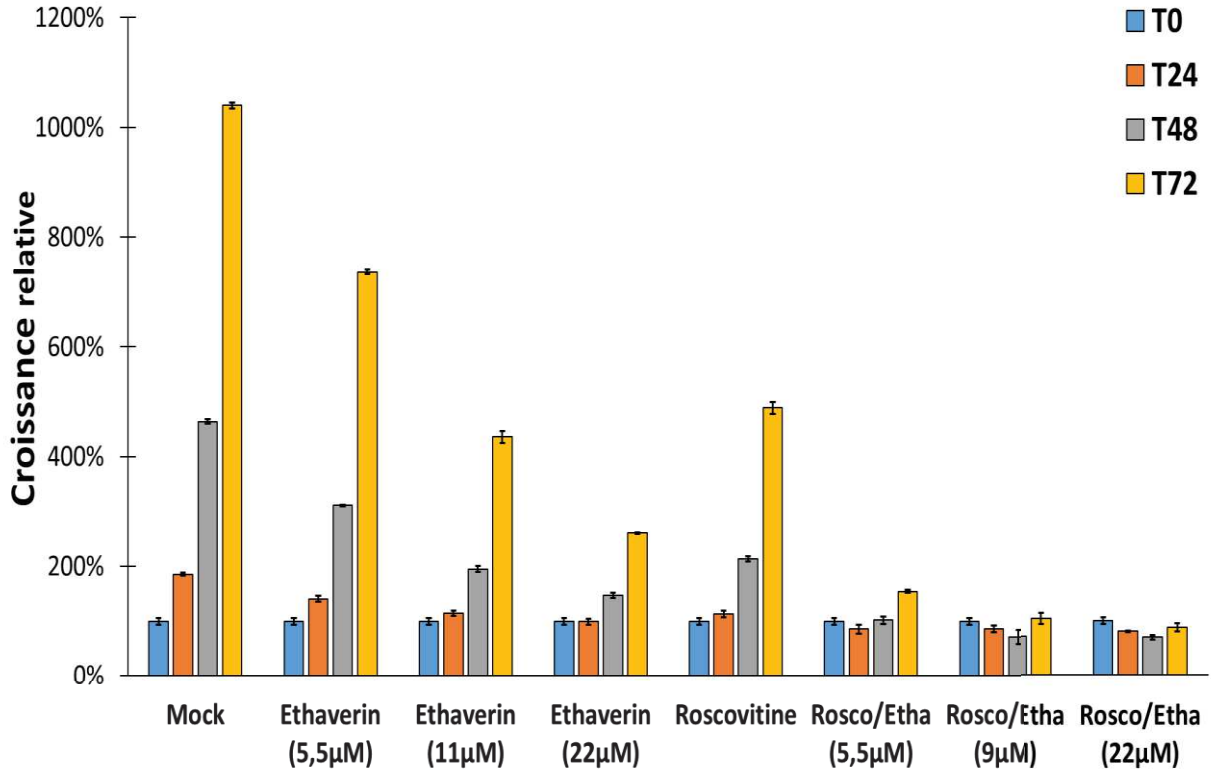


Figure 42. Expérience de prolifération cellulaire des A549 après traitement combinatoire Roscovitine-Ethavérine.

Traitements	*24h Proliferation (%)*	*48h Proliferation (%)*	*72h Proliferation (%)*
Mock	185,7 ± 2,3	463 ± 4	1035,9 ± 5,1
Ethavérine (5,5 µM)	140,4 ± 5,3	310,8 ± 1,8	736,8 ± 4,6
Ethavérine (11 µM)	113,9 ± 4,7	194,9 ± 5,2	436 ± 10,7
Ethavérine (22 µM)	99,1 ± 5,2	146,9 ± 4,7	260,7 ± 1,3
Roscovitine	113,6 ± 6,1	213,9 ± 4,8	488,6 ± 10,3
Rosco/Etha (5,5 µM)	85,8 ± 8	101,8 ± 6,4	154,4 ± 3,3
Rosco/Etha (11 µM)	85,4 ± 6,3	70,9 ± 12,4	103,2 ± 10,1
Rosco/Etha (22 µM)	80,1 ± 1,3	69,2 ± 3,9	87,2 ± 7,6

Tableau 15. Pourcentage de prolifération des A549 après traitements croissants à l'éthavérine. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM.

Traitements	*24h Inhibition (%)*	*48h Inhibition (%)*	*72h Inhibition (%)*
Ethavérine (5,5µM)	24,4 ± 3,8	33 ± 0,6	29,1 ± 0,6
Ethavérine (11 µM)	38,7 ± 4,1	58 ± 2,7	58,1 ± 2,5
Ethavérine (22 µM)	46,6 ± 5,3	68,3 ± 3,2	74,9 ± 0,5
Roscovitine	38,8 ± 5,4	53,9 ± 2,3	53 ± 2,1
Rosco/Etha (5,5 µM)	53,8 ± 9,3	78,1 ± 6,3	85,6 ± 2,2
Rosco/Etha (11 µM)	54 ± 7,3	84,7 ± 17,5	90,1 ± 9,8
Rosco/Etha (22 µM)	56,9 ± 1,6	85,1 ± 5,6	91,6 ± 8,8

Tableau 16. Pourcentage d'inhibition de prolifération des A549 après traitements croissants à l'éthavérine. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM.

ii. Combinaison Roscovitine-Papavérine

Les expériences de prolifération avec un traitement alliant la Roscovitine à la papavérine, présentent globalement des résultats similaires à ceux observés pour l'éthavérine. Comme pour le traitement à l'éthavérine en mono-traitement, l'inhibition 72h après traitement à la papavérine montre une inhibition 2 fois plus importante entre ½ IC_{50} et l'IC_{50} et 1,3 fois entre l'IC_{50} et 2 fois l'IC_{50}. L'inhibition est donc proportionnelle lors des traitements en mono-traitement que ce soit avec l'éthavérine ou la papavérine. Néanmoins l'inhibition de prolifération des A549 est légèrement plus faible lors du traitement à la papavérine. En comparant l'inhibition 72h après traitement à concentration relative d'IC_{50}, l'éthavérine est environ 1,2 fois plus efficace que la papavérine.

Nous trouvons également un meilleur taux d'inhibition lors des traitements combinant la Roscovitine à la papavérine dont le taux d'inhibition après 72h est en moyenne 1,65 fois

supérieur aux traitement en mono-traitement. Les traitements combinatoires Roscovitine-Papavérine engendrent également un effet additif sur l'inhibition de prolifération cellulaire.

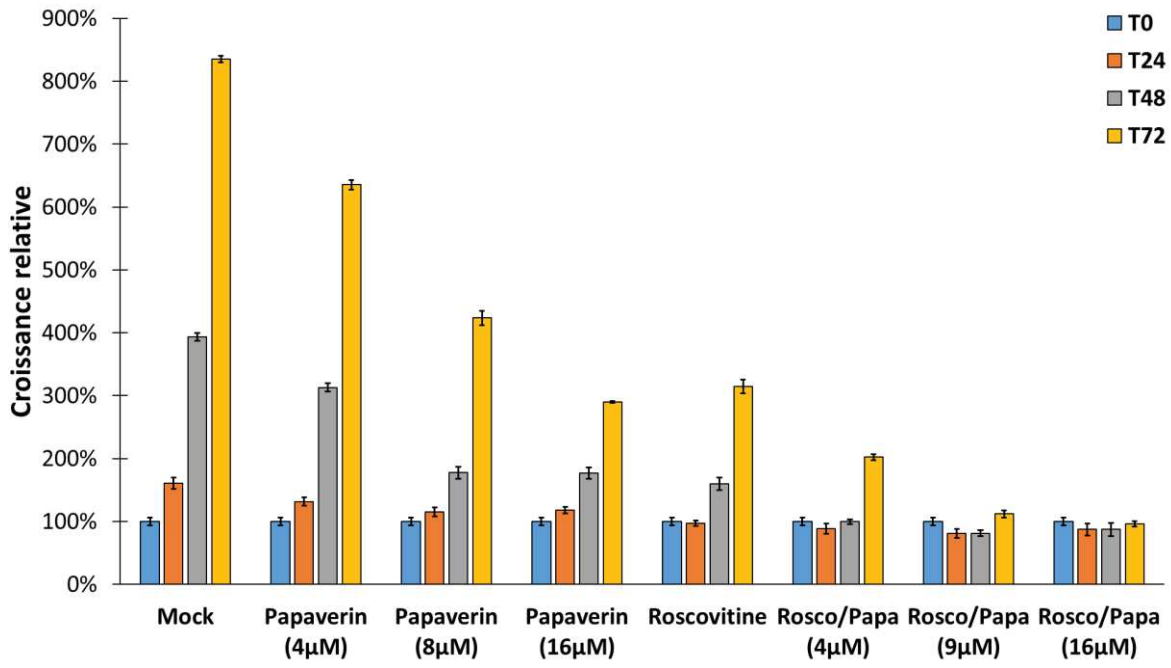


Figure 43. Expérience de prolifération cellulaire des A549 après traitement combinatoire Roscovitine-Papavérine.

Traitements	*24h Proliferation (%)*	*48h Proliferation (%)*	*72h Proliferation (%)*
Mock	160,8 ± 9,2	393,5 ± 6,4	835,6 ± 5,4
Papavérine (4 µM)	131,8 ± 6,6	312,9 ± 6,6	635,4 ± 7,3
Papavérine (8 µM)	115,2 ± 7,5	177,4 ± 9,7	423,5 ± 11,2
Papavérine (16 µM)	118 ± 5,1	177,1 ± 9,1	289,8 ± 1,6
Roscovitine	97 ± 4,4	160 ± 9,8	314,6 ± 10,8
Rosco/Papa (4 µM)	88,6 ± 8,1	99,8 ± 3,8	202,5 ± 4,8
Rosco/Papa (8 µM)	80,7 ± 7	81,4 ± 4,6	112 ± 5,8
Rosco/Papa (16 µM)	87,2 ± 9,8	87,5 ± 10,3	95,8 ± 4,3

Tableau 17. Pourcentage de prolifération des A549 après traitements croissants à la papavérine. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM.

Traitements	*24h Inhibition (%)*	*48h Inhibition (%)*	*72h Inhibition (%)*
Papavérine (4 µM)	18 ± 5	20,5 ± 2,1	24 ± 1,1
Papavérine (8 µM)	28,4 ± 6,5	54,9 ± 5,5	49,3 ± 2,7
Papavérine (16 µM)	26,6 ± 4,3	55 ± 5,1	65,3 ± 0,5
Roscovitine	39,7 ± 4,5	59,3 ± 6,1	62,4 ± 3,4
Rosco/Papa (4 µM)	45 ± 9,2	74,6 ± 3,8	75,8 ± 2,4
Rosco/Papa (8 µM)	49,8 ± 8,6	79,3 ± 5,6	86,6 ± 5,2
Rosco/Papa (16 µM)	45,8 ± 11,3	77,8 ± 11,8	88,5 ± 4,5

Tableau 18. Pourcentage d'inhibition de prolifération des A549 après traitements croissants à la papavérine. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM.

Ces expériences ont permis d'observer un effet additif sur l'inhibition de prolifération cellulaire lorsque l'éthavérine ou la papavérine sont combinées à la Roscovitine. Nous avons pu remarquer que les différentes combinaisons testées permettaient d'obtenir une inhibition 72h après traitements assez similaires entre elles avec des taux variant entre 75,8% ± 2,4% pour la condition la plus faible, et 91,6% ± 8,8% pour la plus élevée. L'association d'un inhibiteur ATP-compétitif à concentration d'IC_{50} avec une concentration croissante d'un des composés allostériques provoque un effet antiprolifératif important dès le début du traitement. De plus, la molécule allostérique exerce un effet inhibiteur important à une concentration inférieure à son IC_{50} lorsqu'elle est combinée à la Roscovitine. Les résultats obtenus révèlent que le traitement simultané avec deux molécules ne visant pas la même poche de la kinase permet d'amplifier l'efficacité de l'inhibition comparé à un mono-traitement.

c. Stratégie d'inhibition par traitements séquentiels

Dans la continuité des expériences de prolifération sur la lignée A549, nous avons exploré l'effet de traitements séquentiel sur l'inhibition de la prolifération cellulaire. Les cellules ont été cultivées en plaque 96-puits et les traitements ont été effectués à la concentration de l'IC_{50} déterminée initialement. Les traitements ont donc été réalisés aux concentrations suivantes : 9 µM pour la Roscovitine, 11 µM pour l'éthavérine et 8 µM pour la papavérine. Concernant les traitements combinatoires, les concentrations utilisées sont identiques à celles des traitements « en mono-traitement ». Les traitements séquentiels ont été effectués toutes les 24 heures. Pour plus de clarté, les résultats sont présentés par tranche horaire afin de mieux apprécier la comparaison entre les différentes conditions de traitements. Les conditions portant le suffixe « _Seq » représentent les cellules d'A549 ayant été traitées toutes les 24 heures.

i. Inhibition 24h après traitements

Les résultats de prolifération cellulaire obtenus pour les mono-traitements et les traitements combinatoires sont identiques à ceux obtenus précédemment (IV.1.b.i et IV.1.b.ii) lors des conditions de traitement à l'IC_{50}. Nous observons une inhibition 24h après traitement qui est similaire entre les mono-traitements (environ 29% d'inhibition) et les traitements combinatoires (environ 45% d'inhibition). Les conditions de traitement séquentiel montrent des taux d'inhibition équivalents à leurs conditions de traitement unique car les traitements à T24 sont identiques. Les cellules recevant un traitement séquentiel sont à nouveaux traitées à partir de T24.

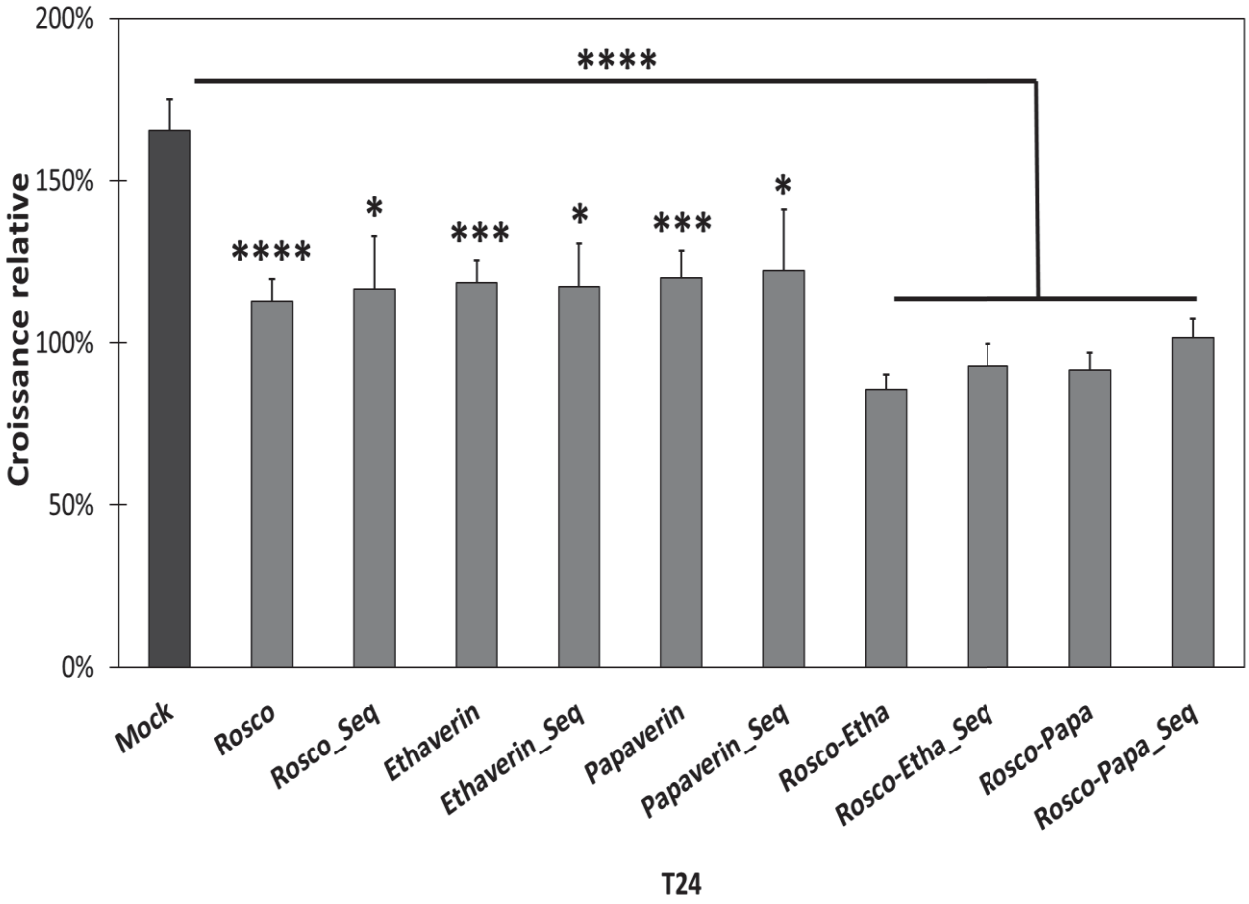


Figure 44. Expérience de prolifération cellulaire des A549 24h après traitements combinatoires et séquentiels. Différence significative : *p < 0.0332, ***p <0.002 et ****p<0.0001.

Traitement	24h Prolifération (%)	24h Inhibition (%)
Mock	165,3 ± 9,6	0
Roscovitine	112,7 ± 6,9	31,8 ± 6,1
Roscovitine_Seq	116,5 ± 16,3	29,6 ± 14
Ethavérine	118,5 ± 6,9	28,3 ± 5,8
Ethavérine_Seq	117,2 ± 13,3	29,1 ± 11,3
Papavérine	120 ± 8,4	27,4 ± 7
Papavérine_Seq	122,3 ± 18,7	26,0 ± 15,3
Rosco-Etha	85,5 ± 4,6	48,3 ± 5,3
Rosco-Etha_Seq	92,8 ± 6,8	43,8 ± 7,4
Rosco-Papavérine	91,5 ± 5,5	44,6 ± 6
Rosco-Papa_Seq	101,5 ± 6	38,6 ± 6

Tableau 19. Prolifération et inhibition relative des A549 24h après traitement. % de prolifération est relatif au T0 et le % d'inhibition est relatif au Mock. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM.

ii. Inhibition 48h après traitements

Nous pouvons commencer à observer des différences entre les traitements uniques et séquentiels. L'effet inhibiteur de la prolifération est plus marqué lorsque les cellules ont été traitées 24h après le traitement initial. L'inhibition après traitement séquentiel est le plus marqué pour la Roscovitine où elle y est 1,5 fois plus importante par rapport au traitement unique.

En moyenne, les traitements séquentiels sont 1,37 fois plus efficaces en mono-traitement contre 1,13 fois pour les traitements combinatoires.

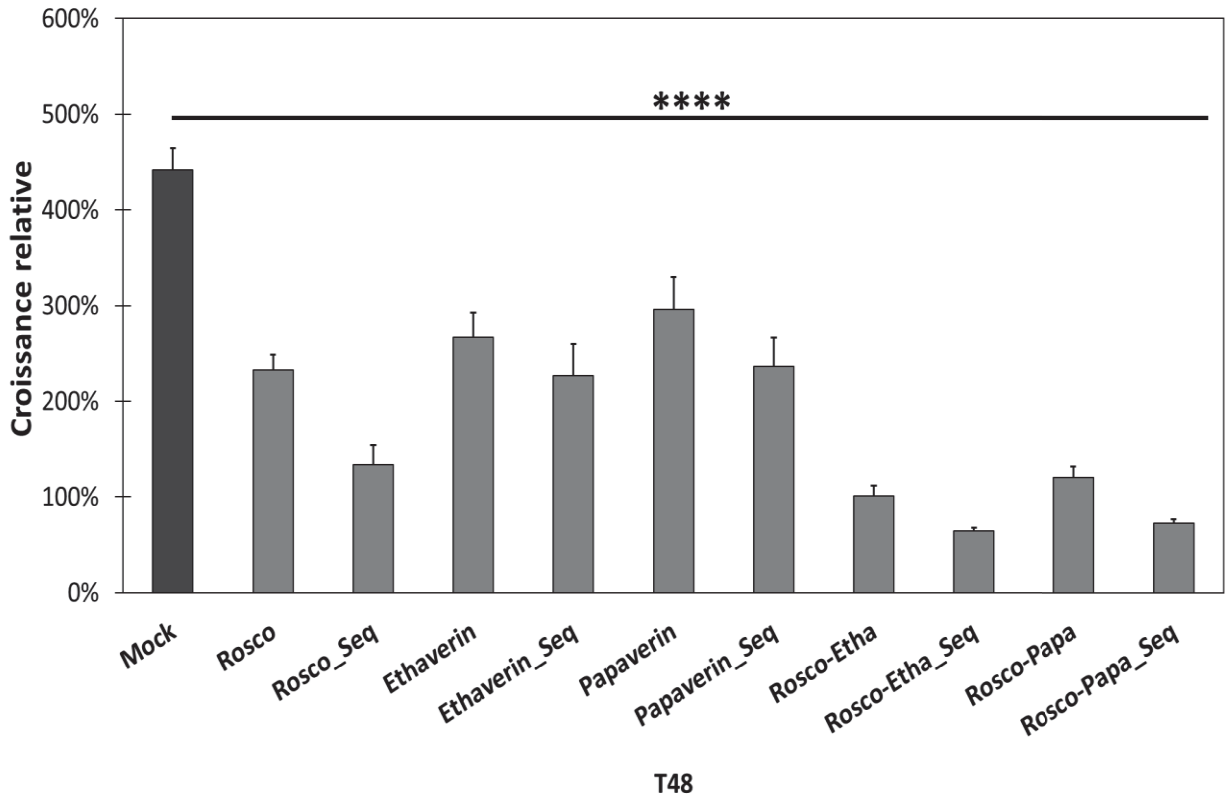


Figure 45. Expérience de prolifération cellulaire des A549 48h après traitements combinatoires et séquentiels. Différence significative : ****p<0.0001.

Traitements	48h Proliferation (%)	48h Inhibition (%)
Mock	441,7 ± 23,1	0
Roscovitine	232,6 ± 15,8	47,3 ± 6,8
Roscovitine_Seq	134 ± 20	69,7 ± 14,9
Ethavérine	267,1 ± 25,3	39,5 ± 9,5
Ethavérine_Seq	227 ± 33	48,6 ± 14,5
Papavérine	296,1 ± 33,8	33,0 ± 11,4
Papavérine_Seq	296,1 ± 33,8	46,4 ± 12,6
Rosco-Etha	101,1 ± 10,4	77,1 ± 10,2
Rosco-Etha_Seq	65 ± 2,8	85,3 ± 4,3
Rosco-Papavérine	120,2 ± 11,9	72,8 ± 9,9
Rosco-Papa_Seq	72,9 ± 3,8	83,5 ± 5,2

Tableau 20. Prolifération et inhibition relative des A549 48h après traitement. % de prolifération est relatif au T0 et le % d'inhibition est relatif au Mock. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM.

iii. Inhibition 72h après traitements

La même tendance que celle observée à T48 se retrouve ci-dessous où les traitements séquentiels sont en moyenne 1,22 plus efficaces pour les mono-traitements contre 1,08 fois pour les combinatoires. A l'exception de la papavérine dont l'inhibition à 72h est de 40,9% ± 10,2% en mono-traitement et de 41,4% ± 13,4% en séquentiel, les traitements séquentiels

toutes les 24 heures présentent un effet inhibiteur plus important en comparaison au traitement unique.

Néanmoins, l'efficacité d'inhibition de prolifération est nettement plus faible lorsque les traitements combinatoires sont séquentiels. L'utilisation d'un traitement unique en combinatoire apparaît comme suffisant pour atteindre un effet d'inhibition de la prolifération efficace à plus de 80%. Le fait de traiter en combinatoire les cellules A549 à intervalles réguliers de 24h ne permet pas d'améliorer grandement l'efficacité du traitement.

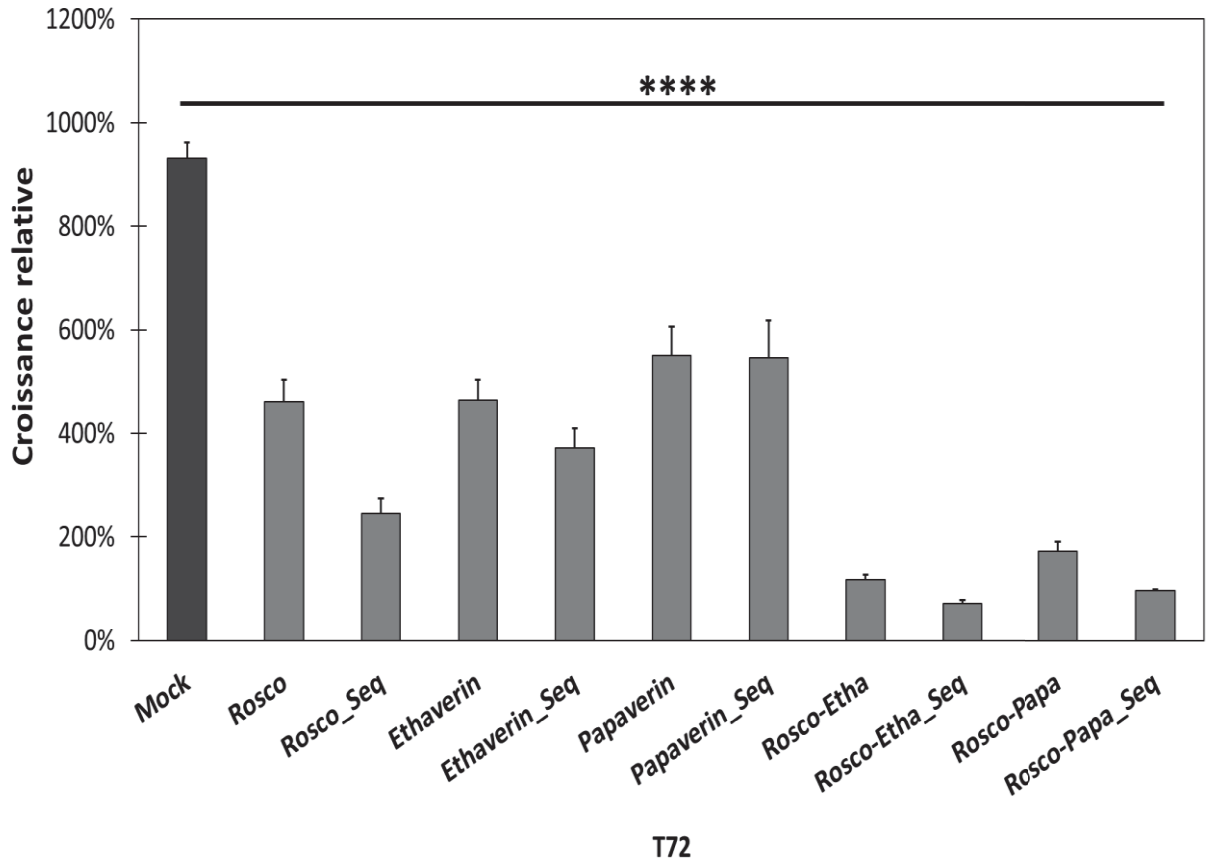


Figure 46. Expérience de prolifération cellulaire des A549 72h après traitements combinatoires et séquentiels. Différence significative : ****p<0.0001.

Traitements	72h Proliferation (%)	72h Inhibition (%)
Mock	931,7 ± 29,7	0
Roscovitine	461,5 ± 41,5	50,5 ± 9
Roscovitine_Seq	244,6 ± 29,9	73,7 ± 12,2
Ethavérine	463,9 ± 39,7	50,2 ± 8,6
Ethavérine_Seq	371,1 ± 39,1	60,2 ± 10,5
Papavérine	550,5 ± 56,1	40,9 ± 10,2
Papavérine_Seq	545,7 ± 73	41,4 ± 13,4
Rosco-Etha	116,6 ± 9,7	87,5 ± 8,4
Rosco-Etha_Seq	71,6 ± 6,2	92,3 ± 8,6
Rosco-Papavérine	171,7 ± 19,5	81,6 ± 11,4
Rosco-Papa_Seq	95,9 ± 3	89,7 ± 3,2

Tableau 21. Prolifération et inhibition relative des A549 72h après traitement. % de prolifération est relatif au T0 et le % d'inhibition est relatif au Mock. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM.

2. Etudes de morphologie cellulaire des A549 et localisation subcellulaire de CDK5

Des expériences de microscopie à épifluorescence ont été réalisées dans l'objectif de déterminer l'impact potentiel des traitements sur la morphologie cellulaire mais également pour étudier la localisation subcellulaire de CDK5. Les expériences de prolifération cellulaire ont montré un effet inhibiteur significatif des molécules. De plus, les résultats obtenus à partir des expériences de SEC sur les U87 ont montré un effet sur la présence de CDK5 sous forme monomérique uniquement 24h après traitement.

L'ensemble de ces résultats nous a conduit à émettre l'hypothèse que les molécules pourraient impacter la localisation subcellulaire de CDK5 et possiblement affecter la morphologie cellulaire. En effet CDK5 a un rôle prépondérant sur la cytoarchitecture par la régulation de substrats impliqués dans l'association de l'actine et des microtubules, essentiels pour la morphologie cellulaire (Humbert, Dhavan and Tsai, 2000; Kimura, Ishiguro and Hisanaga, 2014; Shah and Rossie, 2017; Sharma *et al.*, 2020). L'inhibition de CDK5 pourrait donc avoir des effets délétères sur la structure des cellules, comme c'est le cas dans le SNC où son inhibition altère le développement cérébral (Ohshima *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2001).

Des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées sur des cellules A549 traitées à la Roscovitine, l'éthavérine et la papavérine. Les traitements uniques ont été réalisés à une concentration de 10µM et les cellules ont été fixées après 24h. Ces expériences ont été réalisées avant la série d'expériences de prolifération utilisant les valeurs d'IC_{50}. Ces expériences ont été réalisées peu avant le 1er confinement de mars 2020 et n'ont pas pu être renouvelées par manque de temps.

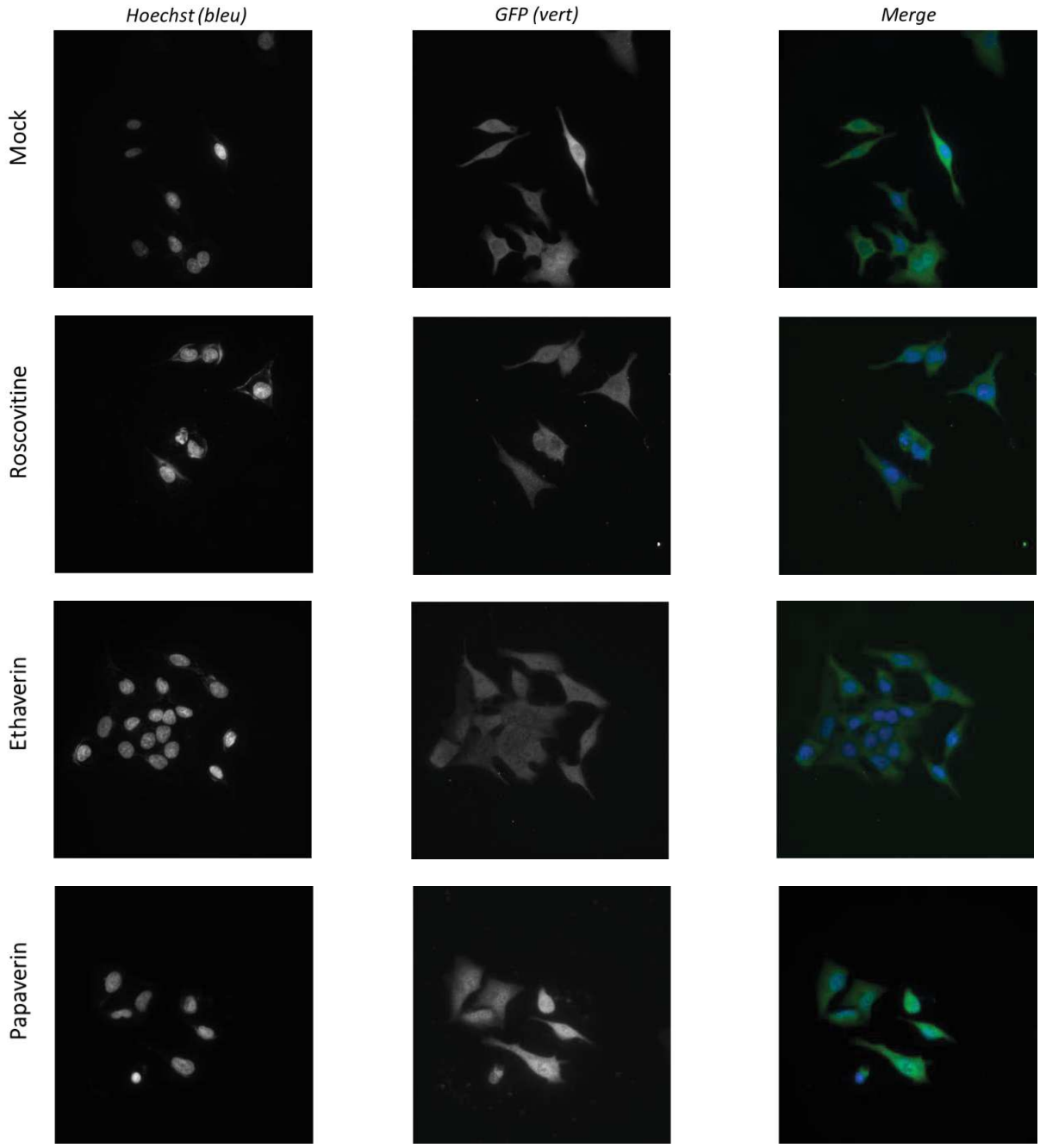


Figure 47. Immunofluorescence de cellules A549 après traitements. Traitements 10µM, coloration au Hoescht pour les noyaux (bleus) et avec le fluorochrome Alexa 488 pour CDK5 (vert).

Les « clichés » ci-dessus représentent une image type obtenue pour chaque condition de traitement. Les noyaux cellulaire ont été marqués au Hoechst qui est un intercalent de l'ADN, et CDK5 est détecté grâce à un anticorps couplé au fluorochrome Alexa 488 (absorption : 495nm et émission : 519nm).

Nous observons une répartition homogène de CDK5 dans le cytoplasme des A549 de façon commune aux différentes conditions. De plus, la morphologie des cellules n'est pas altérée quel que soit le traitement réalisé. Ces observations ne montrent aucune différence significative permettant de conclure que les molécules allostériques affectent la localisation subcellulaire de CDK5 ni la morphologie cellulaire

3. Effets des inhibiteurs de CDK5 sur la division cellulaire des A549

Malgré l'absence de résultats concluants provenant des expériences d'immunofluorescence, nous avons décidé de réaliser des expériences de vidéomicroscopie afin de suivre au cours du temps le comportement des cellules à la suite des différents traitements effectués. Les cellules A549 ont été cultivées dans des plaques 6-puits puis traitées avec un seul inhibiteur ou en combinatoire avec la Roscovitine, la papavérine ou l'éthavérine à leurs concentrations d'IC_{50}, soit 9 µM pour la Roscovitine, 11 µM pour l'éthavérine et 8 µM pour la papavérine. Les cellules en plaque 6-puits ont ensuite été placées en incubateur équipé d'un microscope inversé champ plein. L'acquisition d'images a été faite toutes les 10 minutes pendant 24h en deux phases : la 1ère correspondant entre 0h et 24h après traitement et la 2nde entre 24h et 48h après traitement.

a. *Comportement cellulaire visualisé par vidéomicroscopie à contraste de phase*

i. *Phase 0h-24h*

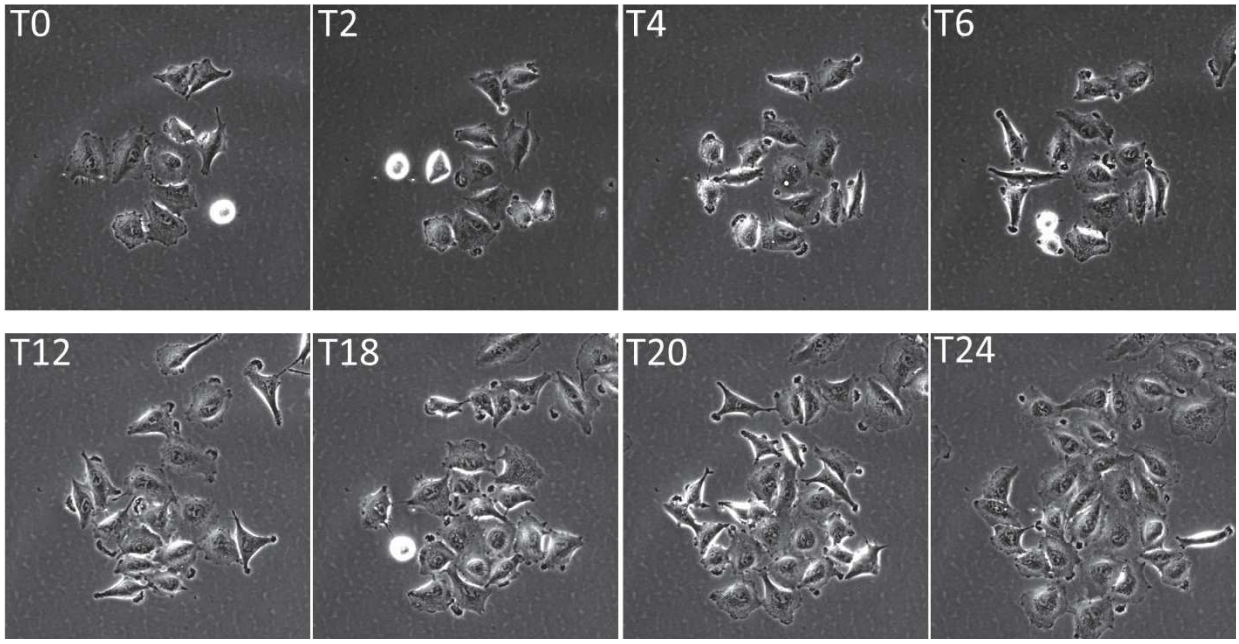


Figure 48. Clichés de cellules A549 traitées au DMSO après 0h, 2h,4h, 6h, 12h, 18h, 20h et 24h.

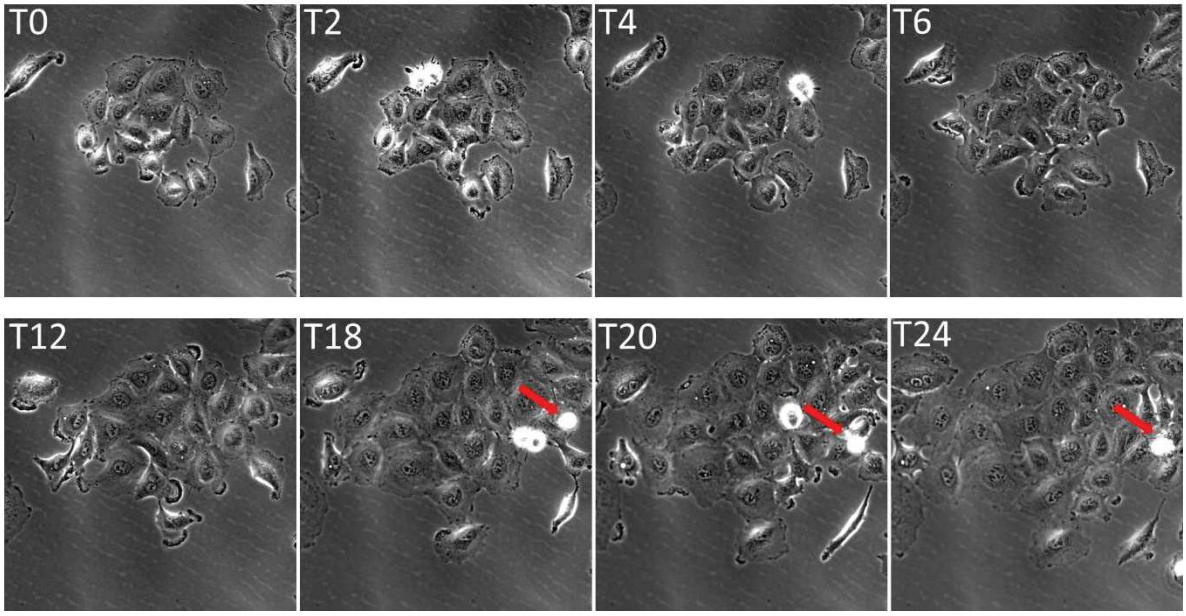


Figure 49. Clichés de cellules A549 traitées à la Roscovitine après 0h, 2h,4h, 6h, 12h, 18h, 20h et 24h. Les flèches rouges représentent des cellules mortes.

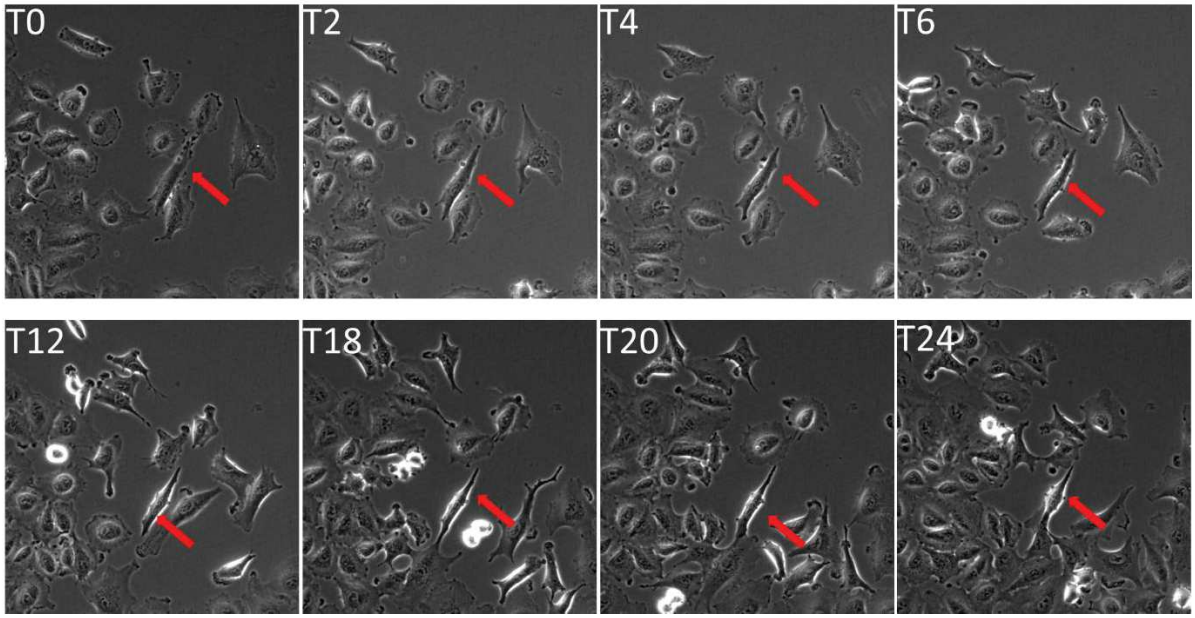


Figure 50. Clichés de cellules A549 traitées à l'éthavérine après 0h, 2h,4h, 6h, 12h, 18h, 20h et 24h. Les flèches rouges représentent la même cellule à travers toutes les images.

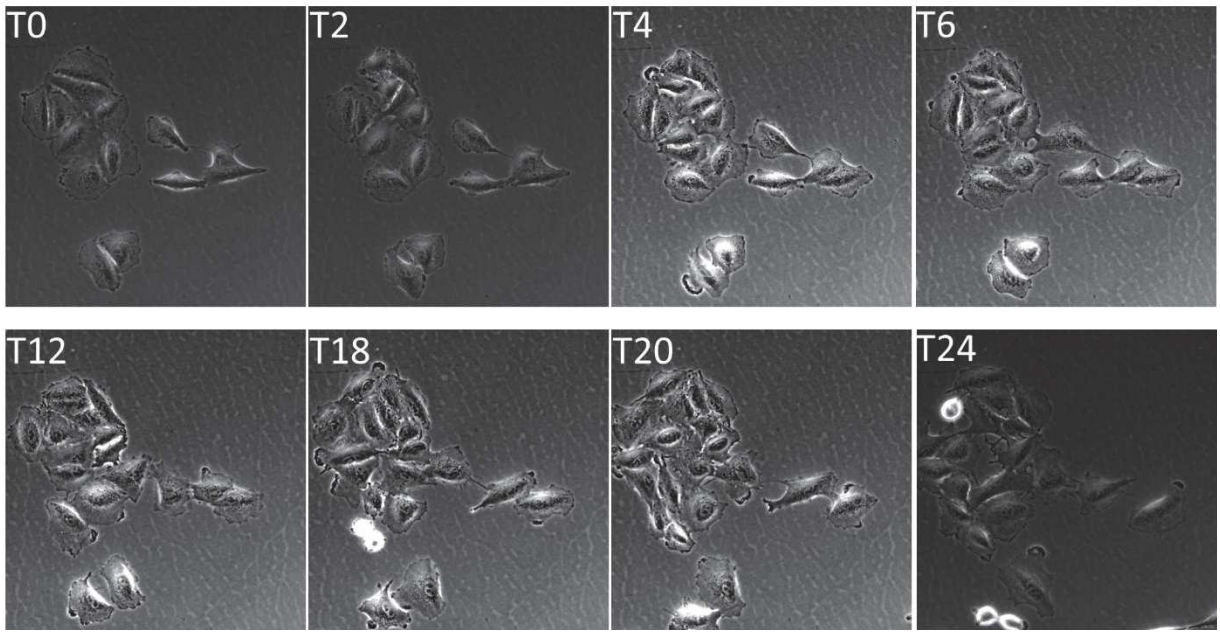


Figure 51. Clichés de cellules A549 traitées à la papavérine après 0h, 2h,4h, 6h, 12h, 18h, 20h et 24h.

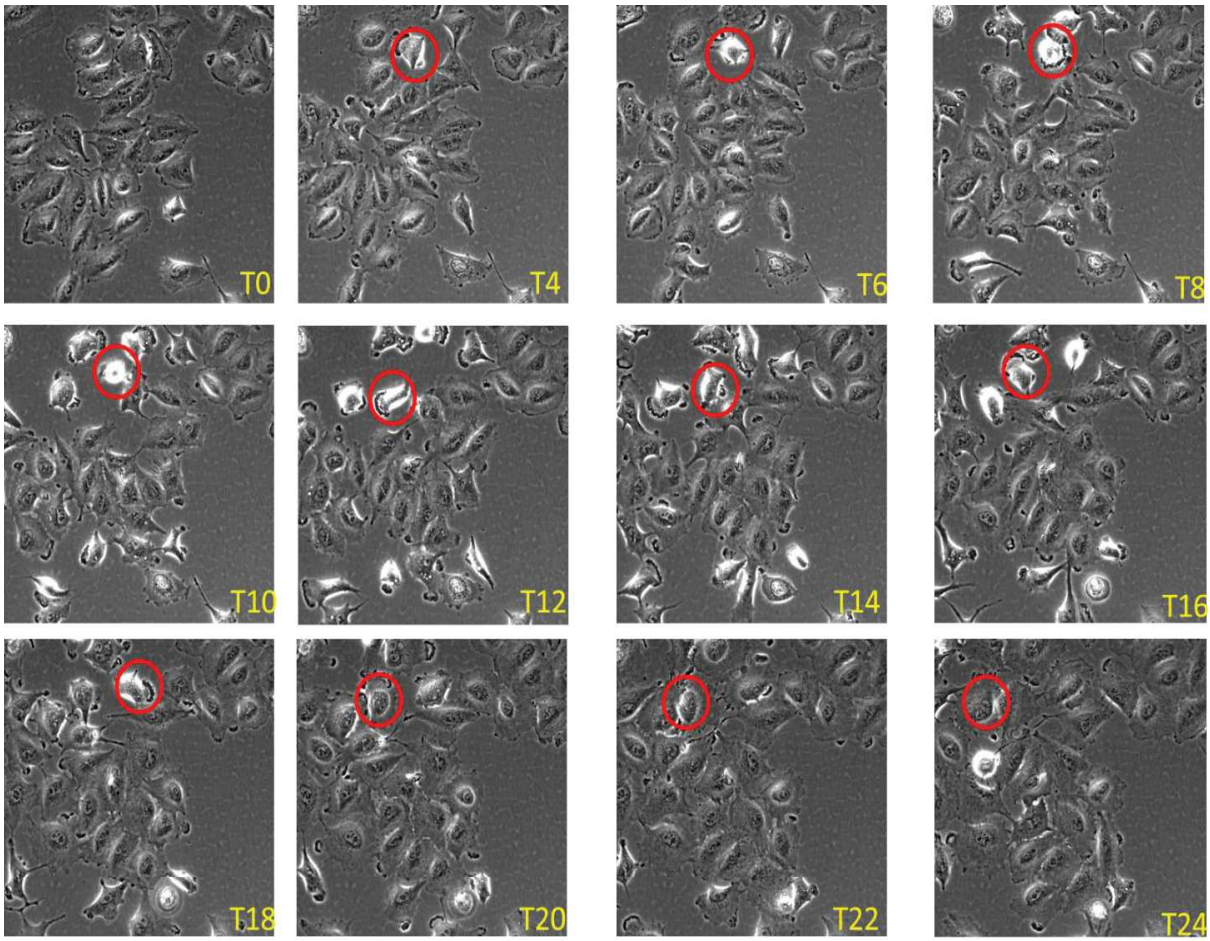


Figure 52. Clichés de cellules A549 après traitement combinatoire Roscovitine-Ethavérine après 0h, ,4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 14h, 16h, 18h, 20h, 22h et 24h. Les cercles rouges représentent la même cellule à travers toutes les images.

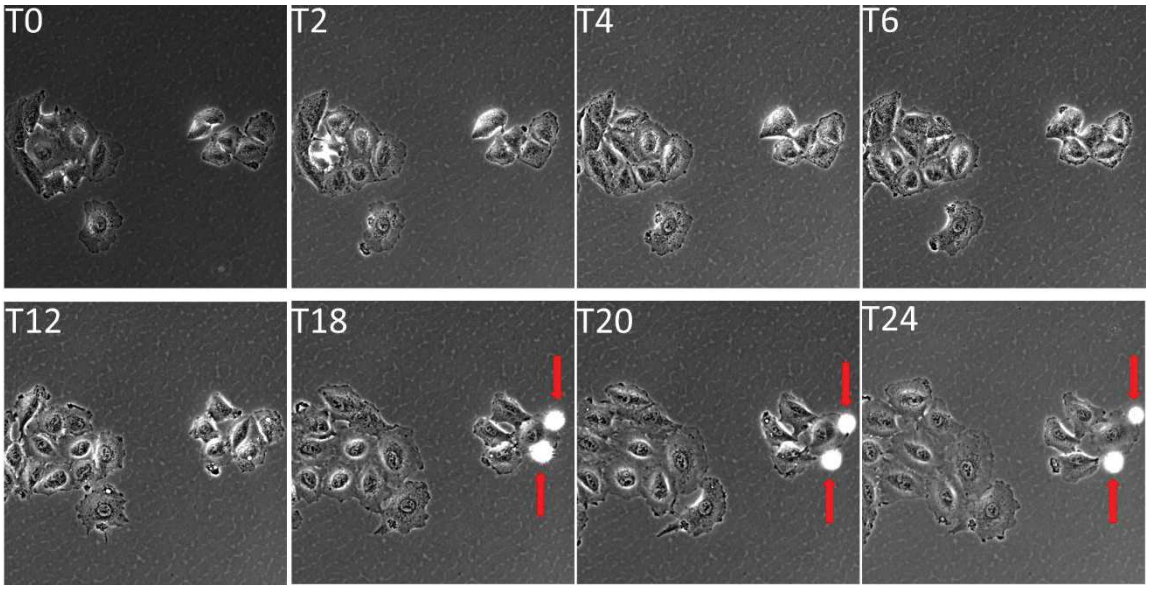


Figure 53. Clichés de cellules A549 après traitement combinatoire Roscovitine-Papavérine après 0h, 2h,4h, 6h, 12h, 18h, 20h et 24h. Les flèches rouges représentent des cellules mortes.

Nous pouvons observer quelques différences selon les conditions dans les 24h suivant les traitements. En l'absence de traitement, les cellules A549 présentent une forme légèrement étoilée (Fig.48). Les cellules s'allongent lorsqu'elles se déplacent et s'arrondissent lorsqu'elles entrent en phase de division. Le traitement à la Roscovitine entraine de la mort cellulaire, à partir de 18h de traitement environ, certaines cellules vont se décoller et flotter signifiant un phénomène d'apoptose (Fig. 49). Nous n'observons pas cela lors des mono-traitements à l'éthavérine (Fig. 50) et à la papavérine (Fig. 51). Le traitement à l'éthavérine a permis d'observer quelques cas de cellules de forme allongée restant statiques tout au long des acquisitions. Lorsque les cellules sont en mouvement, elles vont s'allonger puis se déplacer, dans ce cas certaines cellules restaient allongées mais totalement immobiles. Les traitements combinatoires ont permis d'observer de la mort cellulaire comme dans le cas d'un traitement à la Roscovitine. Nous avons également pu observer le cas de certaines cellules au comportement altéré lors du traitement Roscovitine-Ethavérine (Fig. 52). Les cellules concernées sont arrondies et se déplacent assez longuement dans une zone limitée. Ces cellules donnent l'impression de vouloir se diviser mais n'y parviennent pas. Ce comportement est représenté sur la figure 52 par des cercles rouges identifiant la même cellule pendant 24h.

ii. Phase 24h-48h

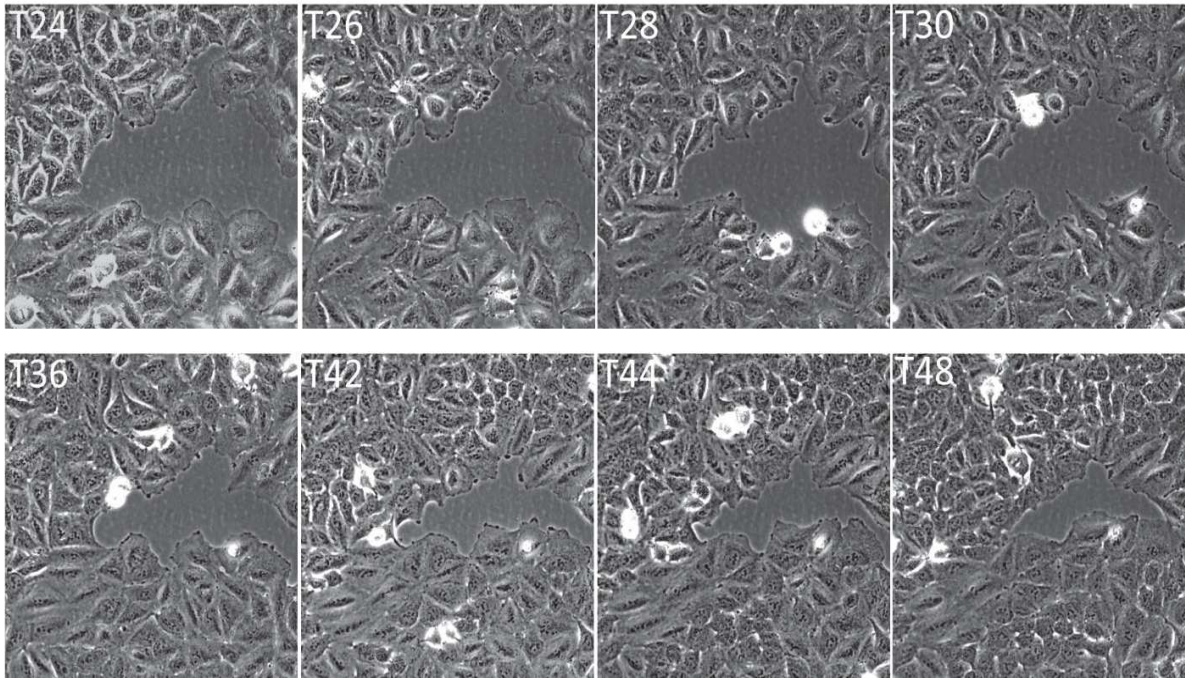


Figure 54. Clichés de cellules A549 traitées au DMSO après 24h, 26h, 28, 30h, 36h, 42h, 44h et 48h.

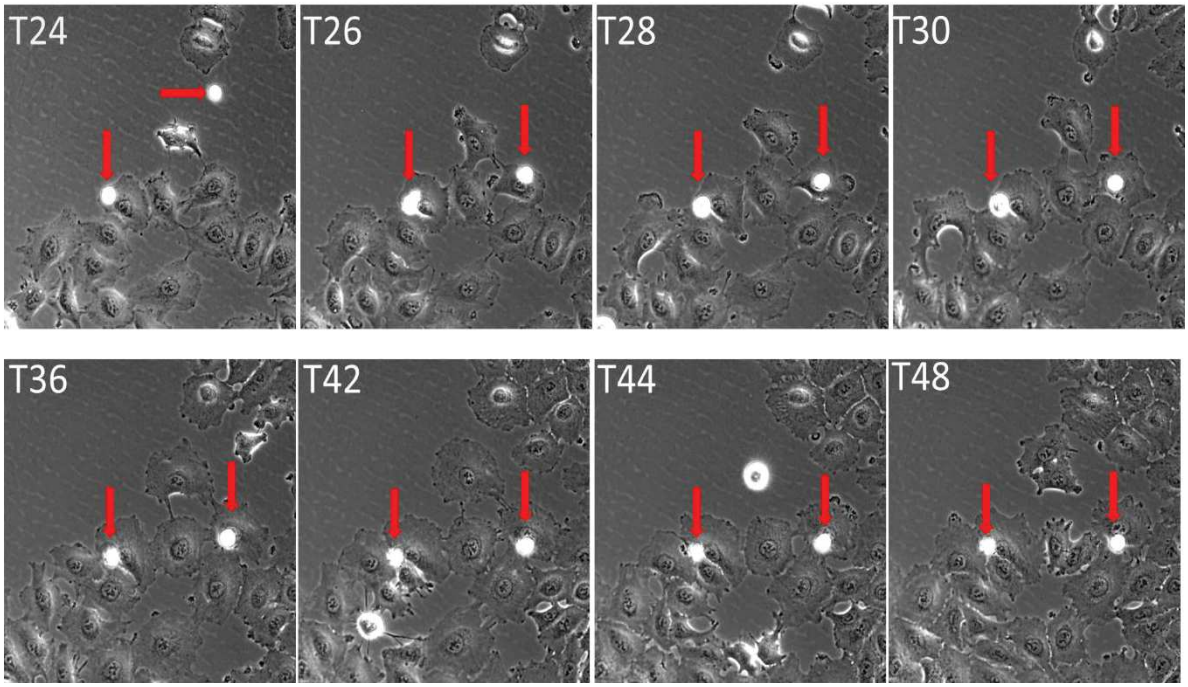


Figure 55. Clichés de cellules A549 traitées à la Roscovitine après 24h, 26h, 28, 30h, 36h, 42h, 44h et 48h. Les flèches rouges représentent des cellules mortes.

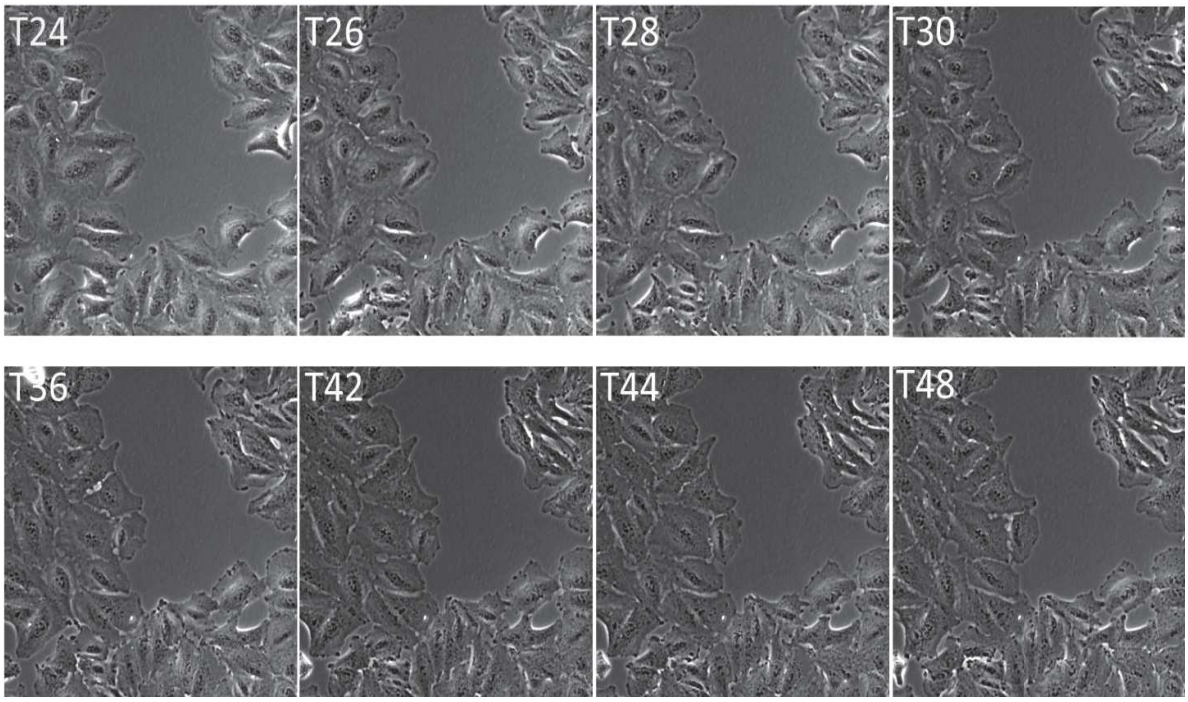


Figure 56. Clichés de cellules A549 traitées à l'éthavérine après 24h, 26h, 28, 30h, 36h, 42h, 44h et 48h.

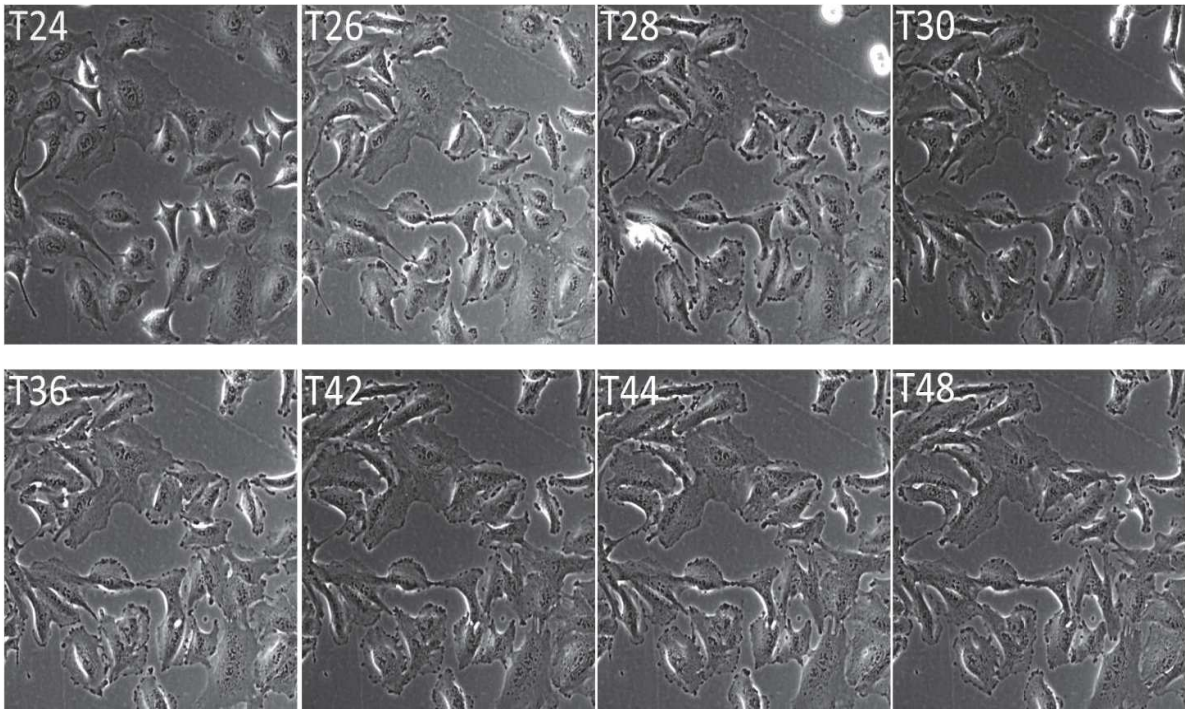


Figure 57. Clichés de cellules A549 traitées à la papavérine après 24h, 26h, 28, 30h, 36h, 42h, 44h et 48h.

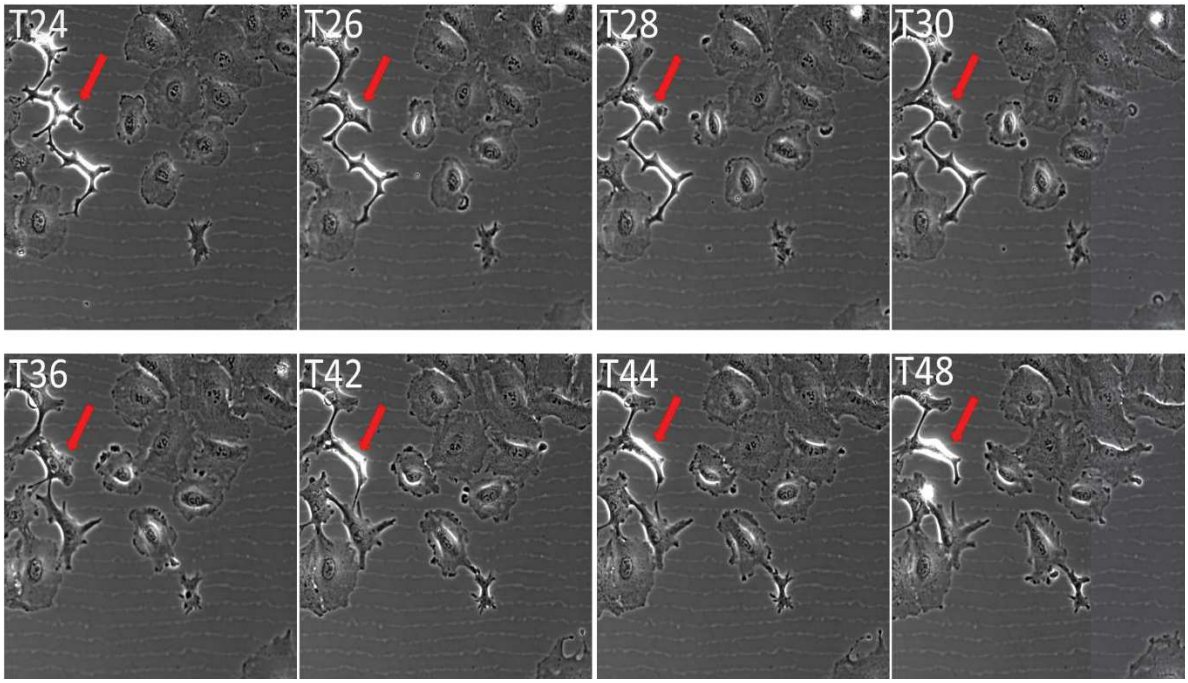


Figure 58. Clichés de cellules A549 après traitement combinatoire Roscovitine-Ethavérine après 24h, 26h, 28, 30h, 36h, 42h, 44h et 48h. Les flèches rouges représentent la même cellule à travers toutes les images.

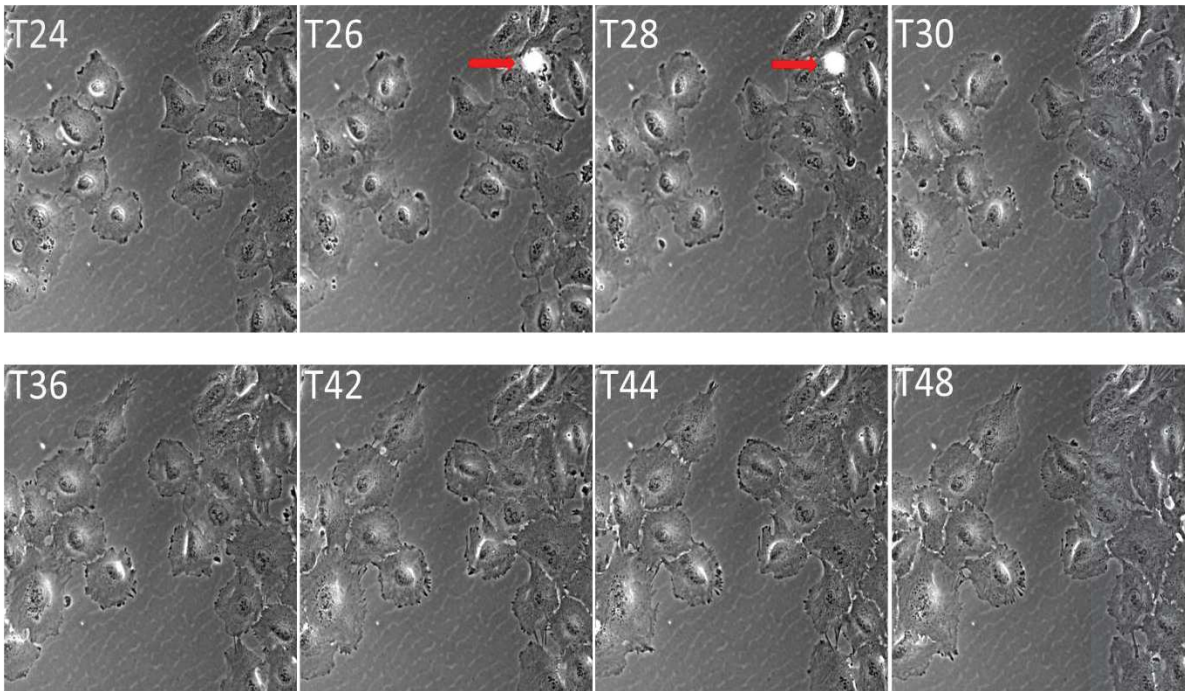


Figure 59. Clichés de cellules A549 après traitement combinatoire Roscovitine-Papavérine après 24h, 26h, 28, 30h, 36h, 42h, 44h et 48h. Les flèches rouges représentent des cellules mortes.

Les observations concernant le comportement cellulaire au cours de la seconde phase correspondant entre 24h à 48h après traitements sont semblables à celles réalisées précédemment.

Les cellules n'ayant pas été traitées ont une morphologie homogène et se divisent abondamment (Fig. 54). Nous observons dès le début des acquisitions d'images des cellules mortes après le traitement à la Roscovitine (Fig. 55), qui sont entrées en apoptose au cours des 24 premières heures suivant le traitement. Contrairement à la Roscovitine, les traitements à l'éthavérine (Fig. 56) et à la papavérine (Fig. 57) ne montrent pas de cellules mortes et nous n'observons pas de phénomène d'apoptose. Néanmoins nous remarquons que la quantité de cellules entre T24 et T48 évolue peu concernant ces trois traitements. La division cellulaire est impactée par les mono-traitements, car les composés ont un effet inhibiteur sur la division des A549. Nous retrouvons également ce phénomène dans les conditions de traitements combinatoires. Il est cependant important d'indiquer que les traitements combinatoires entrainent de la mort cellulaire. Néanmoins les clichés sélectionnés ne présentent quasiment pas de cellules mortes afin d'éviter d'observer des images saturées (Fig. 58 et 59). Le traitement Roscovitine-Ethavérine affecte la morphologie cellulaire. Comme nous pouvons le remarquer au niveau des flèches rouges sur la figure 58, ces cellules vont adopter une forme allongée et rester statiques comme si elles étaient en quiescence. Cela est similaire à ce qui a été observé entre 0h et 24h après traitement à l'éthavérine (Fig. 50), mais pas au comportement observé pour la condition Roscovitine-Ethavérine (Fig. 52). Cette observation pourrait traduire un effet de l'éthavérine sur le plus long terme que celui de la Roscovitine.

b. Inhibition du nombre de divisions cellulaires

De manière plus marquante ces expériences ont démontré un effet significatif des composés sur la division cellulaire. Le nombre de divisions cellulaires est impacté par les composés mais différemment au cours du temps.

Nous pouvons observer que la Roscovitine inhibe en moyenne de manière identique la division cellulaire entre 0h et 24h (50,3%) et 24h et 48h (49,7%). Cela n'est pas le cas pour les deux autres composés utilisés en mono-traitement. L'éthavérine et la papavérine sont 2 fois plus efficaces sur le long terme présentant des taux moyen d'inhibitions respectifs de 91,1% et 93,2% entre 24h et 48h contre 38,1% et 44,7% entre 0h et 24h après traitement. Les traitements combinatoires sont très efficaces dès le départ en présentant une moyenne d'inhibition supérieur à 80% entre 0h et 24h après traitement et supérieur à 90% entre 24h et 48h.

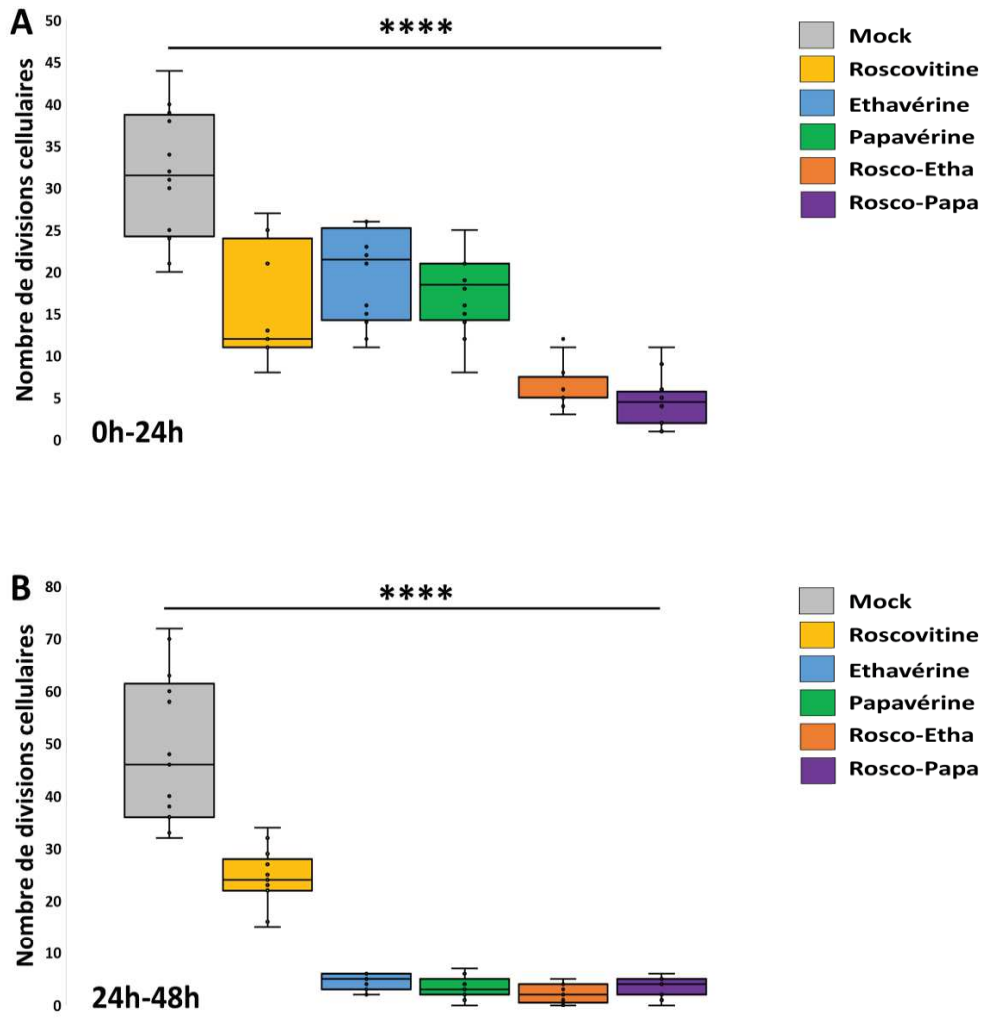


Figure 60. Boites à moustache représentant le nombre de division cellulaire d'A549 après traitement. Différence significative : ****p<0.0001.

Traitements	0h-24h Inhibition (%)	24h-48h Inhibition (%)
Roscovitine	50,3	49,7
Ethavérine	38,1	91,1
Papavérine	44,7	93,2
Rosco-Etha	80,2	95,7
Rosco-Papa	85,4	93,4

Tableau 22. Inhibition moyenne du nombre de division cellulaire d'A549 après traitement.

Ces expériences ont donc permis d'observer que le comportement des cellules pouvait être impacté par l'utilisation des molécules allostériques. Le plus caractéristique est la différence de cinétique d'inhibition des traitements sur la division cellulaire. L'inhibition de la division cellulaire entre 0h et 24h après traitement à l'éthavérine était de 38,1% et pour la papavérine de 44,7%. Les traitements combinatoires étaient deux fois plus efficaces en inhibant 80,2% et 85,4% entre 0h et 24h après traitement à la Roscovitine-Ethavérine et Roscovitine-Papavérine. Nous avons pu remarquer une efficacité considérable d'inhibition de la division cellulaire de l'éthavérine et de la papavérine entre 24h et 48h après traitement. Ces deux composés en mono-traitement ont montré des taux d'inhibition dépassant 90%, semblables aux traitements combinatoires.

Cela se distingue de la Roscovitine qui inhibe de manière identique la division cellulaire au cours du temps en induisant 50,3% d'inhibition entre 0h et 24h après traitement et 49,7% entre 24h et 48h.

Ces variations d'inhibition de la division cellulaire au cours du temps suggèrent des cinétiques d'action distinctes. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la Roscovitine reste efficace au cours du temps et inhibe de manière continue la division cellulaire, permettant tout de même aux cellules de se diviser à une concentration IC_{50}. Nous pouvons aussi interpréter cette observation en suggérant que la Roscovitine n'est efficace qu'entre 0h et 24h va inhiber 50% des cellules au cours des premières 24h. Par la suite ces cellules restent inhibées avant d'entrer en apoptose.

L'éthavérine et la papavérine vont inhiber plus efficacement la division cellulaire à plus long terme. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ces molécules vont totalement inhiber les divisions cellulaires et bloquer l'apparition de nouvelles cellules. Il est cependant également possible qu'elles aient un effet cumulatif d'inhibition au cours du temps où les cellules qui ont pu se diviser entre 0h et 24h seront inhibées dès leur apparition.

4. Effets des inhibiteurs de CDK5 sur la migration cellulaire des A549

L'éthavérine et la papavérine ont démontré une efficacité significative sur l'inhibition de la prolifération cellulaire et également sur la division cellulaire. A la suite de ces résultats et du rôle de CDK5 dans la migration cellulaire décrit dans la littérature (Xie *et al.*, 2003; Liebl *et al.*, 2010; Demelash *et al.*, 2012; Lampropoulou *et al.*, 2018), nous avons voulu déterminer si la papavérine ou l'éthavérine pouvaient affecter la migration des A549. L'inhibition de CDK5 pourrait donc empêcher les cellules cancéreuses de migrer et de se disséminer dans l'ensemble de l'organisme. Cette approche a été décrite dans le mélanome où CDK5 phosphoryle la vimentine, un filament intermédiaire jouant un rôle dans le développement des métastases (Sharma *et al.*, 2020). Cette a démontré que l'inhibition de CDK5 permettait de bloquer la dissémination des cellules tumorales et de se répandre dans tout l'organisme.

Les cellules A549 ont été cultivées dans des plaques 6-puits jusqu'à l'obtention d'une confluence de 90%-100%. Un test de « scratch » a été réalisé afin de créer un sillon en grattant la surface du puit avec la pointe d'une pipette de 200 µl. Les cellules ont ensuite été traitées en mono-traitement ou en traitement combinatoire avec les composés à leurs concentrations d'IC_{50}, soit 9 µM pour la Roscovitine, 11 µM pour l'éthavérine et 8 µM pour la papavérine. Les cellules en plaque 6-puits ont ensuite été placées en incubateur équipé d'un microscope inversé champ plein. L'acquisition d'images s'est faite toutes les 30 minutes pendant 48h afin de suivre l'évolution de la recolonisation de la zone « scratchée » après traitement.

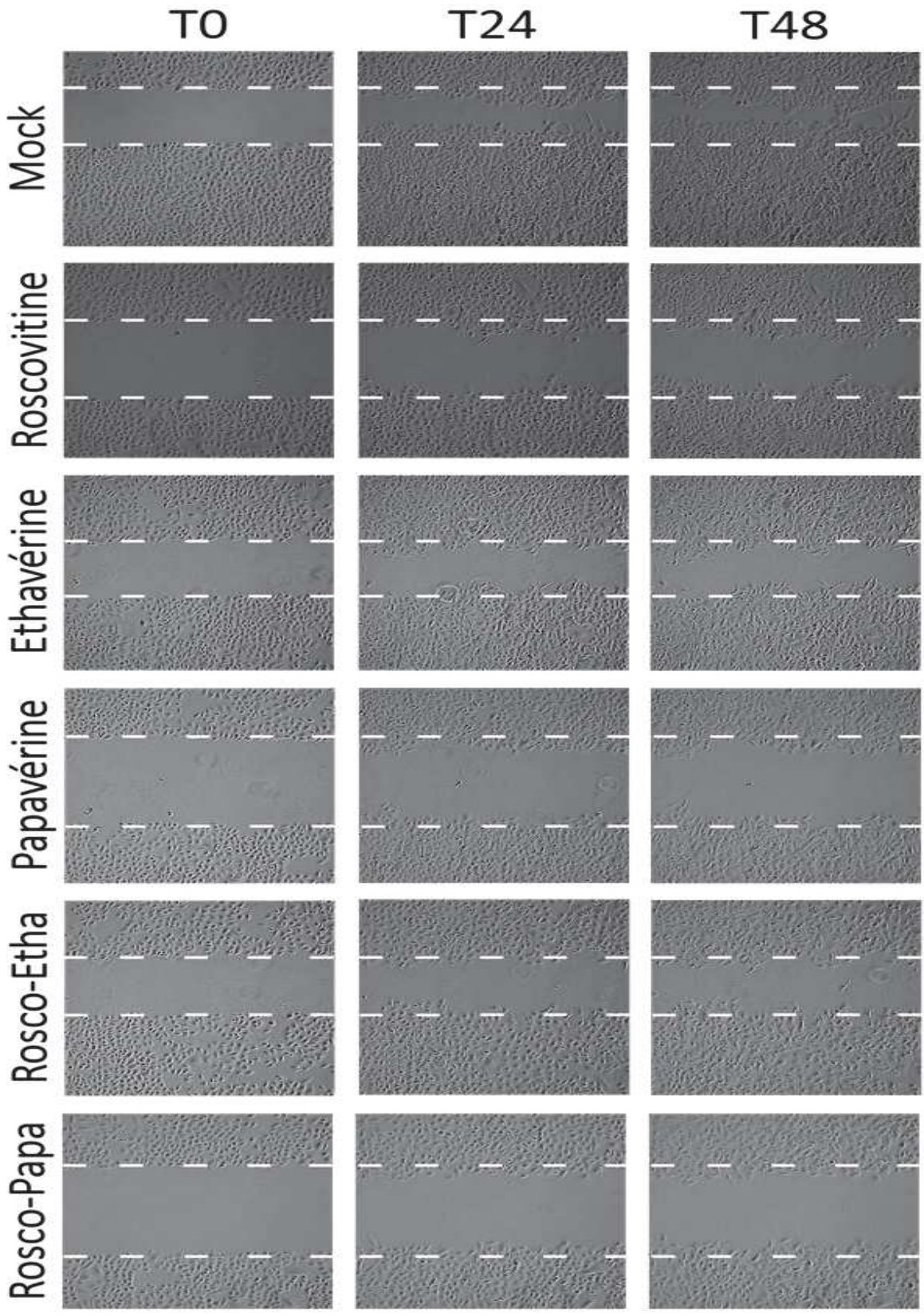


Figure 61. Impact des traitements sur la migration cellulaire des A549. Les lignes discontinues tracées en blanc représentent les limites des sillons réalisés avec le cône de pipette. Ce sillon est recolonisé de manière plus ou moins importante selon les traitements.

La migration cellulaire est déterminée à l'aide d'ImageJ en mesurant la zone vierge de cellules (zone « scratchée ») au cours du temps (Fig. 61). Cette zone est recolonisée par les cellules, plus ou moins rapidement en fonction des traitements, et permet donc de calculer la diminution de l'aire relative sur 48h.

En moyenne, 50% de la zone qui a été grattée est recolonisée en 48h par les cellules non traitées alors que ce taux varie entre 31% et 34% pour les mono-traitements et 25% pour les traitements combinatoires (Tableau 24). Ces expériences ont révélé un effet significatif des traitements sur la migration cellulaire qui est inhibée de 1,5 fois à 2 fois 48h après traitement en comparaison avec le Mock (Fig. 62).

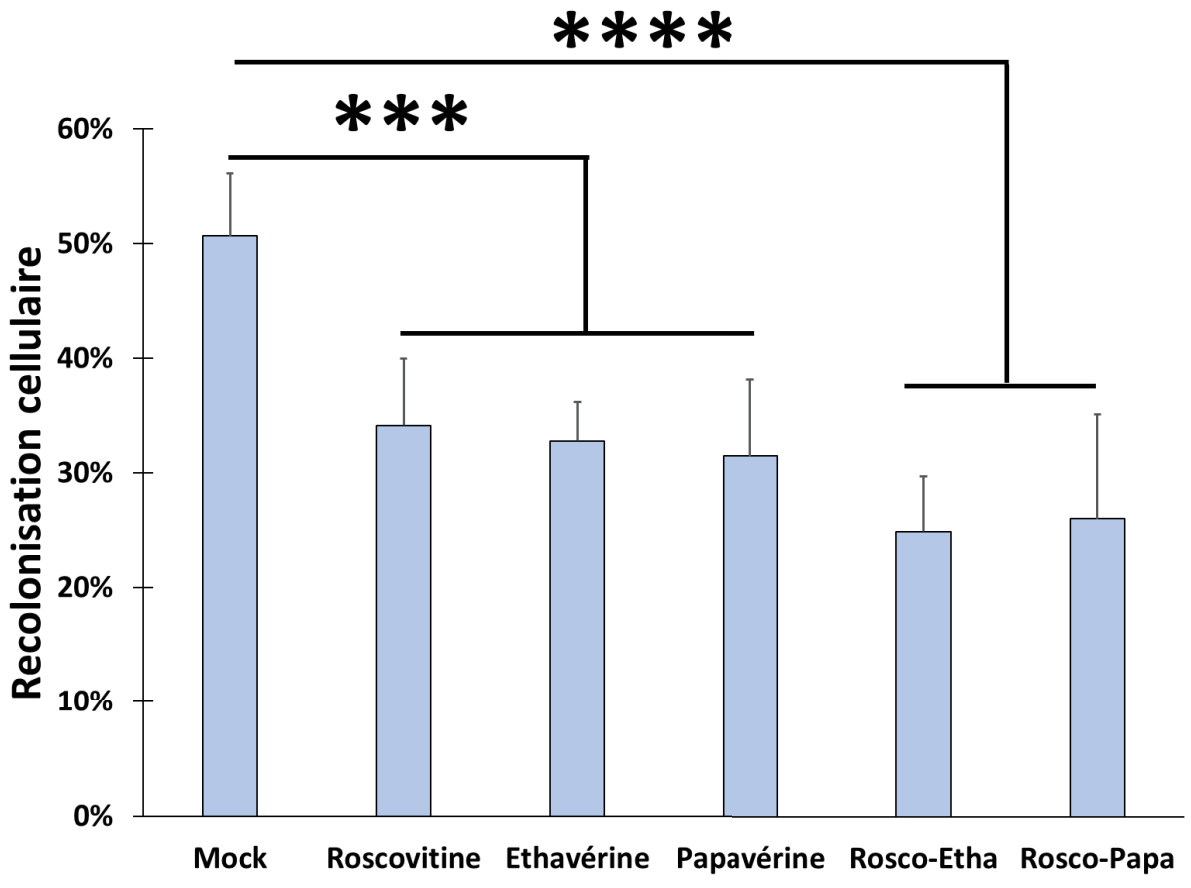


Figure 62. Recolonisation de la zone scratchée par les cellules A549 après 48h selon le traitement.
Différence significative : ***p <0.002 et ****p<0.0001.

Traitements	*0h-48h Inhibition (%)*
Roscovitine	33
Ethavérine	35
Papavérine	38
Rosco-Etha	51
Rosco-Papa	49

Tableau 23. Inhibition moyenne de la migration cellulaire 48h après traitement.

De manière plus détaillée comme décrit dans le tableau 25, la cinétique de recolonisation par migration cellulaire montre un phénomène en deux phases (Fig. 61). L'éthavérine et la papavérine ont un effet inhibiteur de la migration à partir de 24h de traitement. En effet, l'éthavérine inhibe la migration de 19% entre 0h et 24h et la papavérine l'inhibe de 24%. Cependant ces composés inhibent quasiment totalement la migration cellulaire entre 24h et 48h puisque la zone est seulement recolonisée de 1% ± 2% en présence d'éthavérine contre 2% ± 2% avec la papavérine.

A l'inverse, la Roscovitine est plutôt efficace au cours des premières 24h suivant le traitement en inhibant la migration cellulaire de 41% entre 0h et 24h contre 23% entre 24h et 48h.

Concernant les traitements combinatoires, l'inhibition de la migration cellulaire entre 0h et 24h après traitement se rapproche de celui observé avec la Roscovitine. Il est de 49% pour la Roscovitine-Ethavérine et de 40% pour la Roscovitine-Papavérine. En revanche, nous remarquons que l'inhibition de la migration cellulaire entre 24h et 48h après les traitements combinatoires est moins efficace que celle des mono-traitements à l'éthavérine et à la papavérine.

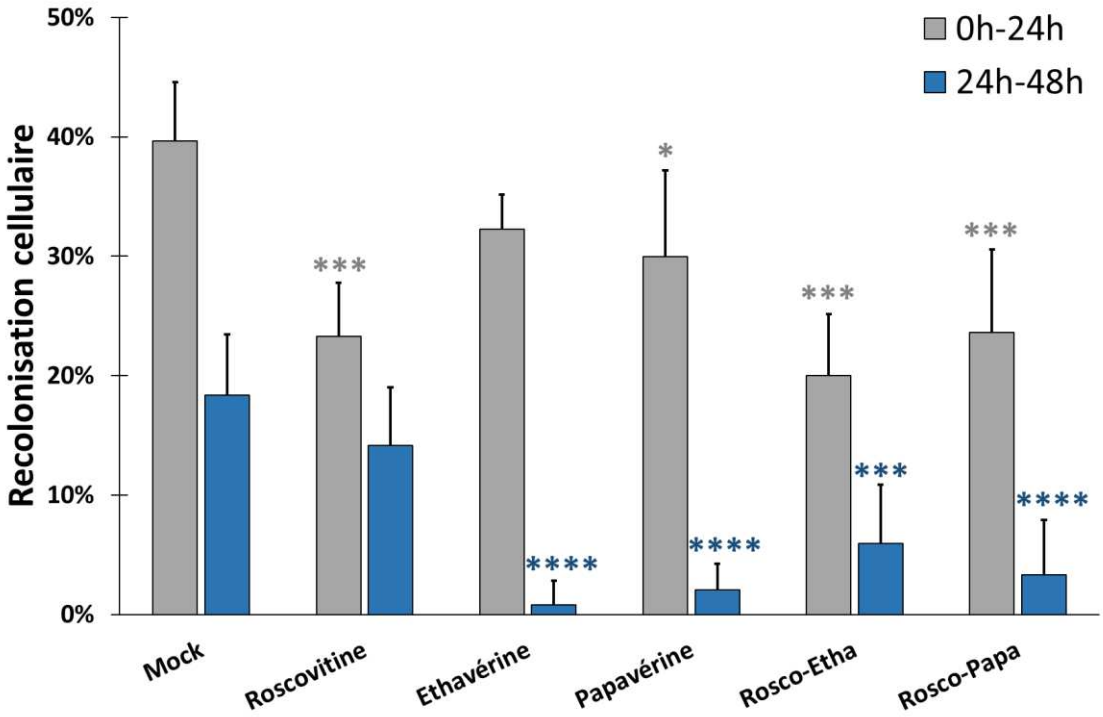


Figure 63. Recolonisation de la zone scratchée par les cellules A549 selon le traitement. Différence significative : *p < 0.0332, ***p <0.002 et ****p<0.0001.

Traitements	*0h-24h Recolonisation (%)*	*0h-24h Inhibition (%)*	*24h-48h Recolonisation (%)*	*24h-48h Inhibition (%)*
Mock	40 ± 5		18 ± 5	
Roscovitine	23 ± 4	41	14 ± 5	23
Ethavérine	32 ± 3	19	1 ± 2	96
Papavérine	30 ± 7	24	2 ± 2	89
Rosco-Etha	20 ± 5	49	6 ± 5	68
Rosco-Papa	24 ± 7	40	3 ± 5	82

Tableau 24. Inhibition moyenne de la migration cellulaire après traitement entre 0h et 24h en comparaison entre 24h et 48h. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SD.

Ces expériences ont permis d'observer que la migration cellulaire est significativement inhibée par les composés allostériques. Nous retrouvons de manière similaire aux résultats sur la division cellulaire sur l'éthavérine et la papavérine sont très efficaces 24h après traitement. L'inhibition est quasi-totale, 96% pour l'éthavérine et 89% pour la papavérine puisque les cellules ne migrent pratiquement plus entre 24h et 48h après traitement. Cela se distingue de la phase entre 0h et 24h après traitement où l'inhibition de la migration est plus faible, présentant un taux de 19% pour l'éthavérine et 24% pour la papavérine.

La Roscovitine présente des résultats d'inhibition inversé par rapport aux inhibiteurs allostériques puisqu'elle est 2 fois plus efficace entre 0h et 24h qu'entre 24h et 48h après traitements avec des taux d'inhibitions respectifs de 40% et 23%. Cela renforce l'hypothèse déjà émise que l'inhibiteur ATP-compétitif a un mécanisme d'action distinct des inhibiteurs allostériques de CDK5.

5. Etudes de stabilité et de thermodénaturation de la protéine CDK5 dans les A549

L'ensemble des résultats précédents ont démontré un effet inhibiteur significatif de le Roscovitine, de l'éthavérine et de la papavérine sur la prolifération et la migration cellulaire. Nous avons également pu observer lors des expériences de titration avec GST-CDK5 que ces molécules influencent l'interaction entre la protéine recombinante et son peptide-substrat. Et nous avons de plus remarqué que les molécules impactaient la forme de monomérique ou dimérique de CDK5 lors des expériences de SEC avec les extraits d'U87.

a. Stabilité de CDK5

Nous avons réalisé des études de stabilité de CDK5 en traitant des échantillons d'A549 dans le but de déterminer si la papavérine ou l'éthavérine induisaient des changements de l'abondance relative de la protéine CDK5 conséquentes à sa dégradation protéolytique, ou à sa stabilisation.

Les A549 ont été cultivées en boîte de Pétri puis traitées à la Roscovitine (9 µM), l'éthavérine (11 µM) et la papavérine (8 µM) en mono-traitement ou en traitement combinatoire. Les cellules ont ensuite été récoltées 24h, 48h et 72h après traitement et les fractions solubles utilisées pour faire des Western-Blot afin quantifier CDK5 au cours du temps.

La tubuline a été utilisée comme témoin de charge lors de cette expérience dans le but de signaler que toutes différences potentiellement observées sur l'expression de CDK5 est dû à un effet des inhibiteurs.

Les résultats obtenus ne démontrent aucune altération de l'abondance relative de CDK5 au cours du temps et quel que soit le traitement effectué sur les A549. La protéine CDK5 n'est ni stabilisée ni dégradée suite aux traitements par les différents composés.

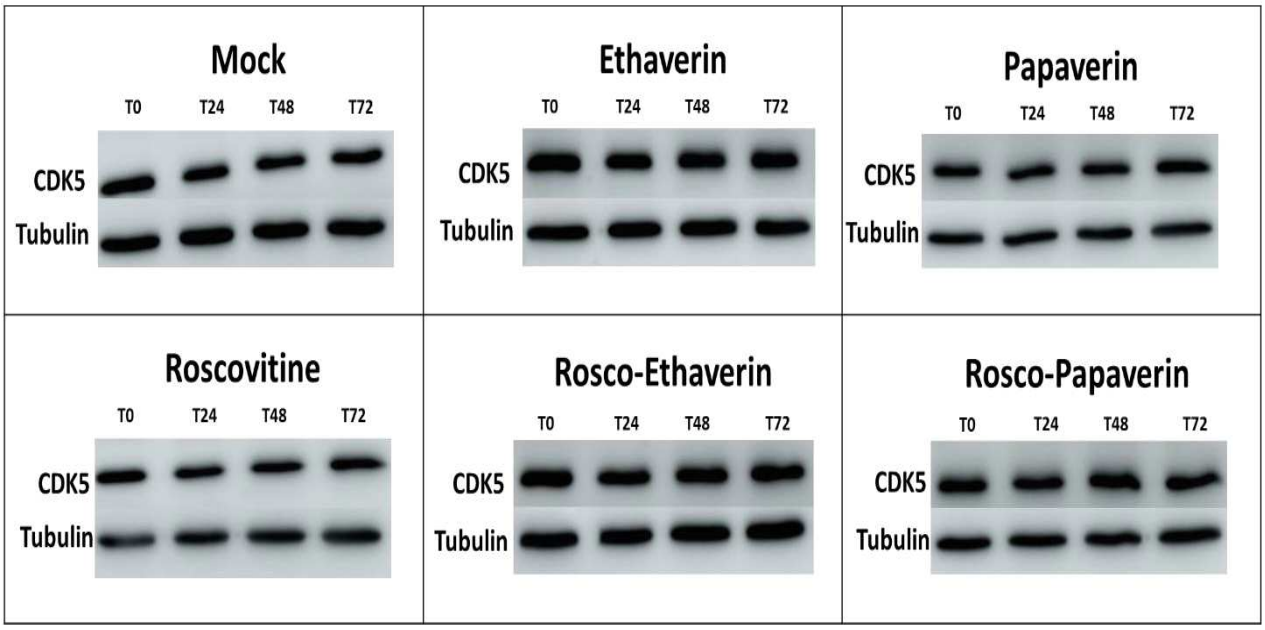


Figure 64. Stabilité de CDK5 24h, 48h et 72h après traitement d'A549.

b. Profilage thermique de CDK5

i. Concept

A la suite des tests de stabilité, des profils de thermodénaturation de CDK5 ont été réalisés dans le but de vérifier si l'éthavérine et la papavérine, interagissent directement avec CDK5. Ces expériences sont inspirées de la technologie CETSA (Cellular Thermal Shift Assay), une méthode utilisée de manière croissante en « drug discovery » ; reposant sur le principe du changement des propriétés physico-chimiques et donc du profil de thermodénaturation d'une protéine d'intérêt induite par un ligand ou par une modification post-traductionnelles (Molina *et al.*, 2013; Miettinen *et al.*, 2018; Friman, 2020). Cela signifie que la température de fusion des protéines est modifiée lorsque ses propriétés physicochimiques sont altérées, par exemple lors de l'interaction physique avec un ligand – on parle alors de « target engagement » ou de modification post-traductionnelle. Cette modification peut se traduire par une stabilisation ou une déstabilisation de la protéine. Ainsi en chauffant à des températures différentes des extraits cellulaires, la quantification de notre protéine d'intérêt présente dans la fraction soluble permet de détecter une altération de ses propriétés physico-chimiques, due à la fixation d'un inhibiteur sur cette protéine.

Récemment, il a été démontré dans des cellules cancéreuses du sein que CDK4 et CDK6 étaient stabilisées en présence de Palbociclib (Miettinen *et al.*, 2018). Cet inhibiteur ATP-compétitif se lie à CDK4 et CDK6 engendrant une stabilisation de ces kinases.

ii. Calibration de l'expérience

Nous avons donc décidé d'appliquer cette méthode afin de déterminer la quantité par Western-Blot de CDK5 soluble après traitement et thermodénaturation. Dans un premier temps, des expériences préliminaires ont été nécessaires afin de calibrer cette expérience. Des lysats cellulaires d'A549 non traités ont été chauffés à 95°C et récoltés toutes les 30s sur une période de 3min. Ces échantillons ont ensuite été utilisés en Western-blots pour quantifier CDK5 et SOD1 (superoxide dismutase). L'utilisation de la protéine SOD comme témoin de charge est due au fait qu'elle est considérée comme thermorésistante, restant stable à des températures élevées (Miettinen and Björklund, 2014). Cela a permis d'identifier le temps requis pour totalement dénaturer CDK5 à une température extrêmement élevée. Nous avons donc décidé par la suite des expériences thermodénaturation de chauffer les échantillons pour une durée de 3min.

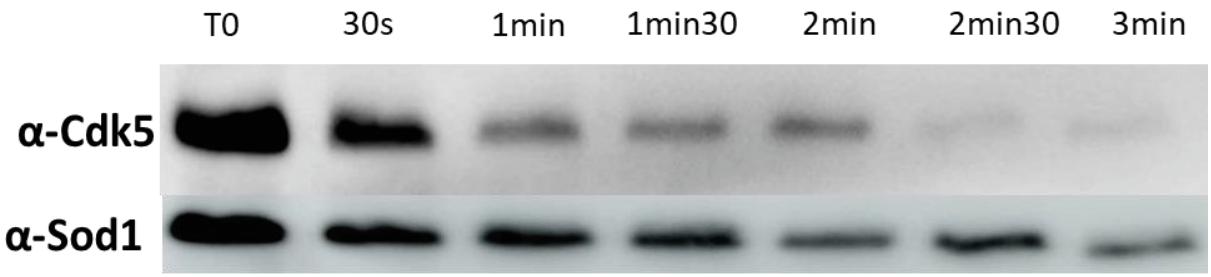


Figure 65. Cinétique de dégradation de CDK5 à partir d'extrait d'A549 chauffés à 95°C.

Des cellules d'A549 ont été cultivées en boite de Pétri puis lysées. Les lysats d'A549 ont été traitées à Roscovitine (9 µM), l'éthavérine (11 µM) et à la papavérine (8 µM) en mono-traitement ou en traitement combinatoire pendant 1h. Les fractions solubles ont ensuite été

récoltées afin de les chauffer à différentes températures. Les échantillons d'A549 ayant subi ces thermodénaturations sont utilisés pour réaliser des Western-Blots afin de quantifier l'abondance relative de CDK5 présente dans les fractions solubles des différents échantillons. Les profils ont été obtenus en calculant le rapport CDK5/SOD1 de chaque échantillon individuellement chauffé. La quantité relative de CDK5 est ensuite déterminée par rapport à l'échantillon chauffé à la plus faible température qui est de 37°C.

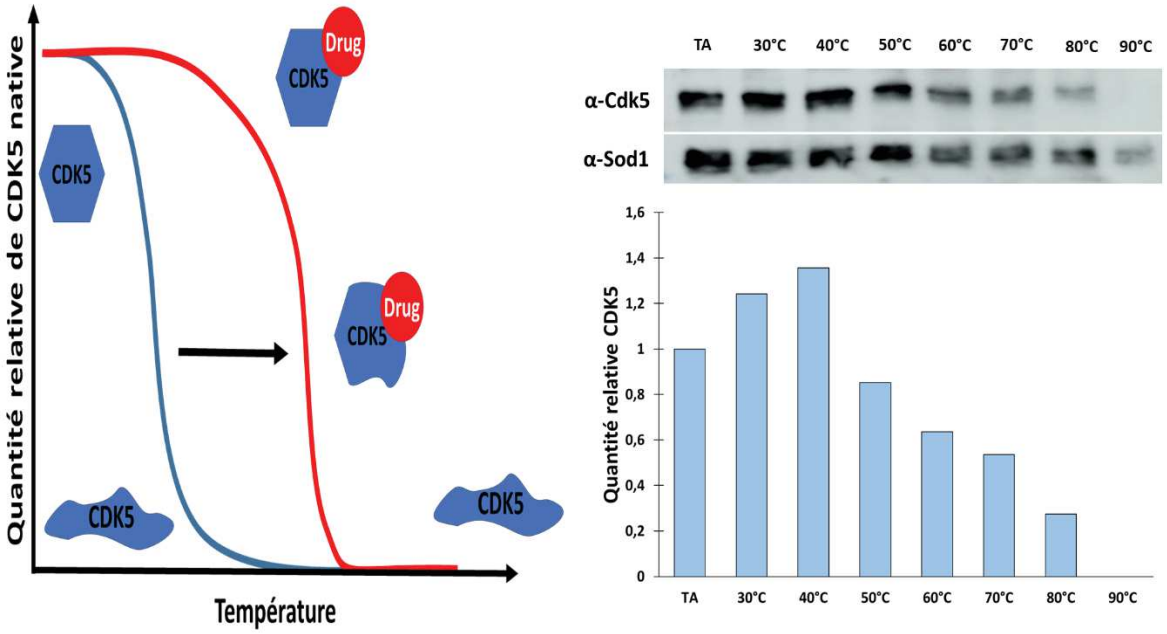


Figure 66. Représentation schématique des expériences de profilage thermique de CDK5.

iii. Profils de thermodénaturation de CDK5 selon les traitements

Nous pouvons observer des profils de thermodénaturation différents selon le traitement effectué sur les fractions solubles d'A549. D'après les résultats de ces expériences, la Roscovitine possède un profil semblable au Mock. Dans nos conditions expérimentales, on ne peut pas donc conclure sur un effet significatif de cet inhibiteur ATP-compétitif sur la stabilité thermique de CDK5. L'éthavérine ne montre pas non plus de différence significative en comparaison au Mock. Néanmoins on peut observer une légère augmentation de la quantité relative de CDK5 à 41°C avant de chuter également Le traitement Roscovitine-Ethavérine ne

montre également pas de différence statistiquement significative sur l'expression de CDK5. La papavérine impacte significativement l'expression relative de CDK5 en la diminuant à 41°C, 45°C et 49°C. Ce composé a donc un effet en déstabilisant CDK5. Nous retrouvons également une différence significative pour le traitement combinatoire Roscovitine-Papavérine. En comparant les histogrammes à 55°C des conditions Mock et Roscovitine-Papavérine, nous pourrions conclure à une thermo-stabilisation de CDK5. Cependant l'analyse qualitative des blots indiquent très bien révèle que la quantité de CDK5 est fortement réduite dès 55°C puis n'est quasi-plus exprimée dans le cadre du traitement combinatoire. Il y a donc un effet déstabilisant de CDK5 de la part de ce traitement.

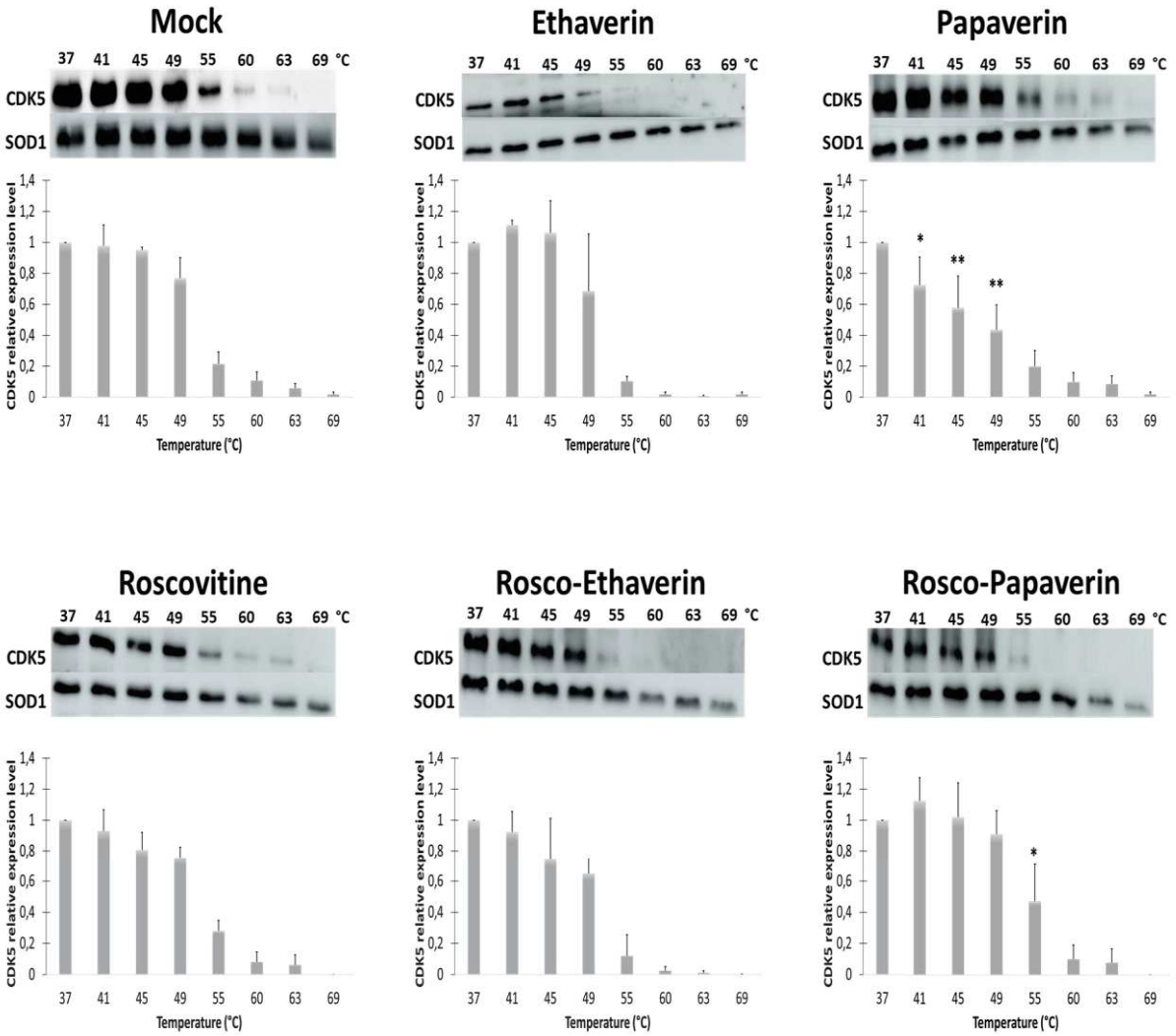


Figure 67. Profilage thermique de CDK5 à partir d'extrait d'A549 traités selon différentes conditions. Différence significative : *p < 0.0332 et **p < 0.0021.

Ces expériences ont permis de confirmer les résultats issus du crible CDKCONF5 en apportant une preuve supplémentaire de l'interaction direct de la papavérine sur CDK5. Concernant l'éthavérine les résultats ne sont pas significatifs malgré le fait que nous observons une tendance à la déstabilisation sur les blots dès 49°C. Cela peut s'expliquer par la qualité des WB pour cette condition qui n'ont pas permis une quantification optimale de la quantité de CDK5.

Nous avons pu remarquer que la Roscovitine possède un profil de thermodénaturation similaire au Mock. Ainsi ces résultats pourraient suggérer que la Roscovitine n'interagit pas par liaison directe avec CDK5, mais des études structurales ont bel et bien démontré que la Roscovitine interagit avec le complexe CDK5/p25 de manière *in vitro* (Mapelli *et al.*, 2005). Les conditions d'expérimentations de thermodénaturation ne sont absolument pas identiques à celles ayant permis de décrire une structure de CDK5 en interaction avec la Roscovitine. Dans les expériences de thermodénaturation, la Roscovitine est ajoutée directement dans le lysat cellulaire et pendant un temps assez court (1h) qui n'est peut-être pas suffisant pour que l'interaction physique puisse être stable. La Roscovitine peut de plus agir sur beaucoup d'autres kinases présentes dans l'échantillon.

L'absence de changement du profil de thermodénaturation pourrait donc s'expliquer par le temps court expérimental et le manque de spécificité de la Roscovitine pour CDK5 étant donné qu'elle lie d'autres CDKs (Bach *et al.*, 2005). Les résultats obtenus avec l'éthavérine ne sont pas statistiquement significativement différents pour conclure sur une interaction directe du composé avec CDK5 malgré le fait que les WB semblent indiquer l'inverse. L'éthavérine a cependant été identifiée lors du criblage de composés allostériques ciblant CDK5. Les conditions de traitements lors de ces expériences ne sont peut-être pas optimales pour cette molécule qui nécessiterait plus de temps se lier de manière stable et agir efficacement sur CDK5. Il est également possible que ces différences proviennent des propriétés physico-chimiques de l' éthavérine et la papavérine qui ne sont pas similaires et affectent leurs liaisons avec CDK5. Malgré des structures analogues, ces deux composés ont des caractéristiques

propres pouvant affecter leurs affinités pour CDK5. Cela sera discuté de manière plus approfondie dans la section « discussion et perspectives ».

Concernant la papavérine, nous pouvons conclure à une liaison du composé à CDK5 car nous observons un effet déstabilisant de CDK5. Cette molécule cible donc CDK5 et cela se retrouve également lorsqu'elle est combinée à la Roscovitine. Le traitement combinatoire Roscovitine-Ethavérine n'indique pas non plus de différence significative avec le Mock. Néanmoins la quantité de CDK5 observable sur les WB semblent diminuer énormément dès 55°C et cela se retrouve sur les histogrammes où la quantité est nulle entre 60°C et 69°C. Il y aurait donc un effet déstabilisant de CDK5 dû à une liaison soit de la Roscovitine soit de l'éthavérine, voire même des deux ensemble.

V. Etudes sur d'autres lignées dérivées de cancers du poumon

Alors que les expériences précédentes ont été réalisées sur la lignée cellulaire A549, nous avons exploré le potentiel d'inhibition de prolifération de l'éthavérine et de la papavérine sur d'autres lignées dérivées de cancer du poumon.

Afin de vérifier si l'éthavérine et la papavérine avaient un spectre d'inhibition similaire dans différentes lignées dérivées de cancers du poumon NSCLC, nous avons réalisé des études d'inhibition de la prolifération dans les lignées cellulaires H1299 qui n'exprime pas p53 (p53-/-) et la lignée PC9 qui exprime une forme mutante de p53 (R248Q), sachant que les A549 expriment une forme sauvage de p53 (Pellerano *et al.*, 2019).

Les cellules ont été cultivées en plaque 96-puits et les traitements ont été effectués à la concentration de l'IC50 déterminée initialement. Les traitements ont donc été réalisés aux concentrations suivantes : 9 µM pour la Roscovitine, 11 µM pour l'éthavérine et 8 µM pour la papavérine. Concernant les traitements combinatoires, les concentrations utilisées sont identiques à celles des traitements « en mono-traitement ».

1. Prolifération H1299

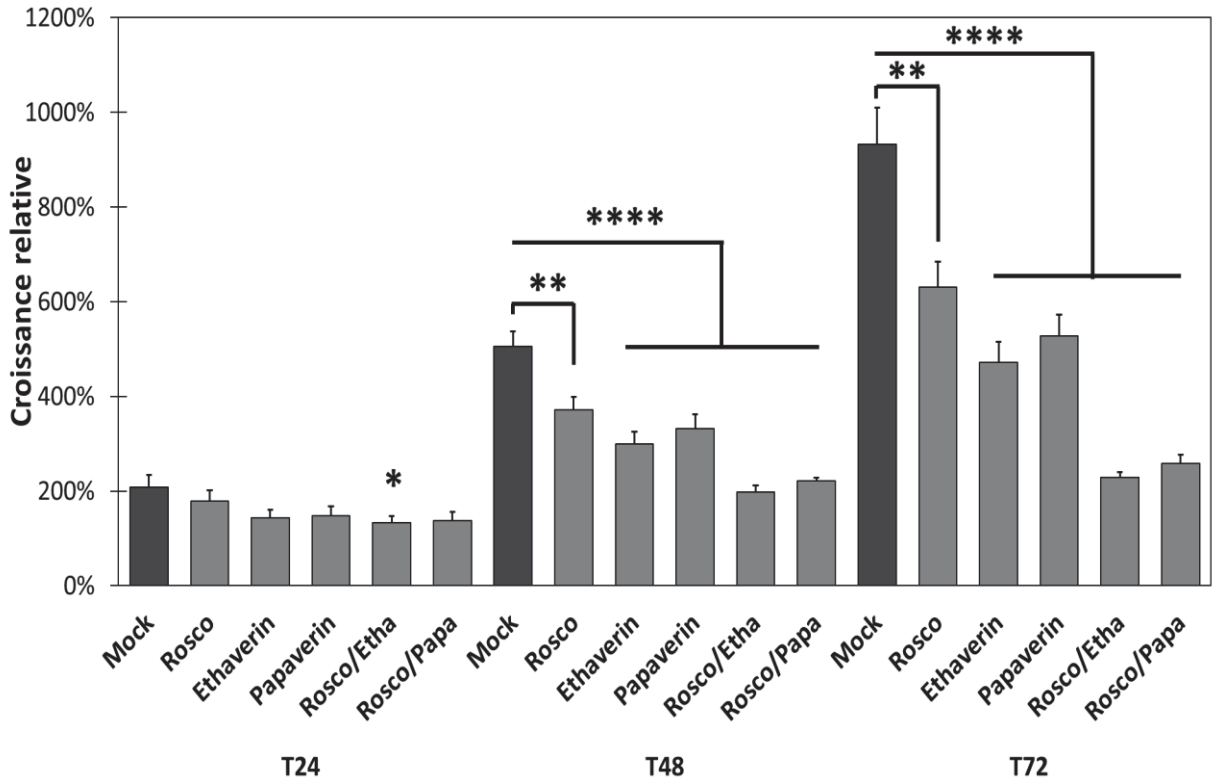


Figure 68. Test de prolifération cellulaire sur les H1299 selon différents traitements. Différence significative : *p < 0.0332, **p < 0.0021 et ****p<0.0001.

Traitements	24h	48h	72h
Mock	208,9 ± 25,3	506,0 ± 32	932,8 ± 77,4
Roscovitine	178,9 ± 22,1	371,7 ± 26,9	630,1 ± 54,7
Ethavérine	142,9 ± 17,8	299,9 ± 25,1	471,7 ± 43,2
Papavérine	147,7 ± 20,6	331,3 ± 30,7	527,4 ± 45,9
Rosco-Etha	132,8 ± 15	197,9 ± 14,5	228,7 ± 12
Rosco-Papa	136,9 ± 19	221,1 ± 6,4	259,1 ± 17,2

Tableau 25. Prolifération relative des H1299 24h, 48h et 72h après traitement. % de prolifération est relatif au T0 et le % d'inhibition est relatif au Mock. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM.

Traitements	24h	48h	72h
Roscovitine	14,4 ± 12,3	26,5 ± 7,2	32,4 ± 8,7
Ethavérine	31,6 ± 12,4	40,7 ± 8,4	49,4 ± 9,2
Papavérine	29,3 ± 13,9	34,5 ± 9,3	43,5 ± 8,7
Rosco-Etha	36,4 ± 11,3	60,9 ± 7,3	75,5 ± 5,3
Rosco-Papa	34,5 ± 13,8	56,3 ± 2,9	72,2 ± 6,7

Tableau 26. Inhibition relative des H1299 24h, 48h et 72h après traitement. % de prolifération est relatif au T0 et le % d'inhibition est relatif au Mock. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM.

Dans la lignée H1299 (p53-/-), nous observons une inhibition moyenne de 30% après 24h traitement avec l'éthavérine et la papavérine et de 35% pour les traitements combinatoires. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus lors des expériences avec les A549, sauf pour la Roscovitine qui est deux fois moins efficace que les autres traitements. Concernant les pourcentages d'inhibition obtenus 48h et 72h après traitements, nous observons également des valeurs similaires à celles obtenues avec les A549. Les traitements combinatoires étant 1,6 fois plus efficaces que les mono-traitements. Nous remarquons que la Roscovitine est moins efficace que l'éthavérine ou la papavérine seules alors que cela n'était pas le cas avec les A549. Néanmoins nous retrouvons un effet additif des traitements combinatoires comme cela avait été le cas précédemment.

2. Prolifération PC9

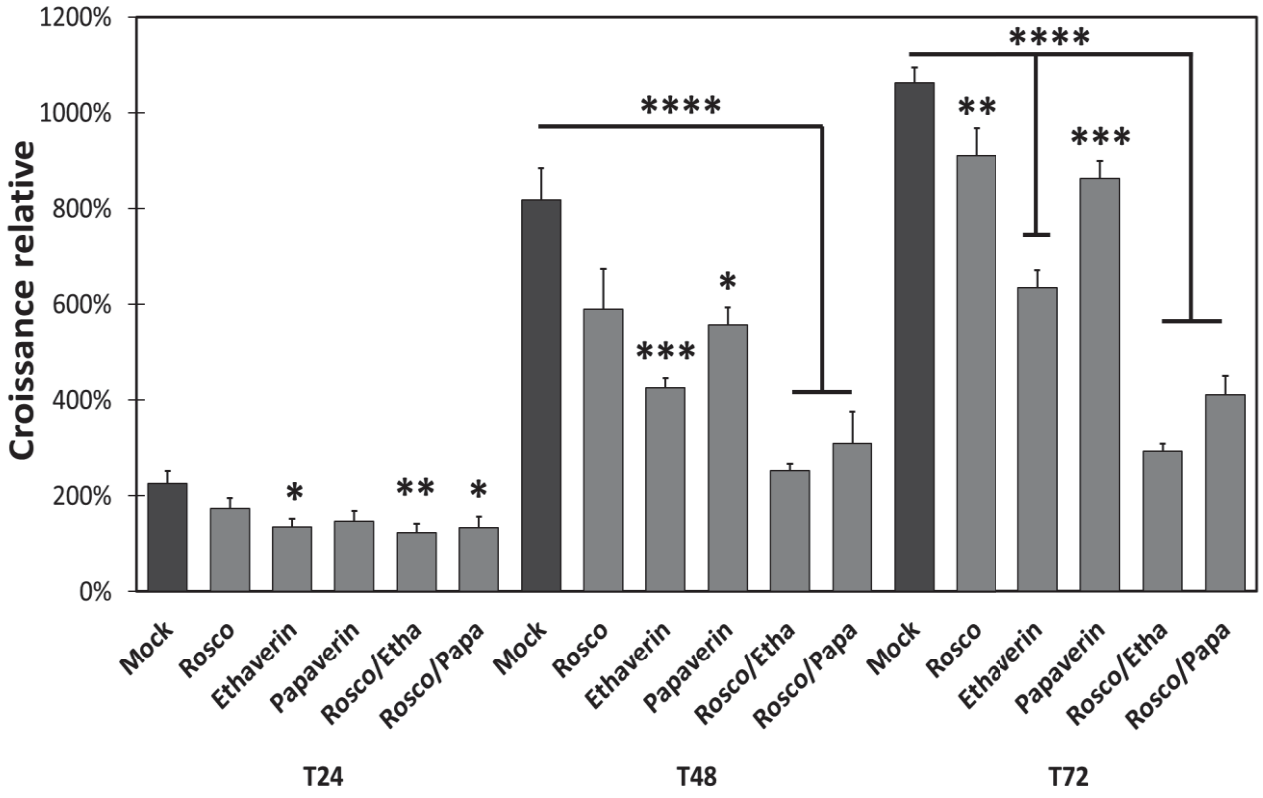


Figure 69. Test de prolifération cellulaire sur les PC9 selon différents traitements. Différence significative : *p < 0.0332, **p < 0.0021, ***p <0.002 et ****p<0.0001.

Traitements	24h	48h	72h
Mock	225,9 ± 26	818,4 ± 66,7	1061,9 ± 33,2
Roscovitine	174,3 ± 21	590,4 ± 83,1	910,9 ± 56,9
Ethavérine	135,3 ± 16,4	425,1 ± 20,5	634,2 ± 36,2
Papavérine	147,4 ± 20,7	556,6 ± 36,7	863,2 ± 36,3
Rosco-Etha	123,3 ± 18,5	253,5 ± 13	293,7 ± 15,7
Rosco-Papa	133,2 ± 22,9	309,1 ± 66,6	410,2 ± 40,4

Tableau 27. Prolifération relative des PC9 24h, 48h et 72h après traitement. % de prolifération est relatif au T0 et le % d'inhibition est relatif au Mock. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM.

Traitements	24h	48h	72h
Roscovitine	22,9 ± 12	27,9 ± 14,1	14,2 ± 6,3
Ethavérine	40,1 ± 12,1	48,1 ± 4,8	40,3 ± 5,7
Papavérine	34,7 ± 14,1	32,0 ± 6,6	18,7 ± 4,2
Rosco-Etha	45,4 ± 15	69,0 ± 5,1	72,3 ± 5,3
Rosco-Papa	41,1 ± 17,2	62,2 ± 21,5	61,4 ± 9,8

Tableau 28. Inhibition relative des PC9 24h, 48h et 72h après traitement. % de prolifération est relatif au T0 et le % d'inhibition est relatif au Mock. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM.

Dans la lignée PC9 (p53 R248Q), nous observons une inhibition 24h après traitements assez similaire selon les conditions, exceptée pour la Roscovitine qui est 1,8 fois moins efficace. L'inhibition 48h après traitement est plus hétérogène, nous observons une efficacité assez faible de la Roscovitine (27,9% ± 14,1%) et de la papavérine (32,0% ± 6,6%). L'éthavérine atteint 48,1% ± 4,8% d'inhibition 48h après traitement alors que les conditions de traitements combinatoires dépassent les 60% d'inhibition. Nous observons donc des différences significatives d'efficacité entre les mono-traitements mais également en comparant les mono-traitements et les traitements combinatoires. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus précédemment au sein des A549 mais aussi des H1299.

Nous identifions la même tendance 72h après traitement où la Roscovitine (14,2% ± 6,3%) et la papavérine (18,7% ± 4,2%) présentent une inhibition relative faible. L'éthavérine induit 40,3% ± 5,7% d'inhibition 72h après traitement, ce taux d'inhibition de la prolifération est similaire à ceux obtenus avec les A549 (50,2% ± 8,6% cf. tableau 21) et les H1299 (49,4% ± 9,2% cf. tableau 26). Les traitements combinatoires Roscovitine-Ethavérine et Roscovitine-Papavérine sont très efficaces avec des inhibitions respectives de 72,3% ± 5,3% et 61,4% ±

9,8%. Ces valeurs d'inhibition obtenues 72h après traitement laissent supposer que l'effet des traitements combinatoires est plus efficace qu'un simple effet additif et que les composés auraient donc un effet synergique. De plus, nous remarquons que la Roscovitine et la papavérine seules sont très peu efficaces alors que cela n'était pas le cas lors des expériences avec les A549 et les H1299.

L'ensemble des résultats de proliférations indique un lien entre p53 et CDK5 qui est déjà bien décrit dans la littérature (Zhang, Krishnamurthy and Johnson, 2002; Schmid and Strosznajder, 2006; Lee *et al.*, 2007; Ajay *et al.*, 2010). En effet, les composés ciblant CDK5 n'ont pas tous la même efficacité lorsqu'ils sont en présence d'une forme mutante de p53. Nous avons pu observer que l'éthavérine était toujours aussi efficace quel que soit la forme de p53 dans les lignées cellulaires (WT, -/- ou R248Q). En revanche, la Roscovitine et la papavérine sont largement moins efficaces en présence de la forme p53 R248Q. Ces molécules seules n'inhibent pas autant la prolifération cellulaire que lorsque que p53 est exprimée normalement ou pas du tout. Mais il est intéressant de remarquer que la combinaison de la Roscovitine et de la papavérine va engendrer un important effet inhibiteur de la prolifération qu'importe la forme de p53.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

I. Stratégie d'identification d'inhibiteurs allostériques de CDK5

CDK5 a été identifiée comme jouant un rôle majeur dans le développement du glioblastome, mais également dans certains cancers non neuronaux et notamment le cancer du poumon (Catania *et al.*, 2001; Demelash *et al.*, 2012; Yushan *et al.*, 2015; Pozo and Bibb, 2016).

Il n'existe actuellement aucun inhibiteur ciblant CDK5 pour le traitement de pathologies neurodégénératives ou de cancers dans lesquels CDK5 est identifiée comme dérégulée. Quelques inhibiteurs ATP-compétitifs comme la Roscovitine, Dinaciclib ou l'AT7519 ont été développés pour cibler CDK5, mais les résultats obtenus lors des tests cliniques ne se sont pas montrés assez satisfaisants. Ces composés ont été cliniquement testés pour le traitement de tumeurs et non pas de pathologies neurodégénératives. Plusieurs inconvénients ont été observés au cours des phases cliniques, une faible efficacité, un manque de spécificité et surtout une toxicité importante pour les patients (Asghar *et al.*, 2015b; Shupp, Casimiro and Pestell, 2017; Juric and Murphy, 2020).

1. Les limites de l'inhibition par la poche ATP

Les inhibiteurs ATP-compétitifs, notamment ceux de première génération, sont peu sélectifs car la poche ATP est hautement conservée à travers toutes les kinases. Cependant certains inhibiteurs ATP-compétitifs de seconde et troisième génération tels que l'Abemaciclib, le Palbociclib ou le Ribociclib sont plus sélectifs et ciblent spécifiquement CDK4/6 (Kwapisz, 2017; Sánchez-Martínez *et al.*, 2019). Le manque de sélectivité de la majorité des inhibiteurs ATP-compétitifs peut conduire à l'apparition d'effets secondaires néfastes pour le patient. En ciblant plusieurs kinases, ces inhibiteurs vont également impacter le rôle physiologique de certaines kinases qui ne sont pas dérégulées pouvant se traduire par des lésions gastriques et par conséquent des nausées et des diarrhées, ou du système nerveux conduisant à des neutropénies parmi d'autres (Ramiro-Ibáñez, Trajkovic and Jessen, 2005; Illanes *et al.*, 2006).

Ces composés sont en général peu efficaces et favorisent l'apparition de phénomènes de résistance des cellules tumorales envers les traitements (Longacre, Snyder and Sarkar, 2014; Ramirez *et al.*, 2016; Pandey *et al.*, 2019). Il existe plusieurs mécanismes de résistance au traitement. Les cellules tumorales peuvent muter ou compenser une voie de signalisation inhibée par une autre afin de contourner l'effet de l'inhibiteur. Dans le cas des inhibiteurs ciblant CDK4/6 utilisés en clinique pour le traitement dans le cancer du sein (Palbociclib, Abemaciclib ou Ribociclib), plusieurs mécanismes de résistance ont été identifiés, tels que la perte de RB, l'amplification de p16 ou encore la compensation par l'activation d'autres voies de signalisation telles que PI3K/AKT/mTOR ou CDK2 (Herrera-Abreu *et al.*, 2016; Pandey *et al.*, 2019).

2. Identification d'inhibiteurs allostériques de CDK5 et repositionnement de composés

La stratégie de ciblage par des inhibiteurs allostériques est une alternative efficace et prometteuse. En ne ciblant pas la poche ATP mais des poches moins conservées, il est possible d'augmenter la spécificité des inhibiteurs et de ce fait leur efficacité tout en réduisant les risques d'effets secondaires et de résistances (Changeux, 2013; Wu, Clausen and Nielsen, 2015). Il n'existe actuellement aucun inhibiteur allostérique de CDKs approuvé par la FDA. Le Trametinib est un inhibiteur allostérique spécifique de MEK1/MEK2, il est le seul inhibiteur allostérique de protéine kinase utilisé en clinique et approuvé par la FDA dans le traitement du mélanome métastatique ou du NSCLC comportant la mutation BRAF V600E ou V600K (Roskoski, 2017; Cotto-Rios *et al.*, 2020; Kozak, Świtaj and Rutkowski, 2021).

Le Tamoxifène et CPD1 ont été identifiés comme des modulateurs allostériques de CDK5 en ciblant l'interface de liaison entre CDK5/p25 au niveau d'une poche de p25 (Zhang *et al.*, 2011; Corbel *et al.*, 2015). Notre équipe a précédemment développé une technologie de biosenseurs conformationnels et publié une première preuve de concept en appliquant un biosenseur de CDK2 au criblage de la chimiothèque nationale (Pellerano *et al.*, 2017). L'équipe a ensuite

développé un biosenseur conformationnel de CDK4 qui a servi au criblage de banques de petites molécules et à l'identification de plusieurs inhibiteurs allostériques de cette kinase (Thèse Camille Prével et projet CDK4PPI, Prix MATWIN 2019). Plus récemment notre équipe a développé un biosenseur fluorescent conformationnel de CDK5, CDKCONF5, qui a permis d'identifier des modulateurs allostériques de CDK5 perturbant la zone de la boucle d'activation de CDK5 (Thèse Peyressatre, 2016; Peyressatre *et al.*, 2020). Cet outil a mené à l'identification de l'éthavérine et de la papavérine comme des modulateurs allostériques de CDK5, mais également de composés quinazolinones inhibant l'activité de CDK5/p25 et la prolifération cellulaire d'U87 (Peyressatre, Arama, *et al.*, 2020). La papavérine est une substance naturelle extraite du latex du pavot, identifiée comme un inhibiteur des phosphodiestérases (PDE4 et PDE10) tout comme son analogue, l'éthavérine (Siuciak *et al.*, 2006; Bihel *et al.*, 2011). Les phosphodiestérases représentent une famille d'enzymes hydrolysant l'Adénosine monophosphate cyclique (AMPc) ou la Guanosine monophosphate cylique (GMPc) qui sont essentielles dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques (Lugnier, 2006). PDE4 et PDE10 sont notamment impliquées dans des fonctions neuronales (Levy *et al.*, 2011). Des liens entre CDK5 et PDE4 ont été décrits dans la littérature, notamment la phosphorylation de PDE4 par CDK5 dans le cerveau (Plattner *et al.*, 2015). Néanmoins, PDE4 et PDE10 sont totalement différentes de CDK5 d'un point de vue structural, et CDKCONF5 a permis de définir un repositionnement de l'éthavérine et de la papavérine ciblant CDK5. Le repositionnement de composés est une stratégie avantageuse, souvent le fruit du hasard, permettant la découverte de nouvelles cibles et de nouveaux effets thérapeutiques de médicaments déjà existants (Pushpakom *et al.*, 2018; Antoszczak *et al.*, 2020). Cette stratégie permet de réutiliser des médicaments sur des cibles thérapeutiques différentes de la cible initiale, et par conséquent généralement à un usage thérapeutique / pathologie différente. Il existe de nombreux exemples de médicaments repositionnés dont l'exemple historique est le Sildenafil initialement utilisé pour des problèmes cardiovasculaires mais réaffecté pour les troubles de l'érection (Fenig and McCullough, 2007). Plus récemment l'Aspirine qui est régulièrement administré pour la soulager la douleur a été indiqué pour la

prévention du cancer colorectal (Drew, Cao and Chan, 2016). Le repositionnement est une méthode permettant de réduire le temps et l'argent investis dans la recherche et développement de nouveaux médicaments. De plus la découverte d'un nouvel usage thérapeutique d'un médicament déjà utilisé en clinique permet une homologation plus rapide car tous les tests précliniques sur l'humain ont déjà été effectués (Pushpakom *et al.*, 2018). Le risque d'échec d'autorisation d'utilisation d'un médicament déjà existant pour de nouveaux traitements est donc largement réduit par rapport à une nouvelle molécule qui vient d'être développée. Cette stratégie a d'ailleurs été largement employée pour découvrir des traitements contre le COVID-19 au début de la pandémie (Ng, Salim and Chu, 2021). L'exemple le plus médiatisé a été la chloroquine, initialement utilisé contre le paludisme puis contre le lupus et finalement proposée pour lutter contre la COVID-19 (Chem, 2012; Plantone and Koudriavtseva, 2018; Manivannan *et al.*, 2021). Le développement de vaccins n'ayant pas de suite débuté et l'absence de connaissances sur cette nouvelle maladie ont nécessité l'identification de médicaments déjà existants pour tenter de traiter la maladie.

II. Mécanismes moléculaires des inhibiteurs allostériques de CDK5

A la suite du crible de molécules allostériques réalisé au cours de la thèse de Marion Peyressatre (2013-2016), d'autres composés que l'éthavérine et la papavérine ont été identifiés. Ces molécules ont été caractérisées à travers des tests de prolifération, d'interaction CDK5/p25 et d'activité de CDK5. Les inhibiteurs les plus efficaces ont été retenus pour les caractériser de manière plus approfondie au cours de mes travaux de thèse.

1. Impact sur l'interaction *in vitro* de CDK5 avec le peptide Tau

Dans un premier temps, afin de confirmer que CDK5 était bien la cible de ces molécules, j'ai réalisé des tests d'interaction *in vitro*. Nous avons évalué l'impact de ces molécules sur la liaison entre de la protéine recombinante GST-CDK5 et un peptide dérivé de la protéine Tau,

un substrat de CDK5. Le site de liaison des inhibiteurs sur CDK5 n'est pas connu, mais ils ne se lient pas dans la poche de liaison à l'ATP car le biosenseur CDKCONF5 discrimine contre des molécules qui se lient dans la poche ATP et favorise l'identification de composés modulant la zone de la boucle d'activation (Peyressatre, Arama, *et al.*, 2020).

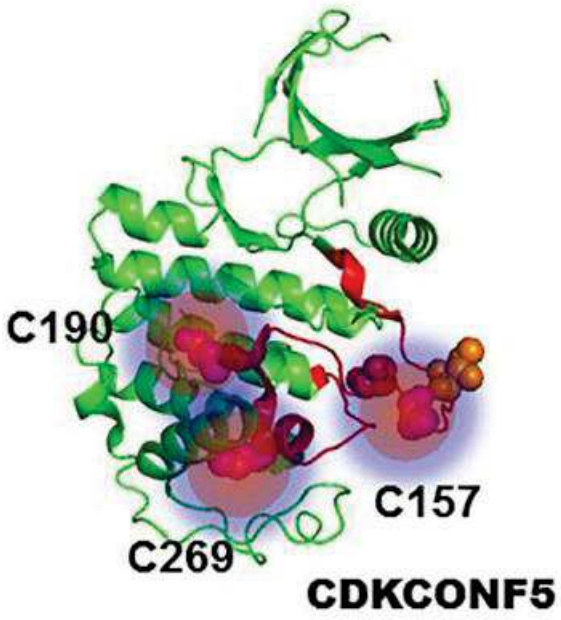


Figure 70. Biosenseur conformationnel CDKCONF5 dérivé de la structure de CDK5 (Peyressatre, Arama, *et al.*, 2020)**.** Les résidus C157, C190 et C269 sont couplés avec le fluorophore Cy3 afin de d'observer des changements de fluorescence provoqués par des modifications structurales de CDK5 (Les autres résidus cystéines natives C53, C83, C94, C117 et C290 ont été mutés en sérine) (PDB 1H4L).

Les expériences d'interactions *in vitro* ont démontré que tous les composés identifiés lors du crible allostérique diminuaient l'affinité de la liaison entre GST-CDK5 et le peptide Tau. L'unique molécule n'ayant pas cet effet était la Roscovitine dont l'affinité de liaison était augmentée. La Roscovitine se fixe dans la poche ATP de CDK5 et n'inhibe donc pas l'interaction entre la kinase et son substrat. Le peptide Tau, comme tous les autres substrats, se lie dans le site catalytique de CDK5, nous pouvons en déduire que les inhibiteurs allostériques modulent la conformation de la kinase qui ne peut plus se lier correctement avec son substrat.

En revanche cela n'est pas le cas des modulateurs allostériques qui affectent l'affinité de la liaison entre les deux partenaires. Nous avons pu observer une augmentation du Kd, plus ou

moins importante selon les composés, indiquant un effet inhibiteur de l'interaction entre GST-CDK5 et le peptide Tau des modulateurs allostériques.

En l'absence d'inhibition, le peptide Tau va s'introduire dans la fente catalytique où il pourra être phosphorylé par CDK5. La Roscovitine cible la poche de liaison à l'ATP et n'empêche pas le peptide Tau de s'introduire dans la fente catalytique. Néanmoins nous avons pu remarquer que l'éthavérine et la papavérine inhibaient légèrement l'affinité du peptide Tau pour GST-CDK5. La variation du Kd était de 19% pour l'éthavérine et 18% pour la papavérine. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que ces composés vont moduler légèrement la conformation de la kinase, affectant les interactions du substrat dans la fente catalytique.

Il y a donc plusieurs hypothèses possibles concernant la zone de liaison des inhibiteurs. En effet, ils pourraient se lier dans des poches allostériques proches de la boucle d'activation de CDK5 qui va adopter une conformation qui va restreindre l'accès au substrat de la fente catalytique. Il est également possible de supposer que les inhibiteurs vont se lier dans une zone proche de la poche ATP, modulant ainsi la conformation la poche qui ne sera plus correctement alignée avec la fente catalytique et donc accueillir correctement le substrat.

2. Engagement de la cible des inhibiteurs allostériques

Les expériences de profilage thermique de CDK5 avec les extraits d'A549 avaient pour objectif de confirmer l'association physique entre la kinase et l'éthavérine et la papavérine. Ces expériences, inspirées par la méthode CETSA, avaient pour objectif de mettre en évidence des changements de thermodénaturation des protéines associées à des changements de leurs propriétés physicochimiques par exemple lors de la liaison d'un inhibiteur, et donc indirectement de vérifier si le composé se lie à CDK5 dans un environnement physiologique cellulaire.

Nous avons pu remarquer que le profil de thermodénaturation de CDK5 dans des extraits non traités et traités à la Roscovitine étaient similaires suggérant que dans les conditions

expérimentales que j'ai utilisées, la Roscovitine ne se lie pas à CDK5 de manière stable. Néanmoins plusieurs études biochimiques et structurales ont démontré l'interaction *in vitro* de ce composé avec CDK5/p25 (Bach *et al.*, 2005; Mapelli *et al.*, 2005). Le résultat que j'ai obtenu avec le CETSA est donc paradoxal et mérite de réfléchir aux conditions expérimentales choisies avant de conclure de manière erronée que la Roscovitine n'interagit pas avec CDK5. Il est nécessaire de rappeler que les conditions expérimentales des thermodénaturations diffèrent totalement des études structurales. Dans le cadre de l'étude structurale entre CDK5/p25 et la Roscovitine (PDB : 1UNL), les cristaux de CDK5/p25 purifiés étaient incubés avec 10 mM à 100 mM de Roscovitine pendant 48h à 72h dans une solution contenant du glycérol afin de stabiliser les différents partenaires avant d'être congelés dans de l'azote liquide (Tarricone *et al.*, 2001; Mapelli *et al.*, 2005). Ces conditions ont permis d'observer l'interaction de la Roscovitine avec CDK5/p25 où le complexe était pur et dans un environnement stable ne contenant aucune autre molécule pouvant interagir avec CDK5, p25 ou la Roscovitine.

De manière totalement différente dans les expériences de thermodénaturation, la Roscovitine a été ajoutée à une concentration de 10 µM dans le lysat cellulaire et incubée pendant 1h à 37°C sous rotation dans une solution de PBS contenant de l'inhibiteur de protéase. L'incubation se fait donc sous une courte durée et nécessite peut-être plus de temps pour que la Roscovitine se lie de manière stable à CDK5. La cinétique de liaison entre un inhibiteur et sa cible est importante pour déterminer son efficacité dans le temps, sa spécificité et son affinité (Lu and Tonge, 2010; Tonge, 2018). L'identification du site de liaison d'un inhibiteur sur la cible et la caractérisation de leur structure permet d'optimiser l'affinité de ce composé dans une approche de développement thérapeutique. Les cinétiques de liaison dépendent des propriétés physicochimiques du ligand et de sa cible, et varient également en fonction de l'environnement physico-chimiques et cellulaire. De fait les temps de résidences d'un inhibiteur pour sa cible peut être de quelques minutes à plusieurs jours. Ce paramètre, définit par les constantes d'association (K_{on}) et de dissociation (K_{off}), va permettre de déterminer si l'affinité

d'un inhibiteur pour sa cible est forte ou non. Les résultats obtenus lors des CETSA où la Roscovitine apparaît comme ne liant pas CDK5 pourrait s'expliquer par un temps de résidence court de cet inhibiteur pour sa cible. Cela signifie que cet inhibiteur possède un K_{on} et un K_{off} assez rapide indiquant une dissociation presque immédiatement après sa liaison avec sa cible, mais également une affinité faible et donc un manque de spécificité. A l'inverse la papavérine possèderait un K_{off} plus lent donc sa dissociation avec CDK5 serait plus lente. De ce fait l'affinité de la papavérine est plus forte que celle de la Roscovitine vis-à-vis de CDK5.

Par ailleurs, les propriétés pharmacocinétiques d'un inhibiteur dans le plasma et les tissus d'un organisme affectent sa biodisponibilité et donc l'accès à sa cible. La Roscovitine a été décrit comme étant rapidement métabolisée dans les tissus où sa demi-vie d'élimination était inférieur à 30 min (Vita *et al.*, 2005).

Une étude a démontré que le Roniciclib, un inhibiteur ATP-compétitif pan-CDKs, présentait des temps de résidence très différents à travers les CDKs allant de 125 min et 40 min pour CDK2/cycline A et CDK9/cycline T à seulement 1 min pour CDK4/cycline D ou CDK6/cycline D (Ayaz *et al.*, 2016). Ces résultats ont permis de décrire le Roniciclib comme étant sélectif de CDK2 et CDK9. Au cours de cette étude les temps de résidence d'autres inhibiteurs ATP-compétitifs de CDKs ont été mesurées. La Roscovitine a été testé sur CDK1, CDK2, CDK4 et CDK9 et les temps de résidences mesurées ont tous été inférieur à 1 min (Ayaz *et al.*, 2016). Il n'existe pas d'expérience dans la littérature qui ait décrit le temps de résidence de la Roscovitine pour CDK5. Dans ls expériences que j'ai réalisées et les conditions expérimentales que j'ai choisies, on peut supposer que la Roscovitine a un temps de résidence pour CDK5 très faible, expliquant l'absence de changement dans le profil de thermodénaturation.

De plus, dans les extraits cellulaires la Roscovitine peut également se fixer dans les poches ATP d'autres kinases présentes. Par conséquent la concentration effective qui se lie à CDK5 peut expliquer l'absence de changement de profil de thermodénaturation de CDK5.

L'engagement d'une cible par un inhibiteur est également affectée par son environnement qui diffère *in vitro* ou *in cellulo.* Ainsi, l'environnement cellulaire va affecter la cinétique d'association et de dissociation de l'inhibiteur et par conséquent son affinité pour sa cible (Lee *et al.*, 2019). Cela a été observé avec le Crizotinib, un inhibiteur de kinases ATP-compétitif, utilisé dans le traitement des cancers du poumon (Vasta *et al.*, 2018). L'utilisation du BRET pour une mesure quantitative des kinases intracellulaires ciblée par l'inhibiteur a permis d'observer dans des cellules vivantes le Crizotinib utilisé à des doses similaires à celles utilisées en clinique, ne se lie pas forcément à ses cibles. Cela s'explique par la présence de l'ATP cellulaire endogène dont la concentration varie selon la localisation subcellulaire et va interférer dans l'affinité entre l'inhibiteur et son substrat. C'est pour cela que des mesures biochimiques réalisées dans des conditions spécifiques ne s'observent pas forcément dans des conditions plus physiologiques comme dans des cellules vivantes

L'éthavérine et la papavérine ont montré des profils de thermodénaturation différents qui indiquent une déstabilisation de la kinase de manière statistiquement significative pour la papavérine mais pas pour l'éthavérine. Cette différence observée entre deux modulateurs allostériques structuralement proches est intéressante car elle suggère que les différences dans leurs propriétés physico-chimiques affectent l'affinité de liaison pour CDK5, soit des groupements methyl (papavérine) ou ethyl (éthavérine). Ces structures analogues possèdent 5 hydrogènes accepteurs de liaison, en revanche la papavérine possède 6 liaisons rotatives contre 10 pour l'éthavérine. Cette différence est importante car l'affinité décroit lorsque le nombre de liaisons rotatives augmente, et pourrait expliquer que la papavérine se lie mieux à CDK5 que l'éthavérine (Lipinski, 2005). L'éthavérine pourrait avoir un k_{off} plus rapide que la papavérine et se dissocier plus rapidement alors que la papavérine aurait un k_{off} plus lent et rester lié à CDK5 de manière plus stable dans le temps.

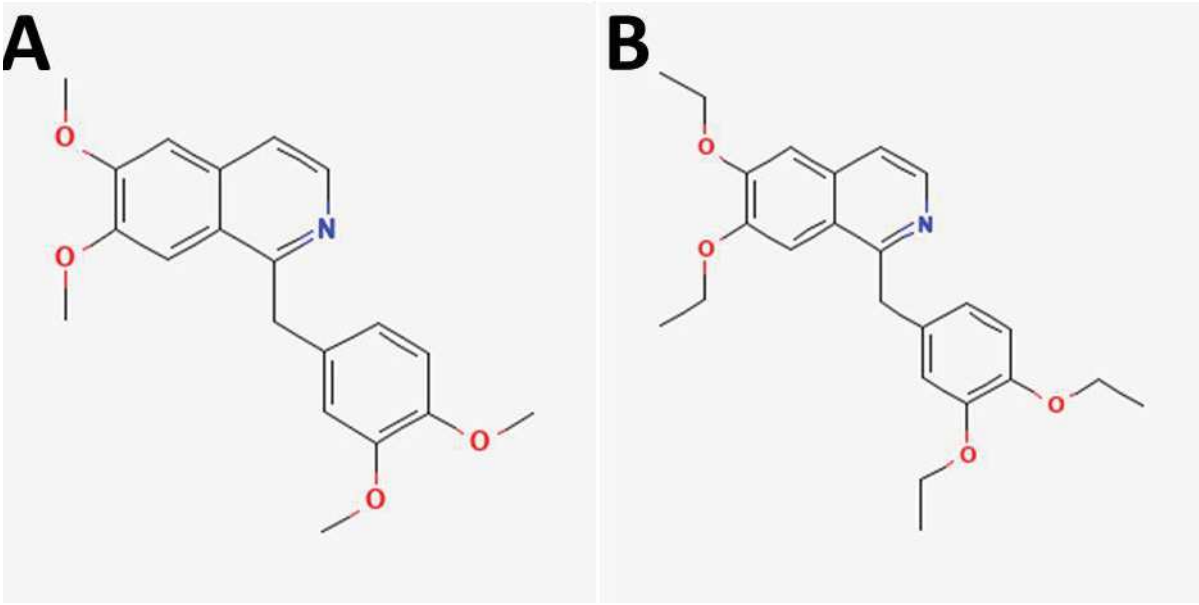


Figure 71. Structures de la papavérine et de l'éthavérine (source : https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/). **(A)** Structure de la papavérine possédant des groupes méthyles au niveau des atomes d'oxygène. **(B)** Structure de l'éthavérine possédant des groupes éthyles au niveau des atomes d'oxygène.

Nous avons également pu observer une différence lors du traitement combinatoire Roscovitine-Papavérine qui thermo-déstabilise CDK5. Etant donné que dans ces conditions la Roscovitine ne lie pas CDK5, il est probable que la papavérine soit responsable de l'interaction et la déstabilisation de CDK5. Concernant l'éthavérine nous n'avons pas pu conclure à une différence assez significative indiquant une interaction avec CDK5. Plusieurs raisons sont possibles pour expliquer ce résultat. La première est que les conditions d'expérimentation ne permettent pas de détecter une interaction stable entre la kinase et l'inhibiteur. Il est probable qu'il faille allonger le temps d'interaction ou la concentration d'inhibiteur. Il est possible aussi d'expliquer ce résultat par une cinétique d'action plus rapide de l'éthavérine va se lier et se dissocier rapidement de CDK5.

3. Impact des inhibiteurs allostériques sur la forme monomérique ou dimérique de CDK5

A partir des résultats issus des expériences d'interaction, nous avons émis l'hypothèse que les modulateurs allostériques de CDK5 pouvaient impacter l'interaction de CDK5 avec des partenaires et/ou substrats. Nous avons voulu vérifier cette hypothèse en étudiant la présence de CDK5 par Western-Blotting et identifier la présence de forme monomérique, dimérique ou en complexe macromoléculaire dans des expériences de gel filtration avec des extraits cellulaires de U87.

Nous avons pu remarquer que le traitement à la Roscovitine, l'éthavérine et le A08 favorisaient la forme monomérique de CDK5 24h après traitement mais qu'après 48h nous pouvions observer également CDK5 sous forme dimérique. Cela suggère que ces traitements inhibent temporairement la formation d'un complexe dimérique actif. Cette inhibition transitoire peut résulter d'une dégradation des molécules qui pourraient être éliminer par les cellules. La dégradation de CDK5 par le protéasome est conditionnée par p35 (Takasugi *et al.*, 2016), de ce fait si les molécules se lient à CDK5 et inhibent la liaison avec p35, la kinase ne sera pas dégradée dans le protéasome. Il est donc possible de supposer que les inhibiteurs agissent transitoirement sur CDK5, puis sont éliminées de la cellule. A la suite de cela, CDK5 n'est plus inhibée et peut à nouveau lier ses partenaires régulateurs.

A priori la Roscovitine ne devrait pas inhiber la formation du complexe CDK5/p25 ou CDK5/p35, puisqu'elle se fixe dans la poche ATP et n'empêche pas l'interaction entre la kinase et son partenaire (Mapelli *et al.*, 2005), mais il est possible que cela affecte son interaction avec son partenaire dans un contexte cellulaire.

Cependant pour l'éthavérine et l'A08, nous pouvons supposer que la liaison de ces molécules sur CDK5 va entrainer une modification structurale de CDK5 qui empêchera la kinase de pouvoir se lier avec l'un de ses partenaires coactivateur. Ces résultats concordent donc avec les expériences d'interaction *in vitro* qui indiquaient une diminution de l'affinité de liaison entre GST-CDK5 et son substrat. Concernant les autres composés que sont la papavérine, le LC05

ou le LF03, il n'y a pas de CDK5 sous forme monomérique. Cela ne signifie pas forcément que ces composés agissent différemment des autres modulateurs allostériques mais ils pourraient agir moins efficacement.

III. Caractérisation des inhibiteurs dans différentes lignées cancéreuses

Les expériences de prolifération cellulaire au sein d'une lignée dérivée de glioblastome humain (U87) ont démontré une efficacité d'inhibition assez faible pour certains des composés allostériques. Seules l'éthavérine et la papavérine ont permis d'atteindre une efficacité d'inhibition comparable à la Roscovitine.

Nous avons exploré l'inhibition de la prolifération cellulaire de l'éthavérine et de la papavérine au sein d'autres lignées cellulaires dont une lignée de mélanome (A375), une lignée de cancer du sein (MCF7) et une lignée dérivée de cancer du poumon NSCLC (A549). Il est apparu que l'inhibition 24h et 48h après traitement était significativement plus importante chez les A549.

Le potentiel inhibiteur n'était pas identique selon les différentes lignées cellulaires. Les inhibiteurs allostériques de CDK5 se sont montrés les plus efficaces pour inhiber la prolifération des A549 rapport au MCF7 et A375. Il est donc probable que l'éthavérine et la papavérine ciblent une fonction spécifique de CDK5 associée à un processus essentiel dans le cancer du poumon NSCLC.

IV. Caractérisation dans le cancer du poumon

Comme l'inhibition des U87 n'était pas significative, nous avons décidé de changer de modèle de lignée cellulaire et d'explorer une autre pathologie liée à un dysfonctionnement de CDK5 en abordant le cancer du poumon. CDK5 a été identifiée dans le développement du cancer du poumon, notamment de par son implication dans la migration et le développement de

métastases (Bisht *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2018). Nous avons sélectionné la lignée A549 dérivée de cellules humaines de cancer pulmonaires non à petites cellules (NSCLC) pour la suite des expériences. Nous avons également décidé de nous focaliser uniquement sur la caractérisation de l'éthavérine et de la papavérine qui sont apparues comme les deux composés les plus prometteurs à la suite de l'ensemble des expériences réalisées.

1. Inhibition de la prolifération cellulaire et stratégie combinatoire

Après avoir déterminé l'IC_{50} de la Roscovitine (9,10 µM ± 1,9 µM), de l'Ethavérine (0,6 µM ± 5,4 µM) et de la Papavérine (8 µM ± 3 µM) après 24h de traitement, nous avons étudié l'effet des traitements combinatoires sur la prolifération cellulaire des A549. En effet, la stratégie de combiner des composés pour les traitements anti-cancéreux est intéressante car elle permet d'outre-passer les limites atteintes par un mono-traitement classique. L'utilisation d'inhibiteurs de kinases ATP-compétitifs lors des monothérapies anti-cancéreuses favorise les cellules tumorales à acquérir la capacité de résister au traitement (Herrera-Abreu *et al.*, 2016; Ramirez *et al.*, 2016; De Leeuw *et al.*, 2018; Pandey *et al.*, 2019; Vasan, Baselga and Hyman, 2019). Pour contourner ce problème, les cliniciens doivent s'adapter en utilisant un nouveau traitement efficace contre les cellules tumorales résistantes. Une stratégie utilisée en clinique est l'utilisation en combinaison de différents composés (Ray, Jablons and He, 2010; Politi and Herbst, 2015; Novello *et al.*, 2016; Planchard *et al.*, 2019). C'est le cas pour le traitement dans le cancer du sein HER2-negatif ou le palbociclib, ciblant CDK4 et CDK6, est associé au fulvestrant, un inhibiteur du récepteur estrogène (Cristofanilli *et al.*, 2016). Actuellement de nombreuses études cliniques sont en cours pour le traitement du cancer du poumon par thérapie combinatoire en utilisant un inhibiteur de CDK tel que le palbociclib associé à un inhibiteur de MEK, d'ERK ou de PD-L1 (Qin *et al.*, 2020).

Les composés peuvent cibler des voies moléculaires différentes et engendrer des effets synergiques ou additifs d'inhibition permettant de réduire les doses appliquées en

monothérapie. Dans notre cas de ciblage de CDK5, cette stratégie est intéressante car nous avons combiné un inhibiteur ATP-compétitif (Roscovitine) avec un inhibiteur allostérique (éthavérine ou papavérine). L'association de la Roscovitine ciblant la poche de liaison à l'ATP, avec l'éthavérine ou la papavérine identifiées comme modulateurs allostériques de CDK5, pourrait se révéler être une approche propice à l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses du poumon. Comme nous avons pu le voir lors des tests d'interactions *in vitro*, l'éthavérine et la papavérine inhibaient partiellement la liaison entre la kinase et son substrat peptidique mais pas la Roscovitine. En ciblant deux poches différentes de la même kinase, il est possible de supposer que CDK5 est contrainte d'adopter une forme conformationnelle ne lui permettant plus de lier l'ATP ni l'un de ses partenaires moléculaires (coactivateur et/ou substrat). Nous pouvons également émettre l'hypothèse que le Roscovitine cible un certain type de sous-population de CDK5 alors que l'éthavérine ou la papavérine ciblent une autre sous-population. Ainsi, l'inhibition de des cellules cancéreuses résulte d'un ciblage de CDK5 couvrant un spectre plus large de sous-populations de la kinase que le mono-traitement ne peut pas offrir.

Nous avons pu observer qu'en traitant les cellules A549 en combinant 9 µM de Roscovitine et 5,5 µM, 11 µM ou 22 µM d'éthavérine, les pourcentages d'inhibitions après 24h, 48h ou 72h de traitements étaient assez similaires entre les trois conditions. Cela signifie que l'administration unique d'un traitement combinatoire avec une concentration réduite en éthavérine permet une inhibition efficace au cours du temps. De plus, nous avons pu observer que les traitements combinatoires sont significativement plus efficaces que les mono-traitements. Ces résultats ont également pu être observés en combinant la Roscovitine (9µM) avec la papavérine (4µM, 8µM et 16µM), où l'inhibition de prolifération était semblable selon les conditions. Il est donc possible de réduire la dose d'inhibiteur d'allostérique de moitié et de conserver une efficacité d'inhibition de la prolifération dans le cadre des traitements combinatoires.

2 . Traitements séquentiels

En plus de l'effet des traitements combinatoires, nous avons effectué des traitements séquentiels en traitant toutes les 24h. A part pour la Roscovitine, où le traitement séquentiel est nettement plus efficace que le traitement unique, il apparaît que l'inhibition relative des traitements uniques est assez similaire à celles des séquentiels. Cette observation pourrait s'expliquer que la première dose de Roscovitine n'est pas suffisante, car elle ne cible pas uniquement CDK5 mais également d'autres kinases. De plus des études pharmacocinétiques montrent que la Roscovitine était rapidement métabolisée et éliminée par l'organisme (Nutley *et al.*, 2005; Vita *et al.*, 2005). Cela expliquerait que le fait de traiter de manière séquentielle à la Roscovitine inhibe plus efficacement la prolifération car le composé aura ainsi un effet cumulatif et donc un temps d'action plus important. A l'inverse, l'éthavérine et la papavérine cibleraient plus spécifiquement CDK5 mais seraient métabolisés moins rapidement que la Roscovitine. De par leur mécanisme d'action différent, la dissociation de l'éthavérine et de la papavérine pour CDK5 est assurément différente de celle de la Roscovitine et influe probablement sur leurs engagements sur CDK5. Les inhibiteurs allostériques pourraient être physiquement plus engagés sur CDK5 que l'est la Roscovitine, entrainant une association avec CDK5 plus longue et résulterait en une inhibition plus prolongée de CDK5 dans le temps. De ce fait un traitement séquentiel n'est pas plus efficace car l'éthavérine et la papavérine agiraient surtout sur CDK5 de manière plus stable au cours du temps que la Roscovitine.

Ces composés, en mono-traitement ou en traitement combinatoire, apparaissent comme étant efficaces jusqu'à 72h après leurs utilisation sur l'inhibition de la prolifération cellulaire. Le fait de traiter à nouveau les cellules toutes les 24h n'ayant pas voire très peu d'effets supplémentaires, il est donc intéressant d'avoir des composés qui ne nécessitent pas d'être renouvelés régulièrement pour prolonger leurs effets.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que la Roscovitine, en se liant dans la poche de liaison à l'ATP de CDK5, va induire un changement ou une stabilisation de conformation de la kinase,

permettant la liaison du composé allostérique pouvant agir plus efficacement qu'en l'absence de Roscovitine. Cette hypothèse serait plus confirmée si nous avions observé un effet synergique des traitements combinatoires. Néanmoins, nous avons pu constater que la combinaison de la Roscovitine avec l'éthavérine ou la papavérine produit un effet additif. Cela oriente notre hypothèse vers le ciblage de différentes sous-populations de CDK5 par les composés. La Roscovitine ciblerait une sous-population spécifique de CDK5 alors que l'Ethavérine et la Papavérine cibleraient une sous-population différente de la kinase. En effet, la Roscovitine pourrait cibler des kinases dont la poche ATP est accessible. Cependant, les inhibiteurs allostériques pourraient se lier à des conformations de CDK5 dont la poche ATP n'est pas accessible et donc pas ciblées par la Roscovitine.

2. Cinétique d'inhibition de la division et la migration cellulaire

Les études réalisées par vidéomicroscopie ont montré que les inhibiteurs avaient une cinétique d'inhibition de la division cellulaire différentes. Le traitement à la Roscovitine était aussi efficace entre 0h et 24h après traitement qu'entre 24h et 48h après traitement où la division cellulaire était inhibée de moitié dans les deux cas. Néanmoins pour les inhibiteurs allostériques, utilisés en mono-traitement, l'efficacité d'inhibition était deux fois plus efficace lors de la seconde phase, dépassant les 90% d'inhibition entre 24h et 48h après traitement. Ces taux sont semblables aux traitements combinatoires qui étaient déjà très efficaces dès le début où l'inhibition atteignaient les 80% entre 0h et 24h. Ces observations suggèrent des mécanismes et cinétiques d'action distincts entre l'inhibiteur ATP-compétitif et les inhibiteurs allostériques. La Roscovitine semble être efficace en continu au cours du temps, où la moitié des cellules ne peuvent plus se diviser alors que l'autre moitié a toujours la capacité de proliférer. Nous pouvons également émettre l'hypothèse que la Roscovitine inhibe la division cellulaire dans la moitié des cellules lors des premières 24h, puis que ces cellules demeurent inhibées au cours des 24h heures suivantes avant d'entrer en apoptose. Concernant la papavérine et l'éthavérine, il semblerait que l'inhibition est totale puisqu'à plus long terme il n'y

a plus d'apparition de nouvelles cellules. Il est possible qu'il y ait un effet cumulatif de l'inhibition au cours du temps par une dégradation plus lente de ces composés qui resteraient liés à CDK5 de manière plus stable dû à un k_{off} que la Roscovitine.

Les expériences de vidéomicroscopie ont également permis d'observer que la migration cellulaire était inhibée de manière significative par les différents traitements. La Roscovitine est efficace au cours des premières 24h, puis inhibe faiblement la migration. A l'inverse, l'éthavérine et la papavérine ont une inhibition de la migration cellulaire assez faible entre 0h et 24h après traitement, puis inhibent quasi-totalement la migration entre 24h et 48h. De manière analogue aux observations précédentes, nous retrouvons une cinétique d'action différente entre les inhibiteurs ATP-compétitif et allostériques. Ces résultats renforcent les hypothèses émises précédemment et sont des preuves supplémentaires que le mécanisme d'action de la Roscovitine diffère de l'éthavérine ou de la papavérine, et donc que leur combinaison peut être bénéfique pour une réponse thérapeutique.

V. Influence de p53 sur l'inhibition allostérique de CDK5

Les résultats obtenus sur les tests de prolifération témoignent d'un lien entre p53 et CDK5 qui a déjà été identifié dans la littérature (Zhang, Krishnamurthy and Johnson, 2002; Schmid and Strosznajder, 2006; Lee *et al.*, 2007; Ajay *et al.*, 2010). CDK5 est capable de phosphoryler et d'activer p53 et de réguler son activité, induisant l'apoptose dans les cellules neuronales (Zhang, Krishnamurthy and Johnson, 2002; Lee *et al.*, 2007).

L'efficacité des inhibiteurs visant CDK5 est différente selon la forme de p53 exprimée dans les lignées dérivées de cancers NSCLC. L'éthavérine conserve son potentiel inhibiteur de la prolifération quel que soit la forme de p53 présente (WT, -/-, R248Q). Mais la Roscovitine et la papavérine inhibent significativement moins la prolifération des PC9 exprimant la forme mutante R248Q de p53. Alors que nous avons pu observer un effet additif lors de l'utilisation de traitements combinatoires pour inhiber la prolifération cellulaire des A549, H1299 et PC9 ; il est apparu que la combinaison Roscovitine-Papavérine engendre un effet synergique

d'inhibition. Ces deux molécules, qui étaient très peu efficaces sur les PC9 lorsqu'elles étaient utilisées seules, sont très puissantes lorsqu'elles sont combinées. En ciblant simultanément deux poches différentes d'une même kinase il est possible d'induire une inhibition plus forte. Il y a donc une interaction de ces inhibiteurs avec CDK5 qui va impacter son activité en altérant sa conformation et son interaction avec le substrat. Cet effet n'ayant pas été observé dans les autres lignées cellulaires, il est possible de supposer que cela impact directement le phénomène d'apoptose régulée par la voie CDK5/p53. Nous pouvons émettre l'hypothèse que CDK5 va lier p53 R248Q mais que ni la Roscovitine seule, ni la papavérine seule ne sont capables d'inhiber efficacement l'interaction et la phosphorylation de p53 par CDK5. Mais lors de l'utilisation combinatoire Roscovitine-Papavérine, l'un des deux inhibiteurs va pouvoir stabiliser la kinase dans une conformation permettant au second inhibiteur de se lier de manière plus stable et d'agir plus efficacement que lorsqu'il est utilisé seul. Il y aurait donc une inhibition significativement plus élevée de l'interaction entre CDK5 et p53 se traduisant par une inhibition de la prolifération des cellules tumorales.

Il est également intéressant de remarquer que les deux composés allostériques ciblant CDK5 vont agir différemment sur la prolifération cellulaire selon l'expression de p53. En effet, l'éthavérine et la papavérine sont proches structuralement et nous pourrions nous attendre à observer des effets et des mécanismes d'action similaires. Hors nous avons pu observer que l'efficacité de ces deux molécules n'était pas similaire selon la forme de p53 exprimée au cours de ces expériences de prolifération. La papavérine inhibe efficacement de la prolifération cellulaire où p53 n'est pas exprimée ou est sous forme sauvage, mais pas en présence de la forme mutante dominante R248Q. Alors que l'éthavérine inhibe efficacement la prolifération cellulaire quel que soit l'expression de p53. Ce composé apparaît donc comme le plus propice dans la perspective d'un usage thérapeutique.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que la papavérine n'empêche pas l'interaction entre CDK5 et p53, permettant à la kinase de continuer de réguler p53 alors que l'éthavérine peut efficacement inhiber la régulation de p53 par CDK5. Ces deux composés sont structuralement proches et ciblent tous les deux CDK5. Il est donc possible de supposer qu'ils vont se lier dans

les mêmes poches de la kinase et agir de manière identique. Néanmoins ces résultats laissent supposer que la modulation de la conformation de CDK5 par l'éthavérine est différente de celle induite par la papavérine puisque cette dernière ne permet pas d'inhiber efficacement l'interaction entre CDK5 et p53. L'éthavérine est plus flexible mais possède aussi des groupements éthyles qui confèrent une orientation différente aux atomes d'hydrogènes que celle dans les groupements méthyles de la papavérine. Cela peut avoir des conséquences sur les liaisons entre CDK5 et p53, qui en présence d'éthavérine, seront engagées dans des interactions hydrogènes ou de Van der Waals qui ne sont pas permises par la papavérine de par ses propriétés structurales et physico-chimiques différentes. L'éthavérine apparaît donc comme une molécule efficace face à un spectre plus large de substrats de CDK5.

VI. Perspectives

L'éthavérine et de la papavérine ont été identifiées comme des inhibiteurs allostériques de CDK5. Le repositionnement de ces composés, initialement identifiés comme des inhibiteurs de PDE4 et PDE10, peuvent cibler CDK5 et agir sur la régulation de fonctions essentielles dans le développement de certains cancers est une nouveauté. L'identification de modulateurs allostériques est nécessaire pour le développement d'inhibiteurs efficaces et spécifiques de CDK5 et des kinases en général. L'utilisation d'une stratégie combinatoire associant un inhibiteur ATP-compétitif à un inhibiteur allostérique ont montré un effet additif sur l'inhibition de la prolifération cellulaire. Le ciblage de poches différentes de la kinase permet d'altérer sa conformation et potentiellement inhiber des voies de signalisation distinctes, prouvant que la stratégie combinatoire reste une solution efficace lorsque la monothérapie atteint ses limites.

Les inhibiteurs allostériques sont une opportunité pour le développement d'inhibiteurs spécifiques des kinases. Néanmoins l'utilisation d'inhibiteurs classiques qui visent la poche ATP ne sont pas totalement obsolètes et peuvent être combinés à ces nouveaux inhibiteurs. Il serait intéressant de poursuivre des études sur l'identification et le développement

d’inhibiteurs allostériques CDK5 qui ouvrent la voie à un ciblage spécifique de la kinase. Le repositionnement de médicaments est une possibilité offrant l’avantage de pouvoir identifier des inhibiteurs allostériques de CDK5. CDKCONF5 est un outil intéressant permettant d’identifier des nouveaux modulateurs allostérique de CDK5 notamment par repositionnement de médicament. Cela a permis d’identifier des inhibiteurs déjà décrits pour leur efficacité sur PDE4 et PDE10. Cette stratégie de repositionnement de molécules pourrait être une voie à explorer car cela avait déjà été observé avec le Tamoxifène (Corbel *et al.*, 2015). Il existe déjà plusieurs approches basées sur la fluorescence et la modélisation informatique permettant d’identifier des inhibiteurs allostériques de CDK5 (Zhang *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2013; Simard and Rauh, 2014; Corbel *et al.*, 2015; Fang *et al.*, 2015; Peyressatre, Arama, *et al.*, 2020). Des études structurales du complexe CDK5/p25 en interaction avec l’éthavérine et la papavérine seraient également une approche pour identifier ou se situe l’interaction avec les inhibiteurs. L’identification de la poche allostérique permettant de moduler la conformation de CDK5 pourrait être un atout pour développer des inhibiteurs plus performants de CDK5.

CDK5 est largement décrite pour son rôle dans les pathologies neurodégénératives, mais son rôle est de mieux en mieux identifié dans certains cancers où elle est impliquée dans la formation de métastases ou dans les réactions inflammatoires. Finalement l’identification de l’éthavérine comme un inhibiteur efficace de CDK5 par la voie p53 est une approche thérapeutique dont le potentiel mérite de plus amples recherches.

MATERIELS ET METHODES

I. Production et purification de protéines recombinantes

1. Préparation de *E.coli* BL21 DEA3 compétentes

Les bactéries *E.coli* BL21 DEA3 codon pLysS + ont été cultivées dans 100 ml de milieu LB (Luria-Bertani Lysogeny Broth) jusqu'à ce que la Densité optique (DO) à 600nm atteigne 0,6. Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 4000 tr/min, à 4°C pendant 15 min (rotor TX-1000, Thermo Scientific). Le culot cellulaire a été remis en suspension dans 5 ml de tampon TSS (Transformation & Storage Solution) froid (10 ml de LB ; 10% de PEG 3000-8000 ; 50 mM de MgCl2 ; 5% de DMSO ; filtré sur 0,2 µm), divisé en aliquots de 200 µl et congelé rapidement dans de l'azote liquide. Les cellules compétentes ont ensuite été stockées à -80°C.

2. Transformation bactérienne

50 µL bactéries compétentes ont été décongelées sur de la glace et incubées avec 100ng ADN plasmidique dans 3-5 µl sur de la glace pendant 20 minutes avant un choc thermique de 45 secondes à 42°C. Ensuite 300 µl de milieu LB ont été ajoutés et les bactéries transformées ont été incubées à 37°C pendant 1 heure puis étalées sur des boîtes de LB (50 µg / ml d'ampicilline). Les boîtes ont ensuite été incubées à 37°C pendant la nuit afin de permettre la croissance des colonies bactériennes.

3. Induction de la protéine recombinante GST-CDK5

Des colonies uniques de *E.coli* BL21 transformées par le plasmide pGex6P1-GSTCDK5 ont été cultivées dans 100 ml de LB + Amp (50 µg / ml) à 37°C sous agitation pendant une nuit. La culture a été diluée dans 1 litre de milieu LB + Amp (50 µg / ml) et incubée dans les mêmes conditions jusqu'à ce que la DO (600) atteigne 0,6 (environ 2-3 h), où 0,5 mM d'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) a été ajouté pour induire l'expression de la GST-CDK5 recombinante soluble pendant 5h à 25°C. Les bactéries ont ensuite été récoltées par

centrifugation à 4000 tr/min pendant 20 min (rotor TX-1000, Thermo Scientific). Le culot bactérien a été remis en suspension dans 25 ml de tampon de lyse PBS contenant 1mM PMSF et 1mM de lysozyme et conservé à -80°C jusqu'à la prochaine manipulation. L'expression des protéines a été vérifiée en comparant une fraction de culture non induite et induite par SDS-PAGE avant purification.

4. Purification de la protéine recombinante GST-CDK5

Les culots de cellules bactériennes ont été décongelés puis lysées par sonication. Le surnageant a été récupéré par centrifugation à 13 000 tr/min pendant 30 min (rotor F15-8x50cy, Thermo Scientific), puis filtré à travers des membranes Millipore de 0,45 µm et 0,2 µm (ClearLine) avant purification par chromatographie.

La purification de GST-CDK5 a été réalisée par FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) avec une Äkta start (GE Healthcare).

Le surnageant a d'abord été purifié par affinité sur colonne de 5 ml GSTrap High Performance (GE Healthcare) dans du tampon PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, référence : D8537, Sigma) et élué avec 50 mM glutathion réduit (Euromedex) dilué dans du PBS. Afin d'éliminer le glutathion, la fraction éluée de GST-CDK5 est passée sur colonne de dessalage HiTrap Desalting (GE Healthcare). La pureté de la protéine est vérifiée sur Gel SDS-PAGE puis dosée à 280 nm (Nanodrop™ ND-1000 Thermo Scientific) afin de déterminer sa concentration.

II. Biochimie

1. Préparation des échantillons

Pour vérifier l'induction de GST-CDK5, 1 ml de culture bactérienne ont été prélevés avant et après l'induction par IPTG. Après centrifugation pendant 5 min à 10000 tr/min (rotor 75003424, Thermo Scientific), le culot bactérien a été remis en suspension dans 50 µl de H_2O + 50 µl de tampon Laemmli, puis soniqué pendant 20 s. Les échantillons ont ensuite été chauffés à 95°C pendant 5 minutes et déposés sur gel SDS-PAGE.

2. Gels SDS-PAGE

Des gels de concentration à 4% d'acryl/bisacryl et de séparation à 15% ont été préparés. Les échantillons de protéines dénaturés et un marqueur de protéine (« Low Molecular Weight Calibration Kit », Amersham,) ont été chargés dans les puits du gel et mis à migrer à 250 V pendant 1 h en utilisant l'équipement « Mini PROTEAN Tetra Cell » (Bio-Rad).
Les gels ont été colorés au bleu de Coomassie (« Blue Brillant » Sigma) pendant 2 min, puis décolorés à l'eau avant d'observer les bandes de protéines.

3. Western Blotting

a. Préparation des échantillons

Voir le paragraphe « **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**.**Erreur ! Source du renvoi in trouvable.** » pour la préparation des extraits cellulaires. La concentration en protéines totale a été déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre « Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific) et d'une courbe d'étalonnage faite avec de la BSA (de 0.01 à 10mg/ml). La normalisation pour obtenir 1mg/ml de protéines a été réalisée par dilution dans du tampon de lyse à base de PBS.

b. SDS-PAGE

Des gels de concentration à 4% d'acryl/bisacryl et de séparation à 15% ont été préparés comme décrit ci-dessus. Les échantillons de protéines dénaturées et un marqueur de protéine (« Low Molecular Weight Calibration Kit », Amersham,) ont été chargés dans le gel et mis à migrer à 250 V pendant 1 h en utilisant l'équipement « Mini PROTEAN Tetra Cell » (Bio-Rad).

c. Transfert des protéines sur membrane

Les protéines séparées par SDS-PAGE ont ensuite été transférées sur une membrane de PVDF (PolyVinylidene DiFluoride, membrane Immobilon-P, Merck Millipore) pendant 1h15 à 100V en utilisant un tampon de transfert conservé à 4°C et un système de transfert liquide refroidit avec de la glace.

d. Saturation de la membrane

De la BSA (Bovine Serum Albumin, référence : P6154, Dutscher) diluée à 5% a été préparée dans du PBS avec 0,1% de Tween et les membranes ont été bloquées par incubation pendant 1 heure à température ambiante.

e. Anticorps primaire

Les anticorps primaires monoclonaux suivants ont été utilisés pour différentes expériences de Western-Blotting : anti-CDK5 (Souris, Santa-Cruz SC-249, 1:500), anti-SOD1 (Lapin, Sigma-Aldrich HPA001401, 1:2500), anti-Tubuline (Souris, Cell Signaling 3873S, 1:1500), anti-Vimentine (Lapin, Cell Signaling D21H3, 1:1000) et anti-Cycline E (Souris, SC-247, 1:1000).
Les anticorps primaires ont été dilués dans du PBS/tween 0,1%/ BSA 5%. La membrane a ensuite été incubée avec l'anticorps primaire pendant une nuit à 4°C suivie de 3 lavages pendant 10 min avec PBS 0.1% Tween.

f. Anticorps secondaire

L'anticorps anti-souris (Amersham, NA931) ou anti-lapin (Amersham NA9340V) conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) ont été dilués à 1:10000 dans du PBS/tween 0,1%/ BSA 5%. La membrane a été incubée pendant 60 minutes à température ambiante, puis 3 lavages de 5 minutes dans du PBS Tween 0.1% ont été fait.

g. Détection

ECL (ECL^{TM} Prime Western blotting detection reagent, GE Healthcare) a été ajouté sur la membrane et incubé pendant 2 min. La Peroxydase de raifort présente sur l'anticorps secondaire va oxyder le luminol, présent dans l'ECL, qui va émettre de la lumière. La chimiluminescence a été détectée à l'aide d'une caméra d'imagerie à chimiluminescence (Amersham Imager 680, Ge Healthcare).

4. Expériences de titration fluorescentes

a. Peptide Tau et couplage avec la sonde TP-2Rho

La séquence du substrat peptidique Tau, ou peptide Tau, est dérivée des résidus 195-209 des isoformes 5 et 8 de la protéine Tau et a été décrit comme un substrat peptidique spécifique de CDK5/p25 (Goedert *et al.*, 1989; Wada *et al.*, 1998; Peyressatre, Laure, *et al.*, 2020). La séquence est la suivante : SGYSSPGSCSTPGSR (1427,6 Da), une cystéine a été incorporée afin de permettre le couplage avec une sonde fluorescente sur le groupement thiol. Le peptide a été synthétisé et purifié par GLS Biochem.

Le peptide a été préparé dans de l'H_2O (1% DMSO) à une concentration de 10^{-3} M puis dilué à 10^{-4} M dans du PBS avant d'être couplé à la sonde TP2-Rho. Le fluorophore TP-2Rho était stocké à -20°C dans du DMSO à une concentration de 2.10^{-3} M, puis ajouté en excès 2 fois avec le peptide pour réaliser un couplage à 4°C sur la nuit et sous rotation. La solution peptide-

sonde a ensuite été purifiée sur des colonnes NAP5 (GE Healthcare) avec du PBS afin d'éliminer l'excès de sonde libre. L'absorbance était ensuite mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre « Nanodrop^{TM} ND-1000 (Thermo Scientific), et la concentration de peptide couplé à la sonde a été déterminée par application de la loi de Beer-Lambert : A = ε.l.C (ou A correspond à l'absorbance, ε au coefficient d'extinction molaire, l la longueur du trajet optique et C la concentration). La sonde TP-2Rho a été aimablement fournie par le Dr. Florence Mahuteau-Betzer de l'institut Curie (Dumat ***et al.***, 2012). Tp-2Rho possède les propriétés physico-chimiques suivantes :

- ε (coefficient d'extinction molaire $M^{-1}.cm^{-1}$) : 58 900
- λ excitation (nm) : 514
- λ émission (nm) : 610
-

b. Interaction Protéine-Substrat

Les titrations de fluorescence ont été réalisées dans des plaques 96 puits noires (Greiner Bio-one) en utilisant un spectrofluorimètre Clariostar^{TM} (BMG) thermostaté à 30°C pendant 40 minutes dans un volume final de 200 µl. L'émission de fluorescence du peptide-substrat marqué au TP-2Rho à une concentration finale de 1 µM dilué dans du PBS (Sigma) a été mesuré à 614nm après excitation à 510nm, après incubation avec différentes concentrations de protéine recombinante GST-CDK5. Une préincubation des inhibiteurs avec GST-CDK5 était réalisée pendant 30 min à température ambiante. La concentration d'inhibiteur était 10 fois supérieure à celle de GST-CDK5.

L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel GraFit (Erathicus Ltd). L'ajustement de la courbe et le calcul de la constante de dissociation, pour l'interaction entre GST-CDK5 et le peptide Tau, a été réalisé à l'aide d'une équation quadratique:

$$F = Fmin + (Fmax - Fmin) * \frac{Kd + L + p - \sqrt{(\sqrt{(Kd + L + p)^2} - 4 * p)}}{2 * p}$$

où F correspond à la fluorescence, Fmax la fluorescence maximale, Fmin la fluorscence minimale, Kd la constante de dissociation, p la concentration en peptide fluorescent et L la concentration en ligand.

Explication de l'équation quadratique (Heitz *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 2002), démonstration provenant de la thèse de Morgan Pellerano détaillée dans le matériel et méthodes (2019) :

Sachant que : $Kd = \frac{[\mathrm{E}]*[S]}{[\mathrm{ES}]}$ et

[E] = [E_0] – [ES] où [E] et la concentration en ensyme et [E_0] la concentration initiale d'enzyme et [ES] la cocentration en complexe Enzyme/Substrat

[S] = [S_0] – [ES] où [S] et la concentration en substrat et [S_0] la concentration initiale de substat et [ES] la concentration en complexe Enzyme/Substrat

Donc

$$Kd = \frac{([E_0]-[ES])*([S_0]-[ES])}{[\mathrm{ES}]} \text{ soit } Kd = \frac{[E_0]*[S_0]-[E_0]*[ES]-[ES]*[E_0]+[ES]^2}{[\mathrm{ES}]}$$

Ou :

$$Kd * [ES] = [E_0] * [S_0] - [E_0] * [ES] - [ES] * [S_0] + [ES]^2$$

Nous avons fait ici des expériences de titration de fluorescence :

[E_0] la concentration initiale du titrant ou ligand que l'on va appeler L

[S_0] la concentration initiale du substrat ou peptide fluorescent soit [Fmin] que l'on va appeler p.

A chaque titration, l'ajout de titrant va entrainer un increment de fluorescence : ΔF soit (F-Fmin).

La concentration en complexe Enzyme/Substrat est donc le rapport entre, la différence d'emission de fluorescence, sur l'amplitude de l'émission de fluorescence, soit :

$$[ES] = \frac{[E]*[\mathrm{S}]}{Kd} = \frac{(\mathrm{F}-\mathrm{Fmin})*L}{\mathrm{Fmax}-\mathrm{Fmin}}$$

On peut donc écrire :

$$Kd * \frac{(\mathrm{F}-\mathrm{Fmin})*L}{\mathrm{Fmax}-\mathrm{Fmin}} = \mathrm{L}*p - L*\frac{(\mathrm{F}-\mathrm{Fmin})*L}{\mathrm{Fmax}-\mathrm{Fmin}} - \frac{(\mathrm{F}-\mathrm{Fmin})*L}{\mathrm{Fmax}-\mathrm{Fmin}}*p + (\frac{(\mathrm{F}-\mathrm{Fmin})*L}{\mathrm{Fmax}-\mathrm{Fmin}})^2$$

Qui peut aussi s'écrire de la manière suivante :

$$0 = \underbrace{(\frac{(\mathrm{F}-\mathrm{Fmin})*L}{\mathrm{Fmax}-\mathrm{Fmin}})^2}_{ax^2} \underbrace{- (\frac{(\mathrm{F}-\mathrm{Fmin})*L}{\mathrm{Fmax}-\mathrm{Fmin}})*(Kd+L+p)}_{bx} + \underbrace{L*p}_{c}$$

Il s'agit bien d'une équation quadratique du style $ax^2 + bx + c = 0$ avec :

a = 1

b = (Kd+L+p)

c = L * p

Qui se résoud de la manière suivante $x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2-4ac}}{2a}$

On peut donc noter :

$$\frac{(\mathrm{F}-\mathrm{Fmin})*p}{\mathrm{Fmax}-\mathrm{Fmin}} = \frac{\mathrm{Kd}+\mathrm{p}+\mathrm{L}-\sqrt{(Kd+p+L)^2-4*p*L}}{2*p}$$

soit

$$F = Fmin + (Fmax - Fmin) * \frac{Kd + L + p - \sqrt{(\sqrt{(Kd+L+p)^2} - 4*p)}}{2*p}$$

où F correspond à la fluorescence, Fmax la fluorescence maximale, Fmin la fluorscence minimale, Kd la constante de dissociation, p la concentration en peptide fluorescent et L la concentration en ligand.

III. Biologie cellulaire

1. Lignée cellulaire et milieu de culture

Les milieux de culture cellulaire (RPMI 1640 W/GLUTAMAX-I et DMEM+GLUTAMAX) ont été acheté chez Life technologie, le sérum (Fetal Bovine Serum : F7524) et les antibiotiques (Penicilin/streptomycin ref : P4333) chez Sigma-Aldrich. La lignée cellulaire A549 a été obtenue auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection) et la lignée U87 a été généreusement fournie par le Prof. Nobert Bakalara (ex INM, Montpellier et actuel directeur de l'ENSTBB, Bordeaux) et le Dr. Christine Fabre (INM, Montpellier) . Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C contenant 5°CO_2. La lignée cellulaire A549 a été cultivée dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) + Glutamax supplémenté avec 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal), 100 unités / ml de pénicilline (sel de sodium) et 100 µg / ml de streptomycine à 37 ° C dans une atmosphère contenant 5% de CO_2. La lignée cellulaire U87 a été cultivée dans les mêmes conditions en remplaçant le milieu RPMI par du DMEM.

Pour les expériences d'immunofluorescence en microscopie à épifluorescence, du milieu RPMI sans rouge de phénol a été utilisé (RPMI 1640 (1X) without phénol red, life technologie, ThermoFisher).

2. Préparation des extraits cellulaires

Les cellules ont été cultivées jusqu'à une confluence de 90%, lavées avec du PBS, puis récoltées par grattage dans du PBS, suivies d'une centrifugation de 10 min à 13 000 tr/min (rotor 75003424, Thermo Scientific) à 4°C. Les cellules présentes dans les culots cellulaires ont ensuite été lysés dans du tampon de lyse à base de PBS contenant de l'inhibiteur de protéase (Protease Inhbitor Cocktail Complete, Roche) avec des seringues 21G puis 26G (Terumo). Après centrifugation des extraits cellulaires pendant 10 min à 13 000 tr/min (rotor 75003424, Thermo Scientific) à 4°C, le surnageant a été recueilli. La concentration en protéines solubles a été déterminée en mesurant l'absorbance à 280 nm à l'aide d'un

spectrophotomètre Nanodrop™ (Thermo Scientific) et d'une courbe d'étalonnage faite avec de la BSA (de 0.01 à 10mg/ml). La normalisation a été réalisée par dilution dans du tampon de lyse à base de PBS (voir annexe).

Traitements des extraits cellulaires pour les tests de complexes macromoléculaire ou de stabilité

Les cellules ont été cultivées comme décrit précédemment jusqu'à atteindre une confluence de 70%-80%. Le milieu était retiré et les cellules lavées avec du PBS afin d'éliminer les débris cellulaires. Du milieu frais contenant les inhibiteurs à la concentration désirée était ajoutée aux cellules afin de réaliser un traitement sur 24h, 48h, 72h ou 96h.

3. Test de prolifération cellulaire (Crystal Violet)

Pour les tests de proliférations, les cellules sont traitées à la concentration désirée 24h après l'ensemencement. Lors des tests de prolifération avec les U87, les cellules ont étés ensemencées dans des plaques 12 puits à une densité de 15 000 cellules/puits. Pour les autres tests de prolifération (A549, H1299 et PC9), les cellules ont été ensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 4000 cellules/puits.

Les cellules ont ensuite lavées deux fois avec du PBS. La fixation a été effectuée par incubation dans du PFA (paraformaldéhyde) à 4% (dilué dans du PBS) pendant 10 min à température ambiante. Le PFA est retiré puis les cellules sont puis incubées avec du « cristal violet » (Sigma) pendant 30 min (Gillies et al, 1986). Les cellules ont ensuite été lavées trois fois avec de l'H_2O avant l'ajout d'acide acétique à 10%. La croissance relative des cellules est obtenue pour chaque puits par mesure de la densité optique à 595 nm à l'aide d'un spectrofluorimètre Clariostar™ (BMG).

4. Thermodénaturation

La préparation des échantillons cellulaires d'A549 a été adaptée du protocole décrit dans (Miettinen et al., 2018). Les cellules A549 ont été ensemencées à une densité de 5 x 105 cellules dans des boîtes de Petri (100 mm ø), puis incubées 48h à 37°C dans une atmosphère contenant 5% CO2. Les cellules étaient ensuite lavées avec du PBS puis récoltées par grattage dans du PBS, suivies d'une centrifugation de 10 min à 13 000 tr/min (rotor 75003424, Thermo Scientific) à 4 °C. Les culots cellulaires étaient resuspendus dans 500 µl de PBS contenant de l'inhibiteur de protéase (Protease Inhbitor Cocktail Complete, Roche), puis traités avec 11 µM de DMSO, d'éthavérine, 9 µM de Roscovitine ou 8 µM de papavérine pendant 1h à 37°C sous rotation. Les échantillons étaient ensuite séparées équitablement en 8 fractions de 50 µl afin d'être thermodénaturés. Les fractions étaient chauffées dans un thermocycleur PCR (Biometra T Personal Thermocycler) pendant 3 min à différentes températures (37°C, 41°C, 45°C, 49°C, 55°C, 60°C, 63°C et 69°C). Les fractions étaient ensuite lysées en ajoutant 50 µl de tampon de lyse PBS pendant 1h à 4°C sous rotation. Les fractions ont par la suite été centrifugées à 13 000 tr/min pendant 15 min à 4°C et 30 µl de surnageant était récolté de chaque fractions et chauffés avec 30 µl de Laemmli à 95°C pendant 5 min. Les échantillons étaient soit directement utilisés pour faire des Western-Blots, soit stockés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

IV. Microscopie

1. Immunofluorescence

a. Fixation cellulaire et coloration de Hoechst

La fixation des cellules a été effectuée par incubation dans du PFA à 4% (dilué dans du PBS) pendant 5 min à température ambiante, suivie de 3 lavages dans du PBS. Hoechst 33342 (Sigma) dilué au 1/10000 dans H_20 MilliQ (1 µg / ml) a été ajouté, pour colorer les noyaux, à température ambiante pendant 5 min, suivis de 2 lavages dans du PBS. Les lamelles ont ensuite été fixées sur des lames de microscope (Superfrost™; Thermo Scientific) avec du Mowiol.

2. Expérience de vidéomicroscopie (time-lapse)

Les cellules A549 ont étés ensemencées dans des plaques 6 puits à une densité de 35 000 cellules/puits puis incubées 48h à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO_2. Les cellules sont ensuite traitées à la concentration désirée en composé. Les clichés de microscopie à contraste de phase étaient acquises automatiquement avec un microscope inversé Olympus IX83 équipé avec un objectif 40X LUCPLFLN 0.6NA PH2. Pour chaque puits, au minimum 6 champs étaient imagés toutes les 10 min pendant 24h. L'acquisition d'images à une résolution de 2048 x 2048 pixels été réalisée à l'aide d'une caméra scMOS ZYLA 4.2MP pilotée par le logiciel MetaMorph. Les clichés enregistrés au format .TIF étaient analysés avec le logiciel ImageJ afin de construire des « stacks » et de compter les divisions cellulaires manuellement via le plugin « Cell Counter ».

3. Expérience de migration cellulaire

Les tests de migration cellulaire ont été adaptés à partir des expériences de cicatrisation décrit dans (Liang, Park and Guan, 2007). Les cellules A549 ont étés ensemencées dans des

plaques 6 puits à une densité de 200 000 cellules/puits puis incubées 48h à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO_2. Dans chaque puit, une strie linéaire était effectué manuellement dans la monocouche cellulaire avec un cône stérile de 200µl. Les puits étaient ensuite lavés 5 fois avec du PBS afin de retirer tous les débris cellulaires issus du strie effectué. Les puits étaient ensuite incubées avec du milieu frais contenant les composés à la concentration désirée. Les clichés de microscopie à contraste de phase étaient acquises automatiquement avec un microscope inversé Olympus IX83 équipé avec un objectif 10X UPFLN 0.3NA PH1. Pour chaque puits, au minimum 3 champs étaient imagés toutes les 30 min pendant 48h. L'acquisition d'images à une résolution de 2048 x 2048 pixels été réalisée à l'aide d'une caméra scMOS ZYLA 4.2MP pilotée par le logiciel MetaMorph. Les clichés enregistrés au format .TIF étaient analysés avec le logiciel ImageJ afin de construire des « stacks » et la recolonisation cellulaire était mesurée via le plugin « Wound healing Tool » (Suarez-Arnedo *et al.*, 2020).

V. Statistiques

Toutes les données expérimentales ont été analysées et représentées sous la forme de la moyenne ± SD (Standard Deviation), à l'exception des expériences de prolifération qui ont été représentés par la moyenne ± SEM (Standard Error of the Mean). Les résultats sont issus d'au minimum 3 expériences indépendantes, sauf contre-indication décrite sur la figure. Les analyses statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel PRISM 8 (GraphPad, San Diego California, USA). Les p-values ont été calculées à partir de l'analyse de variance unidirectionnelle (One-way ANOVA), après avoir testé et validé la normalité des échantillons. Toutes les comparaisons statistiques ont été effectués relativement à la condition non traitée (MOCK). Les différences statistiques significatives ont été définies de la manière suivante : *p < 0.0332, **p < 0.0021, ***p <0.002 et ****p<0.0001.

ANNEXE A

Tampon de lyse PBS

Tampon PBS

+ 0.1 % NP40

+ 3.3 mM PMSF

+ 0.33 mg/ml lysozyme

Bouillon LB

10 g/l Tryptone

10 g/l NaCl

5 g/l yeast extract

Tampon TSS

10 ml LB

10 % Polyethylene glycol 3000 - 8000

50 mM $MgCl_2$

5 % DMSO

Bouillon LB/ampicilline

Bouillon LB

+ 50 mg/l ampicilline

Boîte de pétri LB/ampicilline

Bouillon LB + 15 g/l Agar

Autoclave pendant 20min
Laisser refroidir jusqu'à 50°C dans une atmosphère, ajouter 100 mg/L d'ampicilline et verser 25 ml de LB agar par boite de pétri de 10 cm.
Lorsque le LB Agar est solidifié, inverser les plaques, fermer avec du parafilm et conserver à 4 ° C

Tampon Laemmli 2.5X

1 ml Bleu de Bromophenol 2 % (dilué dans de l'éthanol 96%)

15 mL glycerol 100 % 1.54 g DTT

10 mL SDS 20 %

8 ml Tris 1M pH=6.8 46 ml H_2O

Tampon de séparation SDS-PAGE 15% (200 ml)

75 ml Acrylamide/Bis-Acrylamide (37,5/1) mix

50 ml Tris 1.5 M pH=8.8

73 ml H2O2 ml SDS 10 %

Tampon de concentration SDS-PAGE 4% (200 ml)

22 ml Acrylamide

13 ml Bis-Acrylamide

25 ml Tris 1 M pH=6.8

2 ml SDS 10 % 138 mL H2O

Bleu de Coomassie

6 g Brilliant Blue R (Sigma Aldrich)

Ajouter 100 ml acide acétique pour solubiliser la poudre

Ajouter 300 ml éthanol 96%

Ajouter 600 ml H H_2O

Tampon de transfert

144 g glycine

30.2 g Tris-Base

900ml H_2O

Tampon de saturation

PBS

5 % BSA

0.1 % tween 20

Tampon de lyse PBS

PBS pH 7.4 (Sigma)

0.2 % NP40

2 mM PMSF

1 mM EDTA

Complete™ protease inhibitors (Roche)

ANNEXE B

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Mock (T24) vs. Rosco (T24)	52,7	24,5 to 81,0	Yes	****	<0,0001
Mock (T24) vs. Rosco_Seq (T24)	49,0	7,38 to 90,6	Yes	*	0,0113
Mock (T24) vs. ETHAVERINE (T24)	46,7	15,9 to 77,6	Yes	***	0,0004
Mock (T24) vs. ETHAVERINE_Seq (T24)	48,0	6,38 to 89,6	Yes	*	0,0140
Mock (T24) vs. PAPAVERINE (T24)	45,2	14,4 to 76,1	Yes	***	0,0007
Mock (T24) vs. PAPAVERINE_Seq (T24)	42,8	1,22 to 84,4	Yes	*	0,0398
Mock (T24) vs. Rosco/Etha (T24)	79,8	46,4 to 113	Yes	****	<0,0001
Mock (T24) vs. Rosco/Etha_Seq (T24)	72,3	30,7 to 114	Yes	****	<0,0001
Mock (T24) vs. Rosco/Papa (T24)	73,8	40,4 to 107	Yes	****	<0,0001
Mock (T24) vs. Rosco/Papa_Seq (T24)	63,8	22,2 to 105	Yes	***	0,0003

Tableau 29. Détermination de la p-value avec un test ANOVA à un facteur sur les tests de prolifération cellulaire des A549 24h après traitement.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Mock (T48) vs. Rosco (T48)	208,8	135,5 to 282,2	Yes	****	<0,0001
Mock (T48) vs. Rosco_Seq (T48)	307,6	199,8 to 415,5	Yes	****	<0,0001
Mock (T48) vs. ETHAVERINE (T48)	174,6	94,53 to 254,6	Yes	****	<0,0001
Mock (T48) vs. ETHAVERINE_Seq (T48)	214,8	107,0 to 322,6	Yes	****	<0,0001
Mock (T48) vs. PAPAVERINE (T48)	145,7	65,67 to 225,7	Yes	****	<0,0001
Mock (T48) vs. PAPAVERINE_Seq (T48)	205,0	97,15 to 312,8	Yes	****	<0,0001
Mock (T48) vs. Rosco/Etha (T48)	340,5	254,1 to 427,0	Yes	****	<0,0001
Mock (T48) vs. Rosco/Etha_Seq (T48)	376,8	269,0 to 484,6	Yes	****	<0,0001
Mock (T48) vs. Rosco/Papa (T48)	321,4	234,9 to 407,8	Yes	****	<0,0001
Mock (T48) vs. Rosco/Papa_Seq (T48)	368,8	261,0 to 476,6	Yes	****	<0,0001

Tableau 30. Détermination de la p-value avec un test ANOVA à un facteur sur les tests de prolifération cellulaire des A549 48h après traitement.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Mock (T72) vs. Rosco (T72)	470,2	346,5 to 593,9	Yes	****	<0,0001
Mock (T72) vs. Rosco_Seq (T72)	687,2	530,9 to 843,5	Yes	****	<0,0001
Mock (T72) vs. ETHAVERINE (T72)	467,8	332,8 to 602,8	Yes	****	<0,0001
Mock (T72) vs. ETHAVERINE_Seq (T72)	560,7	404,4 to 717,0	Yes	****	<0,0001
Mock (T72) vs. PAPAVERINE (T72)	381,2	246,2 to 516,3	Yes	****	<0,0001
Mock (T72) vs. PAPAVERINE_Seq (T72)	386,1	229,8 to 542,3	Yes	****	<0,0001
Mock (T72) vs. Rosco/Etha (T72)	815,2	669,3 to 961,0	Yes	****	<0,0001
Mock (T72) vs. Rosco/Etha_Seq (T72)	859,9	703,7 to 1016	Yes	****	<0,0001
Mock (T72) vs. Rosco/Papa (T72)	759,9	614,1 to 905,8	Yes	****	<0,0001
Mock (T72) vs. Rosco/Papa_Seq (T72)	835,8	679,5 to 992,1	Yes	****	<0,0001

Tableau 31. Détermination de la p-value avec un test ANOVA à un facteur sur les tests de prolifération cellulaire des A549 72h après traitement.

ANNEXE C

	Mock	Roscovitine	Ethaverin	Papaverin	Rosco-Etha	Rosco-Papa
Number of values	12	12	12	12	12	12
Minimum	20,00	8,000	11,00	8,000	3,000	1,000
25% Percentile	24,25	11,00	14,25	14,25	5,000	2,000
Median	31,50	12,00	21,50	18,50	5,000	4,500
75% Percentile	38,75	24,00	25,25	21,00	7,500	5,750
Maximum	44,00	27,00	26,00	25,00	12,00	11,00
Mean	31,50	15,67	19,50	17,42	6,250	4,583
Std. Deviation	7,845	6,760	5,600	4,660	2,734	3,059
Std. Error of Mean	2,265	1,951	1,617	1,345	0,7894	0,8830

Tableau 32. Statistiques descriptives des tests de division cellulaire des A549 entre 0h et 24h après traitement.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Mock vs. Roscovitine	15,83	10,12 to 21,55	Yes	****	<0,0001
Mock vs. Ethaverin	12,00	6,285 to 17,71	Yes	****	<0,0001
Mock vs. Papaverin	14,08	8,369 to 19,80	Yes	****	<0,0001
Mock vs. Rosco-Etha	25,25	19,54 to 30,96	Yes	****	<0,0001
Mock vs. Rosco-Papa	26,92	21,20 to 32,63	Yes	****	<0,0001

Tableau 33. Détermination de la p-value avec un test ANOVA à un facteur sur les tests de division cellulaire des A549 entre 0h et 24h après traitement.

	Mock	Roscovitin	Ethaverin	Papaverin	Rosco-Etha	Rosco-Papa
Number of values	13	13	13	13	13	13
Minimum	32,00	15,00	2,000	0,000	0,000	0,000
25% Percentile	36,00	22,00	3,000	2,000	0,5000	2,000
Median	46,00	24,00	5,000	3,000	2,000	4,000
75% Percentile	61,50	28,00	6,000	5,000	4,000	5,000
Maximum	72,00	34,00	6,000	7,000	5,000	6,000
Mean	48,62	24,46	4,308	3,308	2,077	3,231
Std. Deviation	14,32	5,502	1,548	2,057	1,754	1,833
Std. Error of Mean	3,972	1,526	0,4294	0,5705	0,4865	0,5083

Tableau 34. Statistiques descriptives des tests de division cellulaire des A549 entre 24h et 48h après traitement.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Mock vs. Roscovitine	24,15	17,67 to 30,64	Yes	****	<0,0001
Mock vs. Ethaverin	44,31	37,82 to 50,80	Yes	****	<0,0001
Mock vs. Papaverin	45,31	38,82 to 51,80	Yes	****	<0,0001
Mock vs. Rosco-Etha	46,54	40,05 to 53,03	Yes	****	<0,0001
Mock vs. Rosco-Papa	45,38	38,90 to 51,87	Yes	****	<0,0001

Tableau 35. Détermination de la p-value avec un test ANOVA à un facteur sur les tests de division cellulaire des A549 entre 24h et 48h après traitement.

	DMSO	Rosco	Ethaverin	Papaverin	Rosco-Etha	Rosco-Papa
Number of values	6	6	6	6	6	7
Minimum	0,3378	0,1760	0,2876	0,2068	0,1556	0,1321
25% Percentile	0,3485	0,1941	0,2953	0,2090	0,1593	0,1480
Median	0,3925	0,2205	0,3137	0,3087	0,1851	0,2631
75% Percentile	0,4470	0,2832	0,3582	0,3783	0,2338	0,2753
Maximum	0,4598	0,3064	0,3667	0,3884	0,3045	0,3451
Mean	0,3962	0,2331	0,3225	0,2996	0,2002	0,2364
Std. Deviation	0,05440	0,04905	0,03185	0,07905	0,05598	0,07508
Std. Error of Mean	0,02221	0,02002	0,01300	0,03227	0,02285	0,02838

Tableau 36. Statistiques descriptives des tests de migration cellulaire des A549 entre 0h et 24h après traitement.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant ?	Summary	Adjusted P Value
DMSO vs. Rosco	0,1631	0,07087 to 0,2553	Yes	***	0,0003
DMSO vs. Ethaverin	0,07375	-0,01846 to 0,1660	No	ns	0,1520
DMSO vs. Papaverin	0,09666	0,004446 to 0,1889	Yes	*	0,0374
DMSO vs. Rosco-Etha	0,1960	0,1038 to 0,2882	Yes	****	<0,0001
DMSO vs. Rosco-Papa	0,1598	0,07099 to 0,2487	Yes	***	0,0002

Tableau 37. Détermination de la p-value avec un test ANOVA à un facteur sur les tests de migration cellulaire des A549 entre 0h et 24h après traitement.

	DMSO	Rosco	Ethaverin	Papaverin	Rosco-Etha	Rosco-Papa
Number of values	6	6	6	6	6	7
Minimum	0,1102	0,07432	-0,02700	-0,02481	0,02342	-0,02151
25% Percentile	0,1348	0,09690	-0,01340	0,004617	0,02792	-0,005012
Median	0,1789	0,1350	0,01411	0,02908	0,03875	0,02502
75% Percentile	0,2412	0,1900	0,02438	0,03686	0,08685	0,05766
Maximum	0,2531	0,2216	0,03302	0,04025	0,1653	0,1301
Mean	0,1836	0,1416	0,007812	0,02063	0,05939	0,03288
Std. Deviation	0,05560	0,05293	0,02217	0,02400	0,05368	0,05006
Std. Error of Mean	0,02270	0,02161	0,009053	0,009797	0,02191	0,01892

Tableau 38. Statistiques descriptives des tests de migration cellulaire des A549 entre 24h et 48h après traitement.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant ?	Summary	Adjusted P Value
DMSO vs. Rosco	0,04192	-0,02771 to 0,1116	No	ns	0,3770
DMSO vs. Ethaverin	0,1758	0,1061 to 0,2454	Yes	****	<0,0001
DMSO vs. Papaverin	0,1629	0,09330 to 0,2326	Yes	****	<0,0001
DMSO vs. Rosco-Etha	0,1242	0,05454 to 0,1938	Yes	***	0,0002
DMSO vs. Rosco-Papa	0,1507	0,08358 to 0,2178	Yes	****	<0,0001

Tableau 39. Détermination de la p-value avec un test ANOVA à un facteur sur les tests de migration cellulaire des A549 entre 24h et 48h après traitement.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
37°C					
DMSO vs. Rosco	0,000	-0,2367 to 0,2367	No	ns	>0,9999
DMSO vs. Ethaverin	0,000	-0,2647 to 0,2647	No	ns	>0,9999
DMSO vs. Papaverin	0,000	-0,2367 to 0,2367	No	ns	>0,9999
DMSO vs. Rosco-Etha	0,000	-0,2367 to 0,2367	No	ns	>0,9999
DMSO vs. Rosco-Papa	0,000	-0,2367 to 0,2367	No	ns	>0,9999
41°C					
DMSO vs. Rosco	0,04757	-0,1892 to 0,2843	No	ns	0,6906
DMSO vs. Ethaverin	-0,1336	-0,3983 to 0,1310	No	ns	0,3184
DMSO vs. Papaverin	0,2549	0,01817 to 0,4916	Yes	*	0,0351
DMSO vs. Rosco-Etha	0,05454	-0,1822 to 0,2913	No	ns	0,6482
DMSO vs. Rosco-Papa	-0,1465	-0,3833 to 0,09019	No	ns	0,2219
45°C					
DMSO vs. Rosco	0,1418	-0,09495 to 0,3785	No	ns	0,2372
DMSO vs. Ethaverin	-0,1118	-0,3764 to 0,1529	No	ns	0,4037
DMSO vs. Papaverin	0,3724	0,1356 to 0,6091	Yes	**	0,0024
DMSO vs. Rosco-Etha	0,2073	-0,02942 to 0,4440	No	ns	0,0853
DMSO vs. Rosco-Papa	-0,06935	-0,3061 to 0,1674	No	ns	0,5619
49°C					
DMSO vs. Rosco	0,01200	-0,2247 to 0,2487	No	ns	0,9200
DMSO vs. Ethaverin	0,08292	-0,1818 to 0,3476	No	ns	0,5352
DMSO vs. Papaverin	0,3334	0,09666 to 0,5701	Yes	**	0,0063
DMSO vs. Rosco-Etha	0,1195	-0,1172 to 0,3563	No	ns	0,3184
DMSO vs. Rosco-Papa	-0,1417	-0,3784 to 0,09506	No	ns	0,2375
55°C					
DMSO vs. Rosco	-0,06444	-0,3012 to 0,1723	No	ns	0,5899
DMSO vs. Ethaverin	0,1106	-0,1540 to 0,3753	No	ns	0,4084
DMSO vs. Papaverin	0,01450	-0,2222 to 0,2512	No	ns	0,9034
DMSO vs. Rosco-Etha	0,09589	-0,1408 to 0,3326	No	ns	0,4230
DMSO vs. Rosco-Papa	-0,2594	-0,4961 to -0,02262	Yes	*	0,0321
60°C					
DMSO vs. Rosco	0,02734	-0,2094 to 0,2641	No	ns	0,8190
DMSO vs. Ethaverin	0,09172	-0,1730 to 0,3564	No	ns	0,4928
DMSO vs. Papaverin	0,01022	-0,2265 to 0,2470	No	ns	0,9318
DMSO vs. Rosco-Etha	0,08444	-0,1523 to 0,3212	No	ns	0,4803
DMSO vs. Rosco-Papa	0,005382	-0,2314 to 0,2421	No	ns	0,9641
63°C					
DMSO vs. Rosco	-0,004141	-0,2409 to 0,2326	No	ns	0,9723
DMSO vs. Ethaverin	0,05180	-0,2129 to 0,3165	No	ns	0,6983
DMSO vs. Papaverin	-0,02728	-0,2640 to 0,2095	No	ns	0,8194
DMSO vs. Rosco-Etha	0,04730	-0,1894 to 0,2840	No	ns	0,6923
DMSO vs. Rosco-Papa	-0,02137	-0,2581 to 0,2154	No	ns	0,8581
69°C					
DMSO vs. Rosco	0,01692	-0,2198 to 0,2537	No	ns	0,8874
DMSO vs. Ethaverin	-0,0001448	-0,2648 to 0,2645	No	ns	0,9991
DMSO vs. Papaverin	-0,001171	-0,2379 to 0,2356	No	ns	0,9922
DMSO vs. Rosco-Etha	0,01525	-0,2215 to 0,2520	No	ns	0,8984
DMSO vs. Rosco-Papa	0,01692	-0,2198 to 0,2537	No	ns	0,8874

Tableau 40. Détermination de la p-value avec un test ANOVA à deux facteur sur les tests de thermodénaturation des A549 après traitement.

ANNEXE D

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Mock (T24) vs. Rosco (T24)	30,01	-44,32 to 104,3	No	ns	0,7408
Mock (T24) vs. Ethaverin (T24)	66,08	-8,250 to 140,4	No	ns	0,0966
Mock (T24) vs. Papaverin (T24)	61,24	-13,09 to 135,6	No	ns	0,1380
Mock (T24) vs. Rosco/Etha (T24)	76,16	1,828 to 150,5	Yes	*	0,0429
Mock (T24) vs. Rosco/Papa (T24)	72,00	-2,330 to 146,3	No	ns	0,0606

Tableau 41. Détermination de la p-value avec un test ANOVA à un facteur sur les tests de prolifération cellulaire des H1299 24h après traitement.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Mock (T48) vs. Rosco (T48)	134,3	35,98 to 232,6	Yes	**	0,0034
Mock (T48) vs. Ethaverin (T48)	206,1	107,7 to 304,4	Yes	****	<0,0001
Mock (T48) vs. Papaverin (T48)	174,7	76,34 to 273,0	Yes	****	<0,0001
Mock (T48) vs. Rosco/Etha (T48)	308,1	209,8 to 406,5	Yes	****	<0,0001
Mock (T48) vs. Rosco/Papa (T48)	284,9	186,6 to 383,3	Yes	****	<0,0001

Tableau 42. Détermination de la p-value avec un test ANOVA à un facteur sur les tests de prolifération cellulaire des H1299 48h après traitement.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Mock (T72) vs. Rosco (T72)	302,6	82,36 to 522,9	Yes	**	0,0032
Mock (T72) vs. Ethaverin (T72)	461,1	240,8 to 681,3	Yes	****	<0,0001
Mock (T72) vs. Papaverin (T72)	405,4	185,1 to 625,6	Yes	****	<0,0001
Mock (T72) vs. Rosco/Etha (T72)	704,1	483,8 to 924,4	Yes	****	<0,0001
Mock (T72) vs. Rosco/Papa (T72)	673,7	444,4 to 903,0	Yes	****	<0,0001

Tableau 43. Détermination de la p-value avec un test ANOVA à un facteur sur les tests de prolifération cellulaire des H1299 72h après traitement.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Mock (T24) vs. Rosco (T24)	51,68	-27,80 to 131,2	No	ns	0,3084
Mock (T24) vs. Ethaverin (T24)	90,62	11,14 to 170,1	Yes	*	0,0210
Mock (T24) vs. Papaverin (T24)	78,49	-0,9906 to 158,0	No	ns	0,0539
Mock (T24) vs. Rosco/Etha (T24)	102,7	23,20 to 182,2	Yes	**	0,0077
Mock (T24) vs. Rosco/Papa (T24)	92,78	13,30 to 172,3	Yes	*	0,0176

Tableau 44. Détermination de la p-value avec un test ANOVA à un facteur sur les tests de prolifération cellulaire des PC9 24h après traitement.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Mock (T48) vs. Rosco (T48)	228,0	-0,8132 to 456,8	No	ns	0,0511
Mock (T48) vs. Ethaverin (T48)	393,3	178,4 to 608,2	Yes	***	0,0001
Mock (T48) vs. Papaverin (T48)	261,8	46,89 to 476,7	Yes	*	0,0116
Mock (T48) vs. Rosco/Etha (T48)	564,9	350,0 to 779,8	Yes	****	<0,0001
Mock (T48) vs. Rosco/Papa (T48)	509,3	280,5 to 738,1	Yes	****	<0,0001

Tableau 45. Détermination de la p-value avec un test ANOVA à un facteur sur les tests de prolifération cellulaire des PC9 48h après traitement.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Mock (T72) vs. Rosco (T72)	151,0	29,33 to 272,7	Yes	**	0,0099
Mock (T72) vs. Ethaverin (T72)	427,7	306,0 to 549,4	Yes	****	<0,0001
Mock (T72) vs. Papaverin (T72)	198,7	77,02 to 320,4	Yes	***	0,0005
Mock (T72) vs. Rosco/Etha (T72)	768,1	646,4 to 889,8	Yes	****	<0,0001
Mock (T72) vs. Rosco/Papa (T72)	651,7	522,1 to 781,2	Yes	****	<0,0001

Tableau 46. Détermination de la p-value avec un test ANOVA à un facteur sur les tests de prolifération cellulaire des PC9 72h après traitement.

REFERENCES

Abate, A. A. *et al.* (2013) 'ATP-noncompetitive CDK inhibitors for cancer therapy: An overview', *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 22(7), pp. 895–906. doi: 10.1517/13543784.2013.798641.

Abramczyk, O. *et al.* (2007) 'Expanding the repertoire of an ERK2 recruitment site: Cysteine footprinting identifies the D-recruitment site as a mediator of Ets-1 binding', *Biochemistry*, 46(32), pp. 9174–9186. doi: 10.1021/bi7002058.

Ahlijanian, M. K. *et al.* (2000) 'Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), pp. 2910–2915. doi: 10.1073/pnas.040577797.

Ajay, A. K. *et al.* (2010) 'Cdk5 phosphorylates non-genotoxically overexpressed p53 following inhibition of PP2A to induce cell cycle arrest/apoptosis and inhibits tumor progression', *Molecular Cancer*, 9, pp. 1–15. doi: 10.1186/1476-4598-9-204.

Alexander, K., Yang, H.-S. and Hinds, P. W. (2004) 'Cellular Senescence Requires CDK5 Repression of Rac1 Activity', *Molecular and Cellular Biology*, 24(7), pp. 2808–2819. doi: 10.1128/mcb.24.7.2808-2819.2004.

Amin, N. D., Albers, W. and Pant, H. C. (2002) 'Cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) activation requires interaction with three domains of p35', *Journal of Neuroscience Research*, 67(3), pp. 354–362. doi: 10.1002/jnr.10116.

Andrews, M. J. I. *et al.* (2004) 'Design, synthesis, biological activity and structural analysis of cyclic peptide inhibitors targeting the substrate recruitment site of cyclindependent kinase complexes', *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2(19), pp. 2735–2741. doi: 10.1039/b409157d.

Anne, S. L., Saudou, F. and Humbert, S. (2007) 'Phosphorylation of huntingtin by cyclin-dependent kinase 5 is induced by DNA damage and regulates wild-type and mutant huntingtin toxicity in neurons', *Journal of Neuroscience*, 27(27), pp. 7318–7328. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1831-07.2007.

Antoszczak, M. *et al.* (2020) 'Old wine in new bottles: Drug repurposing in oncology', *European Journal of Pharmacology*, 866, p. 172784. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172784.

Arif, A. *et al.* (2011) 'Phosphorylation of glutamyl-prolyl tRNA synthetase by cyclin-dependent kinase 5 dictates transcriptselective translational control', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), pp. 1415–1420. doi: 10.1073/pnas.1011275108.

Arif, A. (2012) 'Extraneuronal activities and regulatory mechanisms of the atypical cyclin-dependent kinase Cdk5', *Biochemical Pharmacology*, 84(8), pp. 985–993. doi: 10.1016/j.bcp.2012.06.027.

Arkin, M. M. R. and Wells, J. A. (2004) 'Small-molecule inhibitors of protein-protein

interactions: Progressing towards the dream', *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(4), pp. 301–317. doi: 10.1038/nrd1343.

Asada, A. *et al.* (2008) 'Myristoylation of p39 and p35 is a determinant of cytoplasmic or nuclear localization of active cycline-dependent kinase 5 complexes', *Journal of Neurochemistry*, 106(3), pp. 1325–1336. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05500.x.

Asada, A., Saito, T. and Hisanaga, S. I. (2012) 'Phosphorylation of p35 and p39 by Cdk5 determines the subcellular location of the holokinase in a phosphorylation-Site-Specific manner', *Journal of Cell Science*, 125(14), pp. 3421–3429. doi: 10.1242/jcs.100503.

Asghar, U. *et al.* (2015a) 'The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy', *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(2), pp. 130–146. doi: 10.1038/nrd4504.

Asghar, U. *et al.* (2015b) 'The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy', *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(2), pp. 130–146. doi: 10.1038/nrd4504.

Askew, D. *et al.* (2017) 'Cyclin-dependent kinase 5 activity is required for allogeneic T-cell responses after hematopoietic cell transplantation in mice', *Blood*, 129(2), pp. 246–257. doi: 10.1182/blood-2016-05-702738.

Avraham, E. *et al.* (2007) 'Phosphorylation of Parkin by the cyclin-dependent kinase 5 at the linker region modulates its ubiquitin-ligase activity and aggregation', *Journal of Biological Chemistry*, 282(17), pp. 12842–12850. doi: 10.1074/jbc.M608243200.

Ayaz, P. *et al.* (2016) 'Conformational Adaption May Explain the Slow Dissociation Kinetics of Roniciclib (BAY 1000394), a Type i CDK Inhibitor with Kinetic Selectivity for CDK2 and CDK9', *ACS Chemical Biology*, 11(6), pp. 1710–1719. doi: 10.1021/acschembio.6b00074.

De Azevedo, W. F. *et al.* (1996) 'Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(7), pp. 2735–2740. doi: 10.1073/pnas.93.7.2735.

De Azevedo, W. F. *et al.* (1997) 'Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. Crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine', *European Journal of Biochemistry*, 243(1–2), pp. 518–526. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.0518a.x.

Bach, S. *et al.* (2005) 'Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase', *Journal of Biological Chemistry*, 280(35), pp. 31208–31219. doi: 10.1074/jbc.M500806200.

Bagella, L. *et al.* (2007) 'A small molecule based on the pRb2/p130 spacer domain leads to inhibition of cdk2 activity, cell cycle arrest and tumor growth reduction in vivo', *Oncogene*, 26(13), pp. 1829–1839. doi: 10.1038/sj.onc.1209987.

Ball, K. L. *et al.* (1997) 'Cell-cycle arrest and inhibition of Cdk4 activity by small peptides based on the carboxy-terminal domain of p21(WAF1)', *Current Biology*, 7(1), pp. 71–80. doi: 10.1016/S0960-9822(06)00029-7.

Banks, A. S. *et al.* (2015) 'An ERK/Cdk5 axis controls the diabetogenic actions of PPARγ',

Nature, 517(7534), pp. 391–395. doi: 10.1038/nature13887.

Bankston, A. N. *et al.* (2013) 'P39, the primary activator for cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) in oligodendroglia, is essential for oligodendroglia differentiation and myelin repair', *Journal of Biological Chemistry*, 288(25), pp. 18047–18057. doi: 10.1074/jbc.M113.453688.

Barone, G. *et al.* (2016) 'Human CDK18 promotes replication stress signaling and genome stability', *Nucleic Acids Research*, 44(18), pp. 8772–8785. doi: 10.1093/nar/gkw615.

Baumann, K. *et al.* (1993) 'Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5', *FEBS Letters*, 336(3), pp. 417–424. doi: 10.1016/0014-5793(93)80849-P.

Baumli, S. *et al.* (2008) 'The structure of P-TEFb (CDK9/cyclin T1), its complex with flavopiridol and regulation by phosphorylation', *EMBO Journal*, 27(13), pp. 1907–1918. doi: 10.1038/emboj.2008.121.

Beaver, J. A. *et al.* (2015) 'FDA approval: Palbociclib for the treatment of postmenopausal patients with estrogen receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer', *Clinical Cancer Research*, 21(21), pp. 4760–4766. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1185.

Berginski, M. E. *et al.* (2021) 'The Dark Kinase Knowledgebase: An online compendium of knowledge and experimental results of understudied kinases', *Nucleic Acids Research*, 49(D1), pp. D529–D535. doi: 10.1093/nar/gkaa853.

Bettayeb, K. *et al.* (2008) 'CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases', *Oncogene*, 27(44), pp. 5797–5807. doi: 10.1038/onc.2008.191.

Bhaskar, K. *et al.* (2004) 'Co-purification and localization of Munc18-1 (p67) and Cdk5 with neuronal cytoskeletal proteins', *Neurochemistry International*, 44(1), pp. 35–44. doi: 10.1016/S0197-0186(03)00099-8.

Bhatia, K., Bhumika and Das, A. (2020) 'Combinatorial drug therapy in cancer - New insights', *Life Sciences*, 258, p. 118134. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118134.

Bibb, J. A. *et al.* (1999) 'Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons', *Nature*, 402(6762), pp. 669–671. doi: 10.1038/45251.

Bibb, J. A. *et al.* (2001) 'Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5', *Nature*, 410(6826), pp. 376–380. doi: 10.1038/35066591.

Bihel, F. J. J. *et al.* (2011) 'New PDE4 inhibitors based on pharmacophoric similarity between papaverine and tofisopam', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21(21), pp. 6567–6572. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.08.036.

Bisht, S. *et al.* (2015) 'Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) controls melanoma cell motility, invasiveness, and metastatic spread—identification of a promising novel therapeutic target', *Translational Oncology*, 8(4), pp. 295–307. doi: 10.1016/j.tranon.2015.06.002.

Blanchet, E., Annicotte, J. S. and Fajas, L. (2009) 'Cell cycle regulators in the control of

metabolism', *Cell Cycle*, 8(24), pp. 4029–4031. doi: 10.4161/cc.8.24.10110.

Blazek, D. *et al.* (2011) 'The cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes', *Genes and Development*, 25(20), pp. 2158–2172. doi: 10.1101/gad.16962311.

Bonfanti, M. *et al.* (1997) 'p21(WAF1)-derived peptides linked to an internalization peptide inhibit human cancer cell growth', *Cancer Research*, 57(8), pp. 1442–1446.

Bouclier, C. *et al.* (2020) 'Stapled peptide targeting the CDK4/Cyclin D interface combined with Abemaciclib inhibits KRAS mutant lung cancer growth', *Theranostics*, 10(5), pp. 2008–2028. doi: 10.7150/thno.40971.

Bourne, Y. *et al.* (1996) 'Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1', *Cell*, 84(6), pp. 863–874. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81065-X.

Brinkkoetter, P. T. *et al.* (2009) 'Cyclin I activates Cdk5 and regulates expression of Bcl-2 and Bcl-XL in postmitotic mouse cells', *Journal of Clinical Investigation*, 119(10), pp. 3089–3101. doi: 10.1172/JCI37978.

Brinkkoetter, P. T., Pippin, J. W. and Shankland, S. J. (2010) 'Cyclin I-Cdk5 governs survival in post-mitotic cells', *Cell Cycle*, 9(9), pp. 1729–1731. doi: 10.4161/cc.9.9.11471.

Brown, N. R. *et al.* (1995) 'The crystal structure of cyclin A', *Structure*, 3(11), pp. 1235–1247. doi: 10.1016/S0969-2126(01)00259-3.

Brown, N. R. *et al.* (1999) 'Effects of phosphorylation of threonine 160 on cyclin-dependent kinase 2 structure and activity', *Journal of Biological Chemistry*, 274(13), pp. 8746–8756. doi: 10.1074/jbc.274.13.8746.

Bruyère, C. and Meijer, L. (2013) 'Targeting cyclin-dependent kinases in anti-neoplastic therapy', *Current Opinion in Cell Biology*, 25(6), pp. 772–779. doi: 10.1016/j.ceb.2013.08.004.

Burnett, G. and Kennedy, E. P. (1954) 'THE ENZYMATIC PHOSPHORYLATION PROTEINS', *Journal of Biological Chemistry*, pp. 969–980.

Cancino, G. I. *et al.* (2011) 'C-Abl tyrosine kinase modulates tau pathology and Cdk5 phosphorylation in AD transgenic mice', *Neurobiology of Aging*, 32(7), pp. 1249–1261. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.07.007.

Canela, N. *et al.* (2006) 'Identification of an hexapeptide that binds to a surface pocket in cyclin A and inhibits the catalytic activity of the complex cyclin-dependent kinase 2-cyclin A', *Journal of Biological Chemistry*, 281(47), pp. 35942–35953. doi: 10.1074/jbc.M603511200.

Catania, a *et al.* (2001) 'Expression and localization of cyclin-dependent kinase 5 in apoptotic human glioma cells.', *Neuro-oncology*, 3(2), pp. 89–98. doi: 10.1074/jbc.M110709200.

Chae, T. *et al.* (1997) 'Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical

lamination defects, seizures, and adult lethality', *Neuron*, 18(1), pp. 29–42. doi: 10.1016/S0896-6273(01)80044-1.

Chang, Y.-T. *et al.* (1999) 'Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors', *Chemistry and Biology*, 6(6), pp. 361–375. doi: 10.1016/S1074-5521(99)80048-9.

Changeux, J. P. (2013) 'The concept of allosteric modulation: An overview', *Drug Discovery Today: Technologies*, 10(2), pp. e223–e228. doi: 10.1016/j.ddtec.2012.07.007.

Chem, J. M. (2012) 'Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy', pp. 20626–20633. doi: 10.1039/c2jm34330d.

Chen, B. *et al.* (2021) 'Dyrk1a negatively regulates cdk5-sox2 pathway and self-renewal of glioblastoma stem cells', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), pp. 2–15. doi: 10.3390/ijms22084011.

Chen, H.-H., Wang, Y.-C. and Fann, M.-J. (2006) 'Identification and Characterization of the CDK12/Cyclin L1 Complex Involved in Alternative Splicing Regulation', *Molecular and Cellular Biology*, 26(7), pp. 2736–2745. doi: 10.1128/mcb.26.7.2736-2745.2006.

Chen, H. H. *et al.* (2007) 'CDK13/CDC2L5 interacts with L-type cyclins and regulates alternative splicing', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(3), pp. 735–740. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.049.

Chen, S. *et al.* (2010) 'Cyclin-dependent kinases regulate epigenetic gene silencing through phosphorylation of EZH2', *Nature Cell Biology*, 12(11), pp. 1108–1114. doi: 10.1038/ncb2116.

Cheung, Z. H., Gong, K. and Ip, N. Y. (2008) 'Cyclin-dependent kinase 5 supports neuronal survival through phosphorylation of Bcl-2', *Journal of Neuroscience*, 28(19), pp. 4872–4877. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0689-08.2008.

Cheung, Z. H. and Ip, N. Y. (2012) 'Cdk5: A multifaceted kinase in neurodegenerative diseases', *Trends in Cell Biology*, 22(3), pp. 169–175. doi: 10.1016/j.tcb.2011.11.003.

Chiker, S. *et al.* (2015) 'Cdk5 promotes DNA replication stress checkpoint activation through RPA-32 phosphorylation, and impacts on metastasis free survival in breast cancer patients', *Cell Cycle*, 14(19), pp. 3066–3078. doi: 10.1080/15384101.2015.1078020.

Chin, K. T. *et al.* (1999a) 'Identification and structure characterization of a Cdk inhibitory peptide derived from neuronal-specific Cdk5 activator', *Journal of Biological Chemistry*, 274(11), pp. 7120–7127. doi: 10.1074/jbc.274.11.7120.

Chin, K. T. *et al.* (1999b) 'Identification and structure characterization of a Cdk inhibitory peptide derived from neuronal-specific Cdk5 activator', *Journal of Biological Chemistry*, 274(11), pp. 7120–7127. doi: 10.1074/jbc.274.11.7120.

Cho, D. H. *et al.* (2010) 'Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates endothelial nitric oxide synthase at serine 116', *Hypertension*, 55(2), pp. 345–352. doi:

10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.140210.

Choi, J. *et al.* (2010) 'Obesity-linked phosphorylation of PPARγ by cdk5 is a direct target of the anti-diabetic PPARγ ligands', *Nature*, 466(7305), pp. 451–456. doi: 10.1038/nature09291.Obesity-linked.

Choi, J. H. *et al.* (2010) 'Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARγ 3 by Cdk5', *Nature*, 466(7305), pp. 451–456. doi: 10.1038/nature09291.

Cicenas, J. *et al.* (2015) 'Roscovitine in cancer and other diseases', *Annals of Translational Medicine*, 3(10), pp. 1–12. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.61.

Cirillo, D., Pentimalli, F. and Giordano, A. (2011) 'Peptides or Small Molecules? Different Approaches to Develop More Effective CDK Inhibitors', *Current Medicinal Chemistry*, 18(19), pp. 2854–2866. doi: 10.2174/092986711796150496.

Cohen, P. (2002) 'The origins of protein phosphorylation', *Nature Cell Biology*, 4(5). doi: 10.1038/ncb0502-e127.

Contreras-Vallejos, E., Utreras, E. and Gonzalez-Billault, C. (2012) 'Going out of the brain: Non-nervous system physiological and pathological functions of Cdk5', *Cellular Signalling*, 24(1), pp. 44–52. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.08.022.

Corbel, C. *et al.* (2011) 'First BRET-based screening assay performed in budding yeast leads to the discovery of CDK5/p25 interaction inhibitors', *Biotechnology Journal*, 6(7), pp. 860–870. doi: 10.1002/biot.201100138.

Corbel, C. *et al.* (2015) 'Tamoxifen inhibits CDK5 kinase activity by interacting with p35/p25 and modulates the pattern of tau phosphorylation', *Chemistry and Biology*, 22(4), pp. 472–482. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.03.009.

Corsino, P. *et al.* (2009) 'A novel class of cyclin-dependent kinase inhibitors identified by molecular docking act through a unique mechanism', *Journal of Biological Chemistry*, 284(43), pp. 29945–29955. doi: 10.1074/jbc.M109.055251.

Cortés, N. *et al.* (2019) 'CDK5: A Unique CDK and Its Multiple Roles in the Nervous System', *Journal of Alzheimer's Disease*, 68(3), pp. 843–855. doi: 10.3233/JAD-180792.

Cotto-Rios, X. M. *et al.* (2020) 'Inhibitors of BRAF dimers using an allosteric site', *Nature Communications*, 11(1). doi: 10.1038/s41467-020-18123-2.

Courapied, S. *et al.* (2010) 'The cdk5 kinase regulates the STAT3 transcription factor to prevent DNA damage upon topoisomerase I inhibition', *Journal of Biological Chemistry*, 285(35), pp. 26765–26778. doi: 10.1074/jbc.M109.092304.

Cristofanilli, M. *et al.* (2016) 'Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phas', *The Lancet Oncology*, 17(4), pp. 425–439. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00613-0.

Cruz, J. C. *et al.* (2006) 'P25/Cyclin-Dependent Kinase 5 Induces Production and Intraneuronal Accumulation of Amyloid B in Vivo', *Journal of Neuroscience*, 26(41), pp. 10536–10541. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3133-06.2006.

Dai, L. *et al.* (2013) 'A novel CyclinE/CyclinA-CDK Inhibitor targets p27Kip1 degradation, cell cycle progression and cell survival: Implications in cancer therapy', *Cancer Letters*, 333(1), pp. 103–112. doi: 10.1016/j.canlet.2013.01.025.

Dannappel, M. V. *et al.* (2019) 'Molecular and in vivo Functions of the CDK8 and CDK19 Kinase Modules', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(January), pp. 1–9. doi: 10.3389/fcell.2018.00171.

Daval, M. *et al.* (2011) 'Cyclin-dependent kinase 5 promotes pancreatic β-cell survival via Fak-Akt signaling pathways', *Diabetes*, 60(4), pp. 1186–1197. doi: 10.2337/db10-1048.

Davidson, G. and Niehrs, C. (2010) 'Emerging links between CDK cell cycle regulators and Wnt signaling', *Trends in Cell Biology*, 20(8), pp. 453–460. doi: 10.1016/j.tcb.2010.05.002.

Demange, L. *et al.* (2013) 'Potent inhibitors of CDK5 derived from roscovitine: Synthesis, biological evaluation and molecular modelling', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(1), pp. 125–131. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.10.141.

Demelash, A. *et al.* (2012) 'Achaete-scute homologue-1 (ASH1) stimulates migration of lung cancer cells through Cdk5/p35 pathway', *Molecular Biology of the Cell*, 23(15), pp. 2856–2866. doi: 10.1091/mbc.E10-12-1010.

Dhavan, R. and Tsai, L. H. (2001) 'A decade of CDK5', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(10), pp. 749–759. doi: 10.1038/35096019.

Dong, C. *et al.* (2017) 'Functional Role of Cyclin-Dependent Kinase 5 in the Regulation of Melanogenesis and Epidermal Structure', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-017-12567-1.

Dorand, R. D. *et al.* (2016) 'Cdk5 disruption attenuates tumor PD-L1 expression and promotes antitumor immunity', *Science*, 353(6297), pp. 399–403. doi: 10.1126/science.aae0477.Cdk5.

Drew, D. A., Cao, Y. and Chan, A. T. (2016) 'Aspirin and colorectal cancer: The promise of precision chemoprevention', *Nature Reviews Cancer*, 16(3), pp. 173–186. doi: 10.1038/nrc.2016.4.

Dumat, B. *et al.* (2012) 'Vinyl-triphenylamine dyes, a new family of switchable fluorescent probes for targeted two-photon cellular imaging: From DNA to protein labeling', *Organic and Biomolecular Chemistry*, 10(30), pp. 6054–6061. doi: 10.1039/c2ob25515d.

Dumat, B. *et al.* (2013) 'DNA switches on the two-photon efficiency of an ultrabright triphenylamine fluorescent probe specific of at regions', *Journal of the American Chemical Society*, 135(34), pp. 12697–12706. doi: 10.1021/ja404422z.

Eggers, J. P. *et al.* (2011a) 'Cyclin-dependent kinase 5 is amplified and overexpressed in

pancreatic cancer and activated by mutant K-Ras', *Clinical Cancer Research*, 17(19), pp. 6140–6150. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2288.

Eggers, J. P. *et al.* (2011b) 'Cyclin-dependent kinase 5 is amplified and overexpressed in pancreatic cancer and activated by mutant K-Ras', *Clinical Cancer Research*, 17(19), pp. 6140–6150. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2288.

Eglen, R. M. and Reisine, T. (2010) 'Human kinome drug discovery and the emerging importance of atypical allosteric inhibitors', *Expert Opinion on Drug Discovery*, 5(3), pp. 277–290. doi: 10.1517/17460441003636820.

Eglen, R. and Reisine, T. (2011) 'Drug discovery and the human kinome: Recent trends', *Pharmacology and Therapeutics*, 130(2), pp. 144–156. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.01.007.

Ehrlich, S. M. *et al.* (2015) 'Targeting cyclin dependent kinase 5 in hepatocellular carcinoma - A novel therapeutic approach', *Journal of Hepatology*, 63(1), pp. 102–113. doi: 10.1016/j.jhep.2015.01.031.

Endicott, J. A., Noble, M. E. M. and Johnson, L. N. (2012) 'The Structural Basis for Control of Eukaryotic Protein Kinases', *Annual Review of Biochemistry*, 81(1), pp. 587–613. doi: 10.1146/annurev-biochem-052410-090317.

Evans, T. *et al.* (1983) 'Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division', *Cell*, 33(2), pp. 389–396. doi: 10.1016/0092-8674(83)90420-8.

Fajas, L. (2013) 'Re-thinking cell cycle regulators: The cross-talk with metabolism', *Frontiers in Oncology*, 3 JAN(January), pp. 1–6. doi: 10.3389/fonc.2013.00004.

Fang, J. *et al.* (2015) 'Consensus models for CDK5 inhibitors in silico and their application to inhibitor discovery', *Molecular Diversity*, 19(1), pp. 149–162. doi: 10.1007/s11030-014-9561-3.

Fang, Z., Grütter, C. and Rauh, D. (2013) 'Strategies for the selective regulation of kinases with allosteric modulators: Exploiting exclusive structural features', *ACS Chemical Biology*, 8(1), pp. 58–70. doi: 10.1021/cb300663j.

Fant, C. B. and Taatjes, D. J. (2019) 'Regulatory functions of the Mediator kinases CDK8 and CDK19', *Transcription*, 10(2), pp. 76–90. doi: 10.1080/21541264.2018.1556915.

Feldmann, G. *et al.* (2010) 'Inhibiting the cyclin-dependent kinase CDK5 blocks pancreatic cancer formation and progression through the suppression of Ras-Ral signaling', *Cancer Research*, 70(11), pp. 4460–4469. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1107.

Fenig, D. M. and McCullough, A. (2007) 'Sildenafil in the Treatment of Erectile Dysfunction', *Aging Health*, 3(3), pp. 295–303. doi: 10.2217/1745509X.3.3.295.

Fernando, P. *et al.* (2009) 'Bin 1 Src homology 3 domain acts as a scaffold for myofiber sarcomere assembly', *Journal of Biological Chemistry*, 284(40), pp. 27674–27686. doi:

10.1074/jbc.M109.029538.

Ferreira dos Santos Paparidis, N. and Canduri, F. (2018) 'The Emerging Picture of CDK11: Genetic, Functional and Medicinal Aspects', *Current Medicinal Chemistry*, pp. 880–888. doi: http://dx.doi.org/10.2174/0929867324666170815102036.

Fiaschi-Taesch, N. M. *et al.* (2010) 'Induction of human β-cell proliferation and engraftment using a single G1/S regulatory molecule, cdk6', *Diabetes*, 59(8), pp. 1926–1936. doi: 10.2337/db09-1776.

Firestein, R. *et al.* (2008) 'CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates β-catenin activity', *Nature*, 455(7212), pp. 547–551. doi: 10.1038/nature07179.

Fischer, A. *et al.* (2002) 'Cyclin-Dependent Kinase 5 Is Required for Associative Learning', *Journal of Neuroscience*, 22(9), pp. 3700–3707. doi: 10.1523/jneurosci.22-09-03700.2002.

Fischer, E. H. and Krebs, E. G. (1955) 'CONVERSION OF PHOSPHORYLASE b TO PHOSPHORYLASE a IN MUSCLE EXTRACTS', *Journal of Biological Chemistry*, (216), pp. 121–132. doi: 10.1016/0024-3205(74)90355-5.

Fisher, R. P. (2005) 'Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription', *Journal of Cell Science*, 118(22), pp. 5171–5180. doi: 10.1242/jcs.02718.

Fletcher, A. I. *et al.* (1999) 'Regulation of exocytosis by cyclin-dependent kinase 5 via phosphorylation of Munc18', *Journal of Biological Chemistry*, 274(7), pp. 4027–4035. doi: 10.1074/jbc.274.7.4027.

Flute, S. R. *et al.* (2001) 'Amphiphysin 1 Binds the Cyclin-dependent Kinase (cdk) 5 Regulatory Subunit p35 and Is Phosphorylated by cdk5 and cdc2', *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), pp. 8104–8110. doi: 10.1074/jbc.M008932200.

Friman, T. (2020) 'Mass spectrometry-based Cellular Thermal Shift Assay (CETSA®) for target deconvolution in phenotypic drug discovery', *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 28(1), p. 115174. doi: 10.1016/j.bmc.2019.115174.

Fry, D. W. *et al.* (2004) 'Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts', *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(11), pp. 1427–1437.

Fu, A. K. Y. *et al.* (2001) 'Cdk5 is involved in neuregulin-induced AChR expression at the neuromuscular junction', *Nature Neuroscience*, 4(4), pp. 374–381. doi: 10.1038/86019.

Fu, T. J. *et al.* (1999) 'Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription', *Journal of Biological Chemistry*, 274(49), pp. 34527–34530. doi: 10.1074/jbc.274.49.34527.

Fu, X. *et al.* (2006) 'Identification of nuclear import mechanisms for the neuronal Cdk5 activator', *Journal of Biological Chemistry*, 281(51), pp. 39014–39021. doi: 10.1074/jbc.M512663200.

Futatsugi, A. *et al.* (2012) 'Cyclin-dependent kinase 5 regulates E2F transcription factor through phosphorylation of Rb protein in neurons', *Cell Cycle*, 11, pp. 1603–1610.

Gadbois, D. M. *et al.* (1992) 'Staurosporine is a potent inhibitor of p34cdc2 and p34cdc2-like kinases', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 184(1), pp. 80–85. doi: https://doi.org/10.1016/0006-291X(92)91160-R.

Gallazzini, M. *et al.* (2011) 'High NaCl-induced activation of CDK5 increases phosphorylation of the osmoprotective transcription factor TonEBP/OREBP at threonine 135, which contributes to its rapid nuclear localization', *Molecular Biology of the Cell*, 22(5), pp. 703–714. doi: 10.1091/mbc.E10-08-0681.

Gelbert, L. M. *et al.* (2014) 'Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: In-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine', *Investigational New Drugs*, 32(5), pp. 825–837. doi: 10.1007/s10637-014-0120-7.

Giacinti, C. and Giordano, A. (2006) 'RB and cell cycle progression', *Oncogene*, 25(38), pp. 5220–5227. doi: 10.1038/sj.onc.1209615.

Gibson, T. J. *et al.* (1994) 'Evidence for a protein domain superfamily shared by the cyclins, TFIIB and RB/p107', *Nucleic Acids Research*, 22(6), pp. 946–952. doi: 10.1093/nar/22.6.946.

Gillies, R. J., Didier, N. and Denton, M. (1986) 'Determination of cell number in monolayer cultures', *Analytical Biochemistry*, 159(1), pp. 109–113. doi: 10.1016/0003-2697(86)90314-3.

Gilmore, E. C. *et al.* (1998) 'Cyclin-Dependent Kinase 5-Deficient Mice Demonstrate Novel Developmental Arrest in Cerebral Cortex', *The Journal of Neuroscience*, 18(16), pp. 6370–6377. doi: 10.1523/jneurosci.18-16-06370.1998.

Giordano, A. *et al.* (2007) 'Interaction between the Cdk2/Cyclin A complex and a small molecule derived from the prb2/p130 spacer domain: A theoretical model', *Cell Cycle*, 6(21), pp. 2591–2593. doi: 10.4161/cc.6.21.4878.

Glab, N. *et al.* (1994) 'Olomoucine, an inhibitor of the cdc2/cdk2 kinases activity, blocks plant cells at the G1 to S and G2 to M cell cycle transitions', *FEBS Letters*, 353(2), pp. 207–211. doi: 10.1016/0014-5793(94)01035-8.

Goedert, M. *et al.* (1989) 'Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease', *Neuron*, 3(4), pp. 519–526. doi: 10.1016/0896-6273(89)90210-9.

Gondeau, C. *et al.* (2005) 'Design of a novel class of peptide inhibitors of cyclin-dependent kinase/cyclin activation', *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), pp. 13793–13800. doi: 10.1074/jbc.M413690200.

González-Billault, C. *et al.* (2005) 'A role of MAP1B in reelin-dependent neuronal migration', *Cerebral Cortex*, 15(8), pp. 1134–1145. doi: 10.1093/cercor/bhh213.

Goodyear, S. and Sharma, M. C. (2007) 'Roscovitine regulates invasive breast cancer cell

(MDA-MB231) proliferation and survival through cell cycle regulatory protein cdk5', *Experimental and Molecular Pathology*, 82(1), pp. 25–32. doi: 10.1016/j.yexmp.2006.09.002.

Grant, P., Sharma, P. and Pant, H. C. (2001) 'Cyclin-dependent protein kinase 5 (Cdk5) and the regulation of neurofilament metabolism', *European Journal of Biochemistry*, 268(6), pp. 1534–1546. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02025.x.

Grinberg-Bleyer, Y. and Ghosh, S. (2016) 'A Novel Link between Inflammation and Cancer', *Cancer Cell*, 30(6), pp. 829–830. doi: 10.1016/j.ccell.2016.11.013.

Guan, J. S. *et al.* (2011) 'Cdk5 is required for memory function and hippocampal plasticity via the camp signaling pathway', *PLoS ONE*, 6(9). doi: 10.1371/journal.pone.0025735.

Guen, V. J. *et al.* (2017) 'The awakening of the CDK10/Cyclin M protein kinase', *Oncotarget*, 8(30), pp. 50174–50186. doi: 10.18632/oncotarget.15024.

Guidato, S. *et al.* (1998) 'Cyclin D2 Interacts with cdk-5 and Modulates Cellular cdk-5/p35 Activity', *Journal of Neurochemistry*, 70(1), pp. 335–340. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.70010335.x.

Hagmann, H. *et al.* (2015) 'Cyclin I and p35 determine the subcellular distribution of Cdk5', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 308(4), pp. C339–C347. doi: 10.1152/ajpcell.00168.2014.

Haines, E. *et al.* (2018) 'Palbociclib resistance confers dependence on an FGFR-MAP kinase-mTOR-driven pathway in KRAS-mutant non-small cell lung cancer', *Oncotarget*, 9(60), pp. 31572–31589. doi: 10.18632/oncotarget.25803.

Han, Y., Liu, D. and Li, L. (2020) 'PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer.', *American journal of cancer research*, 10(3), pp. 727–742. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32266087.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) 'The Hallmarks of Cancer', *Cell*, 100(1), pp. 57–70.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of cancer: The next generation', *Cell*, 144(5), pp. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hao, X. lin *et al.* (2018) 'TC2N, a novel oncogene, accelerates tumor progression by suppressing p53 signaling pathway in lung cancer', *Cell Death and Differentiation*, 26(7), pp. 1235–1250. doi: 10.1038/s41418-018-0202-8.

Hartwell, L. H. *et al.* (1974) 'Genetic control of the cell division cycle in yeast', *Science*, 183(4120), pp. 46–51. doi: 10.1126/science.183.4120.46.

Hawasli, A. H. *et al.* (2007) 'Cyclin-dependent kinase 5 governs learning and synaptic plasticity via control of NMDAR degradation', *Nature Neuroscience*, 10(7), pp. 880–886. doi: 10.1038/nn1914.

Heitz, F. *et al.* (1997) 'Interactions of cyclins with cyclin-dependent kinases: A common interactive mechanism', *Biochemistry*, 36(16), pp. 4995–5003. doi: 10.1021/bi962349y.

Hellmich, M. R. *et al.* (1992) 'Neuronal cdc2-like kinase: a cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(22), pp. 10867–71. doi: 10.1073/pnas.89.22.10867.

Herrera-Abreu, M. T. *et al.* (2016) 'Early adaptation and acquired resistance to CDK4/6 inhibition in estrogen receptor-positive breast cancer', *Cancer Research*, 76(8), pp. 2301–2313. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0728.

Herzog, J. *et al.* (2016) 'Cyclin-dependent kinase 5 stabilizes hypoxia-inducible factor-1α: A novel approach for inhibiting angiogenesis in hepatocellular carcinoma', *Oncotarget*, 7(19), pp. 27108–27121. doi: 10.18632/oncotarget.8342.

Hisanaga, S. I. *et al.* (1993) 'Tau protein kinase II has a similar characteristic to cdc2 kinase for phosphorylating neurofilament proteins', *Journal of Biological Chemistry*, 268(20), pp. 15056–15060. doi: 10.1016/s0021-9258(18)82437-1.

Ho, A. and Dowdy, S. F. (2002) 'Regulation of G 1 cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes Alan Ho and Steven F Dowdy *', *Current Opinion in Cell Biology*, pp. 47–52.

Hoessel, R. *et al.* (1999) 'Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases', *Nature Cell Biology*, 1(1), pp. 60–67. doi: 10.1038/9035.

Hosokawa, T. *et al.* (2010) 'Quantitative measurement of in vivo phosphorylation states of Cdk5 activator p35 by Phos-tag SDS-PAGE', *Molecular and Cellular Proteomics*, 9(6), pp. 1133–1143. doi: 10.1074/mcp.M900578-MCP200.

Hu, D. *et al.* (2003) 'CDK11 complexes promote pre-mRNA splicing', *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), pp. 8623–8629. doi: 10.1074/jbc.M210057200.

Huang, C. *et al.* (2009) 'Talin Phosphorylation by Cdk5 regulates Smurf1-mediated talin head ubiquitination and cell migration Cai', *Nature Cell Biology*, 11(5), pp. 624–630. doi: 10.1038/ncb1868.Talin.

Humbert, S., Dhavan, R. and Tsai, L. H. (2000) 'P39 Activates Cdk5 in Neurons, and Is Associated With the Actin Cytoskeleton', *Journal of Cell Science*, 113(6), pp. 975–983.

Huse, M. and Kuriyan, J. (2002) 'The conformational plasticity of protein kinases', *Cell*, 109(3), pp. 275–282. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00741-9.

Illanes, O. *et al.* (2006) 'Retinal and Peripheral Nerve Toxicity Induced by the Administration of a Pan-Cyclin Dependent Kinase (cdk) Inhibitor in Mice', *Toxicologic Pathology*, 34(3), pp. 243–248. doi: 10.1080/01926230600713186.

Iorns, E. *et al.* (2008) 'Identification of CDK10 as an Important Determinant of Resistance to Endocrine Therapy for Breast Cancer', *Cancer Cell*, 13(2), pp. 91–104. doi: 10.1016/j.ccr.2008.01.001.

Ishiguro, K. *et al.* (1992) 'Tau protein kinase I converts normal tau protein into A68-like

component of paired helical filaments', *Journal of Biological Chemistry*, 267(15), pp. 10897–10901.

Ishizuka, K. *et al.* (2011) 'DISC1-dependent switch from progenitor proliferation to migration in the developing cortex', *Nature*, 473(7345), pp. 92–96. doi: 10.1038/nature09859.

Itchaki, G. and Brown, J. R. (2017) 'Lenalidomide in the treatment of chronic lymphocytic leukemia', *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 26(5), pp. 633–650. doi: 10.1080/13543784.2017.1313230.

Jackman, M. *et al.* (2003) 'Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase', *Nature Cell Biology*, 5(2), pp. 143–148. doi: 10.1038/ncb918.

Jackson, M. D. and Denu, J. M. (2001) 'Molecular reactions of protein phosphatases - Insights from structure and chemistry', *Chemical Reviews*, 101(8), pp. 2313–2340. doi: 10.1021/cr000247e.

Jeffrey, P. D. *et al.* (1995) 'Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex', *Nature*, 376(6538), pp. 313–320. doi: 10.1038/376313a0.

Jeong, Y. G. *et al.* (2003) 'The cyclin-dependent kinase 5 activator, p39, is expressed in stripes in the mouse cerebellum', *Neuroscience*, 118(2), pp. 323–334. doi: 10.1016/S0306-4522(03)00002-2.

Jessberger, S. *et al.* (2009) 'Making a neuron: Cdk5 in embryonic and adult neurogenesis', *Trends in Neurosciences*, 32(11), pp. 575–582. doi: 10.1016/j.tins.2009.07.002.

Juric, V. and Murphy, B. (2020) 'Cyclin-dependent kinase inhibitors in brain cancer: current state and future directions', *Cancer Drug Resistance*, 3(1), pp. 48–62. doi: 10.20517/cdr.2019.105.

K. Shah & DK. Lahiri (2017) 'A tale of the good and bad: remodeling of the neuronal microtubules in the brain by Cdk5', *Molecular Neurobiology*, 54(3), pp. 2255–2268. doi: 10.1586/14737175.2015.1028369.Focused.

Kahn, O. I. *et al.* (2015) 'Effects of kinesin-5 inhibition on dendritic architecture and microtubule organization', *Molecular Biology of the Cell*, 26(1), pp. 66–77. doi: 10.1091/mbc.E14-08-1313.

Kamei, H. *et al.* (2007) 'Suppression of calpain-dependent cleavage of the CDK5 activator p35 to p25 by site-specific phosphorylation', *Journal of Biological Chemistry*, 282(3), pp. 1687–1694. doi: 10.1074/jbc.M610541200.

Kaminosono, S. *et al.* (2008) 'Suppression of mutant huntingtin aggregate formation by Cdk5/p35 through the effect on microtubule stability', *Journal of Neuroscience*, 28(35), pp. 8747–8755. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0973-08.2008.

Kato, G. and Maeda, S. (1999) 'Neuron-specific Cdk5 kinase is responsible for mitosis-independent phosphorylation of c-Src at Ser75 in human Y79 retinoblastoma cells', *Journal of Biochemistry*, 126(5), pp. 957–961. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022540.

Kawauchi, T. *et al.* (2006) 'Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration', *Nature Cell Biology*, 8(1), pp. 17–26. doi: 10.1038/ncb1338.

Kesavapany, S. *et al.* (2001) 'p35/cdk5 binds and phosphorylates b-catenin and regulates b-catenin/presenilin-1 interaction', *European Journal of Neuroscience*, 13(1998), pp. 241–247.

Kimura, T., Ishiguro, K. and Hisanaga, S. (2014) 'Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7(July), pp. 1–10. doi: 10.3389/fnmol.2014.00065.

Kitagawa, M. *et al.* (1993) 'Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase.', *Oncogene*, 8(9), pp. 2425–2432.

Ko, J. *et al.* (2001) 'P35 and P39 Are Essential for Cyclin-Dependent Kinase 5 Function During Neurodevelopment', *Journal of Neuroscience*, 21(17), pp. 6758–6771. doi: 10.1523/jneurosci.21-17-06758.2001.

Kobayashi, H. *et al.* (2014) 'Phosphorylation of Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) at Tyr-15 is inhibited by Cdk5 activators and does not contribute to the activation of Cdk5', *Journal of Biological Chemistry*, 289(28), pp. 19627–19636. doi: 10.1074/jbc.M113.501148.

Kobayashi, S. *et al.* (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 Letters*, 335(2), pp. 171–175. doi: 10.1016/0014-5793(93)80723-8.

Kohoutek, J. and Blazek, D. (2012) 'Cyclin K goes with Cdk12 and Cdk13', *Cell Division*, 7, pp. 1–10. doi: 10.1186/1747-1028-7-12.

Kollmann, K. *et al.* (2013) 'A kinase-independent function of CDK6 links the cell cycle to tumor angiogenesis', *Cancer Cell*, 24(2), pp. 167–181. doi: 10.1016/j.ccr.2013.07.012.

König, A. *et al.* (1997) 'The novel cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol downregulates Bcl-2 and induces growth arrest and apoptosis in chronic B-cell leukemia lines', *Blood*, 90(11), pp. 4307–4312. doi: 10.1182/blood.v90.11.4307.4307_4307_4312.

Kontopidis, G. *et al.* (2009) 'Truncation and optimisation of peptide inhibitors of cyclin-dependent kinase 2-cyclin A through structure-guided design', *ChemMedChem*, 4(7), pp. 1120–1128. doi: 10.1002/cmdc.200900093.

Kornev, Alexandr P. *et al.* (2006) 'Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(47), pp. 17783–17788. doi: 10.1073/pnas.0607656103.

Kornev, A. P. *et al.* (2006) 'Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(47), pp. 17783–17788. doi: 10.1073/pnas.0607656103.

Kozak, K., Świtaj, T. and Rutkowski, P. (2021) 'Dabrafenib and Trametinib', in Rutkowski, P.

and Mandalà, M. (eds) *New Therapies in Advanced Cutaneous Malignancies*. Cham: Springer International Publishing, pp. 131–147. doi: 10.1007/978-3-030-64009-5_5.

Kozar, K. and Sicinski, P. (2005) 'Cell cycle progression without cyclin D-CDK4 and cyclin D-CDK6 complexes', *Cell Cycle*, 4(3), pp. 388–391. doi: 10.4161/cc.4.3.1551.

Kusakawa, G. I. *et al.* (2000) 'Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25', *Journal of Biological Chemistry*, 275(22), pp. 17166–17172. doi: 10.1074/jbc.M907757199.

Kwapisz, D. (2017) 'Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in breast cancer: palbociclib, ribociclib, and abemaciclib', *Breast Cancer Research and Treatment*, 166(1), pp. 41–54. doi: 10.1007/s10549-017-4385-3.

Kwon, Y. T. *et al.* (2000) 'Regulation of N-cadherin-mediated adhesion by the p35-Cdk5 kinase', *Current Biology*, 10(7), pp. 363–372. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00411-5.

de la Torre, E. R. *et al.* (2009) 'Combined kinase inhibition modulates parkin inactivation', *Human Molecular Genetics*, 18(5), pp. 809–823. doi: 10.1093/hmg/ddn407.

Labbe, J. C. *et al.* (1988) 'Activation at M-phase of a protein kinase encoded by a starfish homologue of the cell cycle control gene cdc2+', *Nature*, 335(6187), p. 251—254. doi: 10.1038/335251a0.

Lai, L., Shin, G. Y. and Qiu, H. (2020) 'The Role of Cell Cycle Regulators in Cell Survival—Dual Functions of Cyclin-Dependent Kinase 20 and p21Cip1/Waf1', *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms21228504.

Lalioti, V. *et al.* (2009) 'The atypical kinase Cdk5 is activated by insulin, regulates the association between GLUT4 and E-Syt1, and modulates glucose transport in 3T3-L1 adipocytes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), pp. 4249–4253. doi: 10.1073/pnas.0900218106.

Lampropoulou, E. *et al.* (2018) 'Cyclin-dependent kinase 5 mediates pleiotrophin-induced endothelial cell migration', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-018-24326-x.

Lane, D. P. (1992) 'p53, guardian of the genome', *Nature*, 358, pp. 15–16.

Lapenna, S. and Giordano, A. (2009) 'Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer', *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(7), pp. 547–566. doi: 10.1038/nrd2907.

Lartia, R. *et al.* (2008) 'Synthetic strategies to derivatizable triphenylamines displaying high two-photon absorption', *Journal of Organic Chemistry*, 73(5), pp. 1732–1744. doi: 10.1021/jo702002y.

Lazaro, J. B. *et al.* (1997) 'Cyclin dependent kinase 5, cdk5, is a positive regulator of myogenesis in mouse C2 cells', *Journal of Cell Science*, 110(10), pp. 1251–1260. doi: 10.1242/jcs.110.10.1251.

Lee, H. Y. *et al.* (2008) 'Cdk5 phosphorylates PLD2 to mediate EGF-dependent insulin secretion', *Cellular Signalling*, 20(10), pp. 1787–1794. doi: 10.1016/j.cellsig.2008.06.009.

Lee, J.-H. and Kim, K.-T. (2007) 'Regulation of cyclin-dependent kinase 5 and p53 by ERK1/2 pathway in the DNA damage-induced neuronal death', *Journal of Cellular Physiology*, 210(3), pp. 784–797. doi: 10.1002/jcp.20899.

Lee, J. H. *et al.* (2007) 'Stabilization and activation of p53 induced by Cdk5 contributes to neuronal cell death', *Journal of Cell Science*, 120(13), pp. 2259–2271. doi: 10.1242/jcs.03468.

Lee, K. S. S. *et al.* (2019) 'Drug-Target Residence Time Affects in Vivo Target Occupancy through Multiple Pathways', *ACS Central Science*, 5(9), pp. 1614–1624. doi: 10.1021/acscentsci.9b00770.

Lee, K. Y. *et al.* (1997) 'Neuronal Cdc2-like kinase (Nclk) binds and phosphorylates the retinoblastoma protein', *Journal of Biological Chemistry*, 272(9), pp. 5622–5626. doi: 10.1074/jbc.272.9.5622.

Lee, K. Y. *et al.* (2012) 'Cdk5 mediates vimentin ser56 phosphorylation during GTP-induced secretion by neutrophils', *Journal of Cellular Physiology*, 227(2), pp. 739–750. doi: 10.1002/jcp.22782.

Lee, M. S. *et al.* (2000a) 'Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain', *Nature*, 405(6784), pp. 360–364. doi: 10.1038/35012636.

Lee, M. S. *et al.* (2000b) 'Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain', *Nature*, 405(6784), pp. 360–364. doi: 10.1038/35012636.

De Leeuw, R. *et al.* (2018) 'MAPK Reliance via acquired CDK4/6 inhibitor resistance in cancer', *Clinical Cancer Research*, 24(17), pp. 4201–4214. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0410.

Lenjisa, J. L. *et al.* (2017) 'CDK5 in oncology: Recent advances and future prospects', *Future Medicinal Chemistry*, 9(16), pp. 1939–1962. doi: 10.4155/fmc-2017-0097.

Levene, P. A. and Alsberg, C. L. (1906) 'The Cleavage Products of Vitellin', *The Journal of Biological Chemistry*, 2(1), pp. 127–133.

Levy, I. *et al.* (2011) 'Phosphodiesterase function and endocrine cells: Links to human disease and roles in tumor development and treatment', *Current Opinion in Pharmacology*, 11(6), pp. 689–697. doi: 10.1016/j.coph.2011.10.003.

Lew, J. *et al.* (1992) 'Purification and characterization of a novel proline-directed protein kinase from bovine brain', *Journal of Biological Chemistry*, 267(19), pp. 13383–13390.

Li, L. *et al.* (2019) 'Cdk5-mediated phosphorylation regulates phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type i γ90 activity and cell invasion', *FASEB Journal*, 33(1), pp. 631–642. doi: 10.1096/fj.201800296R.

Li, R. *et al.* (2015) 'Cyclin i promotes cisplatin resistance via Cdk5 activation in cervical

cancer', *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(23), pp. 4533–4541.

Li, X. *et al.* (2016) 'Cdk12 is a gene-selective RNA polymerase II kinase that regulates a subset of the transcriptome, including Nrf2 target genes', *Scientific Reports*, 6(November 2015), pp. 1–13. doi: 10.1038/srep21455.

Li, Z. *et al.* (2004) 'Cdk5/p35 phosphorylates mSds3 and regulates mSds3-mediated repression of transcription', *Journal of Biological Chemistry*, 279(52), pp. 54438–54444. doi: 10.1074/jbc.M411002200.

Liang, C. C., Park, A. Y. and Guan, J. L. (2007) 'In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro', *Nature Protocols*, 2(2), pp. 329–333. doi: 10.1038/nprot.2007.30.

Liang, K. *et al.* (2015) 'Characterization of Human Cyclin-Dependent Kinase 12 (CDK12) and CDK13 Complexes in C-Terminal Domain Phosphorylation, Gene Transcription, and RNA Processing', *Molecular and Cellular Biology*, 35(6), pp. 928–938. doi: 10.1128/mcb.01426-14.

Liang, Q. *et al.* (2013a) 'CDK5 is essential for TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression', *Scientific Reports*, 3, pp. 1–12. doi: 10.1038/srep02932.

Liang, Q. *et al.* (2013b) 'CDK5 is essential for TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression', *Scientific Reports*, 3, pp. 1–13. doi: 10.1038/srep02932.

Liang, S. *et al.* (2007) 'Major Cdk5-dependent phosphorylation sites of amphiphysin 1 are implicated in the regulation of the membrane binding and endocytosis', *Journal of Neurochemistry*, 102(5), pp. 1466–1476. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04507.x.

Liebl, J. *et al.* (2010) 'Cyclin-dependent kinase 5 regulates endothelial cell migration and angiogenesis', *Journal of Biological Chemistry*, 285(46), pp. 35932–35943. doi: 10.1074/jbc.M110.126177.

Liebl, J. *et al.* (2011) 'Twice switched at birth: Cell cycle-independent roles of the "neuron-specific" cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) in non-neuronal cells', *Cellular Signalling*, 23(11), pp. 1698–1707. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.06.020.

Liebl, J. *et al.* (2015) 'Cdk5 controls lymphatic vessel development and function by phosphorylation of Foxc2', *Nature Communications*, 6. doi: 10.1038/ncomms8274.

Lim, S. and Kaldis, P. (2013) 'Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation', *Development*, 140(15), pp. 3079–3093. doi: 10.1242/dev.091744.

Lin, H., Lin, T. Y. and Juang, J. L. (2007) 'Abl deregulates Cdk5 kinase activity and subcellular localization in Drosophila neurodegeneration', *Cell Death and Differentiation*, 14(3), pp. 607–615. doi: 10.1038/sj.cdd.4402033.

Lipinski, C. A. (2005) 'Capter 11 Filtering in Drug Discovery', *Annual Reports in Computational Chemistry*, 1(C), pp. 155–168. doi: 10.1016/S1574-1400(05)01011-X.

Liu, C. *et al.* (2017) 'Cyclin I-like (CCNI2) is a cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) activator and is involved in cell cycle regulation', *Scientific Reports*, 7(June 2016). doi: 10.1038/srep40979.

Liu, H. *et al.* (2013) 'A chrysin derivative suppresses skin cancer growth by inhibiting cyclin-dependent kinases', *Journal of Biological Chemistry*, 288(36), pp. 25924–25937. doi: 10.1074/jbc.M113.464669.

Liu, J. L. *et al.* (2011) 'Expression of CDK5/p35 in resected patients with non-small cell lung cancer: Relation to prognosis', *Medical Oncology*, 28(3), pp. 673–678. doi: 10.1007/s12032-010-9510-7.

Liu, J. L. *et al.* (2015) 'Cyclin-dependent kinase 5 regulates the proliferation, motility and invasiveness of lung cancer cells through its effects on cytoskeletal remodeling', *Molecular Medicine Reports*, 12(3), pp. 3979–3985. doi: 10.3892/mmr.2015.3868.

Liu, R. *et al.* (2008) 'Cdk5-mediated regulation of the PIKE-A-Akt pathway and glioblastoma cell invasion.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(21), pp. 7570–7575. doi: 10.1073/pnas.0712306105.

Liu, S. *et al.* (2010) 'Structural and Functional Analysis of Cyclin D1 Reveals p27 and Substrate Inhibitor Binding Requirements', *ACS Chemical Biology*, 5(12), pp. 1169–1182. doi: 10.1021/cb1001262.

Liu, W. *et al.* (2017) 'Cdk5 links with DNA damage response and cancer', *Molecular Cancer*, 16(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/s12943-017-0611-1.

Liu, X. xiu *et al.* (2020) 'Endothelial Cdk5 deficit leads to the development of spontaneous epilepsy through CXCL1/ CXCR2-mediated reactive astrogliosis', *Journal of Experimental Medicine*, 217(1). doi: 10.1084/jem.20180992.

Liu, Y. and Gray, N. S. (2006) 'Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations', *Nature Chemical Biology*, 2(7), pp. 358–364. doi: 10.1038/nchembio799.

Lockwood, W. W. *et al.* (2008) 'DNA amplification is a ubiquitous mechanism of oncogene activation in lung and other cancers', *Oncogene*, 27(33), pp. 4615–4624. doi: 10.1038/onc.2008.98.

Longacre, M., Snyder, N. and Sarkar, S. (2014) 'Drug Resistance in Cancer : An Overview', pp. 1769–1792. doi: 10.3390/cancers6031769.

Lopes, J. P. and Agostinho, P. (2011) 'Cdk5: Multitasking between physiological and pathological conditions', *Progress in Neurobiology*, 94(1), pp. 49–63. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.03.006.

Lowman, X. H. *et al.* (2010) 'The Proapoptotic Function of Noxa in Human Leukemia Cells Is Regulated by the Kinase Cdk5 and by Glucose', *Molecular Cell*, 40(5), pp. 823–833. doi: 10.1016/j.molcel.2010.11.035.

Loyer, P. *et al.* (2008) 'Characterization of cyclin L1 and L2 interactions with CDK11 and splicing factors: Influence of cyclin l isoforms on splice site selection', *Journal of Biological*

Chemistry, 283(12), pp. 7721–7732. doi: 10.1074/jbc.M708188200.

Lu, H. and Tonge, P. J. (2010) 'Drug-target residence time: Critical information for lead optimization', *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(4), pp. 467–474. doi: 10.1016/j.cbpa.2010.06.176.

Lugnier, C. (2006) 'Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents', *Pharmacology and Therapeutics*, 109(3), pp. 366–398. doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.07.003.

Luo, F. *et al.* (2016) 'The activators of cyclin-dependent kinase 5 p35 and p39 are essential for oligodendrocyte maturation, process formation, and myelination', *Journal of Neuroscience*, 36(10), pp. 3024–3037. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2250-15.2016.

Luo, S. *et al.* (2005) 'Cdk5 phosphorylation of huntingtin reduces its cleavage by caspases: Implications for mutant huntingtin toxicity', *Journal of Cell Biology*, 169(4), pp. 647–656. doi: 10.1083/jcb.200412071.

Malumbres, M. *et al.* (2004) 'Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6', *Cell*, 118(4), pp. 493–504. doi: 10.1016/j.cell.2004.08.002.

Malumbres, M. *et al.* (2007) 'CDK inhibitors in cancer therapy : what is next ?', (December), pp. 16–21. doi: 10.1016/j.tips.2007.10.012.

Malumbres, M. (2014) 'Cyclin-dependent kinases', *Genome Biology*, 15(6), pp. 1–10. doi: 10.1186/gb4184.

Malumbres, M. and Barbacid, M. (2009) 'Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm', *Nature Reviews Cancer*, 9(3), pp. 153–166. doi: 10.1038/nrc2602.

Mandl, M. M. *et al.* (2017) 'Inhibition of Cdk5 induces cell death of tumor-initiating cells', *British Journal of Cancer*, 116(7), pp. 912–922. doi: 10.1038/bjc.2017.39.

Manivannan, E. *et al.* (2021) 'The Rise and Fall of Chloroquine/Hydroxychloroquine as Compassionate Therapy of COVID-19', *Frontiers in Pharmacology*, 12(December 2019), pp. 1–8. doi: 10.3389/fphar.2021.584940.

Mann, J. (2002) 'Natural products in cancer chemotherapy: Past, present and future', *Nature Reviews Cancer*, 2(2), pp. 143–148. doi: 10.1038/nrc723.

La Manna, S. *et al.* (2018) 'Peptides as therapeutic agents for inflammatory-related diseases', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), pp. 1–18. doi: 10.3390/ijms19092714.

Manning, G. *et al.* (2002) 'The protein kinase complement of the human genome', *Science*, 298(5600), pp. 1912–1934. doi: 10.1126/science.1075762.

Mao, D. and Hinds, P. W. (2010) 'p35 is required for CDK5 activation in cellular senescence', *Journal of Biological Chemistry*, 285(19), pp. 14671–14680. doi: 10.1074/jbc.M109.066118.

Mapelli, M. *et al.* (2005) 'Mechanism of CDK5/p25 binding by CDK inhibitors', *Journal of*

Medicinal Chemistry, 48(3), pp. 671–679. doi: 10.1021/jm049323m.

Marais, A. *et al.* (2010) 'Cell cycle-dependent regulation of the forkhead transcription factor FOXK2 by CDK·cyclin complexes', *Journal of Biological Chemistry*, 285(46), pp. 35728–35739. doi: 10.1074/jbc.M110.154005.

Marshall, R. M. and Grana, X. (2006) 'Mechanisms controlling CDK9 activity', *Frontiers in Bioscience*, 11(3), pp. 2598–2613. doi: 10.2741/1994.

Martinez, A. M. *et al.* (1997) 'Dual phosphorylation of the T-loop in cdk7: Its role in controlling cyclin H binding and CAK activity', *EMBO Journal*, 16(2), pp. 343–354. doi: 10.1093/emboj/16.2.343.

Matsubara, M. *et al.* (1996) 'Site-specific phosphorylation of synapsin I by mitogen-activated protein kinase and Cdk5 and its effects on physiological functions', *Journal of Biological Chemistry*, 271(35), pp. 21108–21113. doi: 10.1074/jbc.271.35.21108.

Matsuda, S. *et al.* (2014) 'PCTAIRE kinase 3/cyclin-dependent kinase 18 is activated through association with cyclin a and/or phosphorylation by protein kinase a', *Journal of Biological Chemistry*, 289(26), pp. 18387–18400. doi: 10.1074/jbc.M113.542936.

Matsuda, S. *et al.* (2017) 'PCTK3/CDK18 regulates cell migration and adhesion by negatively modulating FAK activity', *Scientific Reports*, 7(March), pp. 1–15. doi: 10.1038/srep45545.

Matsumoto, Y., Hayashi, K. and Nishida, E. (1999) 'Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells', *Current Biology*, 9(8), pp. 429–432. doi: 10.1016/S0960-9822(99)80191-2.

Matsuura, I. and Wang, J. H. (1996) 'Demonstration of cyclin-dependent kinase inhibitory serine/threonine kinase in bovine thymus', *Journal of Biological Chemistry*, 271(10), pp. 5443–5450. doi: 10.1074/jbc.271.10.5443.

McGrath, D. A. *et al.* (2013) 'Cks confers specificity to phosphorylation-dependent CDK signaling pathways', *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(12), pp. 1407–1414. doi: 10.1038/nsmb.2707.

Meijer, L. *et al.* (1997) 'Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5', *European Journal of Biochemistry*, 243(1–2), pp. 527–536. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.t01-2-00527.x.

Mendoza, N. *et al.* (2003) 'Selective cyclin-dependent kinase 2/cyclin A antagonists that differ from ATP site inhibitors block tumor growth', *Cancer Research*, 63(5), pp. 1020–1024.

Merk, H. *et al.* (2016) 'Inhibition of endothelial Cdk5 reduces tumor growth by promoting non-productive angiogenesis', *Oncotarget*, 7(5). doi: 10.18632/oncotarget.6842.

Meyerson, M. *et al.* (1992) 'A family of human cdc2-related protein kinases.', *The EMBO Journal*, 11(8), pp. 2909–2917. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05360.x.

Michowski, W. *et al.* (2020) 'Cdk1 Controls Global Epigenetic Landscape in Embryonic Stem

Cells', *Molecular Cell*, 78(3), pp. 459-476.e13. doi: 10.1016/j.molcel.2020.03.010.

Miettinen, T. P. *et al.* (2018) ' Thermal proteome profiling of breast cancer cells reveals proteasomal activation by CDK 4/6 inhibitor palbociclib ', *The EMBO Journal*, 37(10), pp. 1–19. doi: 10.15252/embj.201798359.

Miettinen, T. P. and Björklund, M. (2014) 'NQO2 is a reactive oxygen species generating off-target for acetaminophen', *Molecular Pharmaceutics*, 11(12), pp. 4395–4404. doi: 10.1021/mp5004866.

Migliore, L. and Coppedè, F. (2009) 'Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases', *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 667(1–2), pp. 82–97. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2008.10.011.

Mikolcevic, P. *et al.* (2012) 'Cyclin-Dependent Kinase 16/PCTAIRE Kinase 1 Is Activated by Cyclin Y and Is Essential for Spermatogenesis', *Molecular and Cellular Biology*, 32(4), pp. 868–879. doi: 10.1128/mcb.06261-11.

Minshull, J., Blow, J. J. and Hunt, T. (1989) 'Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated Xenopus eggs to enter mitosis', *Cell*, 56(6), pp. 947–956. doi: 10.1016/0092-8674(89)90628-4.

Miyajima, M., Nornes, H. O. and Neuman, T. (1995) 'Cyclin E is expressed in neurons and forms complexes with cdk5', *NeuroReport*, pp. 1130–1132. doi: 10.1097/00001756-199505300-00014.

Modi, P. K. *et al.* (2012) 'Interplay between MEK-ERK signaling, cyclin D1, and cyclin-dependent kinase 5 regulates cell cycle reentry and apoptosis of neurons', *Molecular Biology of the Cell*, 23(18), pp. 3722–3730. doi: 10.1091/mbc.E12-02-0125.

Mokhtari, R. B. *et al.* (2017) 'Combination therapy in combating cancer SYSTEMATIC REVIEW: COMBINATION THERAPY IN COMBATING CANCER BACKGROUND', *Oncotarget*, 8(23), pp. 38022–38043. Available at: www.impactjournals.com/oncotarget.

Molina, D. M. *et al.* (2013) 'Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay', *Science*, 341(6141), pp. 84–87. doi: 10.1126/science.1233606.

Morelli, X., Bourgeas, R. and Roche, P. (2011) 'Chemical and structural lessons from recent successes in protein-protein interaction inhibition (2P2I)', *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(4), pp. 475–481. doi: 10.1016/j.cbpa.2011.05.024.

Morey, T. M. *et al.* (2015) 'Heat shock inhibition of CDK5 increases NOXA levels through miR-23a repression', *Journal of Biological Chemistry*, 290(18), pp. 11443–11454. doi: 10.1074/jbc.M114.625988.

Morgan, D. O. (1995) 'Principles of CDK regulation', *Nature*, 374(6518), pp. 131–134. doi: 10.1038/374131a0.

Morgan, D. O. (1997) 'CYCLIN-DEPENDENT KINASES: Engines, Clocks, and Microprocessors',

Annual Review of Cell and Developmental Biology, 13(1), pp. 261–291. doi: 10.1146/annurev.cellbio.13.1.261.

Morris, M. C. *et al.* (2002) 'Kinetic mechanism of activation of the Cdk2/cyclin A complex: Key role of the C-lobe of the Cdk', *Journal of Biological Chemistry*, 277(26), pp. 23847–23853. doi: 10.1074/jbc.M107890200.

Moutal, A. *et al.* (2019) 'Cdk5-mediated CRMP2 phosphorylation is necessary and sufficient for peripheral neuropathic pain', *Neurobiology of Pain*, 5(June), pp. 0–1. doi: 10.1016/j.ynpai.2018.07.003.

Na, Y. R. *et al.* (2015) 'The early synthesis of p35 and activation of CDK5 in LPS-stimulated macrophages suppresses interleukin-10 production', *Science Signaling*, 8(404), pp. 1–12. doi: 10.1126/scisignal.aab3156.

Narasimha, A. M. *et al.* (2014) 'Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation', *eLife*, 3, pp. 1–21. doi: 10.7554/elife.02872.

Nemet, J. *et al.* (2014) 'The two faces of Cdk8, a positive/negative regulator of transcription', *Biochimie*, 97(1), pp. 22–27. doi: 10.1016/j.biochi.2013.10.004.

Ng, Y. L., Salim, C. K. and Chu, J. J. H. (2021) 'Drug repurposing for COVID-19: Approaches, challenges and promising candidates', *Pharmacology and Therapeutics*, 228. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107930.

Niethammer, M. *et al.* (2000) 'NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein', *Neuron*, 28(3), pp. 697–711. doi: 10.1016/S0896-6273(00)00147-1.

Nikolic, M. *et al.* (1998) 'The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity', *Nature*, 395(6698), pp. 194–198. doi: 10.1038/26034.

Noble, M. *et al.* (2005) 'Exploiting structural principles to design cyclin-dependent kinase inhibitors', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1754(1–2), pp. 58–64. doi: 10.1016/j.bbapap.2005.08.019.

Noble, M. E. M. *et al.* (1997) 'The cyclin box fold: Protein recognition in cell-cycle and transcription control', *Trends in Biochemical Sciences*, 22(12), pp. 482–487. doi: 10.1016/S0968-0004(97)01144-4.

Noble, W. *et al.* (2003) 'Cdk5 Is a Key Factor in Tau Aggregation and Tangle Formation In Vivo as candidates in pathogenic tau phosphorylation. The activity of cdk5 is regulated by its binding with neuron- specific activator proteins p35, p25, and p39. Cleavage', *Neuron*, 38, pp. 555–565.

Nolen, B., Taylor, S. and Ghosh, G. (2004) 'Regulation of protein kinases: Controlling activity through activation segment conformation', *Molecular Cell*, 15(5), pp. 661–675. doi: 10.1016/j.molcel.2004.08.024.

Novello, S. *et al.* (2016) 'Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up', *Annals of Oncology*, 27(Supplement 5),

pp. V1–V27. doi: 10.1093/annonc/mdw326.

Nurse, P. (1975) 'Genetic control of cell size at cell division in yeast', *Nature*, 256, pp. 547–551.

Nutley, B. P. *et al.* (2005) 'Metabolism and pharmacokinetics of the cyclin-dependent kinase inhibitor R-roscovitine in the mouse', *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(1), pp. 125–139.

O'Hare, M. J. *et al.* (2005) 'Differential roles of nuclear and cytoplasmic cyclin-dependent kinase 5 in apoptotic and excitotoxic neuronal death', *Journal of Neuroscience*, 25(39), pp. 8954–8966. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2899-05.2005.

Odajima, J. *et al.* (2011) 'Cyclin E Constrains Cdk5 Activity to Regulate Synaptic Plasticity and Memory Formation', *Developmental Cell*, 21(4), pp. 655–668. doi: 10.1016/j.devcel.2011.08.009.

Ohshima, T. *et al.* (1996) 'Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20), pp. 11173–11178. doi: 10.1073/pnas.93.20.11173.

Ohshima, T. *et al.* (1999) 'Migration defects of cdk5(-/-) neurons in the developing cerebellum is cell autonomous.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(14), pp. 6017–6026.

Okada, S. *et al.* (2008) 'CDK5-dependent phosphorylation of the Rho family GTPase TC10α regulates insulin-stimulated GLUT4 translocation', *Journal of Biological Chemistry*, 283(51), pp. 35455–35463. doi: 10.1074/jbc.M806531200.

Ortega, S. *et al.* (2003) 'Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice', *Nature Genetics*, 35(1), pp. 25–31. doi: 10.1038/ng1232.

Ou, C. Y. *et al.* (2010) 'Two cyclin-dependent kinase pathways are essential for polarized trafficking of presynaptic components', *Cell*, 141(5), pp. 846–858. doi: 10.1016/j.cell.2010.04.011.

Ouyang, L. *et al.* (2020) 'p39-associated Cdk5 activity regulates dendritic morphogenesis', *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1–16. doi: 10.1038/s41598-020-75264-6.

Paglini, G. *et al.* (1998) 'Evidence for the participation of the neuron-specific CDK5 activator p35 during laminin-enhanced axonal growth', *Journal of Neuroscience*, 18(23), pp. 9858–9869. doi: 10.1523/jneurosci.18-23-09858.1998.

Paglini, G. *et al.* (2001) 'The Cdk5-p35 kinase associates with the Golgi apparatus and regulates membrane traffic', *EMBO Reports*, 2(12), pp. 1139–1144. doi: 10.1093/embo-reports/kve250.

Pan, Q. *et al.* (2011) 'Cdk5 targets active Src for ubiquitin-dependent degradation by phosphorylating Src(S75)', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(20), pp. 3425–3436. doi: 10.1007/s00018-011-0638-1.

Pandey, K. *et al.* (2019) 'Molecular mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer: A review', *International Journal of Cancer*, 145(5), pp. 1179–1188. doi: 10.1002/ijc.32020.

Pardoll, D. M. (2012) 'The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy', *Nature Reviews Cancer*, 12(4), pp. 252–264. doi: 10.1038/nrc3239.

Pareek, T. K. *et al.* (2010) 'Cyclin-dependent kinase 5 activity is required for T cell activation and induction of experimental autoimmune encephalomyelitis', *Journal of Experimental Medicine*, 207(11), pp. 2507–2519. doi: 10.1084/jem.20100876.

Park, H. *et al.* (2015) 'Targeting Cdk5 Activity in Neuronal Degeneration and Regeneration', *Cellular and Molecular Neurobiology*, 16(4), pp. 461–470. doi: 10.1016/j.chembiol.2009.02.014.A.

Park, M. *et al.* (2011) 'CYY-1/Cyclin Y and CDK-5 Differentially Regulate Synapse Elimination and Formation for Rewiring Neural Circuits', *Neuron*, 70(4), pp. 742–757. doi: 10.1016/j.neuron.2011.04.002.CYY-1/Cyclin.

Parry, D. *et al.* (2010) 'Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor', *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(8), pp. 2344–2353. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0324.

Paruch, K. *et al.* (2010) 'Discovery of dinaciclib (SCH 727965): A potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinases', *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 1(5), pp. 204–208. doi: 10.1021/ml100051d.

Patel, V. *et al.* (1998) 'Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, suppresses the growth of head and neck squamous cell carcinomas by inducing apoptosis', *Journal of Clinical Investigation*, 102(9), pp. 1674–1681. doi: 10.1172/JCI3661.

Patnaik, A. *et al.* (2016) 'Efficacy and safety of Abemaciclib, an inhibitor of CDK4 and CDK6, for patients with breast cancer, non–small cell lung cancer, and other solid tumors', *Cancer Discovery*, 6(7), pp. 740–753. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0095.

Patra, D. *et al.* (1999) 'The Xenopus Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G2/M regulators', *Journal of Biological Chemistry*, 274(52), pp. 36839–36842. doi: 10.1074/jbc.274.52.36839.

Patrick, G. N. *et al.* (1998) 'p35, the neuronal-specific activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway', *Journal of Biological Chemistry*, 273(37), pp. 24057–24064. doi: 10.1074/jbc.273.37.24057.

Patrick, G. N. *et al.* (1999) 'Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration', *Nature*, 402(6762), pp. 615–622. doi: 10.1038/45159.

Patzke, H. and Tsai, L. H. (2002) 'Calpain-mediated cleavage of the cyclin-dependent kinase-5 activator p39 to p29', *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), pp. 8054–8060. doi: 10.1074/jbc.M109645200.

Pellerano, M. *et al.* (2016) 'TP-2Rho Is a Sensitive Solvatochromic Red-Shifted Probe for Monitoring the Interactions between CDK4 and Cyclin D', *ChemBioChem*, 17(8), pp. 737–744. doi: 10.1002/cbic.201500641.

Pellerano, M. *et al.* (2017) 'Targeting Conformational Activation of CDK2 Kinase', *Biotechnology Journal*, 12(8). doi: 10.1002/biot.201600531.

Pellerano, M. *et al.* (2019) 'Fluorescent Biosensor for Detection of the R248Q Aggregation-Prone Mutant of p53', *ChemBioChem*, 20(4), pp. 605–613. doi: 10.1002/cbic.201800531.

Peyressatre, M. *et al.* (2015) 'Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: From small molecules to peptide inhibitors', *Cancers*, 7(1), pp. 179–237. doi: 10.3390/cancers7010179.

Peyressatre, M. (2016) *Développement de biosenseurs fluorescents et d'inhibiteurs pour suivre et cibler CDK5/p25 dans le Glioblastome*. Université de Montpellier.

Peyressatre, M., Laure, A., *et al.* (2020) 'Fluorescent Biosensor of CDK5 Kinase Activity in Glioblastoma Cell Extracts and Living Cells', *Biotechnology Journal*, 15(9), p. 1900474. doi: https://doi.org/10.1002/biot.201900474.

Peyressatre, M., Arama, D. P., *et al.* (2020) 'Identification of Quinazolinone Analogs Targeting CDK5 Kinase Activity and Glioblastoma Cell Proliferation', *Frontiers in Chemistry*, 8(August), pp. 1–12. doi: 10.3389/fchem.2020.00691.

Piedrahita, D. *et al.* (2010) 'Silencing of CDK5 reduces neurofibrillary tangles in transgenic Alzheimer's mice', *Journal of Neuroscience*, 30(42), pp. 13966–13976. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3637-10.2010.

Pigino, G. *et al.* (1997) 'Analysis of the expression, distribution and function of cyclin dependent kinase 5 (cdk5) in developing cerebellar macroneurons', *Journal of Cell Science*, 110(2), pp. 257–270.

Pines, J. (1996) 'Cell cycle: Reaching for a role for the Cks proteins', *Current Biology*, 6(11), pp. 1399–1402. doi: 10.1016/S0960-9822(96)00741-5.

Planchard, D. *et al.* (2019) 'Corrigendum: Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up (Annals of Oncology (2018) 29 (iv192–iv237) DOI: 10.1093/annonc/mdy275)', *Annals of Oncology*, 30(5), pp. 863–870. doi: 10.1093/annonc/mdy474.

Plantone, D. and Koudriavtseva, T. (2018) 'Current and Future Use of Chloroquine and Hydroxychloroquine in Infectious, Immune, Neoplastic, and Neurological Diseases: A Mini-Review', *Clinical Drug Investigation*, 38(8), pp. 653–671. doi: 10.1007/s40261-018-0656-y.

Plattner, F. *et al.* (2015) 'The role of ventral striatal cAMP signaling in stress-induced behaviors', *Nature Neuroscience*, 18(8), pp. 1094–1100. doi: 10.1038/nn.4066.

Politi, K. and Herbst, R. S. (2015) 'Lung cancer in the era of precision medicine', *Clinical Cancer Research*, 21(10), pp. 2213–2220. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2748.

Poon, R. Y. C. *et al.* (1993) 'The cdc2-related protein p40(MO15) is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33(cdk2) and p34(cdc2)', *EMBO Journal*, 12(8), pp. 3123–3132. doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05981.x.

Poon, R. Y. C., Lew, J. and Hunter, T. (1997) 'Identification of functional domains in the neuronal Cdk5 activator protein', *Journal of Biological Chemistry*, 272(9), pp. 5703–5708. doi: 10.1074/jbc.272.9.5703.

Poore, C. P. *et al.* (2010) 'Cdk5-mediated phosphorylation of δ-catenin regulates its localization and GluR2-mediated synaptic activity', *Journal of Neuroscience*, 30(25), pp. 8457–8467. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6062-09.2010.

Pozo, K. and Bibb, J. A. (2016) 'The Emerging Role of Cdk5 in Cancer', *Trends Cancer*, 63(1), pp. 217–232. doi: 10.1002/hep.28274.Integrin.

Prével, C. *et al.* (2014) 'Fluorescent biosensors for drug discovery new tools for old targets - Screening for inhibitors of cyclin-dependent kinases', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 88, pp. 74–88. doi: 10.1002/cbic.201402318.

Pushpakom, S. *et al.* (2018) 'Drug repurposing: progress, challenges and recommendations', *Nature Publishing Group*. doi: 10.1038/nrd.2018.168.

Qi, Z. *et al.* (1995) 'Reconstitution of neuronal Cdc2-like kinase from bacteria-expressed Cdk5 and an active fragment of the brain-specific activator. Kinase activation in the absence of Cdk5 phosphorylation', *Journal of Biological Chemistry*, 270(18), pp. 10847–10854. doi: 10.1074/jbc.270.18.10847.

Qin, A. *et al.* (2020) 'Cyclin-dependent kinase inhibitors for the treatment of lung cancer', *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 21(8), pp. 941–952. doi: 10.1080/14656566.2020.1738385.

Qu, D. *et al.* (2007) 'Role of Cdk5-Mediated Phosphorylation of Prx2 in MPTP Toxicity and Parkinson's Disease', *Neuron*, 55(1), pp. 37–52. doi: 10.1016/j.neuron.2007.05.033.

Rakić, S. *et al.* (2015) 'Cdk5 phosphorylation of ErbB4 is required for tangential migration of cortical interneurons', *Cerebral Cortex*, 25(4), pp. 991–1003. doi: 10.1093/cercor/bht290.

Ramirez, M. *et al.* (2016) 'Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells', *Nature Communications*, 7, pp. 1–8. doi: 10.1038/ncomms10690.

Ramiro-Ibáñez, F., Trajkovic, D. and Jessen, B. (2005) 'Gastric and Pancreatic Lesions in Rats Treated with a Pan-CDK Inhibitor', *Toxicologic Pathology*, 33(7), pp. 784–791. doi: 10.1080/01926230500455862.

Rashid, T., Banerjee, M. and Nikolic, M. (2001) 'Phosphorylation of Pak1 by the p35/Cdk5 Kinase Affects Neuronal Morphology', *Journal of Biological Chemistry*, 276(52), pp. 49043–49052. doi: 10.1074/jbc.M105599200.

Ray, M. R., Jablons, D. and He, B. (2010) 'Lung cancer therapeutics that target signaling

pathways: an update', *Expert Review of Respiratory Medicine*, 4(5), pp. 631–645. doi: 10.1586/ers.10.64.

Reményi, A., Good, M. C. and Lim, W. A. (2006) 'Docking interactions in protein kinase and phosphatase networks', *Current Opinion in Structural Biology*, 16(6), pp. 676–685. doi: 10.1016/j.sbi.2006.10.008.

Ren, S. and Rollins, B. J. (2004) 'Cyclin C/Cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit', *Cell*, 117(2), pp. 239–251. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00300-9.

Roach, B. L. *et al.* (2018) 'Identification and characterization of a novel phosphoregulatory site on cyclin-dependent kinase 5', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 504(4), pp. 753–758. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.09.017.

Rosales, J. L., Han, B. and Lee, K. Y. (2003) 'Cdk7 functions as a Cdk5 activating kinase in brain', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 13(5), pp. 285–296. doi: 10.1159/000074543.

Roskoski, R. (2017) 'Allosteric MEK1/2 inhibitors including cobimetanib and trametinib in the treatment of cutaneous melanomas', *Pharmacological Research*, 117, pp. 20–31. doi: 10.1016/j.phrs.2016.12.009.

Roufayel, R. and Murshid, N. (2019) 'CDK5: Key regulator of apoptosis and cell survival', *Biomedicines*, 7(4), pp. 1–13. doi: 10.3390/biomedicines7040088.

Russo, A. A., Jeffrey, P. D. and Pavletich, N. P. (1996) 'Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation', *Nature Structural Biology*, 3(8), pp. 696–700.

Sahlgren, C. M. *et al.* (2003) 'Cdk5 Regulates the Organization of Nestin and Its Association with p35', *Molecular and Cellular Biology*, 23(14), pp. 5090–5106. doi: 10.1128/mcb.23.14.5090-5106.2003.

Saito, T. *et al.* (2003) 'Developmental regulation of the proteolysis of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator by phosphorylation', *Journal of Neuroscience*, 23(4), pp. 1189–1197. doi: 10.1523/jneurosci.23-04-01189.2003.

Saito, T. *et al.* (2007) 'p25/Cyclin-dependent kinase 5 promotes the progression of cell death in nucleus of endoplasmic reticulum-stressed neurons', *Journal of Neurochemistry*, 102(1), pp. 133–140. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04540.x.

Samuels, B. A. *et al.* (2007) 'Cdk5 Promotes Synaptogenesis by Regulating the Subcellular Distribution of the MAGUK Family Member CASK', *Neuron*, 56(5), pp. 823–837. doi: 10.1016/j.neuron.2007.09.035.

Sánchez-Martínez, C. *et al.* (2015) 'Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 25(17), pp. 3420–3435. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.05.100.

Sánchez-Martínez, C. *et al.* (2019) 'Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs: Recent advances (2015–2019)', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 29(20), p. 126637. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.126637.

Santamaría, D. *et al.* (2007) 'Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle', *Nature*, 448(7155), pp. 811–815. doi: 10.1038/nature06046.

Santo, L. *et al.* (2010) 'AT7519, A novel small molecule multi-cyclin-dependent kinase inhibitor, induces apoptosis in multiple myeloma via GSK-3B activation and RNA polymerase II inhibition', *Oncogene*, 29(16), pp. 2325–2336. doi: 10.1038/onc.2009.510.

Sasaki, S. *et al.* (2000) 'A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system', *Neuron*, 28(3), pp. 681–696. doi: 10.1016/S0896-6273(00)00146-X.

Sasaki, Y. *et al.* (2002) 'Fyn and Cdk5 mediate semaphorin-3A signaling, which is involved in regulation of dendrite orientation in cerebral cortex', *Neuron*, 35(5), pp. 907–920. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00857-7.

Schang, L. M. *et al.* (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', *Journal of Virology*, 76(15), pp. 7874–7882. doi: 10.1128/jvi.76.15.7874-7882.2002.

Schmid, G. and Strosznajder, J. B. (2006) 'Interplay Between the p53 Tumor Suppressor Protein Family and Cdk5 Expression and Activity of Cyclin- Dependent Kinases in Proliferating', *Molecular Neurobiology*, 34(1), pp. 027–049.

Schneider, R. *et al.* (2013) 'Overcoming compound fluorescence in the FLiK screening assay with red-shifted fluorophores', *Journal of the American Chemical Society*, 135(22), pp. 8400–8408. doi: 10.1021/ja403074j.

Schubert, S. *et al.* (2010) 'β2-syntrophin is a Cdk5 substrate that restrains the motility of insulin secretory granules', *PLoS ONE*, 5(9). doi: 10.1371/journal.pone.0012929.

Schulman, B. A., Lindstrom, D. L. and Harlow, E. (1998) 'Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18), pp. 10453–10458. doi: 10.1073/pnas.95.18.10453.

Seo, H. R. *et al.* (2006) 'Cyclin G1 overcomes radiation-induced G2 arrest and increases cell death through transcriptional activation of cyclin B1', *Cell Death and Differentiation*, 13(9), pp. 1475–1484. doi: 10.1038/sj.cdd.4401822.

Seo, H. R. *et al.* (2008) 'Cdk5-mediated phosphorylation of c-Myc on Ser-62 is essential in transcriptional activation of cyclin B1 by cyclin G1', *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), pp. 15601–15610. doi: 10.1074/jbc.M800987200.

Seo, J. *et al.* (2020) 'A cyclin-dependent kinase 5-derived peptide inhibits Cdk5/p25 activity and improves neurodegenerative phenotypes', *bioRxiv*, p. 2020.05.12.090472. doi: 10.1101/2020.05.12.090472.

Shah, K. and Rossie, S. (2017) 'Tale of the Good and the Bad Cdk5: Remodeling of the Actin

Cytoskeleton in the Brain', *Molecular Neurobiology*, 55(4), pp. 3426–3438. doi: 10.1007/s12035-017-0525-3.

Shapiro, G. I. (2004) 'Preclinical and Clinical Development of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Flavopiridol', *Clinical Cancer Research*, 10(12), pp. 4270s LP-4275s. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-040020.

Sharma, M. R., Tuszynski, G. P. and Sharma, M. C. (2004) 'Angiostatin-induced inhibition of endothelial cell proliferation/apoptosis is associated with the down-regulation of cell cycle regulatory protein cdk5', *Journal of Cellular Biochemistry*, 91(2), pp. 398–409. doi: 10.1002/jcb.10762.

Sharma, M., Sharma, P. and Pant, H. C. (1999) 'CDK-5-mediated neurofilament phosphorylation in SHSY5Y human neuroblastoma cells', *Journal of Neurochemistry*, 73(1), pp. 79–86. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0730079.x.

Sharma, P. *et al.* (1999) 'Regulation of cyclin-dependent kinase 5 catalytic activity by phosphorylation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), pp. 11156–11160. doi: 10.1073/pnas.96.20.11156.

Sharma, P., Sharma, R. and Tyagi, R. (2008) 'Inhibitors of Cyclin Dependent Kinases: Useful Targets for Cancer Treatment', *Current Cancer Drug Targets*, 8(1), pp. 53–75. doi: 10.2174/156800908783497131.

Sharma, S. *et al.* (2020) 'Targeting the cyclin-dependent kinase 5 in metastatic melanoma', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(14), pp. 8001–8012. doi: 10.1073/pnas.1912617117.

Sharma, S. and Sicinski, P. (2020) 'A kinase of many talents: Non-neuronal functions of CDK5 in development and disease', *Open Biology*, 10(1). doi: 10.1098/rsob.190287.

Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1999) 'CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression', *Genes and Development*, 13(12), pp. 1501–1512. doi: 10.1101/gad.13.12.1501.

Shuang, R. *et al.* (1998) 'Regulation of Munc-18/syntaxin 1A interaction by cyclin-dependent kinase 5 in nerve endings', *Journal of Biological Chemistry*, 273(9), pp. 4957–4966. doi: 10.1074/jbc.273.9.4957.

Shukla, V. *et al.* (2017) 'TFP5, a peptide inhibitor of aberrant and hyperactive Cdk5/p25, attenuates pathological phenotypes and restores synaptic function in CK-p25Tg mice', *Journal of Alzheimer's Disease*, 56(1), pp. 335–349. doi: 10.3233/JAD-160916.

Shulman, J. M., De Jager, P. L. and Feany, M. B. (2011) 'Parkinson's Disease: Genetics and Pathogenesis', *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6(1), pp. 193–222. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130242.

Shupp, A., Casimiro, M. C. and Pestell, R. G. (2017) 'Biological functions of CDK5 and potential CDK5 targeted clinical treatments', *Oncotarget*, 8(10), pp. 17373–17382. doi:

10.18632/oncotarget.14538.

Simard, J. R. and Rauh, D. (2014) *FLiK: A direct-binding assay for the identification and kinetic characterization of stabilizers of inactive kinase conformations*. 1st edn, *Methods in Enzymology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-397918-6.00006-9.

Siuciak, J. A. *et al.* (2006) 'Inhibition of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: A novel approach to the treatment of psychosis', *Neuropharmacology*, 51(2), pp. 386–396. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.04.013.

Smith, P. D. *et al.* (2003) 'Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), pp. 13650–13655. doi: 10.1073/pnas.2232515100.

Squires, M. *et al.* (2009) 'Biological characterization of AT7519, a small-molecule inhibitor of cyclin-dependent kinases, in human tumor cell lines', *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(2), pp. 324–332. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0890.

Squires, M. S. *et al.* (2010) 'AT7519, a cyclin-dependent kinase inhibitor, exerts its effects by transcriptional inhibition in leukemia cell lines and patient samples', *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(4), pp. 920–928. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-1071.

Su, S. C. and Tsai, L.-H. (2011) 'Cyclin-Dependent Kinases in Brain Development and Disease', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), pp. 465–491. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154023.

Suarez-Arnedo, A. *et al.* (2020) 'An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays', *PLoS ONE*, 15(7 July), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0232565.

Sun, K. H. *et al.* (2011) 'Glutathione-S-transferase P1 is a critical regulator of Cdk5 kinase activity', *Journal of Neurochemistry*, 118(5), pp. 902–914. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07343.x.

Sundaram, J. R. *et al.* (2013) 'Specific inhibition of p25/Cdk5 activity by the Cdk5 inhibitory peptide reduces neurodegeneration in vivo', *Journal of Neuroscience*, 33(1), pp. 334–343. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3593-12.2013.

Suvà, M. L. *et al.* (2014) 'Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells', *Cell*, 157(3), pp. 580–594. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.030.

Szilagyi, Z. and Gustafsson, C. M. (2013) 'Emerging roles of Cdk8 in cell cycle control', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(9), pp. 916–920. doi: 10.1016/j.bbagrm.2013.04.010.

Tabouret, E. *et al.* (2020) 'TP5, a peptide inhibitor of aberrant and hyperactive CDK5/p25: A novel therapeutic approach against glioblastoma', *Cancers*, 12(7), pp. 1–16. doi:

10.3390/cancers12071935.

Takahashi, S. *et al.* (2003) 'Tau phosphorylation by cyclin-dependent kinase 5/p39 during brain development reduces its affinity for microtubules', *Journal of Biological Chemistry*, 278(12), pp. 10506–10515. doi: 10.1074/jbc.M211964200.

Takano, T. *et al.* (2010) 'AATYK1A phosphorylation by Cdk5 regulates the recycling endosome pathway', *Genes to Cells*, 15(7), pp. 783–797. doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01419.x.

Takasugi, T. *et al.* (2016) 'Two degradation pathways of the p35 Cdk5 (Cyclin-dependent Kinase) activation subunit, dependent and independent of ubiquitination', *Journal of Biological Chemistry*, 291(9), pp. 4649–4657. doi: 10.1074/jbc.M115.692871.

Tamaoki, T. *et al.* (1986) 'Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipidCa++dependent protein kinase', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 135(2), pp. 397–402. doi: https://doi.org/10.1016/0006-291X(86)90008-2.

Tanaka, T. *et al.* (2001) 'Neuronal cyclin-dependent kinase 5 activity is critical for survival', *Journal of Neuroscience*, 21(2), pp. 550–558. doi: 10.1523/jneurosci.21-02-00550.2001.

Tang, D. *et al.* (1997) 'Cyclin-dependent Kinase 5 (Cdk5) Activation Domain of Neuronal Cdk5 Activator', *Journal of Biological Chemistry*, 272(19), pp. 12318–12327. doi: 10.1074/jbc.272.19.12318.

Taniguchi, Y. *et al.* (2012) 'Both cyclin I and p35 are required for maximal survival benefit of cyclin-dependent kinase 5 in kidney podocytes', *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 302(9), pp. 1161–1171. doi: 10.1152/ajprenal.00614.2011.

Tarricone, C. *et al.* (2001) 'Structure and regulation of the CDK5-p25nck5a complex', *Molecular Cell*, 8(3), pp. 657–669. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00343-4.

Taylor, S. S., Radzio-Andzelm, E. and Hunter, T. (1995) 'How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase', *The FASEB Journal*, 9(13), pp. 1255–1266. doi: 10.1096/fasebj.9.13.7557015.

Thonel, A. de *et al.* (2010) 'Protein Kinase Cζ Regulates Cdk5/p25 Signaling during Myogenesis', *Molecular Biology of the Cell*, 21(8), pp. 1423–1434. doi: 10.1091/mbc.e09-10-0847.

Tian, B., Yang, Q. and Mao, Z. (2009) 'Phosphorylation of ATM by Cdk5 mediates DNA damage signalling and regulates neuronal death', *Nature Cell Biology*, 11(2), pp. 211–218. doi: 10.1038/ncb1829.

Tomashevski, A. *et al.* (2010) 'Cyclin-C-dependent cell-cycle entry is required for activation of non-homologous end joining DNA repair in postmitotic neurons', *Cell Death and Differentiation*, 17(7), pp. 1189–1198. doi: 10.1038/cdd.2009.221.

Tonge, P. J. (2018) 'Drug-Target Kinetics in Drug Discovery', *ACS Chemical Neuroscience*, 9(1),

pp. 29–39. doi: 10.1021/acschemneuro.7b00185.

Trembley, J. H. *et al.* (2004) 'Cyclin Dependent Kinase 11 in RNA Transcription and Splicing', *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 77, pp. 263–288. doi: 10.1016/S0079-6603(04)77007-5.

Tsai, L.-H. *et al.* (1994) 'p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5', *Nature*, 371(6496), pp. 419–423. doi: 10.1038/371419a0.

Tsai, L. H. *et al.* (1993) 'Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system', *Development*, 119(4), pp. 1029–1040.

Tseng, H. C. *et al.* (2002) 'A survey of Cdk5 activator p35 and p25 levels in Alzheimer's disease brains', *FEBS Letters*, 523(1–3), pp. 58–62. doi: 10.1016/S0014-5793(02)02934-4.

Tsutsumi, K. *et al.* (2010) 'Phosphorylation of AATYK1 by Cdk5 Suppresses Its Tyrosine Phosphorylation', *PLoS ONE*, 5(4), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0010260.

Turner, N. C. *et al.* (2008) 'A synthetic lethal siRNA screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor', *EMBO Journal*, 27(9), pp. 1368–1377. doi: 10.1038/emboj.2008.61.

Ugrinova, I., Pashev, I. G. and Pasheva, E. A. (2011) 'Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates mammalian HMGB1 protein only if acetylated', *Journal of Biochemistry*, 149(5), pp. 563–568. doi: 10.1093/jb/mvr005.

Vasan, N., Baselga, J. and Hyman, D. M. (2019) 'A view on drug resistance in cancer', *Nature*, 575(April), pp. 299–309. doi: 10.1038/s41586-019-1730-1.

Vasta, J. D. *et al.* (2018) 'Quantitative, Wide-Spectrum Kinase Profiling in Live Cells for Assessing the Effect of Cellular ATP on Target Engagement', *Cell Chemical Biology*, 25(2), pp. 206-214.e11. doi: 10.1016/j.chembiol.2017.10.010.

Veselý, J. *et al.* (1994) 'Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues', *European Journal of Biochemistry*, 224(2), pp. 771–786. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.00771.x.

Vigneron, A., Gamelin, E. and Coqueret, O. (2008) 'The EGFR-STAT3 oncogenic pathway up-regulates the Eme1 endonuclease to reduce DNA damage after topoisomerase I inhibition', *Cancer Research*, 68(3), pp. 815–825. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5115.

Vita, M. *et al.* (2005) 'Tissue distribution, pharmacokinetics and identification of roscovitine metabolites in rat', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25(1), pp. 91–103. doi: 10.1016/j.ejps.2005.02.001.

Vogelstein, B. *et al.* (2013) 'Cancer genome landscapes', *Science*, 340(6127), pp. 1546–1558. doi: 10.1126/science.1235122.

Wada, Y. *et al.* (1998) 'Microtubule-stimulated phosphorylation of tau at Ser202 and Thr205 by cdk5 decreases its microtubule nucleation activity', *Journal of Biochemistry*, 124(4), pp.

738–746. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022174.

Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S. and Gatto, G. J. (2005) 'Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications', *Angewandte Chemie - International Edition*, 44(45), pp. 7342–7372. doi: 10.1002/anie.200501023.

Walsh, D. A., Perkins, J. P. and Krebs, E. G. (1968) 'An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle.', *Journal of Biological Chemistry*, 243(13), pp. 3763–3765.

Wang, H. *et al.* (2017) 'The metabolic function of cyclin D3-CDK6 kinase in cancer cell survival', *Nature*, 546(7658), pp. 426–430. doi: 10.1038/nature22797.

Wang, S. and Fischer, P. M. (2008) 'Cyclin-dependent kinase 9: a key transcriptional regulator and potential drug target in oncology, virology and cardiology', *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(6), pp. 302–313. doi: 10.1016/j.tips.2008.03.003.

Warenius, H. M. *et al.* (2011) 'Selective anticancer activity of a hexapeptide with sequence homology to a non-kinase domain of Cyclin Dependent Kinase 4', *Molecular Cancer*, 10(June). doi: 10.1186/1476-4598-10-72.

Wei, F. Y. *et al.* (2005) 'Control of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activity by glutamatergic regulation of p35 stability', *Journal of Neurochemistry*, 93(2), pp. 502–512. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03058.x.

Wei, K. *et al.* (2016) 'An immunohistochemical study of cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) and small cell lung cancer (SCLC): A possible prognostic biomarker', *World Journal of Surgical Oncology*, 14(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/s12957-016-0787-7.

Wei, X. *et al.* (2020) 'Inhibition of cyclin-dependent kinases by AT7519 enhances nasopharyngeal carcinoma cell response to chemotherapy', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 85(5), pp. 949–957. doi: 10.1007/s00280-020-04068-2.

Weinstein, J. N. *et al.* (2013) 'The cancer genome atlas pan-cancer analysis project', *Nature Genetics*, 45(10), pp. 1113–1120. doi: 10.1038/ng.2764.

Whittaker, S. R. *et al.* (2017) 'Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics', *Pharmacology and Therapeutics*, 173, pp. 83–105. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.008.

Wilson, A. J. (2009) 'Inhibition of protein–protein interactions using designed molecules', *Chemical Society Reviews*, 38(12), pp. 3289–3300. doi: 10.1039/b807197g.

Wood, D. J. and Endicott, J. A. (2018) 'Structural insights into the functional diversity of the CDK–cyclin family', *Open Biology*, 8(9). doi: 10.1098/rsob.180112.

Worth, D. C. *et al.* (2013) 'Drebrin contains a cryptic F-actin-bundling activity regulated by Cdk5 phosphorylation', *Journal of Cell Biology*, 202(5), pp. 793–806. doi: 10.1083/jcb.201303005.

Wu, P., Clausen, M. H. and Nielsen, T. E. (2015) 'Allosteric small-molecule kinase inhibitors', *Pharmacology and Therapeutics*, 156, pp. 59–68. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.10.002.

Wu, P., Nielsen, T. E. and Clausen, M. H. (2016) 'Small-molecule kinase inhibitors: An analysis of FDA-approved drugs', *Drug Discovery Today*, 21(1), pp. 5–10. doi: 10.1016/j.drudis.2015.07.008.

Wyatt, P. *et al.* (2008) 'Identification of N-(4-Piperidinyl)-4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxamide (AT7519), a Novel Cyclin Dependent Kinase Inhibitor Using Fragment', *ACS Publications*, 51, pp. 4986–4999. Available at: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm800382h.

Xi, C. *et al.* (2019) 'Inhibition of cyclin-dependent kinases by AT7519 is effective to overcome chemoresistance in colon and cervical cancer', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 513(3), pp. 589–593. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.04.014.

Xie, Q. *et al.* (2015) 'Mitochondrial Control by DRP1 in Brain Tumor Initiating Cells', *Nature neuroscience*, 18(4), pp. 501–510. doi: 10.1038/nn.3960.

Xie, T. *et al.* (2020) 'Conformational states dynamically populated by a kinase determine its function', *Science*, 370(6513). doi: 10.1126/science.abc2754.

Xie, Z. *et al.* (2003) 'Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration', *Cell*, 114(4), pp. 469–482. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00605-6.

Xiong, Y., Zhang, H. and Beach, D. (1992) 'D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA', *Cell*, 71(3), pp. 505–514. doi: 10.1016/0092-8674(92)90518-H.

Yu, D. S. *et al.* (2010) 'Cyclin-dependent kinase 9-cyclin K functions in the replication stress response', *EMBO Reports*, 11(11), pp. 876–882. doi: 10.1038/embor.2010.153.

Yu, H. P. *et al.* (2015) 'TIGAR regulates DNA damage and repair through pentosephosphate pathway and Cdk5-ATM pathway', *Scientific Reports*, 5, pp. 1–9. doi: 10.1038/srep09853.

Yushan, R. *et al.* (2015) 'Insights into the clinical value of cyclin-dependent kinase 5 in glioma: A retrospective study', *World Journal of Surgical Oncology*, 13(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s12957-015-0629-z.

Zeng, J. *et al.* (2018) 'CDK5 functions as a tumor promoter in human lung cancer', *Journal of Cancer*, 9(21), pp. 3950–3961. doi: 10.7150/jca.25967.

Zeng, S., Shen, W. H. and Liu, L. (2018) 'Senescence and Cancer.', *Cancer translational medicine*, 4(3), pp. 70–74. doi: 10.4103/ctm.ctm_22_18.

Zhang, B. *et al.* (2011) 'An in silico approach for the discovery of CDK5/p25 interaction inhibitors', *Biotechnology Journal*, 6(7), pp. 871–881. doi: 10.1002/biot.201100139.

Zhang, H. *et al.* (2013) 'Mammalian adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP1) regulates

cofilin function, the actin cytoskeleton, and cell adhesion', *Journal of Biological Chemistry*, 288(29), pp. 20966–20977. doi: 10.1074/jbc.M113.484535.

Zhang, J., Krishnamurthy, P. K. and Johnson, G. V. W. (2002) 'Cdk5 phosphorylates p53 and regulates its activity', *Journal of Neurochemistry*, 81(2), pp. 307–313. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.00824.x.

Zhang, L. *et al.* (2012) 'P10, the N-terminal domain of p35, protects against CDK5/p25-induced neurotoxicity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(49), pp. 20041–20046. doi: 10.1073/pnas.1212914109.

Zheleva, D. I. *et al.* (2002) 'Highly potent p21WAF1-derived peptide inhibitors of CDK-mediated pRb phosphorylation: Delineation and structural insight into their interactions with cyclin A', *Journal of Peptide Research*, 60(5), pp. 257–270. doi: 10.1034/j.1399-3011.2002.21014.x.

Zheng, D. *et al.* (2008) 'Cyclin-dependent kinase 3-mediated activating transcription factor 1 phosphorylation enhances cell transformation', *Cancer Research*, 68(18), pp. 7650–7660. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1137.

Zheng, M., Leung, C. L. and Liem, R. K. H. (1998) 'Region-specific expression of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) and its activators, p35 and p39, in the developing and adult rat central nervous system', *Journal of Neurobiology*, 35(2), pp. 141–159. doi: 10.1002/(SICI)1097-4695(199805)35:2<141::AID-NEU2>3.0.CO;2-4.

Zheng, Y. L. *et al.* (2002) 'A peptide derived from cyclin-dependent kinase activator (p35) specifically inhibits Cdk5 activity and phosphorylation of tau protein in transfected cells', *European Journal of Biochemistry*, 269(18), pp. 4427–4434. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03133.x.

Zheng, Y. L. *et al.* (2010a) 'A 24-residue peptide (p5), derived from p35, the Cdk5 neuronal activator, specifically inhibits Cdk5-p25 hyperactivity and tau hyperphosphorylation', *Journal of Biological Chemistry*, 285(44), pp. 34202–34212. doi: 10.1074/jbc.M110.134643.

Zheng, Y. L. *et al.* (2010b) 'A 24-residue peptide (p5), derived from p35, the Cdk5 neuronal activator, specifically inhibits Cdk5-p25 hyperactivity and tau hyperphosphorylation', *Journal of Biological Chemistry*, 285(44), pp. 34202–34212. doi: 10.1074/jbc.M110.134643.

Zhuang, K. *et al.* (2016) 'CDK5 functions as a tumor promoter in human colorectal cancer via modulating the ERK5–AP-1 axis', *Cell Death and Disease*, 7(10), pp. e2415-12. doi: 10.1038/cddis.2016.333.

Zukerberg, L. R. *et al.* (2000) 'Cables Links Cdk5 and c-Abl and Facilitates Cdk5 Tyrosine Phosphorylation, Kinase Upregulation, and Neurite Outgrowth Cdks are involved in events unrelated to cell division. A function of Cdk5 has been demonstrated only in the development of the nervous s', *Neuron*, 26, pp. 633–646. Available at: https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0896-6273%2800%2981200-3.

ARTICLE

frontiers in Chemistry

ORIGINAL RESEARCH
published: 19 August 2020
doi: 10.3389/fchem.2020.00691

Identification of Quinazolinone Analogs Targeting CDK5 Kinase Activity and Glioblastoma Cell Proliferation

*Marion Peyressatre, Dominique Patorno Arama, Arthur Laure, Juan A. González-Vera†, Morgan Pellerano, Nicolas Masurier, Vincent Lisowski and May C. Morris**

Institut des Biomolecules Max Moussaron, UMR 5247, CNRS, Université de Montpellier, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Montpellier, France

OPEN ACCESS

Edited by:
John D. Wade,
University of Melbourne, Australia

Reviewed by:
Dimitros D. Leonidas,
University of Thessaly, Greece
Laszlo Otvos,
Opio LLC, United States

****Correspondence:***
May C. Morris
may.morris@umontpellier.fr

†Present address:
Juan A. González-Vera,
Departamento de Fisicoquímica,
Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, Spain

Specialty section:
This article was submitted to Chemical Biology, a section of the journal Frontiers in Chemistry

Received: *20 December 2019*
Accepted: *03 July 2020*
Published: *19 August 2020*

Citation:
Peyressatre M, Arama DP, Laure A, González-Vera JA, Pellerano M, Masurier N, Lisowski V and Morris MC (2020) Identification of Quinazolinone Analogs Targeting CDK5 Kinase Activity and Glioblastoma Cell Proliferation. Front. Chem. 8:691. doi: 10.3389/fchem.2020.00691

CDK5/p25 kinase plays a major role in neuronal functions, and is hyperactivated in several human cancers including glioblastoma and neurodegenerative pathologies such as Alzheimer's and Parkinson's. CDK5 therefore constitutes an attractive pharmacological target. Since the successful discovery and development of Roscovitine, several ATP-competitive inhibitors of CDK5 and peptide inhibitors of CDK5/p25 interface have been developed. However, these compounds suffer limitations associated with their mechanism of action and nature, thereby calling for alternative targeting strategies. To date, few allosteric inhibitors have been developed for successful targeting of protein kinases. Indeed, although this latter class of inhibitors are believed to be more selective than compounds targeting the active site, they have proven extremely difficult to identify in high throughput screens. By implementing a fluorescent biosensor that discriminates against ATP-pocket binding compounds to screen for allosteric inhibitors that target conformational activation of CDK5, we have identified a novel family of quinazolinones. Characterization of these hits and several of their derivatives revealed their inhibitory potential toward CDK5 kinase activity *in vitro* and to inhibit glioblastoma cell proliferation. The quinazolinone derivatives described in this study are the first small molecules reported to target CDK5 at a site other than the ATP pocket, thereby constituting attractive leads for glioblastoma therapeutics and providing therapeutic perspectives for neurodegenerative diseases. These compounds offer alternatives to conventional ATP-competitive inhibitors or peptides targeting CDK5/p25 interface with the potential of bypassing their limitations.

Keywords: CDK5, kinase, conformational biosensor, quinazoline, small molecule inhibitor, fluorescence-based screening

INTRODUCTION

The serine/threonine kinase CDK5, an unconventional member of the cyclin-dependent kinases (CDK) family, is essentially active in post-mitotic neurons where it is involved in neuronal maturation and migration, axonal guidance and synaptic transmission (Dhavan and Tsai, 2001). CDK5 is tightly regulated by its neurospecific partner p35, which anchors it at the membrane in an

inactive form (Lim et al., 2001). Following an influx of calcium, p35 undergoes calpain-mediated cleavage into p25, which is released into the cytoplasm in an active complex with CDK5. CDK5 hyperactivity has been described in several neurodegenerative disorders including Alzheimer's and Parkinson's disease as well as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (Cheung and Ip, 2012). In addition, a growing number of studies describe upregulation or hyperactivation of CDK5 in human cancers, indicating that CDK5 constitutes a relevant target in oncology (Catania et al., 2001; Peyressatre et al., 2015; Pozo and Bibb, 2017). Indeed, CDK5-mediated phosphorylation of phosphatidylinositol 3-kinase enhancer PIKE-A stimulates its GTPase activity, in turn activating nuclear Akt, and mediating growth factor-induced migration and invasion of glioblastoma cells (Liu et al., 2008). CDK5 has also been found to phosphorylate dynamin-related protein 1 (DRP1), thereby stimulating its activity in brain tumor-initiating cells; DRP1 activation correlates with poor prognosis in glioblastoma (Xie et al., 2015). More recently CDK5 has been identified as a valuable predictive marker of tumorigenesis and progression in glioma (Yushan et al., 2015). CDK5 therefore constitutes an attractive pharmacological target.

CDK5 has long been considered a relevant pharmacological target in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's, ALS) and has more recently become an attractive drug target for cancer therapy (Cheung and Ip, 2012; Pozo and Bibb, 2017; Shupp et al., 2017). Aberrant expression or hyperactivation of this kinase contributes to tumorigenesis and progression of several tumors including cancer stem cells by stimulating proliferation, migration, angiogenesis, and CDK5 activity regulates the DNA damage pathway, chemotherapy resistance and anti-tumor immunity (Lenjisa et al., 2017; Pozo and Bibb, 2017; Shupp et al., 2017).

A wide variety of ATP-competitive inhibitors of CDK/cyclins have been identified in high throughput screening assays, and/or further developed through structure-guided approaches for anticancer therapeutics (Lapenna and Giordano, 2009; Bruyère and Meijer, 2013; Asghar et al., 2015). Whilst first generation pan-CDK inhibitors such as flavopiridol or R-Roscovitine have shown disappointingly low activity and high toxicity in clinical trials, further efforts have yielded second-generation CDK inhibitors with improved potency and selectivity. Notwithstanding the success of such compounds, they ultimately lead to emergence of resistance, calling for new generations of kinase inhibitors, whose mechanism of action does not involve targeting the ATP pocket (Wu et al., 2016).

Most inhibitors developed to target CDK5, including R-Roscovitine, Purvalanol-A, Dinaciclib and AT7519, bind within its ATP-binding pocket (Peyressatre et al., 2015). Since the mechanism of action of ATP-competitive inhibitors is notorious for its lack of selectivity, resulting in a variety of undesirable secondary effects, alternative strategies have been deployed to identify compounds that target sites other than the ATP-binding pocket or the catalytic site and thereby enable development of novel classes of therapeutics (Cirillo et al., 2011; Abate et al., 2013; Bruyère and Meijer, 2013; Asghar et al., 2015). In particular, several peptides have been designed to target the main interface between CDK5 and its regulatory coactivator p25/p35, with the aim of preventing complex formation. Peptides derived from p25/p35 were successfully developed to target CDK5/p25 with high specificity, thereby downregulating CDK5 hyperactivity and Tau hyperphosphorylation, reducing neurodegeneration and preventing Alzheimer's in mouse models without any toxicity (Chin et al., 1999; Zheng et al., 2002, 2010; Shukla et al., 2013; Sundaram et al., 2013). More recently, CDK5i, a peptide inhibitor derived from the activation loop of CDK5 was patented for its ability to selectively disrupt the interaction between CDK5 and p25/p35 without affecting CDK5 physiological activity (Tsai et al., 2019; patent N° WO/2019/055236). Although such peptides constitute promising therapies, they remain problematic for clinical use due to low cell membrane permeability, solubility and bioavailability. A different strategy has consisted in screening for small molecules that target allosteric sites of the kinase rather than the ATP binding pocket. Combining alanine-scanning calculations for locating binding sites, virtual screening for small molecules, molecular dynamics simulations and a BRET-based screen in budding yeast led to the unexpected identification of Tamoxifen as a p25 binder and inhibitor of CDK5/p25 complex formation (Zhang et al., 2011). Taken together these studies provide encouraging perspectives for development of new drugs targeting protein-protein interactions (PPI) rather than the ATP pocket.

CDK activation is a complex process, which is initiated by the interaction with the cyclin subunit, which induces a major conformational reorganization of the kinase fold, and further proceeds through a series of regulatory phosphorylation/dephosphorylation steps (Jeffrey et al., 1995; Morgan, 1995; Russo et al., 1996; Morris et al., 2002). In particular, a segment known as the activation loop (T-loop) of the CDK undergoes a positional switch to a conformation which provides complete access to the substrate. In the structure of CDK5/p25 complex, S159 which lies within the activation loop, interacts with I153 and E240 in p25, thereby stabilizing an "open" conformation enabling access to the substrate (Tarricone et al., 2001). Tampering with T-loop dynamics would potentially provide a selective means of inhibiting CDK activation, by preventing its conformational reorganization, and thereby substrate binding. We previously tested this hypothesis by developing a conformational biosensor of CDK2 which enabled identification of a novel family of allosteric inhibitors targeting the activation loop (Pellerano et al., 2017). Here we report on the design of a conformational biosensor derived from the protein scaffold of CDK5 into which fluorescent "molecular hinges" were introduced to report on binders or modulators of the activation loop. This biosensor does not respond to ATP or the ATP-competitive inhibitor Roscovitine and was therefore implemented to screen for small molecules that would target CDK5 without binding the ATP pocket and potentially inhibit

its activity and glioblastoma cell proliferation, resulting in the discovery of a class of quinazolinone derivatives.

MATERIALS AND METHODS

Design and Engineering of CDKCONF5 Biosensor

The cDNA sequence of human CDK5 was cloned into the pGex6P1 vector (GE Healthcare) 5'BamHI 3' EcoRI. For CDKCONF5 cysteine residues C53, C83, C94, C117, C290 were mutagenized to serine, so as to yield a mutant bearing three cysteines at positions C157, C190, and C269, within or close to the T-loop of CDK5. CDKCONF5 (C157 C190 C269) : C53S/C83S/C94S/C117S/C290S was expressed in *E.coli* as a GST fusion following induction with 0.5 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 5 h at 25°C, then purified by affinity on GST-Trap HP columns (GE Healthcare) followed by size exclusion chromatography on Hiload 16/60 Superdex 75 prepgrade columns (GE Healthcare) equilibrated in PBS buffer (50 mM Phosphate, pH 6.5, 500 mM NaCl), then labeled with a ten-fold molar excess of Cy3 maleimide overnight at 4°C and further purified from free label on NAP-5 columns. CDKCONF2-Cy3 was expressed, labeled and purified as described in Pellerano et al. (2017) and used as a control.

Protein Expression and Purification of Cyclin-Dependent Kinases

Recombinant GST-CDK5, GST-CIV and 6His-p25 were expressed *in E. coli* following induction with 0.5 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 5 h at 25°C (GST-CDK5), or overnight at 20°C (GST-CIV) and purified by chromatography first by affinity GST-Trap HP columns (GE Healthcare) followed by size exclusion chromatography on Hiload 16/60 Superdex 75 prepgrade columns (GE Healthcare) equilibrated in TBS buffer (50 mM TRIS-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl), respectively. Recombinant Tau was expressed in *E. coli* following induction with 0.5 mM IPTG for 3 h at 37°C. The soluble-protein fraction was incubated for 15 min at 75°C and centrifuged to pellet precipitated proteins. The supernatant was incubated with 60% ammonium sulfate overnight. After centrifugation, the pellet was resuspended in TRIS buffer (50 mM TRIS-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) and purified by FPLC on a HiLoad 16/60 Superdex 75 prep-grade column (GE Healthcare) equilibrated in TRIS buffer.

Fluorescence Titration Experiments

Fluorescence titration assays were performed in 96-well plates using a Clariostar™ spectrofluorimeter (BMG) in 200 µL PBS (Sigma). Fluorescence emission of Cy3-labeled CDKCONF5 biosensor was acquired at 570 nm following excitation at 544 nm either alone, or following incubation with positive (CIV, Tau) and negative controls (ATP, Roscovitine). Data analysis was performed using the GraFit 7 Software (Erathicus Ltd). Experiments were performed in triplicate, and error bars indicate standard deviation from average.

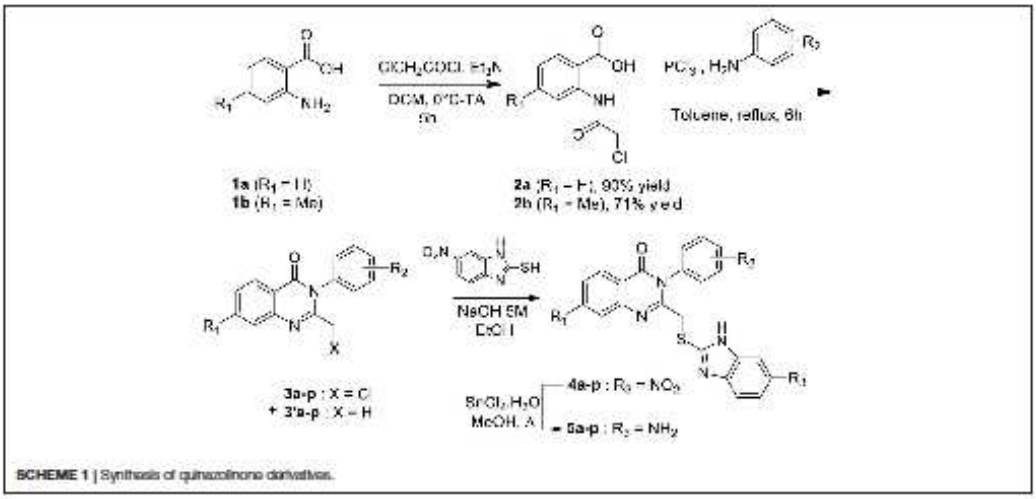
Automated High Throughput Screen Conditions and Hit Validation

Prior to the HTS, stability assays and downscaling experiments were performed to establish the best conditions for a miniaturized assay in 96-well plates and optimized so as to obtain a robust and reproducible signal. Performance criteria for reproducibility, sensitivity (in the presence of DMSO), tolerance and robustness were established with the ATP-competitive inhibitor of CDK5 Roscovitine, and a control peptide that barely affected Cy3-labeled CDKCONF5 Biosensor fluorescence and CIV as a positive control, that promotes significant enhancement of Cy3-labeled CDKCONF5 Biosensor fluorescence. Optimal screening conditions were established as follows: 10 nM freshly purified Cy3-labeled CDKCONF5 Biosensor preincubated in 50 mM KH_2PO_4/K_2PO_4, pH 6.5, 500 mM NaCl, 1% DMSO. Prescreen results: amplication by positive control (CIV) 1.8-fold enhancement; best prescreen Z-factor = 0.89. Prescreen results: Z-factor = 0.54

The screen itself was performed in 96-well black Greiner Bio One plates on a TECAN Freedom Evo Robot with an in-house library of 221 heterocyclic compounds, which belong to several chemical families (quinazolines, diazepines, 1,2,4-triazoles, aminothiazoles...). Fluorescence emission of 10 nM Cy3-labeled CDKCONF5 Biosensor in 50 mM KH_2PO_4/K_2PO_4, pH 6.5, 500 mM NaCl was measured at 570 nm following excitation at 550 nm after 5 h incubation with 10^{-5} M final concentration each of the 221 compounds. In parallel, the intrinsic fluorescence of the library compounds at 570 nm following excitation at 550 nm was evaluated, to eliminate autofluorescent compounds. Relative increase of fluorescence emission was calculated with reference to the basal fluorescence of Cy3-labeled CDKCONF5 biosensor alone. A molecule was considered a hit when it was not autofluorescent, yet induced changes in Cy3-labeled CDKCONF5 biosensor fluorescence 3 times or greater the standard deviation of CDKCONF5 biosensor fluorescence alone. Hits identified in the screen were retested manually in quadruplet to confirm they were positive hits with a fresh batch of Cy3-labeled CDKCONF5 biosensor and stock solutions of the library compounds in DMSO.

Synthesis of Quinazolines

Synthesis of substituted quinazolinones **5a-p** resulted from a 4-steps sequence starting from anthranilic acids (**Scheme 1**, **Table 1**, **Supplementary Methods**). Anthranilic acid **1a** and 4-methylanthranilic **1b** were successively acylated using 2-chloroacetyl chloride to access amides **2a-b** with 90 and 71% isolated yields respectively. Amides **2a-b** reacted then with phosphorus chloride in presence of the suitable aniline, leading to the crude quinazolinone derivatives **3a-p**. A LC-MS analysis of each crude product revealed the concomitant presence of one minor compound, which has been identified as a quinazoline having lost its chlorine atom (compounds **3'a-p**). The crude was then reacted with 2-mercapto-5-nitrobenzimidazole in alkaline medium to offer substituted quinazolinones **4**, which were isolated as a precipitate in a 21–91% isolated yields for the two steps. The reduction of the nitro group was then achieved



SCHEME 1 | Synthesis of quinazolinone derivatives.

TABLE 1 | Compounds synthesized in this study.

Compounds 3, 4, and 5	Correspondence cpd 5/JMV	R_1	R_2	Ratio 3/3'	Yield of 4 (%)	Yield of 5 (%)
a	JMV5798	H	(3-CF_3)C_6H_4	58/42	54	91
b	JMV5891	H	(2-CF_3)C_6H_4	87/13	82	53
c	JMV5890	H	(4-CF_3)C_6H_4	92/8	55	53
d	JMV5800	H	C_6H_5	95/5	83	97
e	JMV5888	H	cyclohexyl	56/44	21	75
3	JMV5892	H	3-$MeOC_6H_4$	94/6	80	54
g	JMV5893	H	2-$MeOC_6H_4$	94/6	91	82
h	JMV5894	H	3-$MeOC_6H_4$	91/9	65	64
i	JMV5883	H	4-$MeOC_6H_4$	92/8	72	91
j	JMV5886	H	2-BrC_6H_4	87/13	39	50
k	JMV5887	H	3-BrC_6H_4	80/20	45	77
l	JMV5889	H	4-BrC_6H_4	51/49	30	59
m	JMV5884	H	3-ClC_6H_4	90/10	34	74
n	–	H	3-NO_2,4-MeC_6H_3	70/30	68	–
n	JMV5885	H	3-NH_2,4-MeC_6H_3	–	–	53
o	JMV5882	Me	(3-CF_3)C_6H_4	43/57	61	66
p	JMV5735	Me	C_6H_5	72/28	67	82

using $SnCl_2.H_2O$ in methanol reflux. After purification by chromatography, amine derivatives **5a-p** were finally isolated in 50–93% yields.

Cell Culture, Cell Proliferation and Cell Extract Preparation

Cell culture media, serum and antibiotics were purchased from Life Technologies. U87 cells were cultured in DMEM + Glutamax supplemented with 10% FCS, 100 units/mL (0.168 mM) penicillin (G sodium salt) and 100 µg/mL (0.172 mM) streptomycin at 37°C in an atmosphere containing 5% CO_2.

Cell extracts were prepared in PBS lysis buffer containing PBS (Sigma) 0.2 % NP40, 1mM EDTA, 2 mM PMSF, Complete™ protease inhibitors (Roche), and normalized following spectrophometric dosage at 280 nm.

For cell proliferation/viability assays, cells were seeded in 96-well plates at 4,000 cells/well in 100 µL medium. 24 h later, cells were treated in triplicate or quadruplicate with different concentrations of small molecule inhibitors or peptides (from 10 nM to 20 µM). Stock solutions of

drugs were prepared in DMSO and freshly diluted in PBS to the desired concentration prior to use, then added to unsynchronized cells cultured to subconfluency (60-70%), which were then further incubated for 24, 48, or 72 h. Cell proliferation was evaluated by crystal violet staining at the indicated times following treatment with drugs: cells were washed with PBS, fixed with 3.7% formaldehyde for 10 min and then incubated with 0.1% crystal violet dye for 30 min. After rinsing, crystals were dissolved in 10% acetic acid and viability was determined by measuring absorbance at 595 nm.

CDK5 Kinase Activity Assays

CDK5 kinase assays were performed using the CDKACT5 activity biosensor developed in our group and U87 glioblastoma cell extracts as a source of CDK5 kinase (Peyressatre et al., 2020). Fluorescence kinase assays were performed as described previously (Van et al., 2014) in 96-well plates in a thermostated chamber using a Clariostar™ spectrofluorimeter (BMG) at 30°C in 200 µL PBS (Sigma) supplemented with 5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM ATP. Fluorescence emission of Cy5-labeled CDKACT5 was recorded at 680 nm following excitation at 620 nm. In all experiments, relative fluorescence was calculated following substraction of CDKACT5-Cy5 fluorescence from fluorescence values obtained in the presence of CDK5/p25 kinase incubated with or without inhibitors. Data analysis was performed using the GraFit 7 Software (Erathicus Ltd). Experiments were performed in triplicate, and error bars indicate standard deviation from average.

For concentration-dependent inhibition assays, CDKACT5-Cy5 biosensor was incubated with U87 cell extracts treated with increasing concentrations of each inhibitor and the values corresponding to CDKACT5-Cy5 fluorescence response (at 2000 s) were plotted against inhibitor concentration. When possible, IC_{50} values were calculated using the following equation, which takes into account when maximal inhibition values do not reach zero.In this equation, "Range" is the fitted uninhibited value minus the Background, and s is a slope factor. The equation assumes that y falls with increasing x.

$$y = \frac{Range}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^{s}} + Background$$

Statistical Analyses

All data are summarized and presented as the mean ± SEM from at least two or three representative and separate experiments or more whenever indicated. Statistical analyses were performed using a paired Student's *t*-test, with XLSTAT software (Addinsoft, Paris, France). Statistical significance was defined as: $^{*}p \leq 0.05$, $^{**}p \leq 0.01$ and $^{***}p \leq 0.001$.

RESULTS

Engineering a Conformational Biosensor to Screen for CDK5 Inhibitors That Do Not Bind the ATP Pocket

In order to screen for compounds that inhibit CDK5 by targeting its activation loop and thereby potentially disrupt its conformational activation, we engineered a fluorescent biosensor according to a previously described strategy (Pellerano et al., 2017) by introducing fluorescent Cy3 dyes into the protein scaffold of CDK5 (cysteine residues C157, C190, and C269, within or close to the T-loop of CDK5), whilst other native cysteines C53, C83, C94, C117, C290 were mutagenized to serine (**Figures 1A,B**). The CDK5 biosensor (CDKCONF5) responds robustly and in a dose-dependent fashion to the CDK-activating kinase CIV, which phosphorylates the activation loop, and to the CDK5 substrate protein Tau, but is insensitive to ATP and to the ATP-competitive inhibitor Roscovitine (**Figure 1C**). As such it constitutes a highly sensitive sensor to screen for modulators of CDK5 conformation, whilst discriminating against ATP-competitive compounds.

In order to apply this tool to screen a library of small molecules, we first performed downscaling experiments to optimize the concentration, temperature and kinetics of the assay and establish the best conditions for a miniaturized assay in 96-well plates to obtain the most robust and reproducible signal and appropriate Z' factor (**Supplementary Figures 1, 2**). CDKCONF5 biosensor was then applied to screen an in-house library of 221 heterocyclic compounds, from different chemical families including diazepines, quinazolines, 1,2,4-triazoles and aminothiazoles synthesized in our institute (Institut des Biomolecules Max Mousseron, Montpellier, France). The layout of compounds in 96-well plates is shown in **Supplementary Figure 2B**). As expected, 10 µM ATP used as a negative control did not induce any significant changes in CDKCONF5 fluorescence, whereas 400 nM CIV used as a positive control induced 40% fluorescence enhancement. Unexpectedly, very few compounds induced fluorescence enhancement of CDKCONF5, but several hits induced significant quenching of fluorescence, as shown for the compounds screened in plate 2 (**Figure 2A**). In particular we identified a family of 8 substituted quinazolinones which induced between 30 and 40% quenching of CDKCONF5 which we selected for further studies. These compounds possess a quinazolinone core, substituted in position 3 by a phenyl group (substituted or not) and bears, in position 2, an aminobenzimidazole group. These compounds are: JMV5800, JMV5882, JMV5883, JMV5884, JMV5885, JMV5890, JMV5892, and JMV5893 (compounds D4–D11 in plate 2). Compound JMV5952, corresponding to the common 5-aminobenzimidazole group present in all selected compounds, did not affect CDKCONF5 fluorescence in the screen (compound E3 in plate 2). This result indicates that this group is not sufficient to modulate conformational transitions of CDKCONF5 biosensor and JMV5952 was therefore considered as a negative control in subsequent experiments. Structures of these compounds are shown in **Figure 2B**.

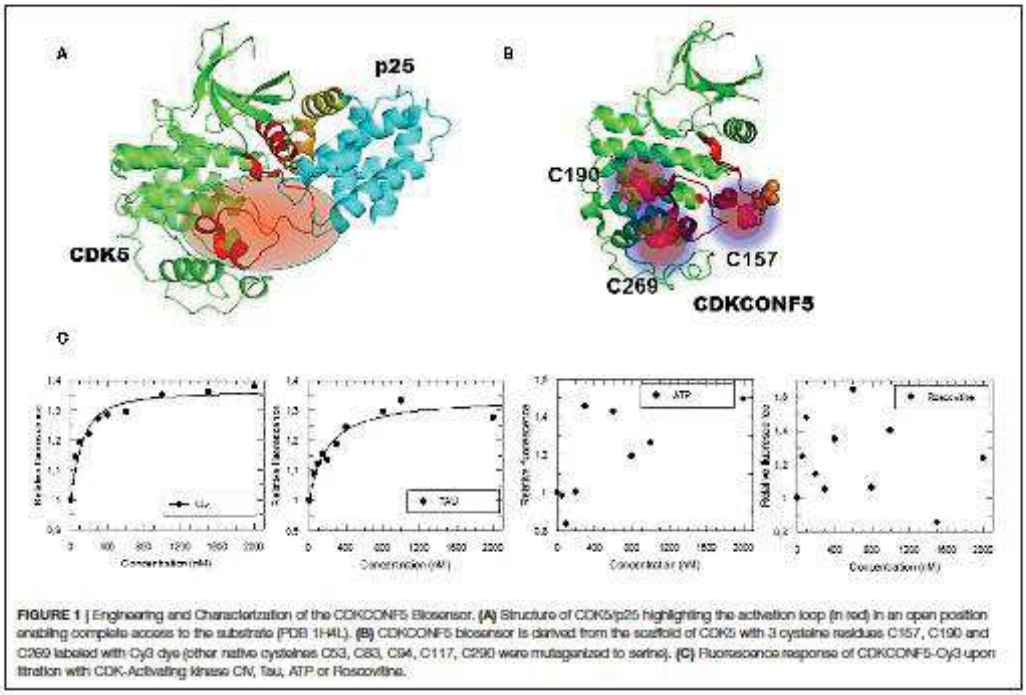


FIGURE 1 | Engineering and Characterization of the CDKCONF5 Biosensor. **(A)** Structure of CDK5/p25 highlighting the activation loop (in red) in an open position enabling complete access to the substrate (PDB 1H4L). **(B)** CDKCONF5 biosensor is derived from the scaffold of CDK5 with 3 cysteine residues C157, C190 and C269 labeled with Cy3 dye (other native cysteines C53, C83, C94, C117, C290 were mutagenized to serine). **(C)** Fluorescence response of CDKCONF5-Cy3 upon titration with CDK-Activating kinase CN, Tau, ATP or Roscovitine.

Since CDKCONF5 biosensor quenching was unexpected compared to fluorescence enhancement observed with the positive control, we asked whether it might be due to direct interactions with the Cy3 probe since this would lead to quenching. Fluorescence titration of 200 nM Cy3 alone with compound JMV5800 and JMV5884 indeed induced Cy3 quenching inferring that these compounds interacted with CDK5 scaffold at positions where the probe was conjugated (**Supplementary Figure 3A**). In contrast, these compounds did not induce any significant quenching of the CDKCONF2-Cy3 conformational biosensor, previously developed to screen for CDK2 allosterics (Pellerano et al., 2017) (**Supplementary Figure 3B**). Since CDKCONF-Cy3 biosensor is derived from CDK2, the most closely related CDK to CDK5, the lack of quenching observed compared to CDKCONF5-Cy3 response supports selective interaction of quinazolines with CDK5 over CDK2. Moreover, these results indicate that the interaction and quenching of the quinazolines with the Cy3 dye is not random but quite specifically defined within the CDKCONF5 scaffold.

In an attempt to address how quinazolines might affect the conformational dynamics of CDKCONF5-Cy3, we asked whether they might compete with p25 binding. To this aim we performed fluorescence titration experiments in which CDKCONF5B-Cy3 was incubated with 400 nM recombinant 6His-p25 and/or a ten-fold greater concentration (4 μM) of quinazolines JMV5800 and JMV5884. Whereas, quinazolines induced significant quenching of CDKCONF5-Cy3 fluorescence, incubation with p25 counteracted this effect, promoting a net relative increase in CDKCONF5-Cy3 fluorescence (**Supplementary Figure 4**). These data infer that quinazolines may affect the conformational dynamics of CDK5 induced by p25 binding, thereby competing with its site of interaction.

Quinazolinone Analogs Identified in the CDKCONF5 Screen Modulate CDK5 Activity

In order to determine whether the quinazolinone modulators of CDKCONF5 fluorescence indeed affected CDK5 activity, we performed CDK5 kinase inhibition assays with 10^{-5}M of these compounds using the CDKACT5 activity biosensor developed in our group and U87 glioblastoma cell extracts as a source of CDK5 kinase (Peyressatre et al., 2020) (**Figure 3A**). In this assay, upon incubation with a source of CDK5 kinase, in this case U87 cell extracts, fluorescence of the CDKACT5 biosensor is enhanced, thereby reporting on CDK5 activity (**Supplementary Figure 5A**). However, when incubated with 10 μM quinazolinones identified in the screen, we found that only two of these compounds effectively inhibited CDK5 activity:

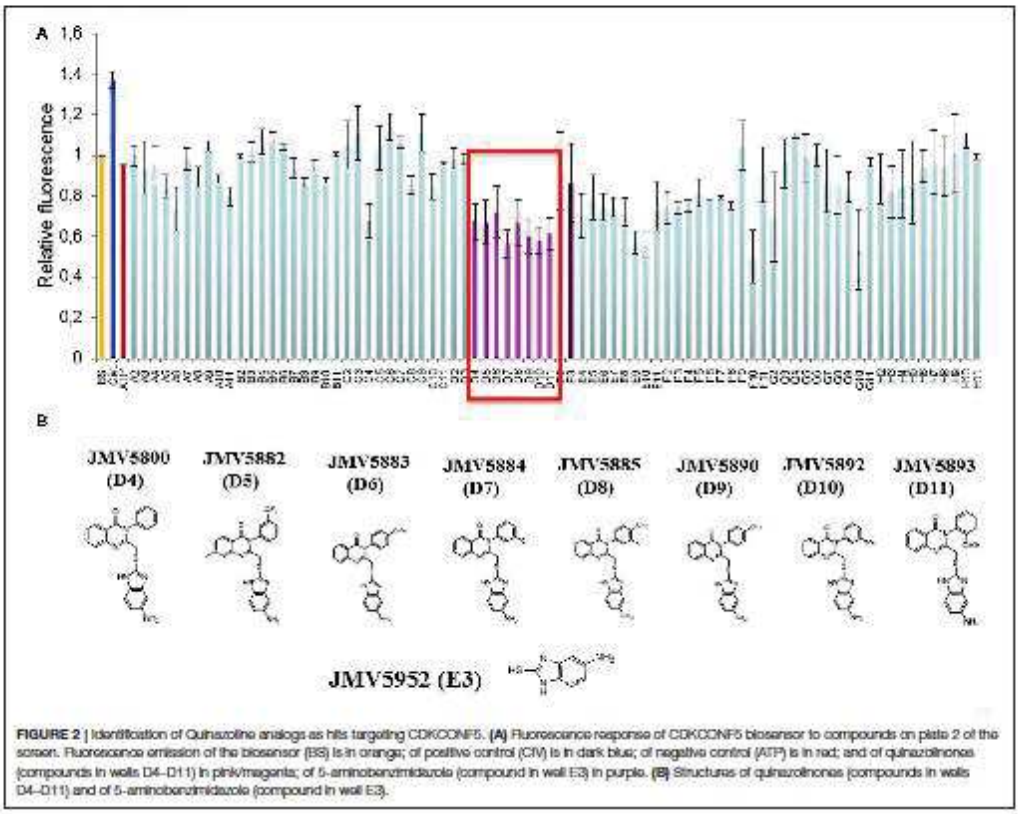


FIGURE 2 | Identification of Quinazoline analogs as hits targeting CDK/CONF5. **(A)** Fluorescence response of CDK/CONF5 biosensor to compounds on plate 2 of the screen. Fluorescence emission of the biosensor (BS) is in orange; of positive control (CtV) is in dark blue; of negative control (ATP) is in red; and of quinazolinones (compounds in wells D4–D11) in pink/magenta; of 5-aminobenzimidazole (compound in well E3) in purple. **(B)** Structures of quinazolinones (compounds in wells D4–D11) and of 5-aminobenzimidazole (compound in well E3).

JMV5800 and JMV5884 (**Figure 3A, Supplementary Figure 5B**). Interestingly, compounds JMV5952 and JMV5893 promoted further increase in biosensor fluorescence inferring a possible potentiation of CDK5 activity. To further characterize the efficiency of JMV5800 and JMV5884, we performed a concentration-dependent inhibition assay (**Figure 3B**), which enabled calculation of IC_{50} values of 8.29 ± 3.56 µM and 7.6 ± 3.8 µM, respectively and a maximal inhibitory efficiency of 50–60% at 100 µM (**Table 2**).

Characterization of Quinazolinone Derivatives as Inhibitors of CDK5 Activity

Based on the results obtained with the hits identified in the screen, a second series of quinazolinone derivatives were synthesized and evaluated. Four kinds of modulations were studied: first, importance of the methyl group in position 7 of the quinazoline ring, second, replacement of the aromatic group in N-3 by a cyclohexyl group, and third, the influence of the nature and of the position of the substituent on the phenyl group (**Figure 4A**). Fluorescence activity assays were performed with the CDK5 activity reporter and U87 cell extracts, to assess the inhibitory potential of the quinazoline derivatives between 100 µM and 100 nM (**Figure 4B**). The eight quinazoline derivatives, bearing the aminobenzimidazole moiety, displayed inhibitory potential toward CDK5 activity in U87 cell extracts (JMV5735, JMV5798, JMV5886, JMV5887, JMV5888, JMV5891, JMV5894, and JMV5889). **Table 2** lists the maximal inhibition values of CDK5 activity by these compounds at 100 µM using U87 cell extracts as a source of CDK5 activity. Compounds JMV5735, 5798, 5886 and 5889 achieved 66.5, 60, 55, and 46% inhibition at 100 µM, respectively. IC_{50} values of 9.35 ± 11.1, 24.4 ± 32.5, 28.7 ± 51.2 µM were calculated for JMV5735, 5886, and 5889, respectively (**Supplementary Figure 6**). Hence, the most promising compounds with respect to *in vitro* kinase inhibition were JMV5735, 5886, 5889. JMV 5798 values were unfittable to calculate an IC_{50} value. Compounds JMV5887, 5888, 5891, and 5894 inhibited kinase activity less significantly (20–33% maximal inhibition at 100 µM concentration quinazolinones) (**Figure 4B, Table 2**).

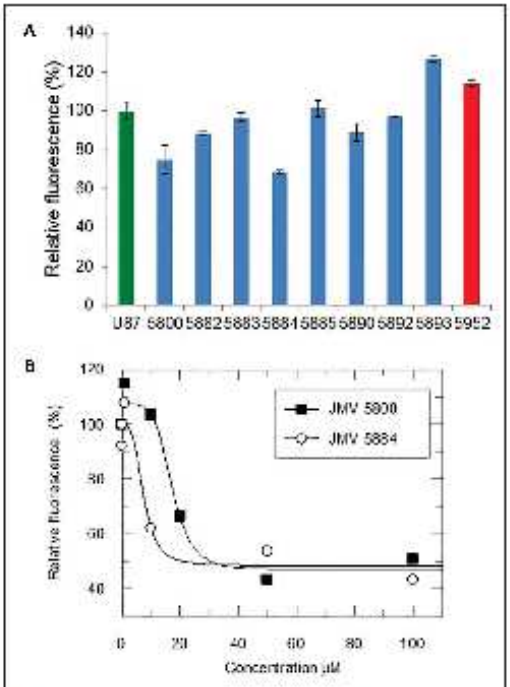


FIGURE 3 | Quinazolinones modulate CDK5 activity. **(A)** Fluorescence-based CDK5 activity assays with the CDKACT5 biosensor, 10 µM quinazolinones and U87 cell extracts. 100% activity for U87 cell extracts alone (green) and relative activity upon incubation with 10uM quinazolinones (blue) or compound 5952 (red). **(B)** Concentration-dependent inhibition of CDK5 activity with JMV5800 and 5884.

Characterization of Quinazoline Derivatives as Inhibitors of U87 Glioblastoma Cell Proliferation

We finally addressed the inhibitory potential of these quinazolinones compared to Roscovitine in proliferation assays in the U87 glioblastoma cell line (**Figure 5**). The original hits identified in the screen, JMV5800 and JMV5884 were efficient inhibitors of U87 cell proliferation with 40% and 50% inhibition, respectively, but JMV5800 was less potent than JMV5884 after 48 h. Likewise, the eight other quinazolinones derivatives characterized *in vitro*, induced a similar inhibition of U87 cell proliferation as compared to JMV5800 and JMV5884 and to Roscovitine at 24 h, relative to mock-treated cells. After 48 h however further differences were observed with compounds JMV5887 and JMV5891 exhibiting the greatest anti-proliferative potential, comparable to that of JMV5884 and Roscovitine. JMV5889 and 5894 inhibited cell proliferation less potently than Roscovitine after 48h, but still significantly relative to mock-treated cells followed by JMV5888, 5886, 5798, and 5735 which induced similar inhibition as JMV5800. U87 cell proliferation values relative to mock-treated cells following treatment with quinazolinone derivatives after 24 and 48 h are listed in **Table 3**.

TABLE 2 | Relative CDK5 activity in lysates of U87 cells treated with 100 µM inhibitors.

Molecules	Activity at 100 µM (%)
JMV 5800	50.7 ± 7.8
JMV5884	43.2 ± 5.6
JMV5735	33.5 ± 1
JMV5798	40.2 ± 2.4
JMV5886	45 ± 0.6
JMV5887	76.5 ± 8.4
JMV 5888	80 ± 5.5
JMV5889	53.6 ± 11.2
JMV 5891	75.5 ± 1.3
JMV 5894	68.3 ± 2.6

DISCUSSION

CDK5/p25 kinase plays a major role in neuronal functions, and is hyperactivated in several human cancers including glioblastoma and neurodegenerative pathologies such as Alzheimer's and Parkinson's. Several inhibitors of CDK5 have been reported in the literature, including pan-ATP-competitive inhibitors such as Roscovitine, or more selective inhibitors such as Dinaciclib. To date all compounds targeting CDK5 which have made it through *in vivo* and preclinical studies bind the ATP binding site, which exhibits similarity throughout the kinome and is further found in a many other enzymes including ATP-binding chaperones and molecular motors. As a consequence, these inhibitors display limited selectivity and face important limitations, since their promiscuity affords for severe and undesirable toxic side-effects and poor tolerability, the dose administered necessary to inhibit the kinase target often inducing off-target effects that limit efficacy (Guha, 2013). Aside from ATP-competitive compounds alternative strategies have been explored to interfere with pockets and interfaces other than the ATP binding pocket of the CDK, including peptides and small molecules, some of which exhibit potent antiproliferative activity, although none of them has yet made it to the clinic.

To address this challenge and propose new strategies to target CDK5, we engineered a CDK5-specific conformational biosensor designed to discriminate against ATP-pocket binders and to report on modulators of the activation segment. By implementing this biosensor to screen for compounds that target conformational activation of CDK5, we identified a family of quinazolinone derivatives which induced biosensor quenching rather than enhancement as expected by comparison with the positive control (CIV). Fluorescence titration of Cy3 with these compounds revealed that they induce probe quenching and therefore directly interact with Cy3, inferring that they bind

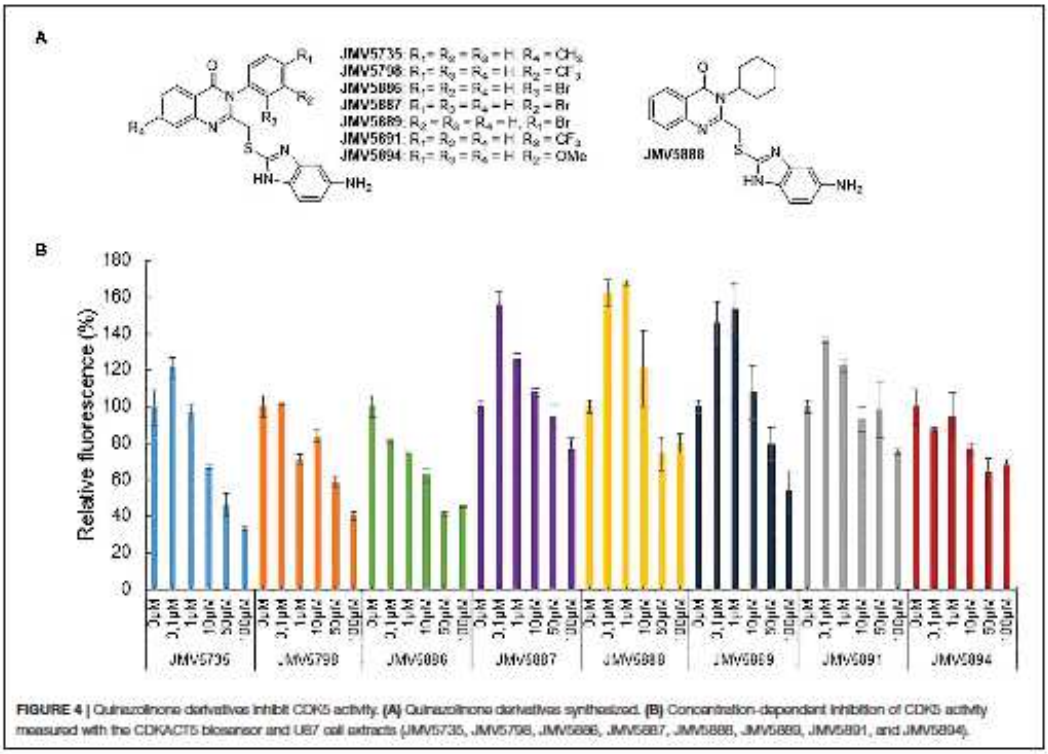


FIGURE 4 | Quinazolinone derivatives inhibit CDK5 activity. **(A)** Quinazolinone derivatives synthesized. **(B)** Concentration-dependant inhibition of CDK5 activity measured with the CDKACT5 biosensor and U87 cell extracts (JMV5735, JMV5798, JMV5886, JMV5887, JMV5888, JMV5889, JMV5891, and JMV5894).

close to the three cysteines onto which they are conjugated within CDKCONF5 scaffold (Cys 157, C190, C269). In contrast these compounds do not affect fluorescence of the CDKCONF2 conformational biosensor we previously developed, inferring that these compounds bind CDK5 selectively over the closely related CDK2. In addition preliminary mechanistic studies suggest that these compounds most likely compete with the site of interaction of p25 with CDK5. We further showed that several of these compounds indeed inhibited CDK5 kinase activity *in vitro* using U87 cell extracts and further exhibited inhibitory potential toward glioblastoma cell proliferation with an efficacy in the same range as Roscovitine.

All hits identified in the screen and derivatives synthesized thereafter were substituted by a 5-aminobenzimidazole group in position 2 of the quinazoline and several kind of substitutions at N3-phenyl group were tolerated. The common 5-aminobenzimidazole-2-thiol alone revealed to be inactive (JMV5952). Moreover, introduction of a methyl group at R4 (**Figure 4A**) led to a decrease of the kinase inhibition (JMV5735 was less active than JMV5800). Replacement of the N3-phenyl group by a cyclohexyl moiety abolished activity completely, indicating that an aromatic group was necessary at position 3 of the quinazoline ring. Considering the nature of the substituent carried out by the phenyl group, a chlorine (JMV5884), a bromine (JMV5889 and JMV5886) or a methoxy group (JMV5894) were tolerated but not a trifluoromethyl substituent (for example JMV5891 inhibited CDK5 activity but led to a low inhibition of U87 cell proliferation). Halogen atoms possess both -I electron withdrawing and +M mesomer donor effects, whereas methoxy is +M mesomer donor group and trifluoromethyl group is a -I electron withdrawing group. Our results suggests that the activity was dependent on lack of substitution of the N-3 phenyl group (JMV5800) or substitution by a mesomer donor group. Finally, the position of the substituent did not appear to be crucial for activity.

Although compounds JMV5887 and 5891 were the most potent inhibitors of cell proliferation, their *in vitro* efficacy toward CDK5 activity was not as significant as quinazolinones JMV5800, JMV5884, JMV5735, JMV5886, and JMV5889. Conversely, except for JMV5884, these compounds did not achieve the most significant inhibition of U87 cell proliferation. Considering that the *in vitro* kinase inhibition assays point to specific activity of compounds on the target of interest, and taking together the maximal relative inhibition potential of compounds in these kinase assays and in cell proliferation assays, JMV5884 appears to offer the most promising potential combining both

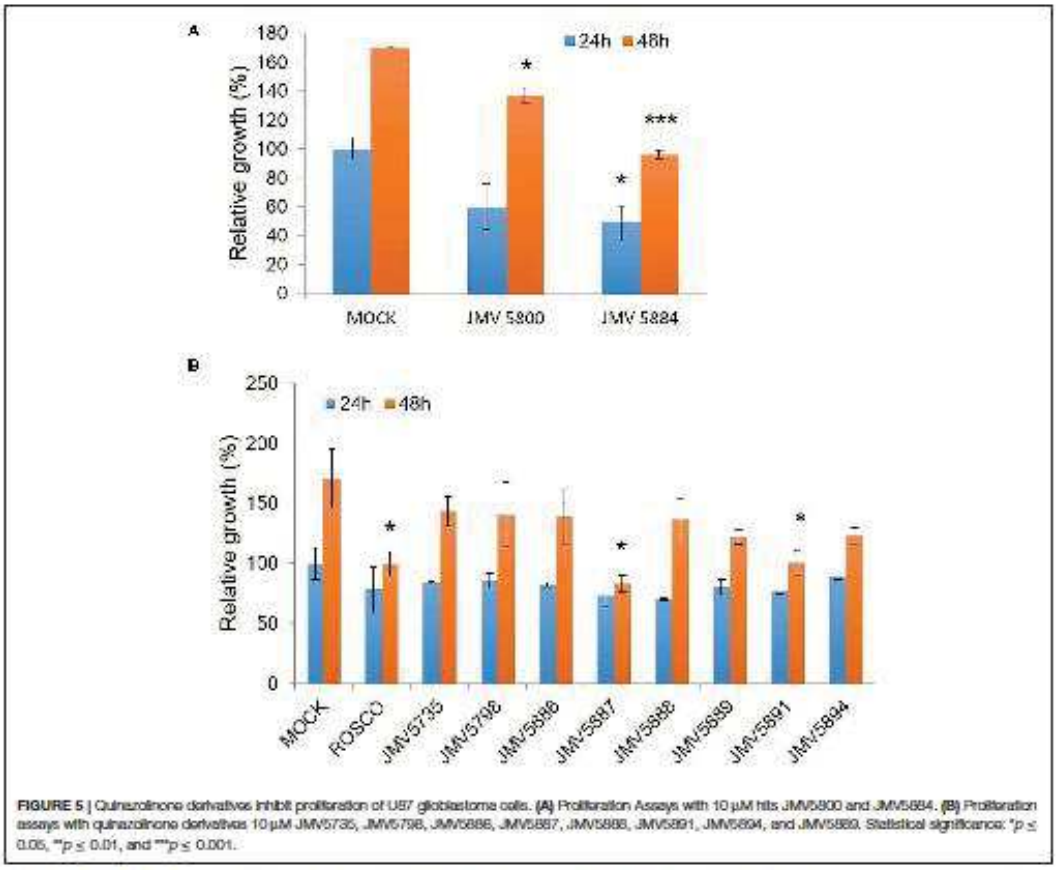


FIGURE 5 | Quinazolinone derivatives inhibit proliferation of U87 glioblastoma cells. **(A)** Proliferation Assays with 10 μM hits JMV5800 and JMV5884. **(B)** Proliferation assays with quinazolinone derivatives 10 μM JMV5735, JMV5798, JMV5886, JMV5887, JMV5888, JMV5891, JMV5894, and JMV5889. Statistical significance: $^{*}p \leq 0.05$, $^{**}p \leq 0.01$, and $^{***}p \leq 0.001$.

significant inhibition of both CDK5 activity and U87 cell proliferation, followed by JMV5889 then JMV5735, JMV5798 JMV5886, and JMV5894. JMV5884 has a chlorine substitution on the N-3 phenyl relative to JMV5800 (unsubstituted phenyl group). Likewise JMV5889 and JMV5886 have a bromide atom on this ring (*para* and *ortho* position respectively) and JMV5894 has a meta methoxy group on the N-3 phenyl group.

Several quinazolines have been evaluated as anticancer therapeutics in different cancer cell lines and EGFR has been identified as one of the relevant molecular targets (Khodair et al., 2019; Soliman et al., 2019). Sulphonamide benzoquinazolinones have also been reported as dual EGFR/HER2 inhibitors with micromolar IC_{50} values, apoptosis inducers and radiosensitizers. Quinazalinone derivatives have also been identified as Pan-Pim kinase inhibitors (Pettus et al., 2016), PI3K inhibitors (Ma et al., 2018), ALK2 inhibitors (Hudson et al., 2018). More recently a quinazolinone-based dual inhibitor of CDK4 and tubulin polymerization has been reported for anti-cancer

TABLE 3 | Proliferation assays: [a]Mock in the first set of proliferation assays performed with JMV5800 and JMV5884; [b]Mock in the second set of proliferation assays performed with quinazolinone derivatives.

Molecules	24 h Proliferation (%)	48 h Proliferation (%)
MOCK[a]	100 ± 8.03	169.83 ± 0.35
JMV 5800	59.9 ± 16.7	137.28 ± 5.17
JMV5884	49.19 ± 11.5	96.1 ± 3.07
MOCK[b]	100 ± 13.1	170.53 ± 24.9
Roscovitine	78.38 ± 18.8	99.66 ± 10.1
JMV5735	83.8 ± 1.3	143.35 ± 12
JMV 5798	85.33 ± 6.4	138.23 ± 26.8
JMV5886	82.26 ± 2	139.05 ± 23
JMV5887	73.06 ± 9.3	83.39 ± 6.8
JMV5888	70.5 ± 1	136.29 ± 17.7
JMV5889	80.32 ± 6.2	121.86 ± 4.1
JMV5891	76.64 ± 2.2	100.68 ± 10.4
JMV5894	89.64 ± 2.9	122.99 ± 6.9

therapy (Sonawane et al., 2019). Hence there is a strong potential for quinazolines to bind protein kinases, in line with our findings that several quinazolinone derivatives constitute CDK5 inhibitors. The conformational biosensor-based screening approach we have developed has yielded the first small molecules reported to target CDK5 at a site other than the ATP pocket. These compounds constitute templates for development of more potent compounds, which can be developed through standard structure/activity relationship studies to identify derivatives with improved inhibitory potential. Our approach constitutes a very potent means of identify non-ATP competitive kinase inhibitors, as we also reported in a previous study yielding original inhibitors of CDK2 (Pellerano et al., 2017), since it discriminates against ATP-pocket binders and is based on the design of a biosensor that reports on conformational transitions required for kinase activation. The consistency of this approach relies on an in-depth understanding of the molecular mechanism of activation of the kinase of interest as well as structural information.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/**Supplementary Material.**

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MPey, JG-V, and MPel generated, purified and characterized the CDKCONF5 biosensor *in vitro* in fluorescence titration experiments, established the conditions for the HTS and performed the screen. MPey, AL, and MPel performed fluorescence validation experiments. MPey, JG-V, and MM analyzed the results from the screen and determined hit compounds to be characterized further. MPey performed kinase assays and cell proliferation assays. NM and VL provided compounds of the in-house library. NM and DA synthesized hit derivatives. MM designed CDKCONF5 biosensors and its implementation for HTS and coordinated the study together with VL and NM. MM, AL, MPel, and NM wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) and a grant from the Canceropole Grand Sud Ouest to MM (n° CGSO 2015-E03). MPey was supported by a fellowship from the CBS2 doctoral school of Montpellier University. JG-V was supported by a Marie-Curie fellowship EC-FP7 Framework (PIEF-GA-2013-623151). We thank Dr. J. Bellis for technical assistance and advice relative to the screen on the TECAN Robot, Montpellier RIO Imaging Facility (CRBM, Montpellier).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2020.00691/full#supplementary-material

REFERENCES

Abate, A. A., Pentimalli, F., Esposito, L., and Giordano, A. (2013). ATP-noncompetitive CDK inhibitors for cancer therapy: an overview. *Expert Opin. Investig. Drugs* 22, 895–906. doi: 10.1517/13543784.2013.798641

Asghar, U., Witkiewicz, A. K., Turner, N. C., and Knudsen, E. S. (2015). The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 130–146. doi: 10.1038/nrd4504

Bruyère, C., and Meijer, L. (2013). Targeting cyclin-dependent kinases in anti-neoplastic therapy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 772–779. doi: 10.1016/j.ceb.2013.08.004

Catania, A., Urban, S., Yan, E., Hao, C., Barron, G., and Allalunis-Turner, J. (2001). Expression and localization of cyclin-dependent kinase 5 in apoptotic human glioma cells. *Neuro. Oncol.* 3, 89–98. doi: 10.1093/neuonc/3.2.89

Cheung, Z. H., and Ip, N. Y. (2012). Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol.* 22, 169–175. doi: 10.1016/j.tcb.2011.11.003

Chin, K. T., Ohki, S. Y., Tang, D., Cheng, H. C., Wang, J. H., and Zhang, M. (1999). Identification and structure characterization of a Cdk inhibitory peptide derived from neuronal-specific Cdk5 activator. *J. Biol. Chem.* 274, 7120–7127. doi: 10.1074/jbc.274.11.7120

Cirillo, D., Pentimalli, F., and Giordano, A. (2011). Peptides or small molecules? Different approaches to develop more effective CDK inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 18, 2854–2866. doi: 10.2174/092986711796150496

Dhavan, R., and Tsai, L. H. (2001). A decade of CDK5. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 749–759. doi: 10.1038/35096019

Guha, M. (2013). Blockbuster dreams for Pfizer's CDK inhibitor. *Nat. Biotechnol.* 31, 187. doi: 10.1038/nbt0313-187a

Hudson, L., Mut, J., Vázquez, S., Carvalho, D. M., Williams, E., Jones, C., et al. (2018). Novel quinazolinone inhibitors of ALK2 Flip between alternate binding modes: structure-activity relationship, structural characterization, kinase profiling, and cellular proof of concept. *J. Med. Chem.* 61, 7261–7272. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00782

Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massagué, J., et al. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376, 313–320. doi: 10.1038/376313a0

Khodair, A. I., Alsafi, M. A., and Nafie, M. S. (2019). Synthesis, molecular modelling and anti-cancer evaluation of a series of quinazoline derivatives. *Carbohydr. Res.* 486:107832. doi: 10.1016/j.carres.2019.107832

Lapenna, S., and Giordano, A. (2009). Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 547–566. doi: 10.1038/nrd2907

Lenjisa, J. L., Tadesse, S., Khair, N. Z., Kumarasiri, M., Yu, M., Albrecht, H., et al. (2017). CDK5 in oncology: recent advances and future prospects. *Future Med. Chem.* 9, 1939–1962. doi: 10.4155/fmc-2017-0097

Lim, H. Y., Seow, K. T., Li, Q., Kesuma, D., Wang, J. H., and Qi, R. Z. (2001). Structural insights into Cdk5 activation by a neuronal Cdk5 activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 77–83. doi: 10.1006/bbrc.2001.5086

Liu, R., Tian, B., Gearing, M., Hunter, S., Ye, K., and Mao, Z. (2008). Cdk5-mediated regulation of the PIKE-A-Akt pathway and glioblastoma cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 7570–7575. doi: 10.1073/pnas.0712306105

Ma, C. C., Zhang, C. M., Tang, L. Q., and Liu, Z. P. (2018). Discovery of novel quinazolinone derivatives as high potent and selective PI3Kδ and PI3Kδ/γ inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 151, 9–17. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.03.068

Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131–134. doi: 10.1038/374131a0

Morris, M. C., Gondeau, C., Tainer, J. A., and Divita, G. (2002). Kinetic mechanism of activation of the Cdk2/cyclin A complex: key role of the C-lobe of the Cdk. *J. Biol. Chem.* 277, 23847–23853. doi: 10.1074/jbc.M107890200

Pellerano, M., Tchernitsk, S., Perals, C., Ngoc Van, T. N., Garcin, E., Mahuteau-Betzer, F., et al. (2017). Targeting conformational activation of CDK2 Kinase. *Biotechnol. J.* 12:531. doi: 10.1002/biot.201600531

Petrus, L. H., Andrews, K. L., Booker, S. K., Chen, J., Cee, V. J., Chavez, F., et al. (2016). Discovery and optimization of quinazolinone-pyrrolopyrrolones as potent and orally bioavailable pan-ptm kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* 59, 6407–6430. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00610

Peyressatre, M., Prével, C., Pellerano, M., and Morris, M. C. (2015). Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to peptide inhibitors. *Cancers (Basel).* 7, 179–237. doi: 10.3390/cancers7010179

Peyressatre, M., Laure, A., Pellerano, M., Boukhaddaoui, H., Soussi, I., and Morris, M. C. (2020). Fluorescent biosensor of CDK5 kinase activity in glioblastoma cell extracts and living cells. *Biotechnology J.* e1900474. doi: 10.1002/biot.201900474

Pozo, K., and Bibb, J. A. (2017). The emerging role of Cdk5 in cancer. *Trends Cancer* 63, 217–232.

Russo, A. A., Jeffrey, P. D., and Pavletich, N. P. (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat. Struct. Biol.* 3, 696–700. doi: 10.1038/nsb0896-696

Shukla, V., Zheng, Y. L., Mishra, S. K., Amin, N. D., Steiner, J., Grant, P., et al. (2013). A truncated peptide from p35, a Cdk5 activator, prevents Alzheimer's disease phenotypes in model mice. *FASEB J.* 27, 174–186. doi: 10.1096/fj.12-217497

Shupp, A., Casimiro, M. C., and Pestell, R. G. (2017). Biological functions of CDK5 and potential CDK5 targeted clinical treatments. *Oncotarget* 8, 17373–17382. doi: 10.18632/oncotarget.14538

Soliman, A. M., Alqahtani, A. S., and Ghorab, M. (2019). Novel sulphonamide benzoquinazolinones as dual EGFR/HER2 inhibitors, apoptosis inducers and radiosensitizers. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 34, 1030–1040. doi: 10.1080/14756366.2019.1609469

Sonawane, V., Mohd Siddique, M. U., Jadav, S. S., Sinha, B. N., Jayaprakash, V., and Chaudhuri, B. (2019). Cmkrt, a quinazolinone-based dual inhibitor of Cdk4 and tubulin polymerization, identified via ligand-based virtual screening, for efficient anticancer therapy. *Eur. J. Med. Chem.* 165, 115–132. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.01.011

Sundaram, J. R., Poore, C. P., Sulaimee, N. H., Pareek, T., Asad, A. B. M. A., Rajkumar, R., et al. (2013). Specific inhibition of p25/Cdk5 activity by the Cdk5 inhibitory peptide reduces neurodegeneration in vivo. *J. Neurosci.* 33, 334–343. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3593-12.2013

Tarricone, C., Dhavan, R., Peng, J., Areces, L. B., Tsai, L. H., and Musacchio, A. (2001). Structure and regulation of the CDK5-p25nck5a complex. *Mol. Cell* 8, 657–669. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00343-4

Van, T. N. N., Pellerano, M., Lykaso, S., and Morris, M. C. (2014). fluorescent protein biosensor for probing CDK/Cyclin activity in vitro and in living cells. *Chem. Biol. Chem.* 15, 2298–2305. doi: 10.1002/cbic.201402318

Wu, P., Nielsen, T. E., and Clausen, M. H. (2016). Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs. *Drug Discov. Today* 21, 5–10. doi: 10.1016/j.drudis.2015.07.008

Xie, Q., Wu, Q., Horbinski, C. M., Flavahan, W. A., Yang, K., Zhou, W., et al. (2015). Mitochondrial control by DRP1 in brain tumor initiating cells. *Nat. Neurosci.* 18, 501–510. doi: 10.1038/nn.3960

Yushan, R., Wenjie, C., Suning, H., Yiwu, D., Tengfei, Z., Madushi, W. M., et al. (2015). Insights into the clinical value of cyclin-dependent kinase 5 in glioma: a retrospective study. *World J. Surg. Oncol.* 13, 1–7. doi: 10.1186/s12957-015-0629-z

Zhang, B., Corbel, C., Guérittie, F., Couturier, C., Bach, S., and Tan, V. B. C. (2011). An *in silico* approach for the discovery of CDK5/p25 interaction inhibitors. *Biotechnol. J.* 6, 871–881. doi: 10.1002/biot.201100139

Zheng, Y. L., Amin, N. D., Hu, Y. F., Rudrabhatla, P., Shukla, V., Kanungo, J., et al. (2010). A 24-residue peptide (p5), derived from p35, the Cdk5 neuronal activator, specifically inhibits Cdk5-p25 hyperactivity and tau hyperphosphorylation. *J. Biol. Chem.* 285, 34202–34212. doi: 10.1074/jbc.M110.134643

Zheng, Y. L., Li, B. S., Amin, N. D., Albers, W., and Pant, H. C. (2002). A peptide derived from cyclin-dependent kinase activator (p35) specifically inhibits Cdk5 activity and phosphorylation of tau protein in transfected cells. *Eur. J. Biochem.* 269, 4427–4434. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03133.x

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Peyressatre, Aranda, Laure, Gonzalez-Vera, Pellerano, Mauriac, Lisowski and Morris. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Résumé

CDK5 est une protéine kinase atypique appartenant à la famille des CDKs découverte dans le système nerveux central où elle y est majoritairement exprimée et a longtemps été considérée comme neurospécifique. CDK5 est associée à son partenaire p35/p25 et permet la régulation de nombreuses fonctions neuronales telles que la migration des neurones ou la formation des synapses et la plasticité neuronale. Cependant nous savons aujourd'hui que cette kinase est exprimée de manière ubiquitaire et exerce aussi des fonctions en dehors du cerveau. La dérégulation de son activité kinase contribue au développement de pathologies neurodégénératives telles qu'Alzheimer ou Parkinson. Mais CDK5 est également impliquée dans le développement de cancers et a notamment été identifiée dans le cancer du poumon pour son rôle important dans la prolifération et la migration des cellules tumorales qui sont à l'origine du développement de métastases.

Actuellement aucun composé n'est approuvé par la FDA ou l'EMA pour le ciblage thérapeutique de CDK5 et les seuls inhibiteurs conçus pour cibler CDK5 sont des petites molécules ciblant la poche de liaison à l'ATP comme la Roscovitine, ainsi que certains peptides ciblant l'interface CDK5/p25. Mais ces derniers présentent de sévères inconvénients tels que le manque de spécificité, le développement de résistances et des propriétés pharmacocinétiques faibles. Une stratégie alternative est de développer des modulateurs allostériques perturbant les transitions conformationnelles conduisant à l'activation de CDK5. Notre laboratoire a développé le biosenseur CDKCONF5 qui a permis d'identifier des modulateurs allostériques de CDK5, dont l'éthavérine et la papavérine. Ces molécules ont initialement été décrites comme des inhibiteurs de PDE4 et PDE10 dans le système neuronal. Au cours de ma thèse j'ai caractérisé le mécanisme moléculaire par lequel ces molécules ciblent et inhibent les fonctions de CDK5. J'ai dans un premier temps cherché à comprendre comment ces inhibiteurs affectaient les interactions de CDK5 entre ses partenaires et substrats à travers des test *in vitro* et dans des extraits cellulaires dérivés du glioblastome. Dans un second temps j'ai caractérisé le potentiel inhibiteur de ces composés dans des lignées cellulaires issus de glioblastome humain et de cancers du poumon. Cela nous a permis de mettre en évidence que ces composés inhibent la prolifération ainsi que la migration cellulaires. Nous avons enfin mis en évidence une dépendance de p53 sur leur potentiel inhibiteur de CDK5. L'identification d'inhibiteurs allostériques de CDK5 par repositionnement de composés offre des perspectives attractives pour proposer des thérapies efficaces pour les cancers du poumon.

Abstract

CDK5 is an atypical protein kinase belonging to the family of CDKs discovered in the central nervous system where it is predominantly expressed and has long been considered as neurospecific. CDK5 is associated with its partner p35/p25 and allows the regulation of many neuronal functions such as neuronal migration, synapse formation and neuronal plasticity. However, we now know that this kinase is expressed ubiquitously and also has functions outside the brain. The deregulation of its kinase activity contributes to the development of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's or Parkinson's. But CDK5 is also involved in the development of cancers and has been identified in lung cancer for its important role in the proliferation and migration of tumor cells that lead to the development of metastases.

Currently, no compound is approved by the FDA or the EMA for the therapeutic targeting of CDK5 and the only inhibitors designed to target CDK5 are small molecules targeting the ATP-binding pocket such as Roscovitine, as well as some peptides targeting the CDK5/p25 interface. However, the latter have severe drawbacks such as lack of specificity, development of resistance and poor pharmacokinetic properties. An alternative strategy is to develop allosteric modulators that disrupt the conformational transitions leading to CDK5 activation. Our laboratory has developed the CDKCONF5 biosensor which has allowed the identification of allosteric modulators of CDK5, including ethaverine and papaverine. These molecules were initially described as inhibitors of PDE4 and PDE10 in the neuronal system. During my thesis I characterized the molecular mechanism by which these molecules target and inhibit CDK5 functions. I first sought to understand how these inhibitors affect the interactions of CDK5 between its partners and substrates through in vitro assays and in glioblastoma-derived cell extracts. I then characterized the inhibitory potential of these compounds in human glioblastoma and lung cancer cell lines, which allowed us to show that these compounds inhibit cell proliferation and migration. Finally, we highlighted a p53-dependence on their CDK5 inhibitory potential. The identification of allosteric inhibitors of CDK5 by repositioning compounds offers attractive perspectives to propose effective therapies for lung cancer.