

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد- تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEN
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de
l'Univers
Département de BIOLOGIE



MÉMOIRE

Présenté par

BENDAHMANE DOUNYA

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Biologie Moléculaire et Cellulaire

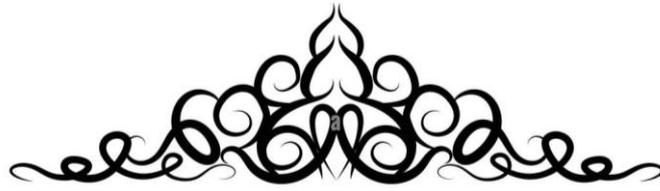
Thème

INHIBITION DE LA KINASE MPF (Cycline B/CDC2)
CIBLES THÉRAPEUTIQUES POUR LE TRAITEMENT DES CANCERS
ÉTUDE *IN SILICO*

Soutenu le 12/07/2023, devant le jury composé de :

Présidente	Dali Youcef Majda	professeure	Université TLEMCEN
Encadrant	Cherrak Sabri Ahmed	Maitre de conférence A	Université TLEMCEN
Examinatrice	Bouanane Samira	Professeure	Université TLEMCEN

Année universitaire 2022/2023



Remerciement

Nous remercions tout d'abord Allah tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience, la santé, la volonté et le courage durant ces longues années d'études et pour réaliser ce modeste travail.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre enseignant Mr Charrek.S qui nous a encadrées ce travail avec une grande rigueur scientifique. Nous la remercions profondément pour ses encouragements, sa patience, sa qualité exceptionnelle d'examiner ce travail, sa disponibilité à tout instant et de m'avoir fait bénéficier de ses connaissances dans le domaine de docking moléculaire.

Nous exprimons nos profonds remerciements aux madame Dalí,S,M le chef de notre département qui nous inspire par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques a contribué ce modeste travail.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous mes enseignants du département de biologie à la faculté des sciences de la Nature et de la Vie.





Dédicaces

En premier lieu louanges à Allah de m'avoir donnée le courage et la force tout au long de mon parcours universitaire.

Je dédie ce modeste travail :

A toute ma famille ; Particulièrement mes chers parents pour leur soutien infailible, leur encouragement, leurs sacrifices et qui n'ont jamais cessé à formuler les prières à mon égard.

Leur amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

J'adresse mes vœux du bonheur et mes salutations les plus distinguées à mes chers frères

Miloude et Akram

A ma seule sœur Karima ; Que Dieu fasse d'Ar Rayyan votre porte, Firdaus votre récompense, Kawthar votre boisson, et le Prophète, que les prières et la paix de Dieu soient sur lui, votre intercesseur et voisin.

On reserve une pensée spéciale à ma copine Hafsa. A pour leur amitié, leur confiance et leur aide.

Enfin, ma chère gratitude à l'ensemble de mes proches qui ont supportés et toute personne ayant contribué et aidé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

BENDAHMANE DOUNYA



Résumé :

Le Complexe CDK1-CyclineB ou MPF est un complexe protéique permettant le passage G2/M du cycle cellulaire. Il active ou inhibe des protéines cibles par phosphorylation et contrôle ainsi leur expression. Il a été observé que le MPF est surexprimé dans divers types de cancer, ce qui lui confère une cible thérapeutique potentielle. Un des médicaments qui agissent en inhibant est le Dinaciclib. Il s'agit d'un inhibiteur de CDK1 se liant au poche ATP via le fragment pyrazolopyrimidine.

Le docking moléculaire par les logiciels Pyrx et UCSF Chimera a été consacré, cette méthode a permis de réaliser un criblage virtuel de seuls 8 composés présentant une affinité supérieure envers le MPF.

À la fin du docking, les composés 71048607 et 95869569 sont les meilleurs inhibiteurs théoriquement plus sélectifs pour utiliser comme des candidats en médecine et pharmacologie.

Mot clés :MPF, CDK1, Cancer, Dinaciclib, Docking Moléculaire.

Abstract :

The CDK1-CyclineB Complex or MPF is a protein complex allowing the G2/M passage of the cell cycle. It activates or inhibits target proteins by phosphorylation and thus controls their expression. It has been observed that MPF is overexpressed in various types of cancer, which consider it as a potential therapeutic target. One of the drugs that act by inhibiting is Dinaciclib. It is a CDK1 inhibitor binding to the ATP pocket via the pyrazolopyrimidine moiety.

Molecular docking by Pyrx and UCSF Chemira software was dedicated, this method made it possible to carry out a virtual screening of only 8 compounds presenting a higher affinity towards MPF.

At the end of docking, the compounds 71048607 and 95869569 are the theoretically better and more selective inhibitors to use as candidates in medicine and pharmacology.

Keywords: MPF, CDK1, Cancer, Dinaciclib, Molecular Docking.

ألملخص:

مركب CDK1-Cycline B او MPF عبارة عن مركب بروتيني يسمح بالانتقال G2/M لدورة الخلية. ينشط أو يثبط البروتينات المستهدفة عن طريق الفسفرة وبالتالي يتحكم في التعبير عنها. لقد لوحظ أن MPF يظهر بشكل مفرط في أنواع مختلفة من السرطان، وبالتالي يعتبر هدفًا علاجيًا محتملاً. أحد الأدوية التي تعمل عن طريق التثبيط هو Dinaciclib. وهو مثبط CDK1 يرتبط بجيب ATP عبر جزء pyrazolopyrimidine .

تم تخصيص الالتحام الجزيئي بواسطة برنامج Pyrx و UCSF Chemira، وقد أتاحت هذه الطريقة إمكانية إجراء فحص افتراضي لـ 8 مركبات فقط تمثل تقاربًا أعلى تجاه MPF.

في نهاية الالتحام، مركبتي الالتحام 71048607 و 9586956 هي أفضل من الناحية النظرية والمثبطات الأكثر انتقائية لاستخدامها كمرشحين في الطب والصيدلة.

الكلمات المفتاحية: MPF, CDK1, السرطان, Dinaciclib, الالتحام الجزيئي.

Tableau des Matières :

Liste d'Abbreviations	10
Liste des Figures	10
Liste des Tableaux	13
Introduction	14
Partie I: Synthèse Bibliographique	16
chapitre 1: Concept de cycle cellulaire	17
A. Le cycle cellulaire :	18
B. La régulation du cycle cellulaire :	18
1. Les kinases dépendantes des Cyclines ; CDKs :	19
01. Définition du CDK :	19
02. Structure du CDK :	20
03. Activation des CDK :	21
04. Les différents complexes CDK-Cycline au cours du cycle cellulaire.....	22
chapitre 2: L'entrée en mitose	24
A. CDK1, kinase pivot de la phase-M.....	25
B. Le MPF, un facteur universel conduisant à l'entrée en mitose	25
1. Identification du facteur MPF :	25
2. Structure du MPF :	26
3. Régulation du MPF :	27
01. Régulation de la quantité de Cycline B	27
<input type="checkbox"/> Régulation transcriptionnelle :	27
<input type="checkbox"/> Dégradation protéique :	29
02. Régulation de l'activité du CDK1 par phosphorylation déphosphorylation :	30
<input type="checkbox"/> Phosphorylation Thr161 activatrice :	30
<input type="checkbox"/> Phosphorylation inhibitrice des résidus Thr14 et la Tyr15 :	31
<input type="checkbox"/> Déphosphorylation activatrice des résidus Thr14 et la Tyr15 :	33
4. Cinétique d'activation du MPF :	35



5. Mode d'activation du MPF :	36
01. Constitution d'un stock de Cycline B / CDK 1 inactif (Pré-MPF)	37
02. Activation brutale des Cycline B / CDK1	37
03. Mode d'action des complexes activés.....	38
6. La chute du MPF :	38
chapitre 3: Le MPF, un cible thérapeutique potentiel contre le cancer	40
A. Les fonctions du CDK1 :	41
B. L'influence des CDK1 dans le développement de Cancer :	42
C. La cause de l'hyperactivité du CDK1 en cancer :	44
D. L'inhibition du MPF :	47
1. Origine de projet :	48
2. Généralité :	48
01. Les inhibiteurs non compétitifs de l'ATP :	49
02. Les inhibiteurs allostériques :	49
03. Les inhibiteurs compétitifs de l'ATP :	49
3. Recherche et optimisation des inhibiteurs du CDK1 :	51
4. Identification de l'inhibiteur du CDK1 :	53
01. Définition de Dinaciclib :	53
02. La structure du Dinaciclib :	53
03. Activités biologiques :	54
Partie II: Matériels et Méthodes	55
A. Screening virtuel :	56
B. Docking moléculaire :	56
1. Récepteur :	56
C. Processus de docking :	56
D. Processus de détermination des interactions :	57
E. Processus d'évaluation les paramètres pharmacocinétiques :	57



Partie III: Résultats et Discussion	58
A. Résultats du criblage moléculaire :	59
B. Résultats du docking moléculaire :	59
C. Résultats des interactions par Discovery Studio :	60
D. Résultat des paramètres pharmacocinétiques :	68
Conclusion.....	70
Références	72

Liste d'Abréviations

-APC/C: Anaphase-promoting complex/Cyclosome.

-ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated

-B-Myb: Proto-oncogène MYB like 2

-CAK : CDK-Activating Kinase

-CCNB : Gène codant pour la Cycline B

-Cdc : Cell Division Cycle

-CDE : Cell cycle Dependent Element

-CDF-1 : cycle DOF facteur 1

-Cdh1 : Cdc20- homologue 1

-CDK : Cycline Dependente Kinase

-CHR: Cell cycle genes Homology Region

-CKI: CDK inhibitor

-Cks: Cycline-dependent kinase subunit

-FoxM1 :Forkhead box protein M1

-FRET: Förster Resonance Energy Transfer

-GI₅₀: Growth inhibitory concentration 50

-IC₅₀: Inhibitory concentration 50

-MAP: Mitogen activated protein

-Mat1: Mating-type protein1

-MEK: MAPK kinase

-Mik1: Mitotic inhibitor kinase 1

-MPF: Mitosis Promoting Factor

-Myt1: Myelin transcription factor 1

-NF-Y: Nuclear transcription factor Y

-PP2A: Protein phosphatase 2A

-PP2C: Protein phosphatase 2C.

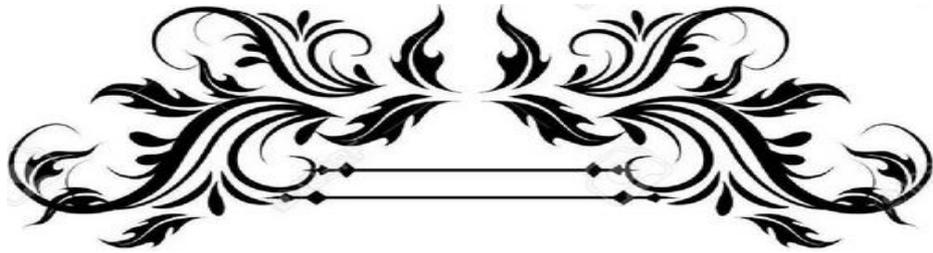
Liste des Figures

Figure 1: Représentation du cycle cellulaire avec ses deux points de contrôle et son point de restriction ⁵ .-----	18
Figure 2: La réaction de phosphorylation ¹⁰ .-----	19
Figure 3: Structure de la CDK humaine complexée avec l'ATP ¹³ .-----	20
Figure 4: La base structurale du CDK et son activation par Cycline ¹⁶ .-----	22
Figure 5: Interventions des CDKs au cours du cycle cellulaire ⁵ .-----	23
Figure 6: Représentation tridimensionnel du CDK1 associé à Cks1 ²⁰ .-----	25
Figure 7: La découverte de l'activité MPF à partir d'ovocytes de <i>Rana pipiens</i> ²⁶ .-----	26
Figure 8: Représentation tridimensionnelle du facteur MPF composé de la sous unité régulatrice Cycline B et de la sous unité activatrice CDK1 ²⁰ .-----	27
Figure 9 : Comparaison de la séquence des promoteurs de Cycline B1 et Cycline B2 humaines et de souris ³⁹ .-----	28
Figure 10 : Régulation de la transcription de l'ARN messenger de Cycline B1 au cours des phases du cycle cellulaire ⁴⁹ .-----	29
Figure 11: Régulation de l'activité de l'APC/C et de la dégradation des Cycline mitotique au cours du cycle cellulaire ⁵² .-----	30
Figure 12 : Régulation de l'activité du complexe Cycline B1-CDK1 chez les mammifères ¹¹⁴ .-----	34
Figure 13: Suivi en temps réel de la cinétique d'activation du complexe Cycline B1-CDK1 au cours du cycle cellulaire ¹¹⁵ .-----	36
Figure 14: Contrôle de la protéolyse par APC/C ¹¹⁷ .-----	39
Figure 15 : Fonctions des CDKs.-----	41
Figure 16 : Analyse de l'expression des niveaux du CDK1 dans le cancer ¹²⁹ .-----	44
Figure 17 : le blocage de la transition G2/M ⁶ .-----	45
Figure 18 : Fonctions de p53 dans la réparation de l'ADN endommagé ⁵ .-----	45
Figure 19 : Implication de P53 dans la prolifération, PDAC(Adénocarcinome canalaire pancréatique) ¹³⁵ .-----	46
Figure 20 : Implication de P53 dans différentes fonctions ¹³⁶ .-----	46
Figure 21 : le mutant P53 inhibe l'expression de CDC20 ¹³⁷ .-----	47
Figure 22 : Activité tumorigène proposée du CDK1 ¹³⁵ .-----	47
Figure 23 : potentiel thérapeutique des inhibiteurs du CDKs ⁵ .-----	49

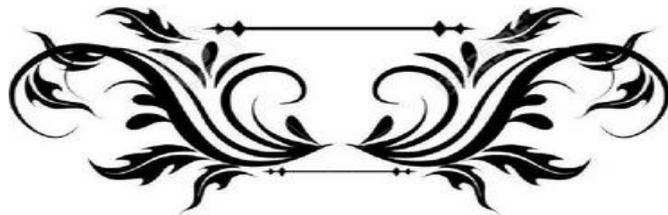
Figure 24 : Composés des inhibiteurs compétitifs de l'ATP en cours de développement clinique ⁵ . -----	50
Figure 25 : A) Principe du dosage de l'activité CDK1/Cycline B ;B) Un exemple d'étude structure-activité ¹⁶⁰ . -----	51
Figure 26: structure chimique de la Dinaciclib. -----	53
Figure 27 : Les scores donnés par UCSF Chimera du composé 133335579. -----	60
Figure 28 : les interactions entre le composé 95869569 et le récepteur. -----	63
Figure 29 : les interactions entre le composé 71048607 et le récepteur. -----	63
Figure 30: les interactions entre le composé 144762923 et le récepteur. -----	64
Figure 31: les interactions entre le composé 58269045 et le récepteur. -----	64
Figure 32 : les interactions entre le composé 23569294 et le récepteur. -----	65
Figure 33 : les interactions entre le composé 44159122 et le récepteur. -----	65
Figure 34 : les interactions entre le composé 70878929 et le récepteur. -----	66
Figure 35 : les interactions entre le composé 133335579 et le récepteur. -----	66

Liste des Tableaux

Tableau 1 : les inhibiteurs du CDKs optimisées en cours d'essais cliniques ⁵	52
Tableau 2 : Des activités biologiques testée par le Dinaciclib sur déverses lignées cellulaires ¹⁶⁵⁻¹⁶⁷	54
Tableau 3 : Les meilleurs scores ΔG révélés par le screening moléculaire.	59
Tableau 4: les meilleurs scores de chaque Analogue.	60
Tableau 5 : Les interactions entre chacun des composés avec le récepteur.	60
Tableau 6 : les paramètres pharmacocinétiques des composés.	68



Introduction

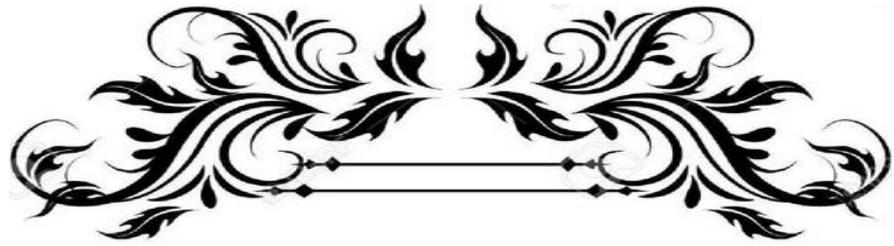


Le cancer est une maladie caractérisée par la prolifération incontrôlée des cellules ; celles-ci ayant échappé aux mécanismes de régulation qui assurent le développement sain de l'organisme. Cette division incontrôlée rend les cellules cancéreuses plus difficiles à éradiquer. Elles échappent ainsi aux mécanismes de la mort programmée de la cellule (apoptose), et sont donc considérées comme « immortelles ». Ramener cette prolifération cellulaire sous contrôle, en tentant de réguler le cycle de la division cellulaire, semble être un moyen efficace pour lutter contre le cancer. Le cycle cellulaire est contrôlé par la présence de protéines régulatrices à chaque étape de la vie cellulaire. Parmi les principaux mécanismes de la régulation, on compte la phosphorylation par les protéines kinases.

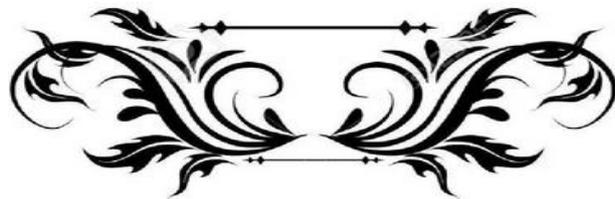
La kinase clé dans la division cellulaire est le CDK1 (également appelée Cdc2) ; c'est le facteur responsable de l'entrée en mitose, d'où son nom MPF (facteur de promotion de la mitose). L'activation du MPF nécessite une association stoechiométrique de la Cycline B avec cdc2, et une série de phosphorylations et de déphosphorylations médiées par Cdc25. Ainsi que cette inactivation nécessite la dissociation de Cdk1 de la Cycline B suivie de la dégradation protéolytique de cette dernière. Or, cet enzyme est dérégulé de façon surexprimé dans les tumeurs, ce qui cause la prolifération permanente des cellules cancéreuses. Ces défauts observés dans la régulation de la division cellulaire ont suscité la recherche de composés capables d'inhiber la prolifération des cellules tumorales. Les kinases dépendantes des Cyclines sont donc des cibles de choix pour la découverte de nouveaux composés à visée thérapeutique.

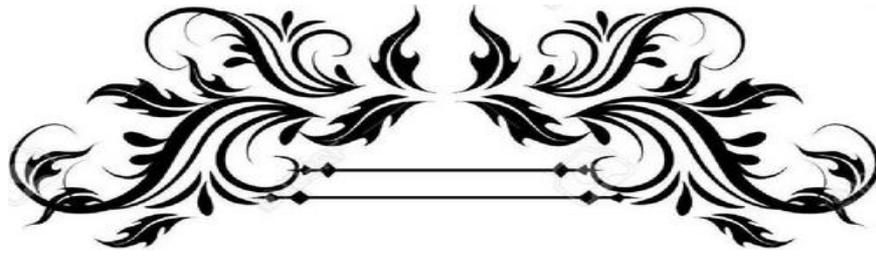
Le développement d'inhibiteurs de kinases en général et de MPF en particulier a permis l'avènement de nouveaux traitements à partir de 2001, validant ce dernier comme une cible thérapeutique. Le dinaciclib est une petite molécule inhibitrice sélective et puissante de CDK1 à une concentration nanomolaire. Il a été rapporté que ce dernier est actif contre un large éventail de lignées cellulaires cancéreuses humaines et inhibe la croissance tumorale dans des modèles précliniques. Le dinaciclib a un profil de sécurité et de pharmacocinétique favorable. Cependant, aucun médicament n'a encore été commercialisé à ce jour.

Nous avons tenté dans cette étude par une approche *in silico*, en utilisant les logiciels de docking moléculaire, de prédire l'utilisation potentielle d'analogues du Dinaciclib comme inhibiteurs du MPF dans la lutte contre le cancer.

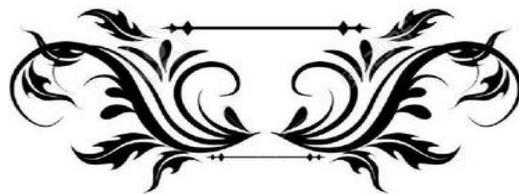


*Partie I: Synthèse
Bibliographique*





*Chapitre 1: Concept
de cycle cellulaire*



A. Le cycle cellulaire :

Le cycle cellulaire est une succession d'étapes qui déterminent et limitent la durée de vie des cellules. La cellule naît, vit, se divise et meurt. Le cycle cellulaire est le point central de tous les organismes et se compose de deux processus séquentiels : l'interphase (phase G1, S et G2), au cours de laquelle la cellule double sa masse et duplique son matériel génétique, et la phase mitotique (phase M), au cours de laquelle deux cellules filles sont formées, chacune avec un ensemble complet de chromosomes¹. Lorsque la cellule ne se divise pas, elle est dans un état de quiescence, appelé aussi phase G0².

À un certain point de la phase G1, les cellules progressent dans le cycle sans avoir besoin de signaux mitogènes et deviennent capables d'auto-prolifération. Ce point est appelé point de restriction³. Ainsi plusieurs anomalies peuvent avoir lieu lors de la formation des nouvelles cellules. Afin d'éviter cela, deux "points de contrôle" vérifient à la fin de la phase G1 ou G2, si le processus a été correctement réalisé avant de progresser dans la phase suivante⁴.

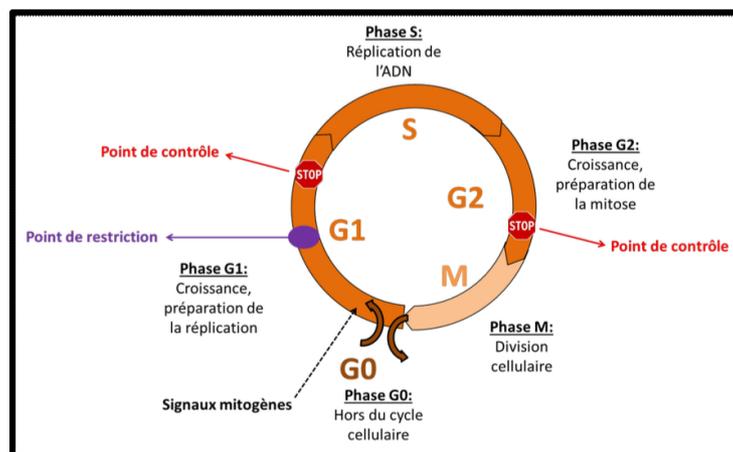


Figure 1: Représentation du cycle cellulaire avec ses deux points de contrôle et son point de restriction⁵.

B. La régulation du cycle cellulaire :

Pour assurer, d'une part, l'ordre immuable de la succession des quatre phases du cycle (régulation du cycle), et d'autre part, l'obtention de deux cellules filles rigoureusement identiques (surveillance de l'ADN), la cellule dispose de systèmes de régulation hautement perfectionnés. Dans le premier cas, ce sont essentiellement des kinases Cyclines-dépendantes, les CDK, qui interviennent. Dans le second cas, d'autres molécules participent à divers

mécanismes de surveillance du cycle pour inhiber les CDK régulant le cycle et stopper le cycle, si l'étape précédente n'est pas terminée, ou si une « réparation » est nécessaire⁶.

1. Les kinases dépendantes des Cyclines ; CDKs :

01. Définition du CDK :

Les protéines kinases sont impliquées dans la régulation des activités cellulaires par le biais de la phosphorylation. Ce rôle régulateur de phosphorylation a été découvert dans les années 1950 par Edwin G. Krebs et Edmond H. Fischer, récompensés en 1992 par le Prix Nobel de médecine¹.

D'un point de vue mécanistique, les protéines kinases accélèrent le transfert d'un groupement γ -phosphate de l'ATP vers une fonction hydroxyle d'un résidu sérine, thréonine ou tyrosine présent dans une protéine cible. Ce mécanisme de régulation cellulaire s'exerce sur les protéines pour modifier leur activité et induire par la suite toute une cascade d'activation. Ces protéines kinases sont donc impliquées dans la majorité des voies de transduction du signal chez les cellules eucaryotes⁷.

L'existence et l'identification de kinases dépendantes des Cyclines a été une découverte clé qui a valu en 2001 le prix Nobel de physiologie et médecine à L. Hartwell, P. Nurse et T. Hunt⁸.

Les CDK sont de petites protéines de 30 à 60 kDa appartenant au groupe des sérine-thréonine kinases. Composées de sous-unités catalytiques, ces CDK ne sont activées que lorsqu'elles forment des complexes hétérodimériques avec la sous-unité régulatrice, la Cycline. Nous verrons que certaines CDKs nécessitent, en plus de leur liaison avec la Cycline, une phosphorylation du complexe afin d'être totalement actives (Hanks et al., 1988)⁹.

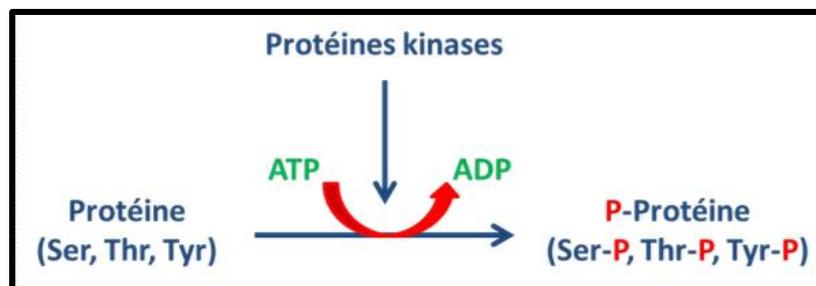


Figure 02: La réaction de phosphorylation¹⁰.

02. Structure du CDK :

L'étude cristallographique aux Rayons X de la protéine humaine CDK2, a permis de déterminer la structure globale des CDKs¹¹.

Les CDKs sont très homologues, on retrouve 40 à 75 % de similitudes entre les CDK1 à CDK7¹². Elles présentent toutes une structure tridimensionnelle similaire, caractérisée par l'existence de deux domaines.

- Un domaine N-terminal, constitué d'un feuillet de 5 brins- β antiparallèles et d'une seule grande hélice α présentant la séquence PSTAIRE (correspond au code à une lettre des acides aminés (PSTAIRE = proline, sérine, thréonine, alanine, isoleucine, arginine et glutamate)).
- Un domaine C-terminal, de plus grande taille, composé essentiellement d'hélices α et d'une région flexible, appelée segment d'activation ou boucle T, qui est impliquée dans la régulation de l'accès au substrat.

Les deux signatures caractéristiques des CDKs, jouant un rôle primordial dans leur régulation, sont l'hélice α PSTAIRE ainsi que le segment d'activation.

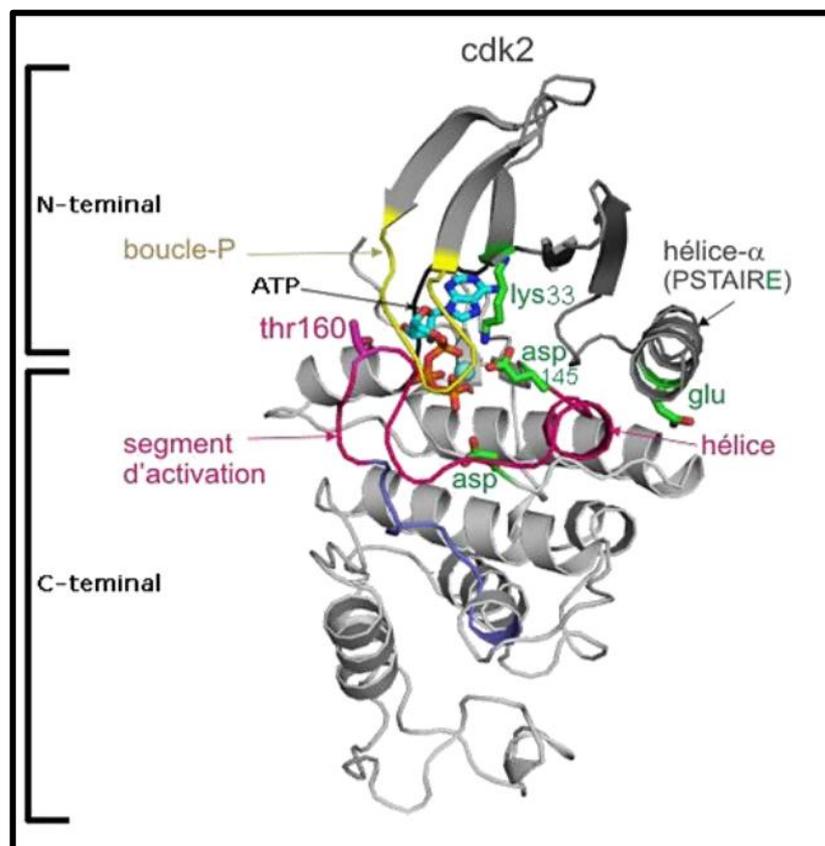


Figure 3: Structure de la CDK humaine complexée avec l'ATP¹³.

03.Activation des CDK :

Pour être actives, les CDKs présentent une conformation de deux sites de fixation qui doivent être accessibles; en plus de l'accrochement avec les Cyclines :

- Le site de liaison de l'ATP :se trouve dans une fente à l'intersection entre les deux domaines (N- et C-terminal)¹⁴. Le positionnement de l'ATP est déterminé par une boucle fixant le phosphate (boucle P) ; Cette boucle est constituée d'une séquence riche en glycine. La base adénine de l'ATP est positionnée dans une poche hydrophobe entre les feuilletts β du petit domaine N-terminal. Les groupements phosphates de l'ATP sont positionnés en fonction des interactions avec certains résidus ainsi que la partie amide du squelette de la boucle fixant le phosphate (boucle P) riche en glycine¹⁵.
- Site de liaison de protéine cible : Deux sites de phosphorylation ont des propriétés inhibitrices (Tyr/Thr). Ces deux résidus sont situés au milieu de la boucle P. On retrouve également un site de phosphorylation, situé sur le segment d'activation, qui possède une propriété activatrice (Thr).
- Site de liaison de la Cycline : Le principal régulateur de l'activité des CDKs est la liaison avec son partenaire, la Cycline. Une même CDK peut s'associer à des Cyclines différentes. Et une même Cycline peut activer différentes CDKs.

Lors de son association, la Cycline interagit avec les deux domaines N- et C- terminaux de la CDK. Ces contacts entraînent des changements significatifs de conformation¹³ qui sont listés ci-dessous :

- - Ouverture de la structure bipolaire
- - Déplacement du segment d'activation avec une exposition vers la surface du résidu thréonine.
- □ Glissement et rotation de 90° de l'hélice PSTAIRE du lobe N-terminal. Ce mouvement va déplacer un acide glutamique (Glu) du domaine vers l'intérieur du site catalytique permettant la fixation et l'orientation de l'ATP lors du transfert du groupement phosphate.

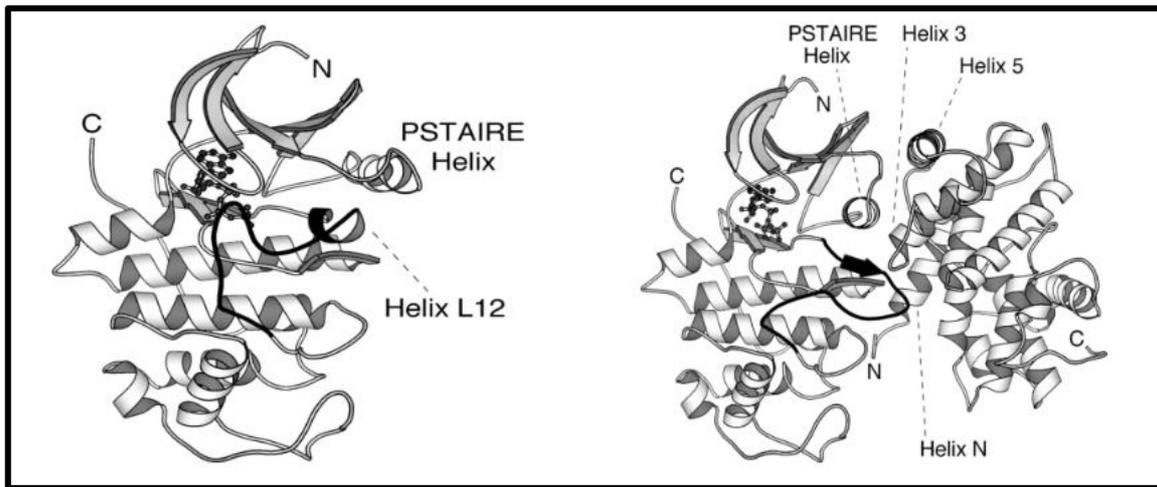


Figure 4: La base structurale du CDK et son activation par Cycline¹⁶.

04. Les différents complexes CDK-Cycline au cours du cycle cellulaire

L'enchaînement des phases au cours du cycle cellulaire dépend de l'association séquentielle de différentes CDKs avec différentes Cyclines. Ceci est souvent spécifique à un CDK particulier¹⁷. En début de phase G1, la cellule est dépourvue de Cycline. Si les conditions nutritives et environnementales sont favorables à sa prolifération, des signaux extracellulaires initient la synthèse de Cycline D qui s'associe à CDK4 et/ou CDK6, les complexes CDK4-Cycline D et CDK6-Cycline D présentant des activités redondantes. Ces néo-complexes CDK4/6-Cycline D lancent la transcription des gènes requis pour la phase-S, en particulier celle de la Cycline E puis de la Cycline A¹⁸. Les complexes CDK2-Cycline E orchestrent l'entrée en phase-S. Les complexes CDK2-Cycline A assurent la réplication de l'ADN et déclenchent simultanément la transcription de la Cycline B. En phase-G2, la Cycline A puis la Cycline B s'associent à CDK1, les complexes CDK1-Cycline B étant maintenus inactifs. Quand les mécanismes de surveillance ont achevé de contrôler la qualité de l'ADN répliqué, les complexes CDK1-Cycline B sont activés et déclenchent l'entrée puis la progression dans la phase-M. En fin de métaphase, les complexes CDK1 sont progressivement inactivés pour permettre la sortie de la phase-M et le retour en interphase.

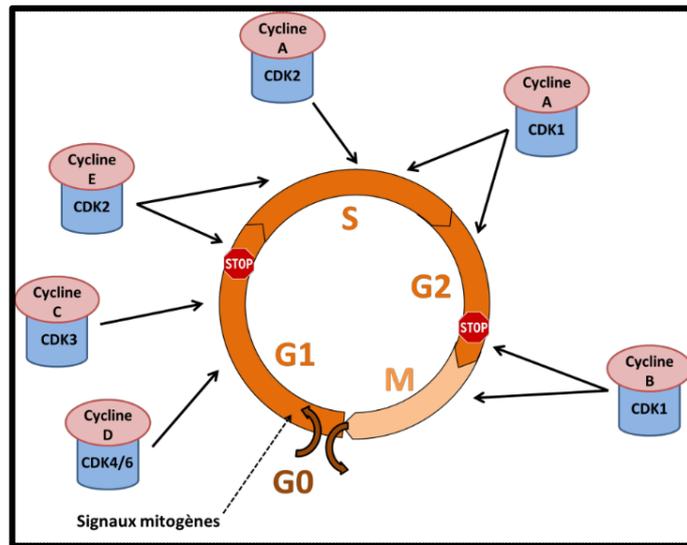
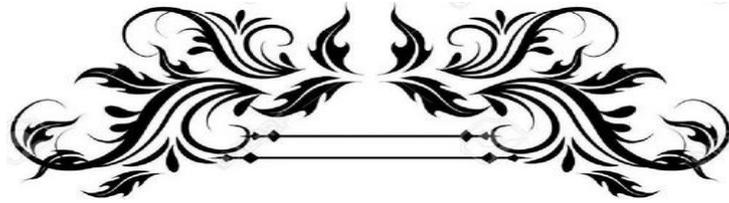


Figure 5: Interventions des CDKs au cours du cycle cellulaire⁵.



*Chapitre 2: L'entrée
en mitose*



A.CDK1, kinase pivot de la phase-M :

La régulation de la division cellulaire fait intervenir deux mécanismes majeurs qui sont indépendants de la transcription car ils sont effacés à ce stade : le turn-over de régulateurs protéiques, qui repose sur leur synthèse et leur dégradations, et des modifications post-traductionnelles réversibles, en particulier les phosphorylations; Depuis la découverte du CDK1 dans les années 1980, cette kinase a longtemps été considérée comme la clé de voûte de la division cellulaire, qu'elle soit mitotique et méiotique¹⁹.

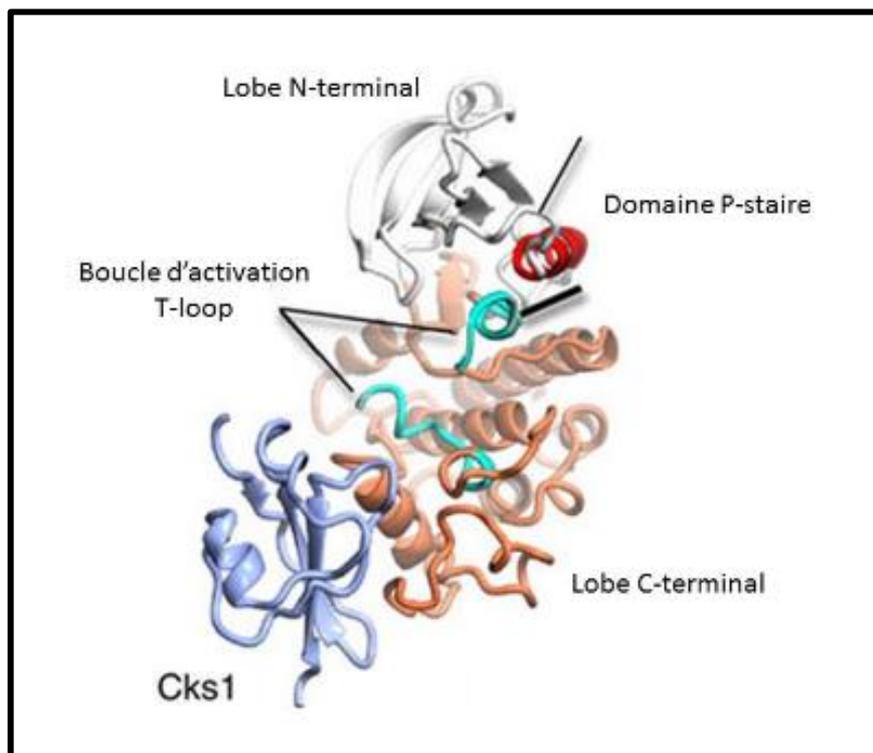


Figure 06: Représentation tridimensionnel du CDK1 associé à Cks1²⁰.

B.Le MPF, un facteur universel conduisant à l'entrée en mitose :

1.Identification du facteur MPF :

Dans les années 1960 et 1970, un facteur universel a été découvert qui permettent aux cellules d'entrer en mitose. Ce sont les travaux de Masui et collaborateurs réalisés à partir d'ovocytes d'amphibiens *Rana pipiens* qui furent les plus marquants²¹. En effet, leurs expériences ont permis, pour la première fois, l'identification d'un facteur cytoplasmique responsable de la rupture de l'enveloppe nucléaire et l'émission du premier globule polaire (maturation méiotique) d'un ovocyte arrêté en prophase de première division de méiose (assimilé à la

phase G2)²¹. Ce facteur issu des ovocytes bloqués en métaphase de deuxième division était appelé facteur favorisant la maturation (ou MPF). Par la suite, d'autres travaux ont mis en évidence que ce facteur était aussi bien requis pour l'entrée en méiose qu'en mitose, il fut donc renommée << M-phase /Mitosis Promoting Factor>>²². A la même époque, le MPF fut isolé et caractérisé dans les cellules humaines²³, des ovocytes de Xénope²⁴ et de *Drosophile*²⁵ démontrant ainsi son universalité pour le contrôle de la transition G2/M.

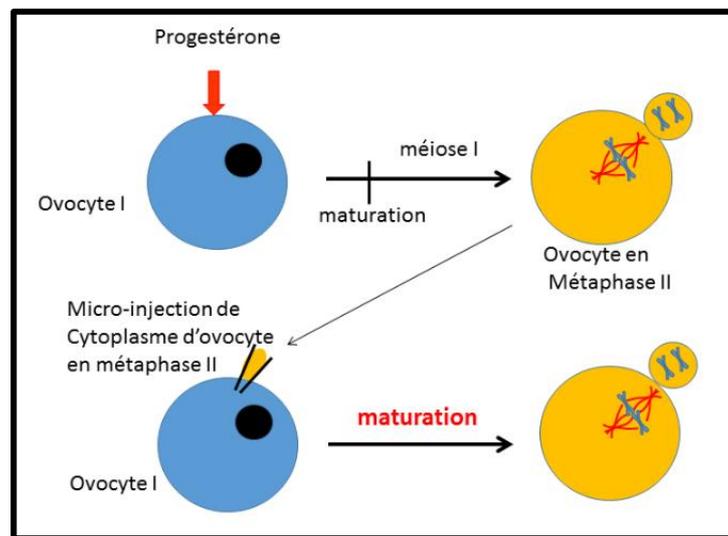


Figure 07: La découverte de l'activité MPF à partir d'ovocytes de *Rana pipiens*²⁶.

2. Structure du MPF :

Au début des années 1990, le MPF purifié d'ovocytes d'amphibiens a été caractérisé comme un hétérodimère constitué de deux protéines de 34 kDa et 45 kDa^{27,28}. Alors que la protéine de 34 kDa fut corrélée aux protéines p34Cdc2 et Cdc28 de *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae*, respectivement^{27,28}, le deuxième composant de 40 à 60 kDa, suivant les organismes, fut identifié comme une protéine Cycline : la Cycline B^{24,28,29}.

La Cycline B étant déterminée comme la sous-unité régulatrice de la protéine kinase, Cdc2, la sous-unité catalytique, fut alors renommée CDK1 pour « Cycline-dependent kinase 1 »³⁰.

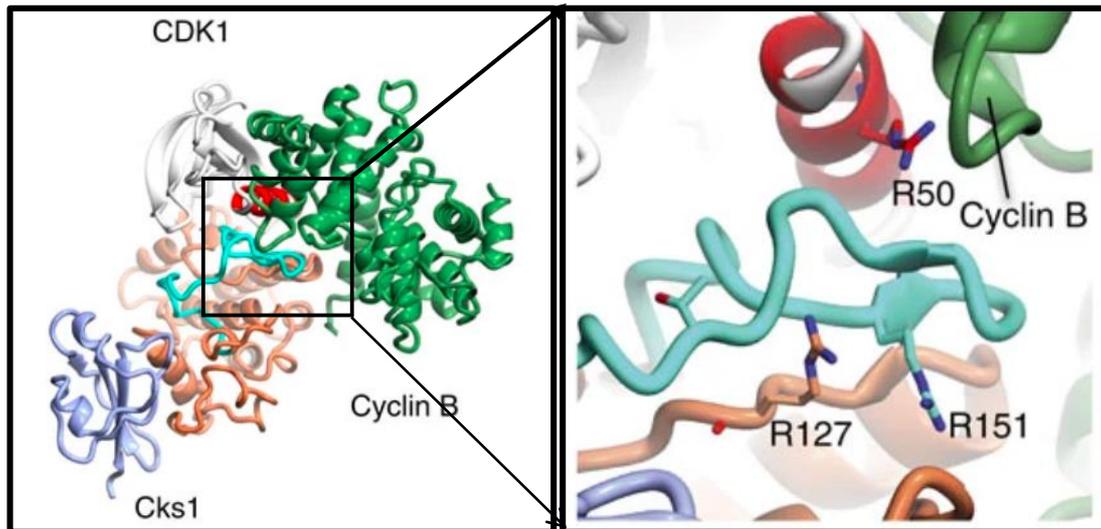


Figure 08: Représentation tridimensionnelle du facteur MPF composé de la sous unité régulatrice Cycline B et de la sous unité activatrice CDK1²⁰.

3. Régulation du MPF :

Suite à la caractérisation du complexe Cycline B-CDK1, les premiers modèles de régulation ont été rapidement développés^{31,32}. L'activité catalytique des complexes portés par les sous-unités CDK1 est étroitement régulée aux niveaux transcriptionnels et post-traductionnel³³.

01. Régulation de la quantité de Cycline B :

◆ Régulation transcriptionnelle :

La formation des complexes Cycline B-CDK1 est essentiellement contrôlée par la régulation de l'abondance de la Cycline B, puisque la concentration de la protéine CDK1 est à la fois excessive et constante au cours du cycle cellulaire. Les travaux de Tim Hunt et ses collègues ont montrés que les Cyclines mitotiques (Cycline B et A) subissent des cycles périodiques de destruction et de resynthèse, en phase avec l'état mitotique³⁴. En effet, le niveau protéique de Cycline B faible en phase G1, augmente à partir de la fin de la phase S atteint son maximum à la transition G2/M, puis diminue pour quasiment disparaître lors du retour en phase G1³⁵⁻³⁷. L'accumulation progressive de Cycline B1/2 au cours de la phase G2 est associée à une régulation transcriptionnelle du gène correspondant CCNB1/2^{36,37}. En effet, la transcription du gène CCNB1/2 suit également des cycles périodiques, et ceci lié à la présence au sein de

son promoteur d'éléments de régulation interne notamment de deux régions CAAT et une région CDE/CHR³⁸⁻⁴¹.

Cyclin B1 human	CTGCAGCTGC	CCGAGAGCGC	AGGCGCAGAG	GCAGAC	CACG	TGAGAGCCTG	GCCAGGCCTT	-295	
Cyclin B1 mouse	CAGCAATGCG	ACTTGTGCC	AGGCATAGAG	CCTGACCTCG	CGAGGGGTGG	GCGGTGCTGC		-282	
Cyclin B1 human	CCGGCCTAGC	CTCACTGTGG	CCCCGCCCT	CTCGAACGCC	T.....TCGCGC		-248	
Cyclin B1 mouse	CAGCGGCAGC	CTCGCTCTGG	CCCCGCCCC	GCCCCACCC	CGCCGAACTT	GGGATCGCGG		-222	
Cyclin B1 human	GATCGCCCTG	GAAACGCATT	CTCTGCGACC	GGCAGCC	CC	AATGGGAAG.	GGAGTGAGTG	-189	
Cyclin B1 mouse	GATCGCCAG	GAAACGCATT	CTACGGGAAC	CCGCGGCC	CC	AATGGGAAG.	AGAGCGAGTG	-163	
Cyclin B2 human	TTCAG	CCAAT	GAGAGTGCGA	GAGTGATCT	TGTGTTGG	CC	AATGAGAACA	GCGACCCGTG	-189
Cyclin B2 mouse	GCCAG	CCAAT	CAACGTGCAG	AAAGGCCCTC	CAGTCTAG	CC	AATGGGTTC	GCGGCCCTG	-145
		CAAT box				CAAT box			
Cyclin B1 human	CCACGAACAG	GCCAAT	AAGG	AGGGAGCAGT	GCGGGG	TTTA	AATC.TGAGG	CTAGGCTGGC	-130
Cyclin B1 mouse	CCACGAACTG	GCCAAT	GAGG	AGCGAGCGGC	CGGGG	TTTA	AATCCTAAGCC	C..GGCAGAC	-105
Cyclin B2 human	CGCAGGGCCG	GCCAAT	GGGG	CGCAGCGGAC	GCGGT	TTTG	AATCCTGGAA	CAAGGCTACA	-129
Cyclin B2 mouse	CGTGCCTCTA	GCCAAT	AGTG	CGTCAGCGGC	GCGGT	TTTG	AATCGCGGAC	CG.GCCGGTG	-86
		CAAT box		CDE		CHR			

Figure 09 : Comparaison de la séquence des promoteurs de Cycline B1 et Cycline B2 humaines et de souris³⁹.

En phase G1, la fixation du facteur CDF-1 au niveau des éléments CDE/CHR, ainsi que d'un facteur de transcription répressif de la famille E2F, E2F4, en partenariat avec les protéines p107 et p130 (également appelée Retinoblastoma-like 1 et 2 respectivement) au niveau des séquences E2F du promoteur, bloque la transcription du gène³⁸. En phase G2, la transcription de l'ARN messager de Cycline B1 (et B2) est activée par différents facteurs de transcription, dont NF-Y, B-Myb, E2F et FoxM1^{43,44}. Ces facteurs de transcription sont activés par l'augmentation progressive en phase G2 de l'activité du complexe Cycline A2-CDK^{45,46}. Le facteur de transcription NF-Y est l'activateur principal de l'expression du gène CCNB. En collaboration avec les membres de la famille des protéines p300 / CBP qui présentent une activité histone acétyltransférase, il se fixe au niveau des boîtes CAAT du promoteur^{38,47}. Enfin, fait intéressant, le promoteur de la Cycline B1 est dans une configuration ouverte en mitose, ce qui lui permet d'être occupé par des facteurs de transcription tels que NF-Y, laissant l'ARN messager de la Cycline B1 même pendant la mitose avancée qui s'est avérée permettre l'expression⁴⁸.

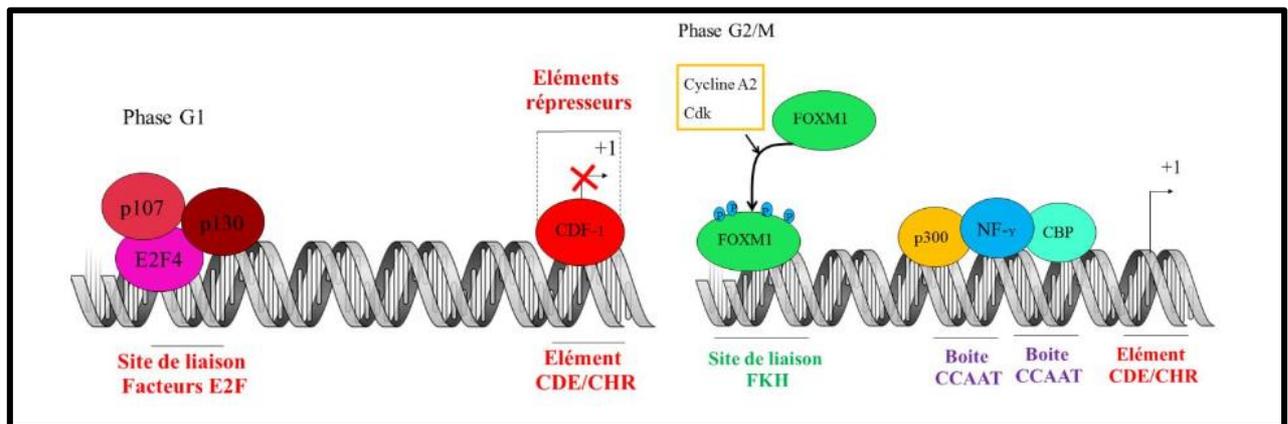


Figure 10 : Régulation de la transcription de l'ARN messager de Cycline B1 au cours des phases du cycle cellulaire⁴⁹.

◆ Dégradation protéique :

L'analyse en temps réel montre que les niveaux de Cycline B diminuent rapidement lorsque le dernier chromosome s'aligne avec la plaque métaphasique⁵⁰. Cycline B possède au niveau de son domaine NH₂-terminal une courte séquence conservée appelée motif de destruction, (RxxLxxxN) reconnu par l'ubiquitine ligase APC/C⁵¹. Cette séquence est indispensable pour sa reconnaissance par l'ubiquitine ligase. En effet, il a été montré qu'une délétion ou des mutations de ce motif réduit ou abolit de l'ubiquitinylation de la Cycline B et sa dégradation⁵¹. Afin de reconnaître ses substrats, l'ubiquitine ligase APC/C doit s'associer avec un co-activateur, soit Cdc20, soit Cdh1²⁸. L'APC/C s'associe d'abord avec Cdc20 dès la prométaphase puis avec Cdh1 en anaphase et pendant la phase G1. Cette association coordonnée dans le temps est dépendante d'une activité CDK⁵³⁻⁵⁶. Chez la levure, une mutation des sites consensus du CDK1 dans les sous-unités Cdc27, Cdc16 et Cdc23 de l'APC/C abolit largement sa liaison avec Cdc20, suggérant que l'activation du complexe APC/C est amorcé par CDK1⁵⁴. A l'inverse, la phosphorylation de Cdh1 par le complexe Cycline B1-CDK1 empêche son association avec l'APC/C^{55,56}. En anaphase, alors que Cycline B1 est dégradée, le complexe APC/C^{Cdh1} s'active pour permettre de maintenir les faibles taux des Cyclines mitotiques tout au long de la phase G1^{57,58}.

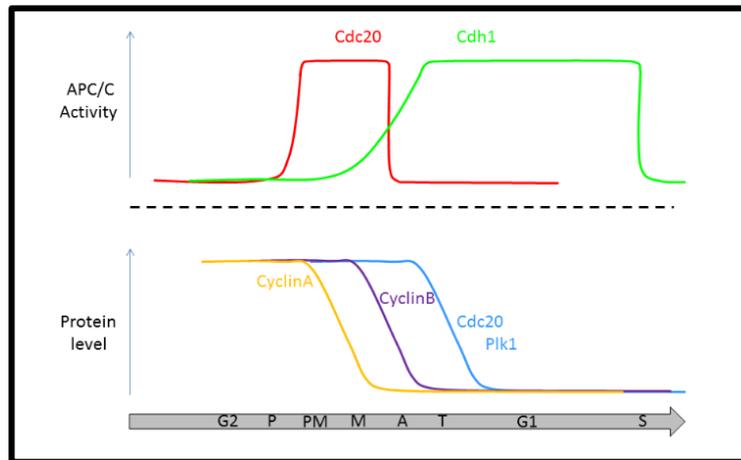


Figure 11: Régulation de l'activité de l'APC/C et de la dégradation des Cycline mitotique au cours du cycle cellulaire⁵².

02.Régulation de l'activité du CDK1 par phosphorylation déphosphorylation :

De nombreux travaux chez les levures, les mammifères et la grenouille ont permis de mettre en évidence que dès lors que le complexe Cycline B-CDK1 est formé, CDK1 est phosphorylée au niveau de trois résidus (deux chez les levures): L'un active la phosphorylation au niveau du résidu Thr161 et deux inhibe la phosphorylation au niveau des résidus Thr14 et Tyr15^{59,60}.

◆ Phosphorylation Thr161 activatrice :

La formation du complexe Cycline B-CDK1 n'est pas suffisante pour l'activation du CDK1. L'activation complète du CDK1 nécessite la phosphorylation du résidu Thr161 au niveau de sa boucle d'activation⁶¹. Hautement conservée parmi les protéines CDKs, la phosphorylation de ce résidu est catalysée par la CAK ou « CDK-Activating Kinase »⁶². Il a été montré que cette phosphorylation conduit à un changement de conformation de la protéine et participe à la reconnaissance et au positionnement des substrats du CDK1^{63,64}. Par ailleurs, il a également été proposé que la phosphorylation de ce résidu facilite l'hydrolyse de l'ATP ainsi correctement positionné⁶³.

Chez les mammifères, la phosphorylation du CDK1 par la CAK nécessite son association avec une Cycline ce qui aide à stabiliser le complexe Cycline-CDK1⁶⁵. Chez les eucaryotes supérieurs, la CAK est un complexe trimérique composé du CDK7, de la sous-unité

régulatrice Cycline H, et d'une troisième sous-unité MAT1 permettant de stabiliser l'interaction entre CDK7 et la Cycline H⁶⁶. Du fait de l'abondance des différentes sous-unités du complexe CAK, son activité enzymatique et sa localisation nucléaire, ne changent pas au cours du cycle cellulaire, la phosphorylation de la boucle d'activation du CDK1 ne constitue pas un élément limitant pour son activation⁶⁷. Ainsi, bien que la phosphorylation de la Thr-161 soit essentielle à l'activation du CDK1, c'est la formation du complexe CyclineB-CDK1 qui constitue la première étape de régulation. La déphosphorylation du résidu Thr161 est assurée par les phosphatases de la famille PP2C et/ou PP2A^{68,69}.

◆ Phosphorylation inhibitrice des résidus Thr14 et la Tyr15 :

L'activité du CDK1 est également régulée par des phosphorylations inhibitrices qui jouent un rôle important dans le contrôle de l'entrée des cellules en mitose. Initialement identifié chez la levure *S.pombe*, le résidu Tyr15, situé à proximité du site de liaison de l'ATP de Cdc2, joue un rôle essentiel pour l'inhibition de son activité⁷⁰. En effet, la mutation de ce résidu en une forme non phosphorylable conduit à une entrée prématurée des cellules en mitose⁷⁰. Plusieurs données moléculaires, biochimiques et cristallographiques ont permis d'étudier le mécanisme par lequel la phosphorylation de la Tyr15 régule l'activité de Cdc2^{71,64,72-74}. Ainsi, il a été montré que la phosphorylation de ce site ne modifie pas la conformation du complexe Cycline-CDK, contrairement à la phosphorylation du résidu Thr161, mais néanmoins, perturbe la liaison des CDKs avec leurs substrats⁶⁴. Bien que le résidu Tyr15 soit à proximité du site actif, sa phosphorylation n'empêche pas la fixation de l'ATP^{64,72}. En revanche, il a été suggéré que le phosphate au niveau de ce résidu puisse altérer la conformation et/ou l'orientation de l'ATP, contribuant ainsi à la diminution du pouvoir catalytique du CDK1^{71,64,72}.

La principale enzyme impliquée dans la phosphorylation du résidu Tyr15 est la sérine/thréonine kinase Wee1, dont les homologues ont été identifiés chez tous les eucaryotes. Le gène correspondant a été identifié pour la première fois chez la levure *S.pombe*, lors d'un criblage génétique qui a permis d'isoler le gène *Cdc2*⁷⁵. L'inactivation de ce gène s'est avérée responsable de l'entrée précoce des cellules en mitose, réduisant la taille de moitié par rapport au type sauvage⁷⁵. À l'inverse, la surexpression de Wee1 conduit à un prolongement de la durée de la phase G2 avec des cellules jusqu'à quatre fois plus grandes qu'en conditions normales⁷⁵. Ces résultats suggèrent un rôle important de Wee1 dans le processus

coordonnant la division cellulaire et la croissance cellulaire. Par la suite, une deuxième kinase, Mik1 (Mitotic inhibitor kinase 1), également capable de phosphoryler CDK1 au niveau du résidu Tyr15 a été identifiée⁷⁶. Bien que les deux kinases Wee1 et Mik1 phosphorylent le même résidu, il a été montré que, contrairement à la délétion du gène *Wee1*, la délétion de *mik1* n'a aucun effet sur la croissance cellulaire⁷⁶. En revanche, la double délétion *mik1/ wee1* conduit à un phénotype létal⁷⁶.

Un deuxième résidu près de Tyr15, Thr14, est également phosphorylé chez tous les eucaryotes supérieurs^{60,61,77}. La phosphorylation sur ces résidus Tyr15 et Thr14 maintient Cdc2 dans un état inactif au cours des phases S et G2 du cycle cellulaire^{70,78}. Il a été montré que la déphosphorylation de ces deux résidus prenait place à la transition G2 / mitose, de manière concomitante avec l'activation de la kinase Cdc2⁶⁰. La fonction de la phosphorylation du résidu Thr14 a été abordée en étudiant le comportement de formes mutantes de Cdc2 dans lesquelles les résidus Thr14 et/ou Tyr15 ont été remplacés par des acides aminés non phosphorylables. L'expression des formes mutantes de Cdc2 dans deux systèmes hétérologues (Cdc2 de poulet exprimée dans des cellules humaines HeLa⁷⁹ ou Cdc2 de souris traduite dans des extraits d'ovocytes de Xénopes⁷⁷) ont produit des résultats similaires : l'expression de mutants simples n'a pas d'effet significatif alors que le double mutant entraîne une activation prématurée de la kinase Cycline B-Cdc2 et une entrée prématurée des cellules en mitose. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation d'un des deux résidus est suffisante pour empêcher l'activation de Cdc2. Ainsi, la déphosphorylation des deux résidus est donc une étape essentielle pour initier l'entrée cellulaire en mitose⁶⁰.

En parallèle, différentes études ont montré que l'expression d'un mutant non phosphorylable du CDK1 sur les résidus Thr14 et Tyr15 dans des cellules de mammifères compromet le déroulement normal du cycle cellulaire⁷⁶. En effet, l'expression de ce mutant induit une entrée précoce des cellules en mitose après un défaut de réplication du génome⁸⁰. Ainsi il a été proposé que la phosphorylation des résidus Thr14 et Tyr15 permet à la cellule d'atteindre une concentration suffisante de complexes Cycline B1-CDK1 nécessaire pour le bon déroulement de la mitose^{32,81}.

Igarashi et al ont identifié l'homologue humain de la kinase Wee1, à la recherche d'une protéine humaine qui pourrait compenser la perte de fonction du gène *Wee1* chez la levure *S.pombe* (*huWee1*)⁸². Bien que les différences structurales existent entre la kinase Wee1 humaine et son homologue chez *S.pombe*⁸³, la surexpression de la kinase *huWee1* conduit également à un arrêt des cellules humaines en phase G2⁸⁴. La kinase humaine a une taille

beaucoup plus petite que son homologue chez la levure avec 214 acides aminés en moins dans la région régulatrice amino-terminale⁸³. Son domaine catalytique possède seulement 29 % d'identité avec la kinase Wee1 de *S.pombe*⁸⁵. Contrairement à son homologue chez la levure qui est capable de phosphoryler les deux résidus Tyr15 et Thr14, la kinase huWee1 phosphoryle exclusivement le résidu Tyr15, suggérant qu'une deuxième kinase est requise pour phosphoryler le résidu Thr14 de Cdc2⁸³⁻⁸⁵.

La kinase Myt1 (Membrane-associated tyrosine and threonine specific Cdc2 inhibitory kinase 1), de séquence très similaire à la kinase huWee1 (46% d'identité)⁸⁶, a été initialement identifiée dans les fractions membranaires d'extraits d'ovocytes de Xénopes⁸⁷. Myt1 est responsable de la phosphorylation du résidu Thr14, et est également capable de phosphoryler le résidu Tyr15 sur Cdc2⁸⁸⁻⁹¹. En particulier, une corrélation temporelle entre la phosphorylation des résidus Thr161 et Thr14 a été montrée, suggérant que Myt1 peut inactiver rapidement le complexe Cycline B1-CDK1 après assemblage^{92,93}.

Enfin, il est intéressant de noter que la kinase Wee1 peut phosphoryler à la fois Cdc2 et CDK2, contrairement à la kinase Myt1 qui ne phosphoryle que Cdc2^{83,94}.

◆ Déphosphorylation activatrice des résidus Thr14 et la Tyr15 :

En utilisant la même approche génétique, Nurse et ses collègues ont identifié la phosphatase Cdc25. Il antagonise l'activité des levures *S.pombe* kinases Wee1 et Mik1^{76,95}. En effet, il observa que la délétion de Cdc25 entraîne un arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/mitose, et qu'à l'inverse sa surexpression induit une entrée prématurée des cellules en mitose de manière dose-dépendante⁹⁵. La délétion de Cdc25 associée à un arrêt des cellules en fin de phase G2, est caractérisée par une accumulation de complexes Cycline B1-Cdc2 inactifs, phosphorylée sur le résidu Tyr15^{70,96}. Chez *Drosophila melanogaster*, l'homologue de la phosphatase Cdc25, fût décrit comme un élément essentiel contrôlant le timing et la localisation des divisions cellulaires au cours de l'embryogenèse⁹⁷. D'autre part, chez *Xenopus laevis* l'addition de protéine Cdc25 purifiée en excès dans des extraits d'ovocytes conduit à la déphosphorylation prématurée du résidu Tyr15 et à l'activation du complexe Cycline B1-CDK1, détectée par la phosphorylation de l'Histone H1^{98,99}. Dans ce cadre, plusieurs équipes ont montré que Cdc25 est responsable de la déphosphorylation du CDK1, de manière directe, sur son résidu Tyr15^{98,100-103}.

La phosphatase Cdc25 est une phosphatase atypique appelée Dual-Specificity Phosphatase (DSPase)¹⁰⁴. En effet, Cdc25 possède non seulement le motif HCX5R commun à toutes les tyrosine phosphatases, mais présente également une forte identité avec la phosphatase VH1 du virus de la vaccine au niveau de son domaine carboxy-terminal, avec des résidus sérine et tyrosine¹⁰⁵. Ainsi Cdc25 est responsable de la déphosphorylation à la fois du résidu Tyr15 mais également du résidu Thr14, ce qui conduit à l'activation du CDK1 chez les eucaryotes supérieur¹⁰⁶.

Des homologues de Cdc25 sont présents chez tous les eucaryotes¹⁰⁷. Chez l'homme, le génome est constitué de trois gènes codant pour les isoformes de Cdc25 (Cdc25A, B et C), chacun subissant plusieurs épissages alternatifs¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Cdc25A,B,C sont capables de déphosphoryler CDK1 et CDK2, alors que seule Cdc25A est capable de déphosphoryler le complexe Cycline D-CDK4/6 présents en phase G1^{106,110}.

L'analyse du rôle des Cdc25s chez la souris a permis de mettre en évidence une redondance fonctionnelle partielle¹¹¹⁻¹¹³. En effet, seule l'inactivation du gène Cdc25A est létal chez la souris à un stade précoce de l'embryogenèse (5-7^{ème} jours)¹¹¹. Les souris avec les gènes Cdc25B et/ou Cdc25C désactivés ne présentent aucun phénotype spécifique, à l'exception de l'infertilité féminine associée à l'échec de la maturation des ovocytes^{112,113}. Les cellules fibroblastiques (MEF ; Mouse Embryonic Fibroblasts) Cdc25B^{-/-} et Cdc25C^{-/-} présentent une prolifération et une réponse aux lésions de l'ADN normales^{111,114}. Cependant, il est intéressant de noter que l'inactivation conditionnelle de Cdc25A chez l'adulte, à l'inverse de l'embryon, est compensée par Cdc25B et/ou Cdc25C¹¹⁴.

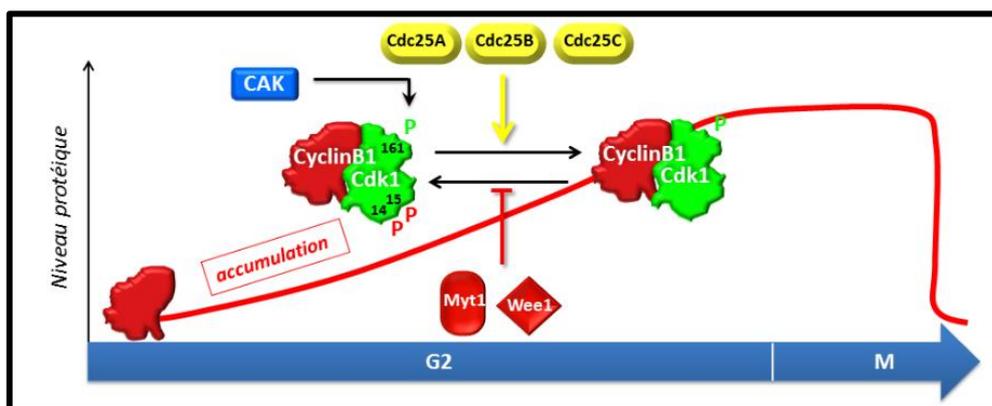


Figure 12 : Régulation de l'activité du complexe Cycline B1-CDK1 chez les mammifères¹¹⁴.

4. Cinétique d'activation du MPF :

Les mécanismes de régulation du complexe Cycline B1-CDK1 sont si complexes que la séquence des étapes moléculaires qui se produisent lors de la progression en G2 et conduisent à l'activation du complexe Cycline B1-CDK1 ne sont pas encore bien caractérisées. L'une des questions fondamentales abordée par de nombreuses études a été de déterminer à quel moment et/ou dans quel compartiment subcellulaire l'activation initiale du complexe Cycline B1-CDK1 prend place au cours de la progression G2-mitose.

Pour répondre à cette question, il a été développé un pseudo-substrat spécifiquement phosphorylé par Cycline B1-CDK1, et non par les complexes Cycline E-CDK2 ou Cycline A2-CDK2, dont les propriétés de fluorescence varient en fonction de son état phosphorylé versus non phosphorylé (Biosenseur FRET : Förster Resonance Energy Transfer)^{115,116}. Grâce à cette approche expérimentale, nous avons pu analyser en temps réel la cinétique d'activation de la Cycline B1-CDK1 et suivre chaque cellule individuellement par vidéo microscopie. Les auteurs ont pu déterminer que l'activation initiale du complexe Cycline B1-CDK1 prenait place de manière parfaitement reproductible en fin de phase G2, 20 min avant la rupture de l'enveloppe nucléaire dans les cellules humaines¹¹⁶. De manière remarquable, cette activation initiale est suffisante pour initier plusieurs événements cellulaires, dont l'import nucléaire du complexe Cycline B1-CDK1, et ainsi permettre l'entrée en prophase^{115,116}. Cette activation est ensuite suivie d'une augmentation progressive de l'activité Cycline B1-CDK1 au cours de la prophase¹¹⁵. Par ailleurs, il a été mis en évidence que différents niveaux d'activités permettent de contrôler différents événements cellulaires comme la rupture de l'enveloppe nucléaire¹¹⁵. Ces résultats suggèrent que l'activation progressive de la Cycline B1-CDK1 au cours de la transition mitotique est un moyen de coordination de la réorganisation cellulaire. L'activation initiale du complexe Cycline B1-CDK1 suggère qu'un changement rapide de l'équilibre entre les activités opposées des kinases inhibitrices (Wee1 & Myt1) et des phosphatases activatrices (Cdc25A, B, C) prend place en fin de phase G2 par des mécanismes moléculaires qui restent à élucider.

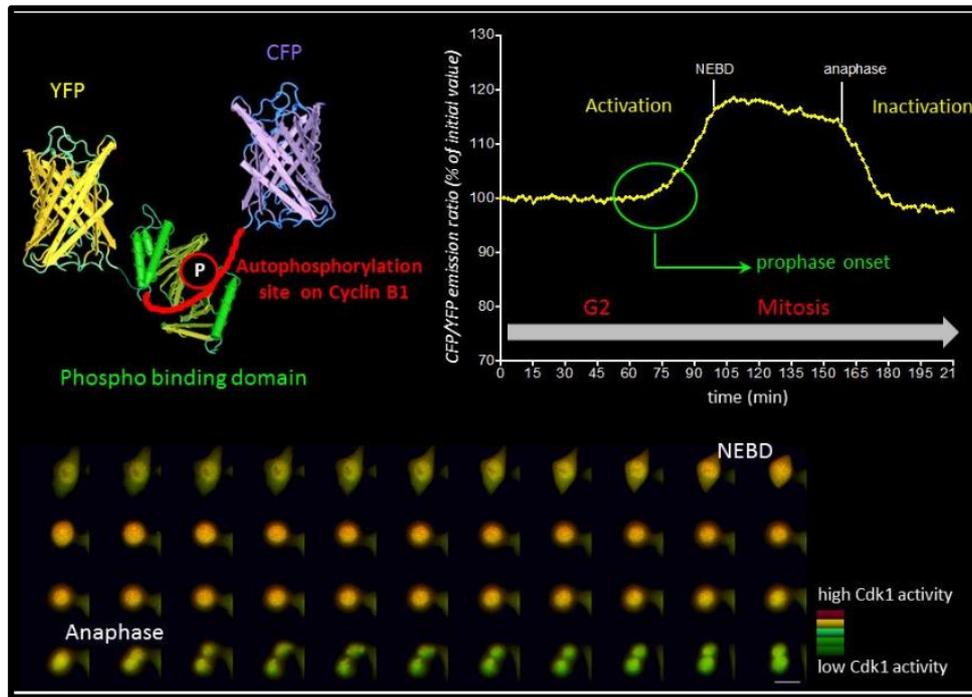


Figure 13: Suivi en temps réel de la cinétique d'activation du complexe Cycline B1-CDK1 au cours du cycle cellulaire¹¹⁵.

L'activité du complexe Cycline B1-CDK1 a été analysée en temps réel par vidéo-microscopie sur cellule vivante via l'utilisation d'un biosenseur FRET représenté en haut à gauche de la figure^{115,116}.

5. Mode d'activation du MPF :

L'entrée en mitose, ou transition G2 / M, est sous le contrôle du complexe Cycline B / CDK1, et se réalise de manière brutale. Or, on peut constater que la Cycline B est synthétisée pendant une longue période du cycle, et que le complexe Cycline B / CDK1 se forme progressivement au cours des phases S et G2⁰⁶.

L'ensemble du processus peut être décomposé en trois temps :

1. Formation d'un stock de Cycline B / CDK1 inactif (pré-MPF).
2. Activation de ces complexes.
3. Action de ces complexes.

01. Constitution d'un stock de Cycline B / CDK 1 inactif (Pré-MPF)

La Cycline B s'accumule progressivement pendant les phases S et G2, ce qui conduit à une accumulation graduelle du complexe au fur et à mesure que la cellule approche de la mitose. La CDK1 est alors phosphorylée sur la thréonine 161 par la CAK (Cycline H / CDK7), mais reste inactive à cause de la phosphorylation de 2 acides aminés voisins (tyrosine 15 et thréonine 14) par la protéine Wee-1. Ainsi, quand la cellule atteint la fin de la phase G2, elle contient un abondant stock de Cycline B / CDK1 (stock de pré-MPF inactif) prêt à agir mais dont l'activité est réprimée par la présence de 2 groupes phosphate qui bloquent la kinase. Pré-MPF = Cycline B / CDK1 Tr 161p, Tr 14p, Ty 15p ⁰⁶.

02. Activation brutale des Cycline B / CDK1

L'activation du stock de Cycline B / CDK1 est le résultat d'une série de réactions interdépendantes⁰⁶ :

Lorsque la réplication est terminée, la phosphatase Cdc25 n'est plus séquestrée dans le cytoplasme et passe dans le noyau, et en fin de phase G2, la phosphatase Cdc25 est activée, probablement par phosphorylation par la kinase Polo. Cdc 25 a alors pour action d'enlever les deux phosphates inhibiteurs de Cycline B / CDK 1. Ceci permet l'activation d'une petite partie du stock de Cycline B / CDK1.

CDK 1 peut alors phosphoryler Cdc 25 (sur un site différent de celui de la kinase Polo). Cette phosphorylation active Cdc 25 : Cycline B / CDK 1 active donc son propre activateur (Processus d'auto-activation). Dans le même temps, Cycline B / CDK 1 phosphoryle Wee 1, inhibant cette protéine : Cycline B / CDK1 inhibe donc son propre inhibiteur.

Ce double mécanisme de rétrocontrôle positif permet d'obtenir rapidement et de façon irréversible une grande quantité de complexes Cycline B / CDK1 actifs (Feed-back positif). Selon ce mécanisme, une activation partielle de Cdc 25 par la kinase Polo permet l'activation d'une sous population de complexes Cycline B / CDK 1 qui, par la suite, phosphoryle plus de Cdc-25 et de Wee-1. Ceci permet plus de déphosphorylation de Cycline B / CDK1 et aboutit à une très rapide activation de tous les complexes Cycline B / CDK 1 dans la cellule.

03.Mode d'action des complexes activés

Les complexes Cycline B / CDK 1, une fois activés, permettent l'entrée en mitose. Pour cela, ils interviennent en déclenchant un certain nombre de phénomènes qui prennent place au début de la mitose, c'est à dire en prophase⁰⁶.

Les effets sur le cycle de l'activité de chaque complexe (ici Cycline B / CDK1) dépendent donc des protéines cibles que chaque complexe phosphoryle.

▪ **Protéines cibles de Cycline B / CDK1 :**

Au début de la mitose, les complexes Cycline B / CDK1 activés agissent en phosphorylant diverses protéines cibles. Parmi ces nombreuses protéines, on trouve :

- ◆ Les condensines, les histones H1 et H3, impliquées dans la condensation des chromosomes.
- ◆ Les lamines, qui permettent la désorganisation de l'enveloppe nucléaire.
- ◆ Des protéines associées aux microtubules (MAPs), qui permettent l'assemblage du fuseau mitotique.

▪ **Conséquences de l'activité des complexes Cycline B / CDK1 :**

Globalement, l'activité kinase de ce complexe permet de provoquer de très nombreux évènements de la mitose :

- La condensation des chromosomes.
- La désorganisation de l'enveloppe nucléaire.
- Le réarrangement du cytosquelette de tubuline et l'assemblage du fuseau mitotique.
- L'attachement des chromosomes répliqués au fuseau.
- Le réarrangement de l'actine.
- La réorganisation du Golgi et du Reticulum Endoplasmique.

6.La chute du MPF :

Une fois les chromosomes alignés et correctement attachés de manière bipolaire au fuseau mitotique, l'anaphase commence et les chromatides sœurs se séparent vers les deux pôles du fuseau mitotique. La sortie de la phase-M dépend alors de la dégradation de plusieurs protéines : les Cyclines B mitotiques, ce qui inactive CDK1, la Sécurine et les cohésines. La sécurine inhibe la séparaase, une protéine impliquée dans le clivage de la cohésine centromère, en se liant, et est donc essentielle pour maintenir la liaison centromère entre les chromatides

sœurs jusqu'à la métaphase. En début d'anaphase, la dégradation de la Sécurine libère la Séparase. Elle clive alors les cohésines centromériques. Les chromatides sœurs, n'étant plus attachés l'une à l'autre, peuvent être tractés vers les pôles par la dépolymérisation active des microtubules kinétochoriens. La dégradation de la Cycline mitotique combinée à la dégradation de la sécurine permet à l'inactivation du CDK1 de coordonner la séparation des chromatides sœurs. Cette coordination est conservée de la levure jusqu'à l'homme et dépend de l'activité de l'E3 ubiquitine ligase APC/C, également appelée Cyclosome^{117,118}.

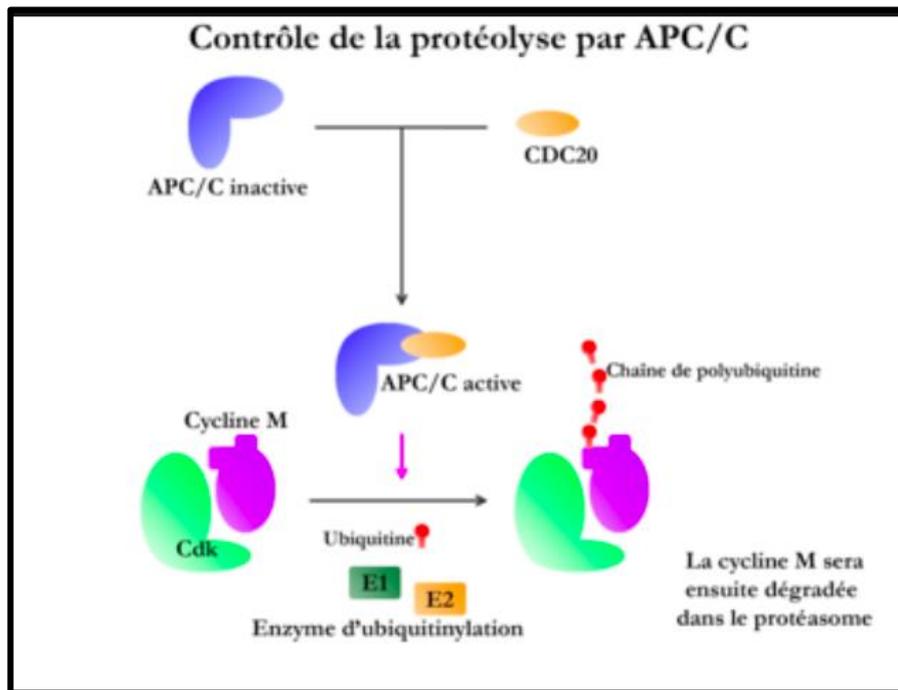
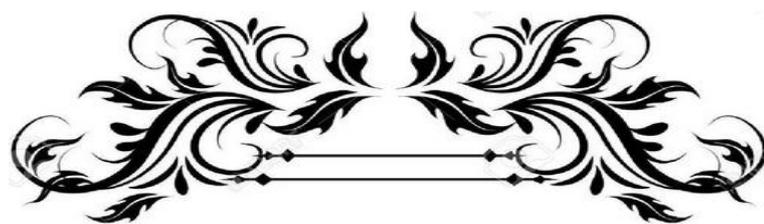
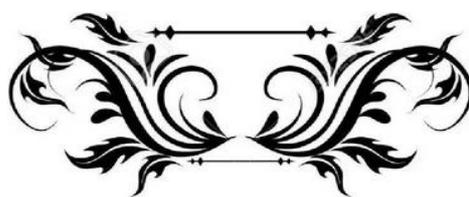


Figure 14: Contrôle de la protéolyse par APC/C¹¹⁷.



*Chapitre 3: Le
MPPF, une cible
thérapeutique potentiel
contre le cancer*



A. Les fonctions du CDK1 :

Après la découverte de *cdc2* chez la levure, les complexes CDKs/Cycline ont été caractérisés dans de nombreux organismes et les CDKs se sont rapidement imposées comme les régulateurs universels de la division cellulaire. Récemment, la découverte de nouvelles CDKs sans rôle évident dans le cycle cellulaire, mais avec des fonctions différentes au sein de la cellule, a élargi la portée de la famille des CDKs pour réguler la transcription, l'apoptose, la différenciation ou la fonction neuronale.

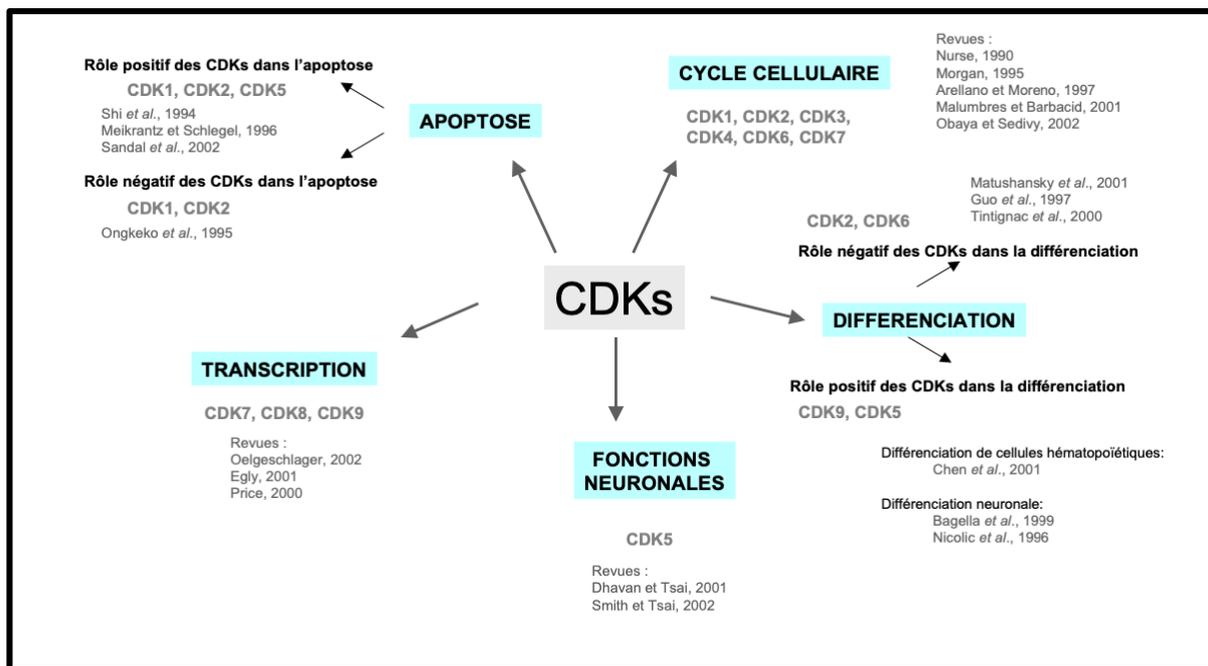


Figure 15 : Fonctions des CDKs.

En particulière, selon la figure montrée au-dessus on observe l'implication du CDK1 dans deux fonctions majeures :

- Cycle cellulaire :

L'entrée en mitose, ou transition G2 / M, est sous le contrôle du CDK1 liée avec son Cycline B, et il est bien expliquée dans le chapitre précédant¹¹⁹.

- L'apoptose :

De nombreuses études ont suggéré que les CDKs sont impliquées dans le processus apoptotique¹²⁰. Cependant, les conclusions contradictoires auxquelles aboutissent ces études ne permettent pas encore de définir le rôle précis que jouent les CDKs dans l'apoptose. Alors

que certains travaux suggèrent que les CDKs sont impliquées de manière "positive" dans le déclenchement de l'apoptose, d'autres en revanche soutiennent l'hypothèse inverse. La variété des modèles cellulaires utilisés et des stimuli apoptotiques utilisés explique certainement en partie ces écarts. Divers arguments ont été avancés pour prouver l'implication des CDKs dans l'apoptose.

Le premier argument réside dans l'observation que l'activité des CDKs spécifiques est altérée au cours de l'apoptose et que la modulation de cette activité pourrait affecter l'initiation de ce processus. Ainsi, certaines CDKs sont activées au cours de l'apoptose et l'abolition de leur activité par différents moyens inhibe l'apoptose¹²¹. A l'inverse, une autre étude a démontré que l'abolition de l'activité CDK favorise l'apoptose, suggérant une implication négative des CDKs dans le déclenchement de ce processus¹²².

Un second argument soutenant l'hypothèse d'une implication des CDK dans l'apoptose réside dans l'observation que les CDKs phosphorylent et altèrent les propriétés physiologiques de régulateurs spécifiques de l'apoptose. Ainsi, Bcl-2 est phosphorylée de façon dépendante du cycle en phase M par CDK1/Cycline B¹²³. Un autre exemple est apporté par la survivine¹²⁴. La survivine phosphorylée sur la Thr34 en phase M par CDK1/Cycline B séquestre la caspase 9, empêchant l'apoptose. L'abolition de cette phosphorylation par mutation du résidu thréonine en alanine conduit à la libération de la caspase 9 et au déclenchement de l'apoptose. En d'autres termes, la survivine doit ses propriétés anti-apoptotiques en mitose à la phosphorylation par CDK1/Cycline B.

Enfin, un troisième argument soutenant l'hypothèse d'une implication du CDK dans l'apoptose est apporté par des études utilisant des approches pharmacologiques utilisant des inhibiteurs chimiques des CDKs.

B.L'influence des CDK1 dans le développement de Cancer :

L'implication des CDKs dans des fonctions cellulaires critiques telles que le cycle cellulaire, l'apoptose, voire la transcription nécessite que leur activité soit régulée de manière très précise pour maintenir l'intégrité cellulaire et assurer son bon fonctionnement. Une dérégulation des CDKs est observée dans certains états pathologiques, mais il n'est pas toujours clairement établi s'ils sont la cause ou la conséquence de la maladie.

Ainsi, la régulation du cycle cellulaire est également contrôlée par un équilibre perpétuel entre les activateurs du CDK (Cyclines, CDC25, CAK) et les inhibiteurs (CKI). Cependant, des

mutations de gènes peuvent mener à une altération de cet équilibre. Le déséquilibre ainsi créé peut faire pencher la balance vers une inhibition totale du cycle, dans ce cas la cellule meurt (apoptose), ou vers une sur-activation où la cellule va alors se diviser d'une manière incontrôlée donnant naissance à des tumeurs³.

Une régulation aberrante des CDK du cycle cellulaire, en particulier celles conduisant à leur hyperactivité, permet aux cellules d'échapper à leur régulation et de proliférer de manière non régulée, conduisant à l'apparition et au développement d'un cancer¹²⁵⁻¹²⁸. La plupart des exemples concerne des dérégulations conduisant à l'hyperactivité des CDKs.

Ainsi, une hyperactivité des CDKs du cycle cellulaire est observée dans de nombreux cancers. En effet, Cette étude a montré que CDK1 est fortement surexprimée dans plusieurs tumeurs malignes. Nous avons utilisé la base de données TIMER 2.0 et évalué le modèle d'expression du CDK1 dans toutes les tumeurs TCGA. L'analyse différentielle de l'expression génique avec des échantillons normaux a démontré que les tumeurs ont tendance à surexprimer CDK1.

Compte tenu de son rôle dans la régulation du cycle cellulaire, processus vital pour la prolifération des cellules tumorales, le ciblage du CDK1 est une stratégie prometteuse¹²⁹.

L'analyse de Gepia2 a également montré une expression élevée du CDK1 dans les tumeurs, à l'exception de la leucémie myéloïde aiguë (LAML), dans laquelle une régulation négative du CDK1 a été observée. Parmi les tumeurs TCGA, le carcinome épidermoïde cervical et l'adénocarcinome endocervical (CESC), le glioblastome multiforme (GBM), le lymphome lymphoïde diffus à grandes cellules B (DLBC), le carcinome urothélial de la vessie (BLCA), le carcinome corticosurrénalien (ACC), le carcinome invasif du sein (BRCA) a montré des niveaux d'ARNm significativement élevés du CDK1 par rapport aux témoins sains normaux¹²⁹.

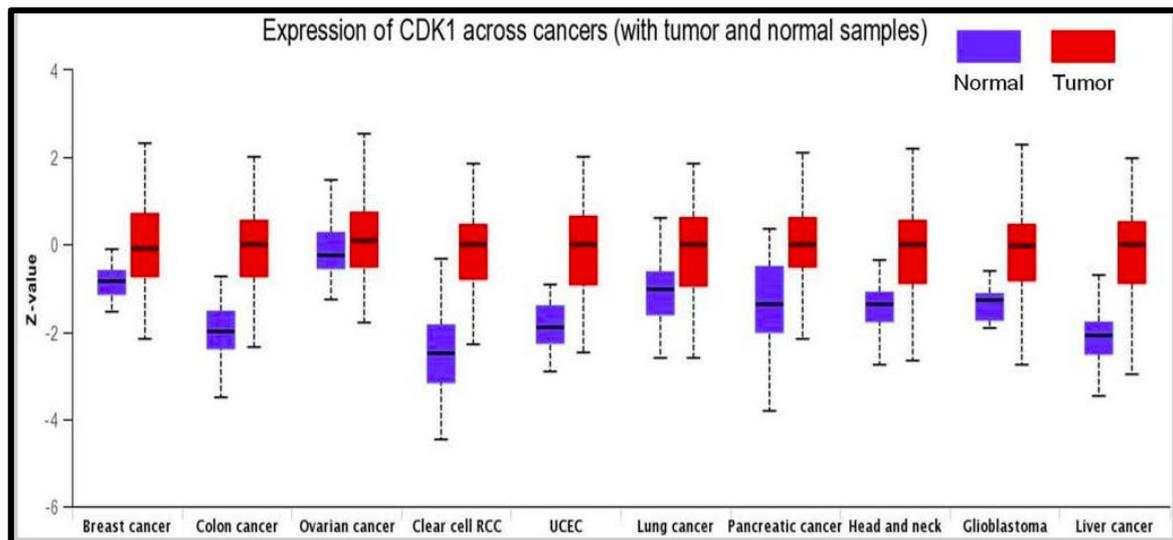


Figure 16 : Analyse de l'expression des niveaux du CDK1 dans le cancer¹²⁹.

C.La cause de l'hyperactivité du CDK1 en cancer :

La cellule cancéreuse est une cellule dont la division n'est plus contrôlée, ce qui développera en prolifération anarchique.

Dans la transition G2/M, les dérèglements du cycle cellulaire conduisent à ces proliférations anarchiques si l'ADN est lésé, ou si la réplication n'est pas achevée.

Dans ce cas, un processus mis en jeu par l'activation de plusieurs voies inhibitrices du complexe CDK 1 / Cycline B permet d'empêcher l'entrée en mitose⁶.

C'est le blocage de transition G2/M : il s'agit pour la cellule de faire en sorte que la mitose ne soit pas déclenchée tant que la réplication n'est pas totalement achevée ou tant que les lésions détectées dans l'ADN qui s'est répliqué ne sont pas réparées. Pour cela, les molécules qui interviennent vont bloquer le processus d'activation de la CDK1⁶.

Deux types de réponses existent :

- La phosphorylation de Cdc25C entraîne sa séquestration dans le cytoplasme, loin de son substrat nucléaire CDK1.
- Le maintien de l'arrêt en G2 fait intervenir également la p53, facteur de transcription de la p21 et d'enzymes de réparation de l'ADN. La p21 bloque l'activité de Cycline B / CDK1.

Ainsi, le complexe Cycline B/CDK1 garde ses phosphorylations inhibitrices, ou bien est bloqué par la p21, tant que la réplication n'est pas achevée : aucune mitose ne débute avant la fin de la réplication⁶.

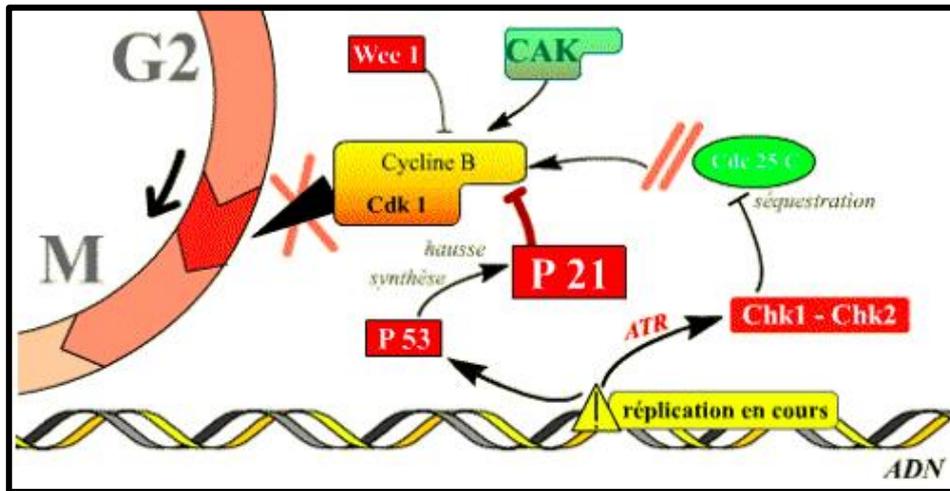


Figure 17 : le blocage de la transition G2/M⁶.

Notamment, dans plus de 50% des cancer le cœur de lésion d'ADN est la mutation sur protéine suppresseur de tumeurs P53. Cette protéine présente généralement une concentration assez basse dans les cellules mais lorsqu'une anomalie de l'ADN est détectée, la concentration en p53 augmente. L'ATM active la Chk2 qui va phosphoryler la protéine p53. Cette dernière va alors stimuler la transcription de différents gènes comme ceux impliqués dans l'apoptose ou la p21, qui est un inhibiteur des CDKs (CKI), et induire l'inhibition du CDK1^{3,130}.

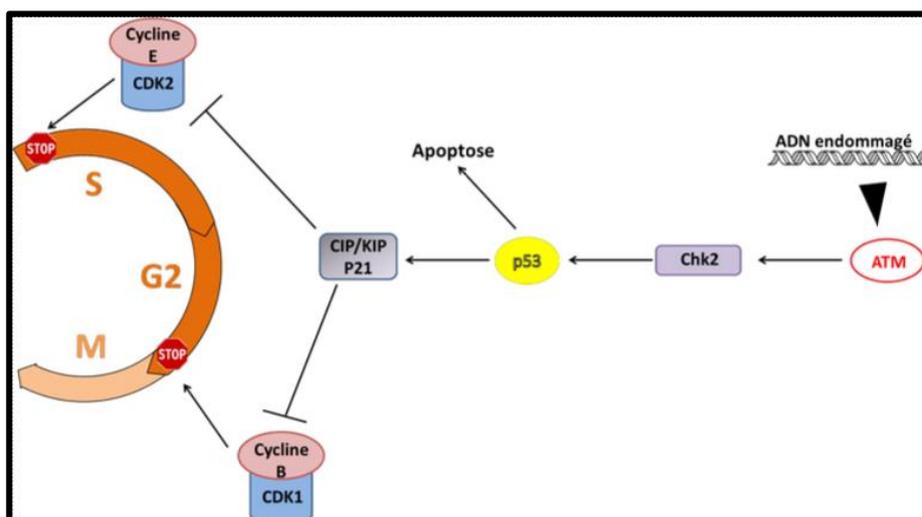


Figure 18 : Fonctions de p53 dans la réparation de l'ADN endommagé⁵.

Alors, lorsqu'il muté, il perd sa fonction à recruter P21, et par conséquent ne plus bloquer le complexe CDK1/Cycline B^{131,132}. Ainsi que, Le p53 muté perd ses autres fonctions impliquées dans l'apoptose, la réparation d'ADN, la transcription des gènes^{133,134}.

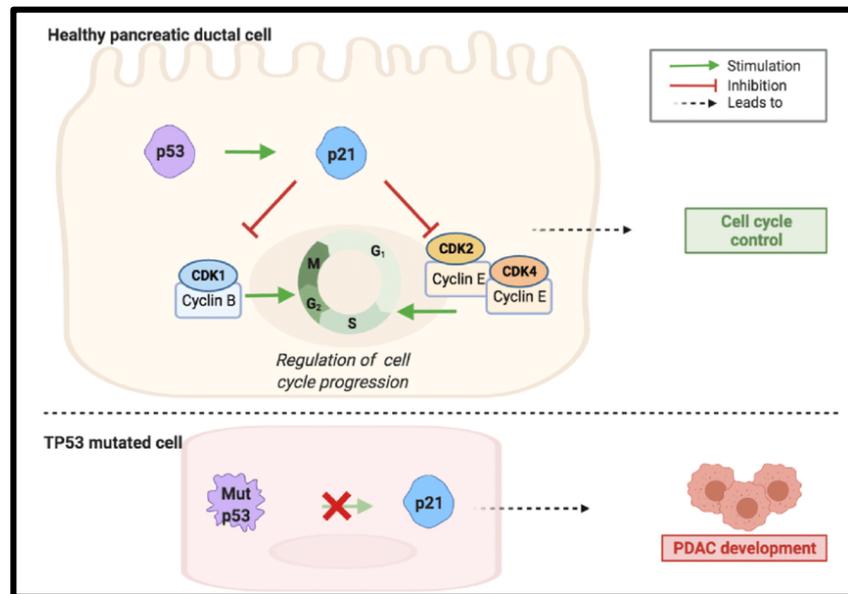


Figure 19 : Implication de P53 dans la prolifération, PDAC(Adénocarcinome canalaire pancréatique)¹³⁵.

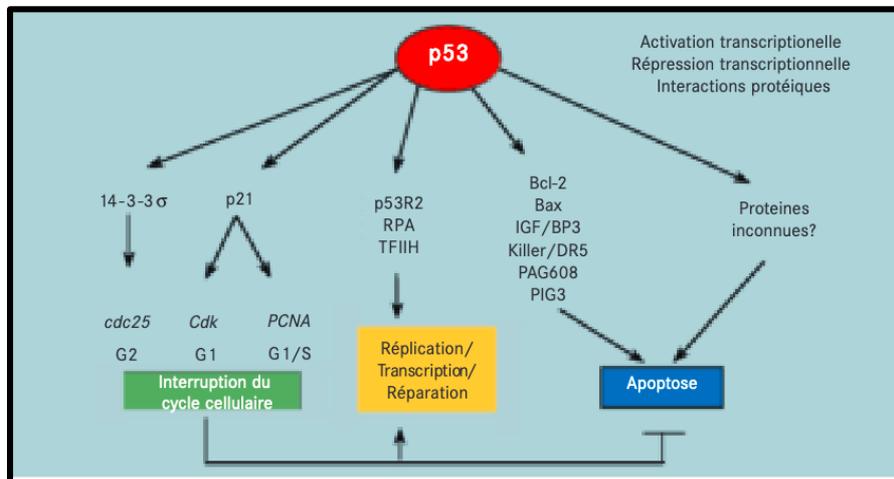


Figure 20 : Implication de P53 dans différentes fonctions¹³⁶.

Aussi, le p53 active le cdc20 qui est la sous-unité activatrice de l'APC/C. Donc le mutant p53 inhibe le cdc20 ce qui bloque la dégradation du Cycline B à la fin de mitose¹³⁷.

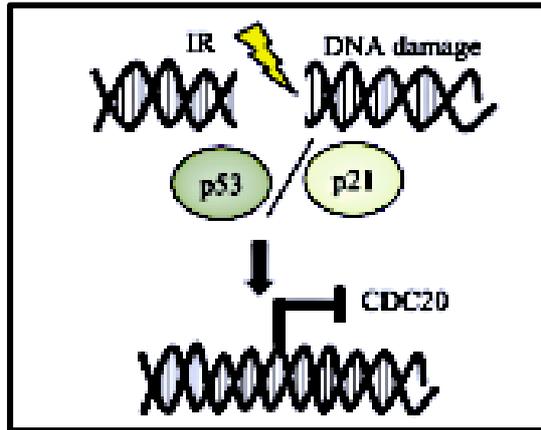


Figure 21 : le mutant P53 inhibe l'expression de CDC20¹³⁷.

Tous ces actions conduisent à l'hyperactivité du MPF et les cellules entrent en prolifération anarchiques avec l'accumulation des altérations d'ADN à chaque division. Enfin, la tumeur devient plus résistante au système immunitaire et plus métastase^{131,132,135}.

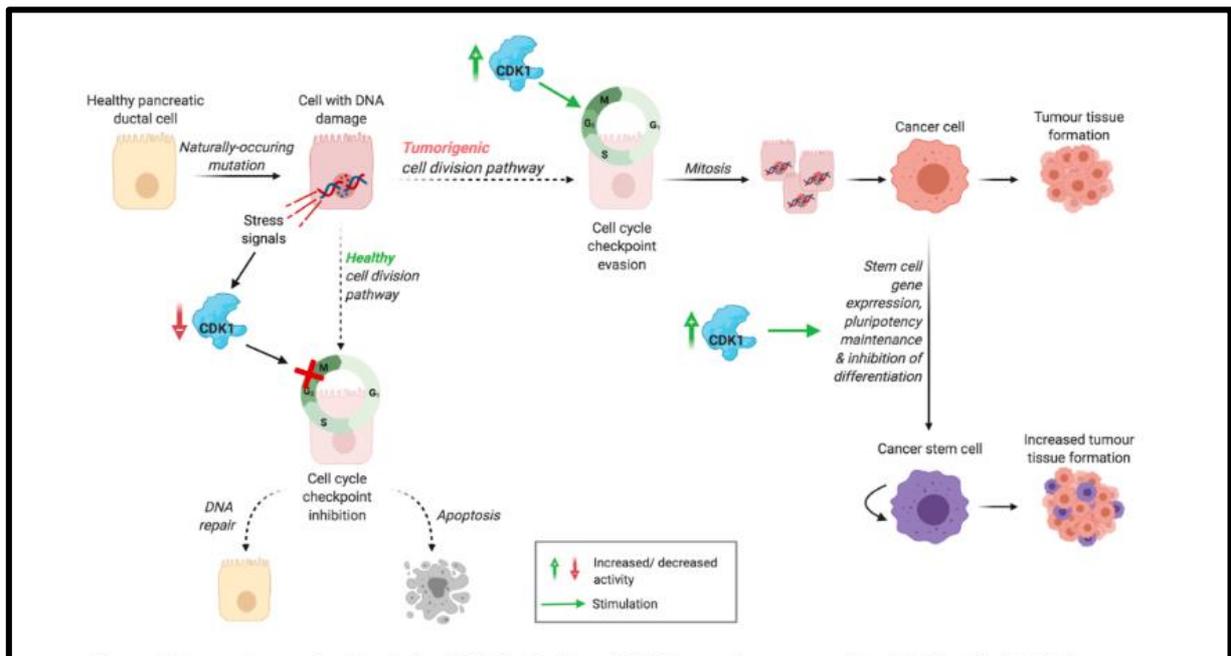


Figure 22 : Activité tumorigène proposée du CDK1¹³⁵.

D.L'inhibition du MPF :

Les défauts observés dans la régulation de la division cellulaire ont stimulé la recherche de composés capables d'inhiber la prolifération des cellules tumorales. L'implication des CDK1 dans un nombre croissant de pathologies a permis de confirmer que cette famille de kinases

constitue une cible thérapeutique de choix et a encouragé la recherche de stratégies permettant de moduler leur activité. Compt tenu de la régulation complexe de cette famille de kinases, la régulation de l'activité du CDK1 peut être obtenue en interférant directement avec leur activité catalytique¹³⁸⁻¹⁴⁴.

1.Origine de projet :

Jusqu'en 2000, l'étude des kinases dans le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses n'était pas considérée comme pertinente. En effet, il semblait difficile de concevoir des inhibiteurs sélectifs parmi les 518 protéines kinases du fait de la similarité de leurs domaines catalytiques par sous-famille.

Cependant, cette idée a été démentie par la découverte du premier inhibiteur de kinases : l'imatinib, également connu sous le nom de Glivec®^{1,144}. Cet inhibiteur efficace dans le traitement du cancer, a été développé par Novartis et commercialisé en 2001. Il est utilisé pour traiter la leucémie myéloïde chronique, une maladie caractérisée par la présence d'une anomalie chromosomique appelée « chromosome de Philadelphie », mais il est également utilisé pour traiter d'autres types de cancer, comme les tumeurs du tractus gastro-intestinal¹⁴⁵. Lors de sa mise sur le marché, le Glivec® a été considéré comme une révolution thérapeutique puisqu'il est capable d'inhiber sélectivement la tyrosine kinase BCR-ABL (kinase appartenant à la famille TK) dont l'expression est due à la présence du chromosome de Philadelphie¹⁴⁴. Ainsi, le mécanisme d'action du Glivec® par inhibition sélective des kinases exprimées dans les cellules tumorales a permis de valider les kinases comme cibles thérapeutiques pour le traitement du cancer.

2.Généralité :

Diverses stratégies inhibitrices sont possibles pour moduler l'activité des CDKs. La stratégie la plus fréquemment rapportée dans la littérature est l'inhibition avec des composés en compétition avec l'ATP. Une autre stratégie récemment mentionnée consiste à utiliser des inhibiteurs de l'ATP non concurrents. Et enfin, la dernière méthode consiste à utiliser des inhibiteurs allostériques¹⁴⁶⁻¹⁴⁸.

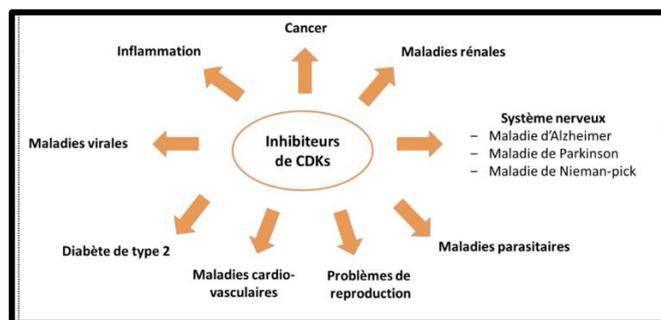


Figure 23 : potentiel thérapeutique des inhibiteurs du CDKs⁵.

01. Les inhibiteurs non compétitifs de l'ATP :

Cette famille de composés est une nouvelle génération d'inhibiteurs qui n'entrent pas en compétition avec l'ATP et ont donc un mécanisme d'action différent des autres types d'inhibiteurs. Il s'agit d'une approche relativement nouvelle du CDK. Par conséquent, très peu de molécules ont été identifiées à ce jour et aucune n'est entrée au stade clinique¹⁴⁹.

02. Les inhibiteurs allostériques :

Cette famille d'inhibiteurs a la spécificité de se lier à l'enzyme en dehors de son site ATP. La liaison à ce site supplémentaire, appelé site allostérique, induit un changement conformationnel de la protéine, modulant ainsi son activité. Ces inhibiteurs ont l'avantage d'être plus sélectifs car ils exploitent l'environnement unique de chaque kinase¹⁵⁰.

L'utilisation de tels inhibiteurs semble une stratégie prometteuse pour les CDK, car ils ont déjà réussi avec des protéines kinases telles que ABL, p38 et MEK1, mais aucun inhibiteur de type CDK n'a été développé à l'heure actuelle¹⁵¹.

03. Les inhibiteurs compétitifs de l'ATP :

La plupart des inhibiteurs connus de la kinase Cycline-dépendante sont des composés en compétition avec l'ATP qui déplacent l'ATP en se liant au site catalytique (ATP) de l'enzyme cible. Actuellement la stratégie la plus efficace pour développer de puissants inhibiteurs des CDK du cycle cellulaire¹.

De nombreux composés ont été brevetés comme inhibiteurs potentiels du CDKs. Ces composés ont été publiés dans plusieurs revues, dont certaines sont actuellement en développement clinique^{152,153-158}.

Les structures de ces molécules sont très diverses et sont généralement des dérivés mixtes ou non de purines, de pyrimidines, d'indoles, de pyrazoles, de thiazoles, ou des dérivés de composés naturels tels que les familles des staurosporines et des flavones¹⁴⁹.

Nous avons choisi de ne présenter que les molécules qui sont en cours de développement clinique¹⁵³⁻¹⁵⁸.

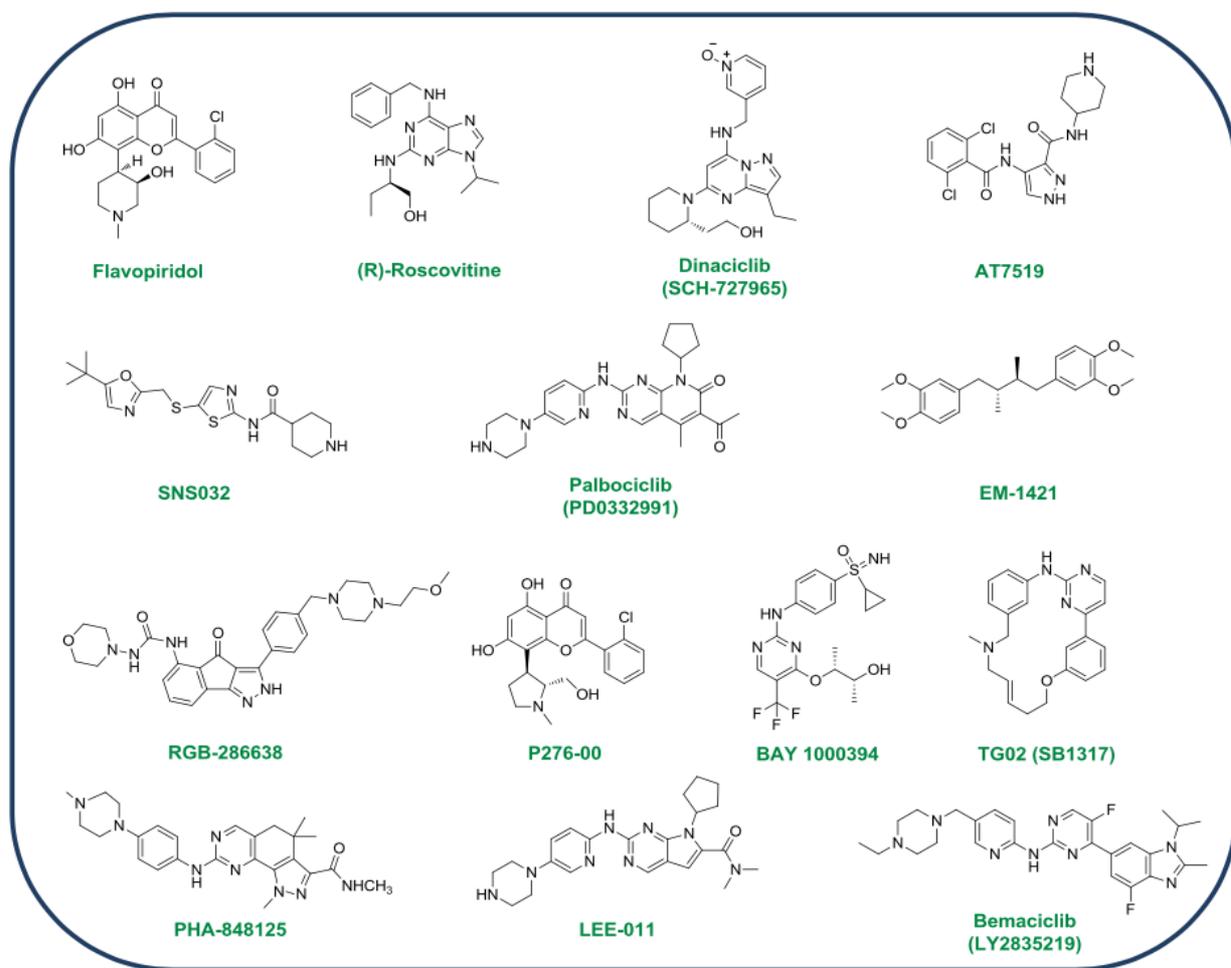


Figure 24 : Composés des inhibiteurs compétitifs de l'ATP en cours de développement clinique⁵.

Ces molécules ont généralement une structure plane et possèdent presque toutes des noyaux aromatiques hétérocycliques ou hydrophobes. Ils ne sont pas très sélectifs car la plupart affectent également d'autres CDKs. Cette faible sélectivité conduit à la complexité du dosage lors des études cliniques. En effet, lorsqu'ils sont utilisés à fortes doses, ces composés deviennent toxiques. Au contraire, lorsqu'ils sont utilisés à faible dose, ils deviennent très inefficaces.

En résumé, jusqu'à présent, le degré élevé d'homologie entre tous les CDK représente un inconvénient majeur dans le développement d'inhibiteurs hautement sélectifs. C'est une stratégie intéressante car elle donne accès à des inhibiteurs sélectifs de la cytotoxicité. Cependant, savoir quels CDKs ou CDK/Cycline complexes à cibler spécifiquement reste un défi. Répondre à ce point nécessite de mieux comprendre quelles CDK conduisent à la progression tumorale dans différents types de cancer. Cependant, cela n'a pas encore été évalué dans des études cliniques, peut-être parce que les inhibiteurs du CDKs testés ne sont pas assez sélectifs.

3. Recherche et optimisation des inhibiteurs du CDK1 :

L'optimisation d'un inhibiteur du CDK1 commence par le criblage d'une bibliothèque de composés. Parallèlement, les molécules candidates sont soumises à des tests qui permettent d'évaluer séquentiellement deux critères majeurs : la puissance et la sélectivité.

L'évaluation de la puissance du composé contre une cible de choix (CDK1) est réalisée par des tests d'activité kinase *in vitro* à des concentrations croissantes de molécules candidates. Dans ce test, l'enzyme purifiée (native ou recombinante) est incubée en présence de son substrat et d'ATP radio-marqué. L'activité de l'enzyme est évaluée en mesurant la quantité de phosphate radioactif incorporé dans le substrat. L'addition de concentrations croissantes de la molécule à tester permet d'obtenir une courbe dose-réponse et de déterminer l'IC₅₀ de la molécule, c'est à dire la concentration de molécule qui inhibe 50% de l'activité maximale de l'enzyme¹⁵⁹. Cette IC₅₀ permet d'évaluer le pouvoir inhibiteur d'un composé et facilite la comparaison de différents inhibiteurs entre eux. Cependant, il convient d'être prudent lors de la comparaison des valeurs d'IC₅₀ entre les composés. En effet, cette valeur dépend de la concentration en ATP utilisée dans le dosage et cette concentration peut varier selon les études¹⁵⁹.

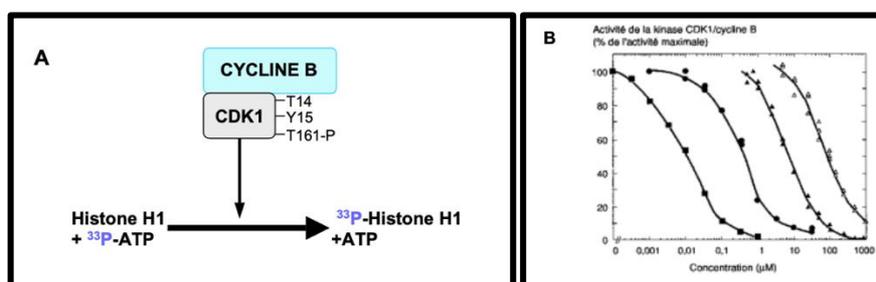


Figure 25 : A) Principe du dosage de l'activité CDK1/Cycline B ; B) Un exemple d'étude structure-activité¹⁶⁰.

Si un composé présente une valeur IC₅₀ intéressante à l'issue de ce premier test, il subit une deuxième série de tests visant à évaluer sa sélectivité. La sélectivité d'un composé mesure sa capacité ou non à inhiber d'autres kinases que celles sur lesquelles il a été initialement identifié. Le plus souvent elle se mesure en testant l'efficacité du composé sur un panel de kinases purifiées. Si un composé inhibe plusieurs kinases, il est dit non sélectif, ne montrant aucune préférence particulière par rapport aux autres familles. En revanche, un composé est dit sélectif s'il est capable d'inhiber plus efficacement une famille de kinases plutôt qu'une autre ou même au sein d'une famille, un membre plutôt qu'un autre. A la différence de l'efficacité, la sélectivité ne se mesure pas de manière stricte et son appréciation est soumise à de grandes variations selon l'importance des moyens mis en œuvre pour l'évaluer (nombre de kinases testées et éloignement de ces kinases de la cible initiale). En d'autres termes, plus un composé est testé avec des kinases différentes, plus l'évaluation de sa sélectivité sera précise¹⁶¹.

Tableau 1 : les inhibiteurs du CDKs optimisées en cours d'essais cliniques⁵.

Composé	Société	Voie d'administration	CDK ciblée	Stade de développement
Flavopiridol	Sanofi-Aventis	intraveineuse	CDK1, 2, 4, 6, 9	II
Roscovitine	Cyclacel	oral	CDK1, 2, 7, 9	II
Dinaciclib	Merck	intraveineuse	CDK1, 2, 5, 9	III
SNS032	Sunesis	intraveineuse	CDK2, 7, 9	I
AT7519	Astex	intraveineuse	CDK1, 2, 4, 5, 9	I/II
PD0332991	Pfizer	oral	CDK4, 6	III
EM-1181	Erimos	intraveineuse	CDK1	I/II
RGB-286638	Agennix	intraveineuse	CDK1,2,3,4,9	I
P276-00	Nicholas Piramal	intraveineuse	CDK1, 4, 9	II
BAY-1000394	Bayer	oral	CDK1,2,3,4,7,9	I
TG02/SG1317	S* ² BIO/Tragara	oral	CDK1,2,3,5,9	I
PHA-848125	Nerviano	oral	CDK1, 2, 4, 5	II
LEE-011	Novartis / Astex	oral	CDK4, 6	III
LY2835219	Eli Lilly	oral	CDK4, 6	I

4. Identification de l'inhibiteur du CDK1 :

La conception d'inhibiteurs compétitifs de l'ATP reste l'approche la plus étudiée. Des composés comme le Dinaciclib sont en essais cliniques de phase III et se sont avérés très efficaces. A l'heure actuelle, c'est le composé dont les études sont les plus avancées en vue d'une utilisation en tant qu'inhibiteurs du CDK1 pour le traitement des cancers. Cependant, malgré une grande attention portée au développement d'inhibiteurs de ce type, il n'existe toujours pas de médicaments sur le marché¹⁶².

01. Définition de Dinaciclib :

Le Dinaciclib (appelé aussi SCH-727965 / 779353-01-4 / MK-7965) a été développé par la société Merck. Il s'agit d'un pyrazole [1,5-a] pyrimidine, il a une activité antinéoplasique potentielle. Le terme "pyrazole" a été donné à cette classe de composés par Ludwig Knorr en 1883. En 1959, le premier pyrazole naturel, la 1-pyrazolyle-alanine, a été isolé à partir de graines de pastèques¹⁶³.

Le Dinaciclib inhibe sélectivement la kinase CDK1 avec une valeur de CI_{50} 3 nM. Ce dernier présente une excellente sélectivité vis-à-vis des autres kinases comme CDK2, CDK5 et CDK9 avec des valeurs de CI_{50} de 1 nM, 1 nM et 4 nM respectivement, ce qui lui confère un meilleur profil de toxicité¹⁶².

02. La structure du Dinaciclib :

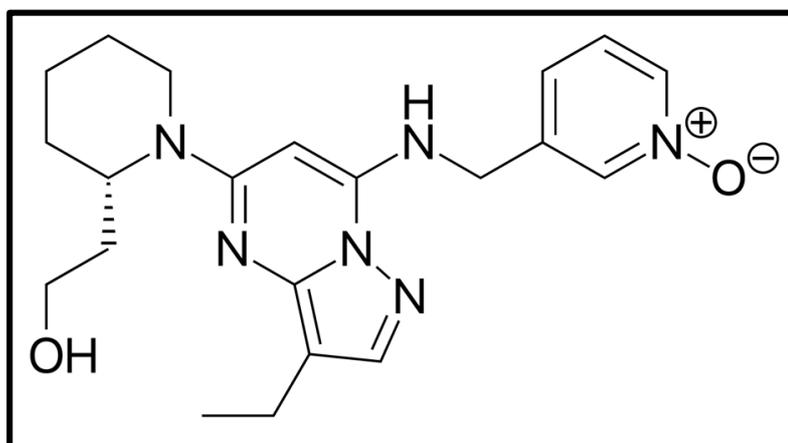
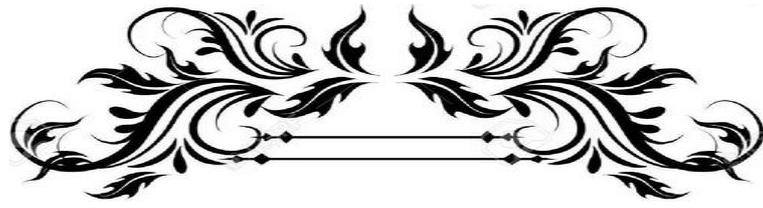


Figure 26: structure chimique de la Dinaciclib¹⁶⁴.

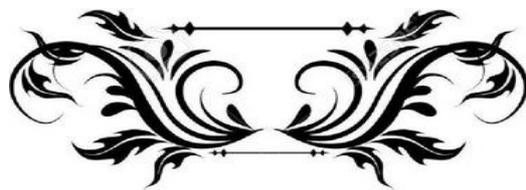
03. Activités biologiques :

Tableau 2 : Des activités biologiques testée par le Dinaciclib sur déverses lignées cellulaires¹⁶⁵⁻¹⁶⁸.

Lignées cellulaires	Type de test	Concentration	Durée d'incubation	Activity Description
Kasumi-1	Test d'apoptose	100 nM	24 h	induit l'arrêt du cycle cellulaire
1205Lu	Test d'inhibition de la croissance	10/30 nM	72 h	inhibe la croissance et la survie des cellules
U937	Teste de fonction	2/10 nM	3 h	bloque l'induction des XBP-1 et des cibles en aval
BE(2)-M17	Test antiprolifératif		72 h	GI50 = 0.021 μ M



Partie I. I. Matériels et Méthodes



A.Screening virtuel :

PubChem est une banque de données américains de molécules chimiques gérée par le National Center for Biothechnology Information (NCBI), branche de la Bibliothèque National de Médecine des États-Unis sous l'autorité des National Institus of Healthe (NIH). Il s'agit d'une ressource publique gratuite pour la découverte de ligands qui peuvent être téléchargées dans des formats 2D et 3D. PubChem est disponible gratuitement sur <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Nous avons recherché dans la base de données PubChem, la molécule "Dinaciclib".

Parmi les 268 analogues présentés par PubChem, nous avons retenu 187 Analogues filtrées selon le poids moléculaire : <396.5g/mol

Ces molécules ont été téléchargées sous format SDF.

B.Docking moléculaire :

1.Récepteur :

La BanK PDB (Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>)) a été utilisée pour télécharger le récepteur. Il s'agit d'un répertoire mondial de dépôt d'informations sur la structure tridimensionnelle des protéines et des acides nucléiques.

La PDB contient des milliers de structures protéiques prises soit par cristallographie (rayons X) ou par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire).

Concernant le CDK1, est disponible dans la banque de données, la molécule répertoriée sous le code 6GU6. Il s'agit d'une protéine de 297 acide aminés, liant la sous-unité régulatrice Cks2 et complexée avec le Dinaciclib.

C.Processus de docking :

Le screening est un processus d'amarrage moléculaire utilisé pour simuler l'affinité d'un très grand nombre de ligands pour une cible thérapeutique donnée, plus simple à mettre en place, plus rapide à un coût bien moindre que les criblages expérimentaux.

Nous avons utilisé les logiciels PyRx et Chimera pour tester l'interaction ligand-récepteur :

- **Pyrx** : est un logiciel de criblage virtuel pour la découverte de médicaments par ordinateur qui peut être utilisé pour cribler des bibliothèques de composés par rapport à des cibles médicamenteuses potentielles.

Utilisant le sous-programme AutoDock Vina qui sert au docking moléculaire et Open Babel pour la conversion des formats des fichiers de petite taille. Après la minimisation des composés, des bibliothèques ont été criblées en calculant leur énergie d'interaction grâce au sous-programme Vina.

- **UCSF Chimera (ou simplement Chimera)** : est un programme extensible pour la visualisation et l'analyse interactives des structures moléculaires et des données associées, y compris les cartes de densité, les assemblages supramoléculaires, les alignements de séquences, les résultats d'amarrage, les trajectoires et les ensembles conformationnels. Des images et des films de haute qualité peuvent être créés. Le processus de docking avec Chimera se déroule après la préparation du récepteur 6GU6 et ses ligands. Les résultats de l'amarrage sont obtenus de forme scores de ΔG .

D.Processus de détermination des interactions :

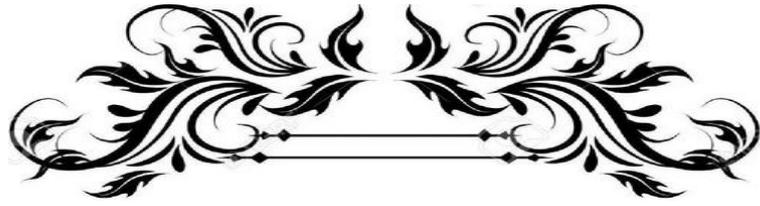
En utilisent logiciel Discovery Studio pour visualiser les interactions de ligand dans le site actif de la protéine cible :

- **Discovery Studio** : est une suite logicielle complète d'analyse et de modélisation moléculaire de structures, séquences et autres données pertinentes. Après le téléchargement des fichier PDB obtenus sous Chemira les interactions sont facilement visualisées à la fois de formes 2D et 3D.

E.Processus d'évaluation les paramètres pharmacocinétiques :

Les paramètres pharmacocinétiques sont la mesure quantifiable d'un médicament qui peut concerner les différentes phases de la vie d'un médicament, à savoir l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination (système ADME).

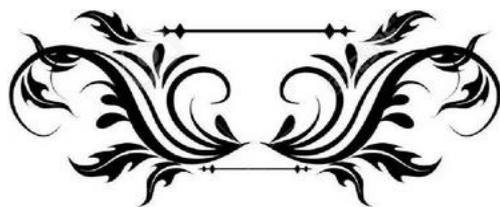
- **SwissADME** : est un site Web qui permet de prédire des descripteurs physicochimiques ainsi que de prédire les paramètres ADME, les propriétés pharmacocinétiques, la nature médicamenteuse et la compatibilité avec la chimie médicinale d'une ou plusieurs petites molécules (<http://www.swissadme.ch/>).



Partie J. J. J. R

résultas et

Discussion



A. Résultats du criblage moléculaire :

Le screening moléculaire a permis de sélectionner 8 composés ayant des conformations favorables interagissant dans le site actif selon leurs résultats de scores envers le MPF.

Le ΔG appelée aussi l'enthalpie libre ou énergie libre de Gibbs, ou simplement énergie de Gibbs : est une fonction d'état extensive introduite par Willard Gibbs. Elle se comporte en effet comme une fonction potentielle et intègre le comportement du milieu extérieur. De plus elle est la fonction d'état la plus appropriée pour étudier les équilibres chimiques réalisés à la température T et à pression constante ce qui est le lot de nombreuses réactions effectuées à l'air libre, à la pression atmosphérique.

Les 8 analogues retenus sont classés selon leur affinité d'interaction estimée par l'énergie de liaison dans le tableau.

Tableau 03 : Les meilleurs scores ΔG révélés par le screening moléculaire.

<i>Ligands</i>	<i>Pubchem code</i>	<i>ΔG (kcal/ml)</i>
Analogue 1	95869569	-8.5
Analogue 2	71048607	-8.2
Analogue 3	144762923	-8.2
Analogue 4	58269045	-8.1
Analogue 5	23569294	-8.0
Analogue 6	44159122	-8.0
Analogue 7	70878929	-8.0
Analogue 8	133335579	-8.0

B. Résultats du docking moléculaire :

Les résultats du docking sous UCSF Chimera affiche la liste tabulaire des poses :

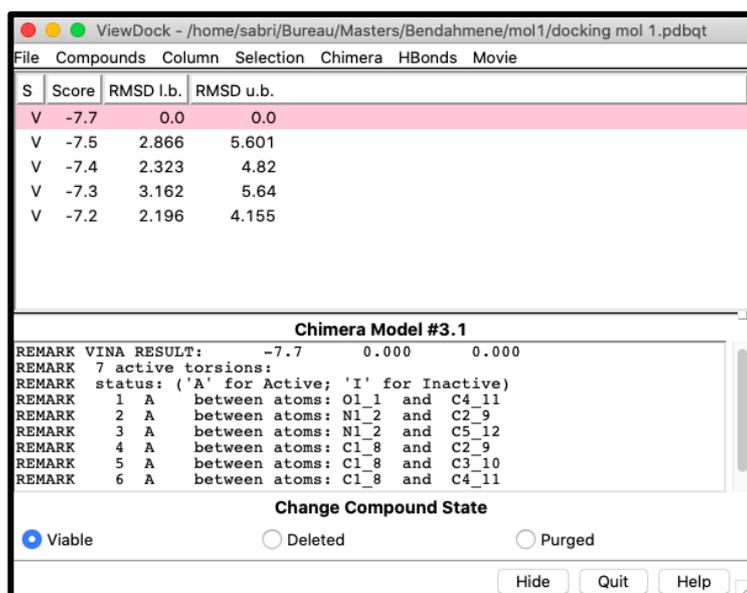


Figure 27 : Les scores donnés par UCSF Chimera du composé 133335579.

Les résultats de l'étude des interactions enzyme-ligand sont présentés sous forme de scores (Kcal/mol) de la meilleure pose pour chaque ligand.

Tableau 4: les meilleurs scores de chaque Analogue.

<i>Analogue</i>	<i>Meilleur score</i>
95869569	-8.3
71048607	-9.1
144762923	-9.0
58269045	-8.3
23569294	-9.2
44159122	-8.4
70878929	-8.8
133335579	-7.7

C. Résultats des interactions par Discovery Studio :

L'analyse des fichiers pdb par « Discovery studio visualiser » permet la visualisation du mode et du type d'interaction entre la meilleure conformation de ligand et son récepteur. Cette interaction engage plusieurs types de liaisons comme le montre le diagramme 2D.

Tableau 5 : Les interactions entre chacun des composés avec le récepteur.

<i>Code</i>	<i>Acide aminée</i>	<i>Type d'interaction</i>
95869569	Leu 83 / Lys 33	Liaison hydrogène conventionnelle
	Met 85 / Glu 81	Liaison Hydrogène carbone
	Lys 89	Liaison pi-cation
	Ala 31 / Ala 145 / Val 64 / Val 18 / Leu 135 / Ile 10	Liaison pi-alkyle
71048607	Lys 33 / Asp 146	Liaison hydrogène conventionnelle
	Gln 132	Liaison Hydrogène carbone
	Phe 80	Liaison pi-sigma
	Ala 145 / Val 64 / Ala 31 / Leu 135 / val 18 / Ile 10	Liaison alkyle / pi-alkyle
144762923	Leu 83	Liaison hydrogène conventionnelle Liaison donneur défavorable donneur
	Glu 81	Liaison Hydrogène carbone
	Ile 10 / Ala 31 / Ala 145 / Leu 135 / Val 64 / Phe 80 / Val 18	Liaison alkyle / pi-alkyle
58269045	Met 85	Liaison Van Der Waals
	Asp 86	Liaison hydrogène conventionnelle
	Lys 33	Liaison pi-cation Liaison donneur défavorable donneur
	Lys 89	Liaison pi-cation
	Ser 84	Liaison pi-amide empilé
	Ile 10 / Val 18 / Ala 145 / Leu 135 / Val 64 / Phe 80 / Ala 31	Liaison alkyle / pi-alkyle
	23569294	Leu 83
Glu 81		Liaison Hydrogène carbone

	Phe 82	Liaison pi-pi empilé
	Ile 10 / Leu 135 / Ala 31 / Ala 145 / Val 64 / Phe 80	Liaison alkyle / pi-alkyle
44159122	Met 85	Liaison Van Der Waals
	Leu 83 / Asp 86 / Gln 132 / Asn 133	Liaison hydrogène conventionnelle
	Lys 89 / Lys 33	Liaison pi-cation
	Ser 84	Liaison pi-amide empilé
	Ile 10 / Val 18 / Ala 145 / Ala 31 / Leu 135 / Phe 80 / Val 64	Liaison alkyle / pi-alkyle
70878929	Leu 83	Liaison hydrogène conventionnelle Liaison donneur défavorable donneur
	Lys 89	Liaison hydrogène conventionnelle
	Glu 81	Liaison Hydrogène carbone
	Phe 82	Liaison pi-pi empilé
	Val 64 / Phe 80 / Ala 31 / Leu 135 / Val 18 / Ile 10	Liaison alkyle / pi-alkyle
133335579	Asp 86	Liaison hydrogène conventionnelle
	Leu 83	Liaison Hydrogène carbone
	Val 18 / Leu 135 / Ala 31	Liaison alkyle / pi-alkyle

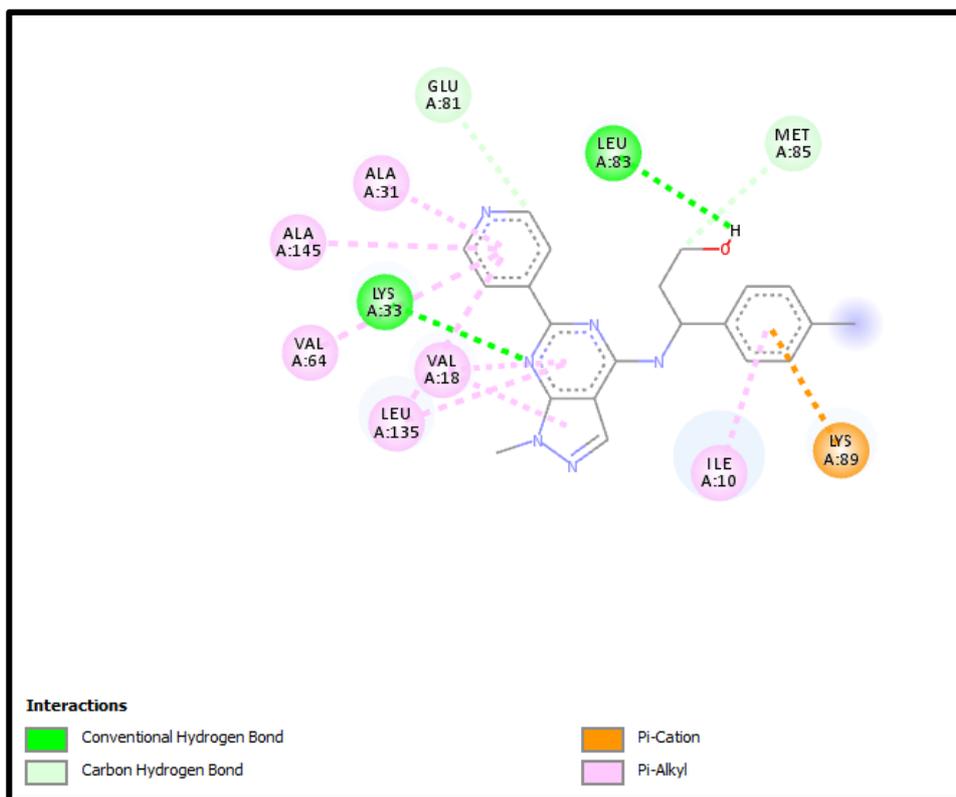


Figure 28 : les interactions entre le composé 95869569 et le récepteur.

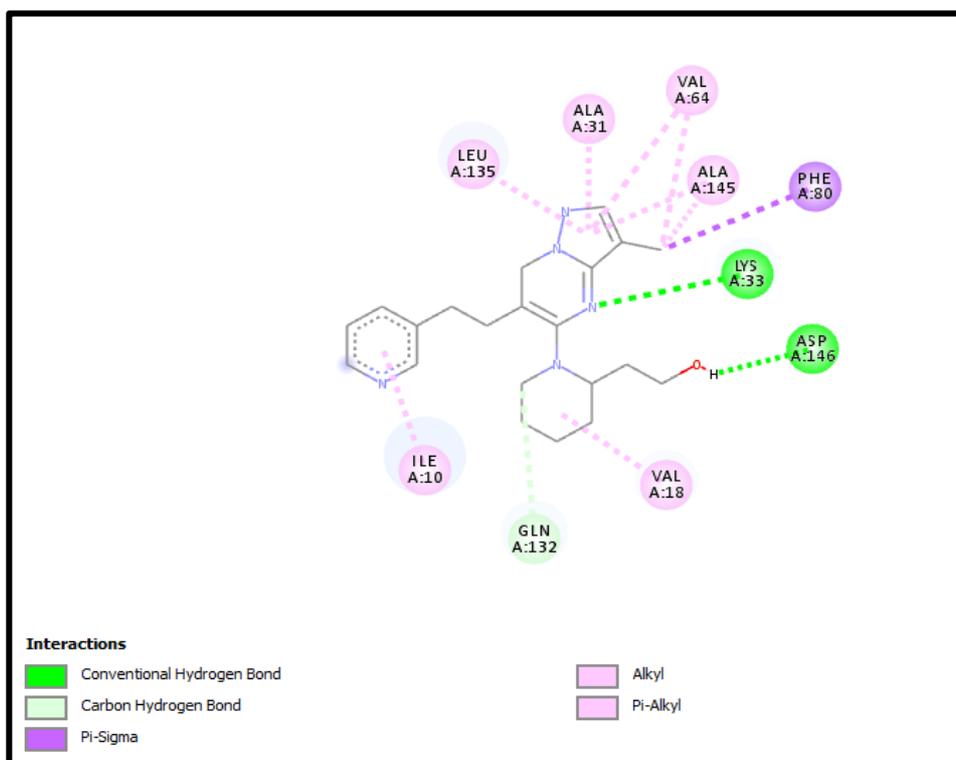


Figure 29 : les interactions entre le composé 71048607 et le récepteur.

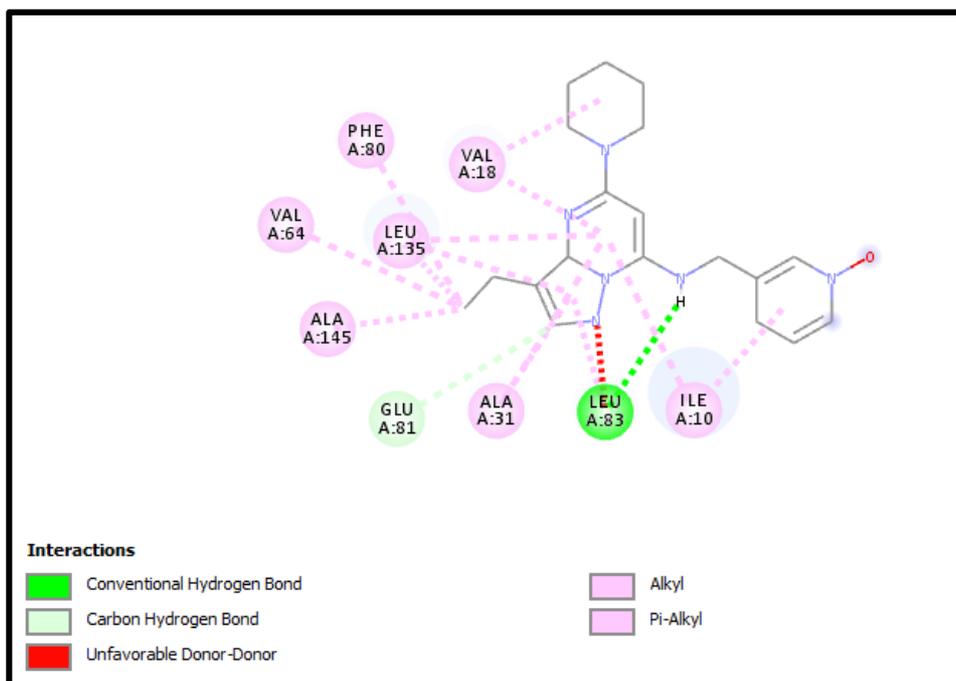


Figure 30: les interactions entre le composé 144762923 et le récepteur.

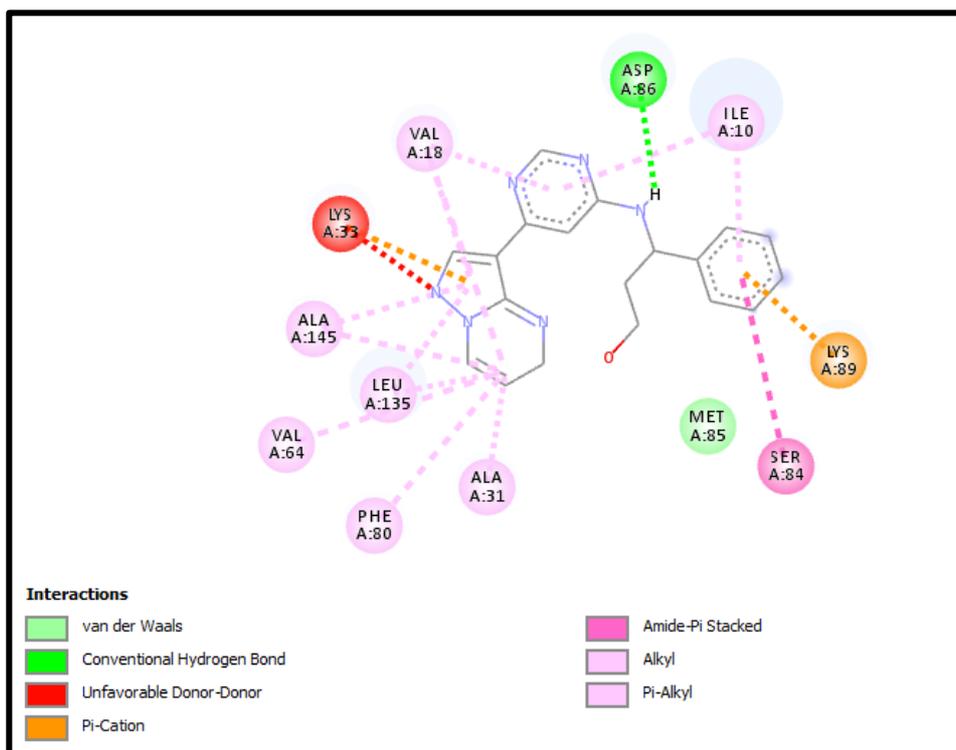


Figure 31: les interactions entre le composé 58269045 et le récepteur.

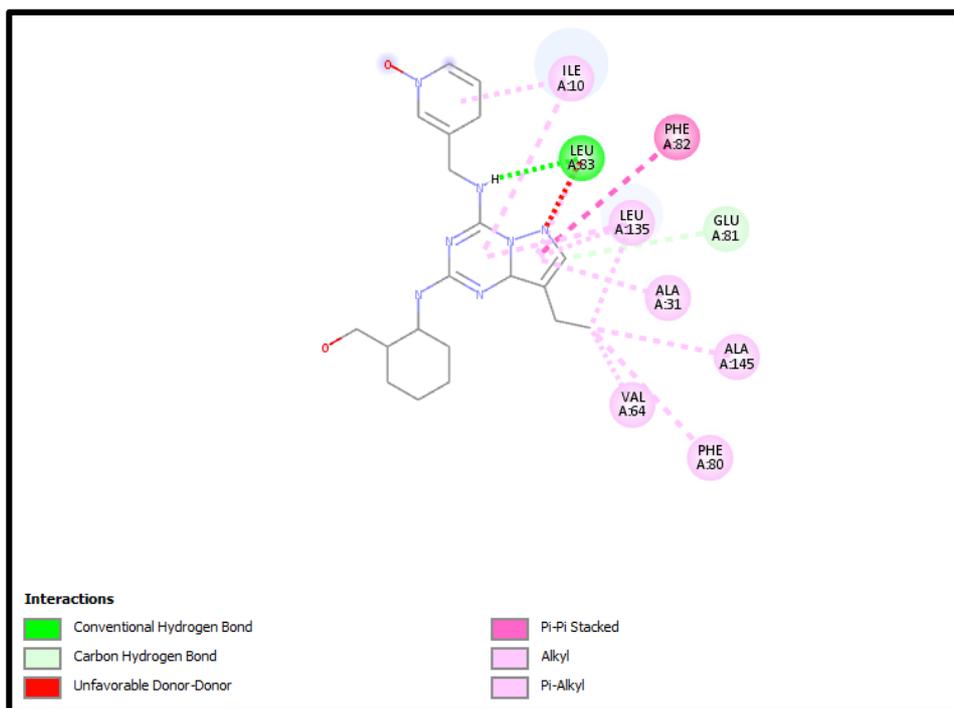


Figure 32 : les interactions entre le composé 23569294 et le récepteur.

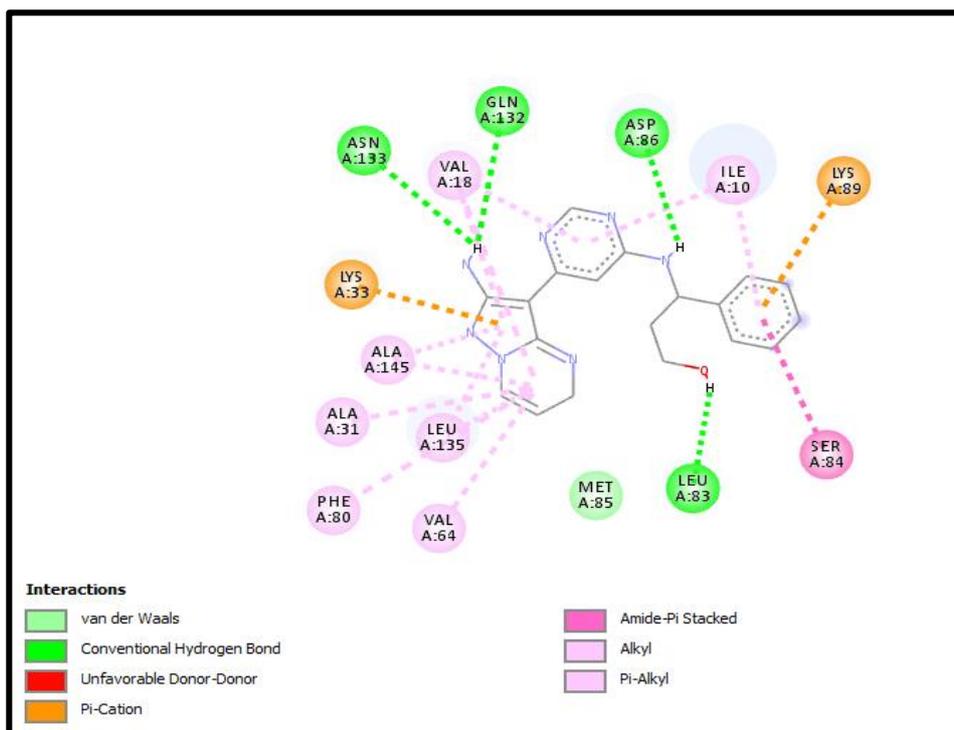


Figure 33 : les interactions entre le composé 44159122 et le récepteur.

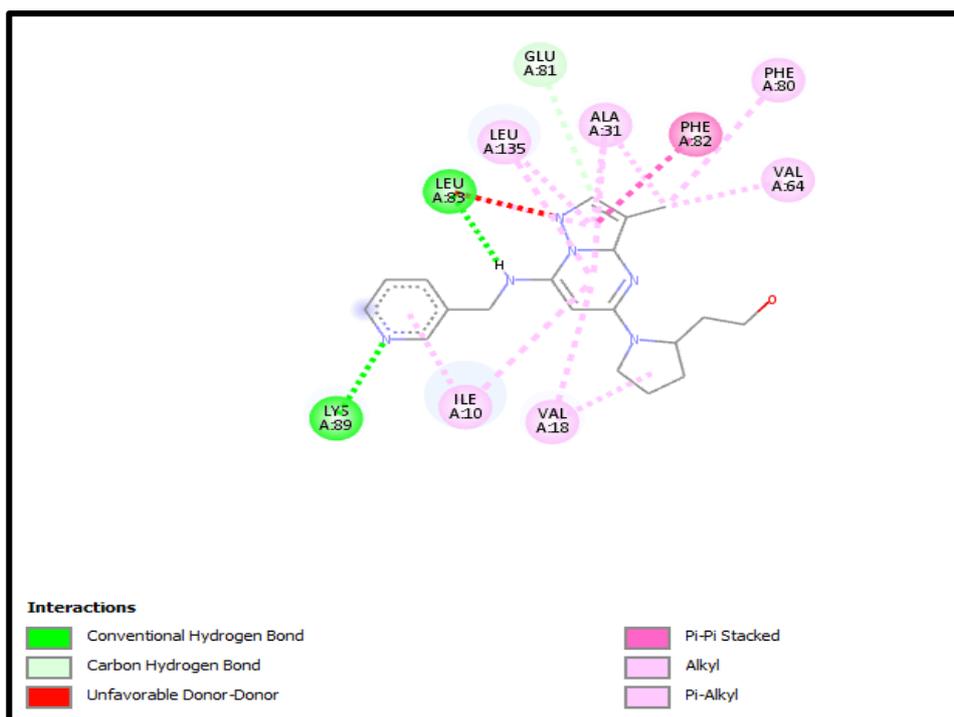


Figure 34 : les interactions entre le composé 70878929 et le récepteur.

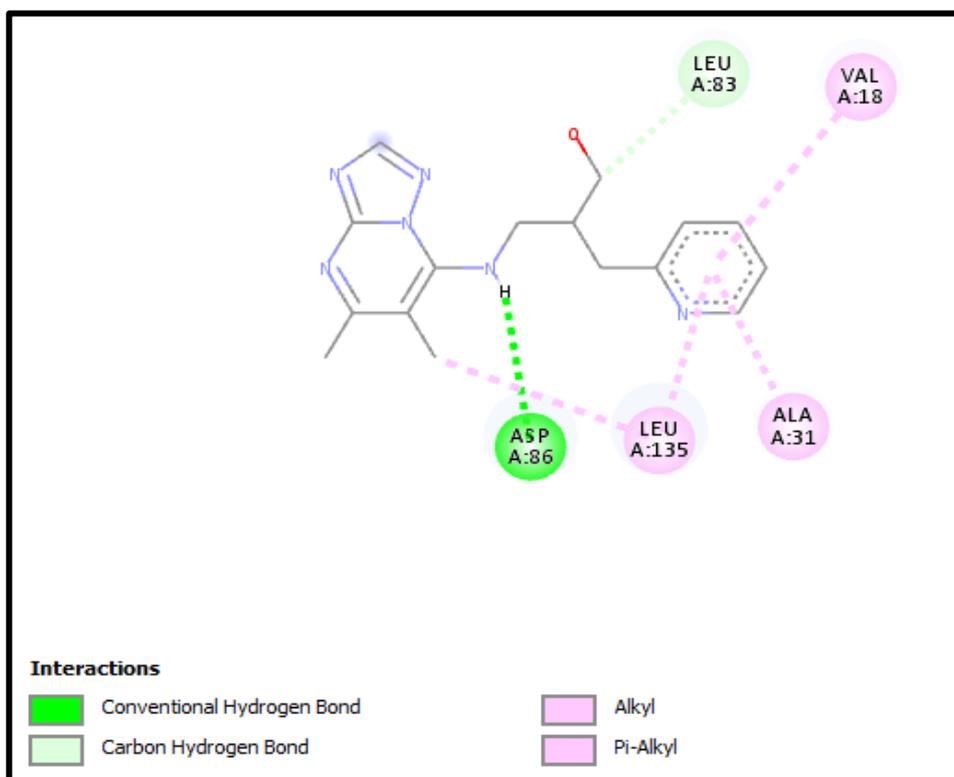


Figure 35 : les interactions entre le composé 133335579 et le récepteur.

Au niveau du site actif, le processus d'interaction se fait par liaison complémentaire du ligand avec l'architecture protéique, sont retenus :

Liaisons Hydrogènes :

Concernant ces interactions qui jouent le rôle le plus important en biologie et le domaine du vivant, elles sont classées comme suit :

Liaisons hydrogène conventionnelles : Cette liaison, intervient lorsqu'un atome d'hydrogène lié par covalence à un atome électronégatif (le donneur D) est attiré par un autre atome électronégatif (l'accepteur A). Le tableau montre les acides aminés (Leu 83/Lys 33/ Asp 86/Asn 133/Asp 146/Gln 132) du site actif de la protéine CDK1 impliqués dans la formation des liaisons hydrogène conventionnelles. Wood,d.j & autres en 2019¹⁶⁹ a été confirmé cette liaison entre ligand et Leu 83, Lys 33 et Asp 146. Plus, Martin,p et autres en 2013¹⁷⁰ et Coxon,R & autres en 2017¹⁷¹ ont confirmé l'existence de ce type d'interaction entre le ligand et les résidus Leu 83, Lys 33, aussi la structure 3D observé dans le pdb :6GU6¹⁷².

Liaisons hydrogène carbone : Elle s'agit d'une liaison chimique entre un atome de carbone et un atome d'hydrogène, qu'on trouve principalement dans les composés organiques. Il est noté que les acides aminés Gln 132 et Leu 83 forment aussi la liaison hydrogène de type C-H, ainsi que le Met 85 et Glu 81. Martin,p & autres¹⁷⁰ et Coxon,R & autres¹⁷¹ ont été confirmé cette liaison avec Gln 132.

Liaisons Pi-Cation :

Un système pi, bien que neutre électriquement concentre des charges négatives (les électrons pi). Un cation peut alors engager une interactions électrostatique stabilisante avec ces charges. Il est montré que le Lysine est le seul acide aminé qui engager à ce type d'interaction en position 33 et 89 de site actif. Wood et al (2019)¹⁶⁹ ont confirmé l'existence de cette liaison en Lys 33 de site actif. L'observation des interactions de ligand sur pdb¹⁷² montre aussi la liaison pi-cation en Lys 89.

Liaison Alkyle/ Pi-Alkyle :

Ce sont des liaisons hydrophobes : Les molécules qui n'ont pas de groupes chargés ou d'atomes capables de former des liaisons hydrogène sont nommés "Molécules Hydrophobes". Les alkyles dérivent des alcanes par la perte d'un atome d'hydrogène. Ils peuvent désigner des radicaux ou des substituants sur des molécules organiques complexes. Les alkyles ne sont pas considérés comme des groupes fonctionnels. Le tableau montre que les acides aminés (Ala 31/Ala 145 Val 64/Val 18/Leu 135/Ile 10/Phe 80) du site actif ont formé ce type

d'interactions avec le ligand. Chacun des études de Wood,d.j & autres¹⁶⁹ et Martin,p & autres¹⁷⁰ ont confirmé l'existence de ce type de liaison entre tous les acides aminés mentionnés et le ligand.

Liaison Pi-Sigma :

Une *liaison* σ (prononcé *sigma*) est une *liaison* chimique covalente formée par le recouvrement axial de deux orbitales atomiques. Il est noté que seulement le Phénylalanine en position 80 est impliqué à ce type d'interaction: puis l'étude fut par Wood,d.j & autres¹⁶⁹ confirmé l'existence de cette interaction.

Liaison Van Der Waals :

Elle résulte de l'attraction entre des dipôles transitoires générée par le mouvement rapide des électrons au niveau de tous les atomes neutres. Ce type d'interaction concerne la Méthionine 85 avec le ligand selon le tableau. Coxon,R et ses collaborateurs a confirmé l'existence de cette liaison entre le ligand et ce acide de site actif ¹⁷¹.

Liaison pi-pi empilé :

Les interactions de type Pi-Pi sont des interactions hydrophobiques qui jouent un très grand rôle dans le domaine du vivant. Seul l'acide aminé Phe 82 forme une telle interaction comme le montre le tableau. Martin,p et ses camarades a confirmé l'existence de ce type de liaison entre le ligand et phe en position 82¹⁷⁰.

Liaison pi-amide empilé :

Fait référence aux interactions présomptives attractives et non covalentes (chevauchement orbital) entre les liaisons pi des cycles aromatiques. Seul le Serine en position 84 du site actif est impliqué dans ce type d'interaction. Coxon,R & autres a confirmé ce type d'interaction entre ce spécifique acide de site actif et le ligand dans ce étude¹⁷¹.

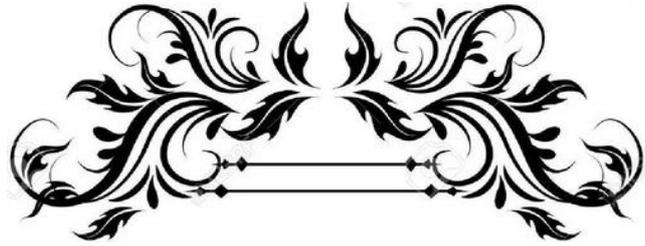
Liaison défavorable :

Des liaisons défavorables affectent la stabilité de l'activité du composé. La formation de tout type de liaison défavorable entre Leu 83 /Lys 33 de protéine et le ligand réduit la stabilité du complexe observé dans le score. Cette interaction est confirmée par l'observation des interactions sur PDB¹⁷² entre le ligand et le résidu Lys 33.

D.Résultat des paramètres pharmacocinétiques :

Tableau 06 : les paramètres pharmacocinétiques des composés.

Analogue (Code PubChem)	Lipo -0.7< XLOGP3 <+5.0	Masse Volumineuse 150 _{g/mol} <MV<500 _{g/mol}	Polarité 20Å <TPSA<130Å ²	Insolubilité -6<ESOL <0	Insaturation 0.25< Fraction (gsp3)<1	Flexibilité 0<Num. rotatable bonds<9	Lipinski
95869569	3.21	374.44	88.75	-4.34	0.24	6	Yes,0 Violation
71048607	2.88	365.47	66.55	-3.94	0.48	6	Yes,0 Violation
144762923	3.37	353.44	69.57	-4.25	0.42	5	Yes,0 Violation
58269045	2.34	346.39	88.23	-3.66	0.16	6	Yes,0 Violation
23569294	2.54	397.47	112.83	-3.83	0.50	7	Yes,0 Violation
44159122	1.99	361.40	144.25	-3.51	0.16	6	Yes,0 Violation
70878929	2.12	352.43	78.58	-3.39	0.42	6	Yes,0 Violation
133335579	2.23	312.37	88.23	-3.27	0.38	6	Yes,0 Violation



Conclusion

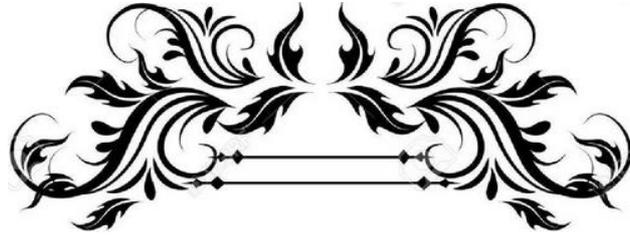


Le MPF ou le CDK1 est impliqué dans la prolifération anarchique ; sachant que ce dernier est surexprimé dans les cellules tumorales. Par conséquent, cette protéine kinase constitue une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de plusieurs cancers.

Notre objectif était de proposer, par la modélisation moléculaire, des analogues de l'inhibiteur « Dinaciclib » ; médicament proposé comme nouvel agent thérapeutique possibles ciblant l'enzyme CDK1, comme inhibiteurs potentiels de cette enzyme. Par la suite les propriétés pharmacocinétiques des huit meilleurs composés ont été évaluées.

A partir des résultats de la prédiction *in silico*, pour les 8 molécules, nous avons proposé les composé 95869569 et 71048607 sont les meilleures susceptibles d'être étudiés plus en profondeur pour une éventuelle exploitation dans l'industrie pharmaceutique.

Notre modeste travail reste seulement une étude théorique préliminaire, qui nécessite des essais complémentaires *in vitro* et *in vivo* pour confirmer et prouver ses efficacités.



References



1. Matthews, D. J., & Gerritsen, M. E. (2011). *Targeting protein kinases for cancer therapy*. John Wiley & Sons.
2. Meijer, L. (2003). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *ONCOLOGIE-PARIS-*, 5(7/8), 311-326.
3. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 36(3), 131-149.
4. Pommier, Y., & Kohn, K. W. (2003). Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie: nouvelles cibles thérapeutiques. *médecine/sciences*, 19(2), 173-186.
5. Mariaule, G. (2014). *Accès original aux hétérocycles par la catalyse organométallique: développement de nouveaux inhibiteurs de kinases* (Université René Descartes-Paris V).
6. Marie-Claude ,L & Jean ,M. (2004). l'Université Pierre ,Paris.
7. Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 80(2), 225-236.
8. Schwob, E. (2001). Nobel Prize in Medicine 2001: The universal key to cell division. *Bulletin du cancer*, 88(10), 937.
9. Hanks, S. K., Quinn, A. M., & Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 241(4861), 42-52.
10. Carassou, P., Meijer, L., Le Moulec, S., Aoun, J., & Bengrine-Lefèvre, L. (2012). Le cycle cellulaire et ses cibles: inhibition des CDK. *Bulletin du cancer*, 99(2), 163-171.
11. De Bondt, H. L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H. D., Morgan, D. O., & Kim, S. H. (1993). Crystal structure of Cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, 363(6430), 595-602.
12. Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massagué, J., & Pavletich, N. P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a CyclinA-CDK2 complex. *Nature*, 376(6538), 313-320.
13. Schulze-Gahmen, U., De Bondt, H. L., Kim, S. H. (1996) .*J Med Chem* **39**: 4540-4546.
14. De Bondt, H. L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H. D., Morgan, D. O., & Kim, S. H. (1993). Crystal structure of Cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, 363(6430), 595-602.

15. Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., & Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 33(2), 389-396.
16. Dr Gerardo Ferbeyre .(2006).Le cycle cellulaire :Introduction Département de biochimie, E515
17. Nasmyth, K. (1993). Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Current opinion in cell biology*, 5(2), 166-179.
18. Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *cell*, 81(3), 323-330.
19. Nurse, P., & Bissett, Y. (1981). Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature*, 292(5823), 558-560.
20. Brown, N. R., Korolchuk, S., Martin, M. P., Stanley, W. A., Moukhametzianov, R., Noble, M. E., & Endicott, J. A. (2015). CDK1 structures reveal conserved and unique features of the essential cell cycle CDK. *Nature communications*, 6(1), 6769.
21. Masui, Y. (2001). From oocyte maturation to the *in vitro* cell cycle: the history of discoveries of Maturation- Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation*, 69(1), 1-17.
22. Miake-Lye, R., Newport, J., & Kirschner, M. (1983). Maturation-promoting factor induces nuclear envelope breakdown in cycloheximide-arrested embryos of *Xenopus laevis*. *The Journal of cell biology*, 97(1), 81-91.
23. Pines, J., & Hunter, T. (1989). Isolation of a human Cyclin cDNA: evidence for Cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell*, 58(5), 833-846.
24. Gautier, J., Minshull, J., Lohka, M., Glotzer, M., Hunt, T., & Maller, J. L. (1990). Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell*, 60(3), 487-494.
25. Lehner, C. F., & O'Farrell, P. H. (1990). The roles of *Drosophila* Cyclins A and B in mitotic control. *Cell*, 61(3), 535-547.
26. Gheghiani, L. (2017). *Mécanisme de contrôle de l'entrée en mitose par Polo-like kinase 1 (PK1)*.
27. Lohka, M. J., Hayes, M. K., & Maller, J. L. (1988). Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(9), 3009-3013.

28. Labbé, J. C., Capony, J. P., Caput, D., Cavadore, J. C., Derancourt, J., Kaghad, M. O. U. R. A. D., ... & Doree, M. (1989). MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of Cycline B. *The EMBO journal*, 8(10), 3053-3058.
29. Meijer, L., Arion, D., Golsteyn, R., Pines, J., Brizuela, L., Hunt, T., & Beach, D. (1989). Cycline is a component of the sea urchin egg M- phase specific histone H1 kinase. *The EMBO Journal*, 8(8), 2275-2282.
30. Dorée, M., & Hunt, T. (2002). From Cdc2 to CDK1: when did the cell cycle kinase join its Cycline partner?. *Journal of cell science*, 115(12), 2461-2464.
31. Murray, A. W., & Kirschner, M. W. (1989). Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science*, 246(4930), 614-621.
32. Solomon, M. J., Glotzer, M., Lee, T. H., Philippe, M., & Kirschner, M. W. (1990). Cycline activation of p34cdc2. *Cell*, 63(5), 1013-1024.
33. Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V., & Medema, R. H. (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *Journal of Cell Biology*, 185(2), 193-202.
34. Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., & Hunt, T. (1983). Cycline: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 33(2), 389-396.
35. Akopyan, K., Cascales, H. S., Hukasova, E., Saurin, A. T., Müllers, E., Jaiswal, H., ... & Lindqvist, A. (2014). Assessing kinetics from fixed cells reveals activation of the mitotic entry network at the S/G2 transition. *Molecular cell*, 53(5), 843-853.
36. Brandeis, M., & Hunt, T. (1996). The proteolysis of mitotic Cyclines in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. *The EMBO journal*, 15(19), 5280-5289.
37. Hwang, A., Maity, A., McKenna, W. G., & Muschel, R. J. (1995). Cell cycle-dependent regulation of the Cycline B1 promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 270(47), 28419-28424.
38. Wasner, M., Haugwitz, U., Reinhard, W., Tschöp, K., Spiesbach, K., Lorenz, J., ... & England, K. (2003). Three CCAAT-boxes and a single cell cycle genes homology region (CHR) are the major regulating sites for transcription from the human Cycline B2 promoter. *Gene*, 312, 225-237.

39. Müller, G. A., & Engeland, K. (2010). The central role of CDE/CHR promoter elements in the regulation of cell cycle- dependent gene transcription. *The FEBS journal*, 277(4), 877-893.
40. Glotzer, M., Murray, A. W., & Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, 349(6305), 132-138.
41. Peters, J. M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Molecular cell*, 9(5), 931-943.
42. Wasner, M., Tschöp, K., Spiesbach, K., Haugwitz, U., Johne, C., Mössner, J., ... & Engeland, K. (2003). Cyclin B1 transcription is enhanced by the p300 coactivator and regulated during the cell cycle by a CHR- dependent repression mechanism. *FEBS letters*, 536(1-3), 66-70.
43. Laoukili, J., Kooistra, M. R., Brás, A., Kaw, J., Kerkhoven, R. M., Morrison, A., ... & Medema, R. H. (2005). FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nature cell biology*, 7(2), 126-136.
44. Zhu, W., Giangrande, P. H., & Nevins, J. R. (2004). E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. *The EMBO journal*, 23(23), 4615-4626.
45. Laoukili, J., Alvarez, M., Meijer, L. A., Stahl, M., Mohammed, S., Kleij, L., ... & Medema, R. H. (2008). Activation of FoxM1 during G2 requires Cyclin A/CDK- dependent relief of autorepression by the FoxM1 N-terminal domain. *Molecular and cellular biology*, 28(9), 3076-3087.
46. Chae, H. D., Yun, J., Bang, Y. J., & Shin, D. Y. (2004). CDK2-dependent phosphorylation of the NF-Y transcription factor is essential for the expression of the cell cycle-regulatory genes and cell cycle G1/S and G2/M transitions. *Oncogene*, 23(23), 4084-4088.
47. Bolognese, F., Wasner, M., Dohna, C. L. Z., Gurtner, A., Ronchi, A., Muller, H., ... & Engeland, K. (1999). The Cyclin B2 promoter depends on NF-Y, a trimer whose CCAAT-binding activity is cell-cycle regulated. *Oncogene*, 18(10), 1845-1853.
48. Sciortino, S., Gurtner, A., Manni, I., Fontemaggi, G., Dey, A., Sacchi, A., ... & Piaggio, G. (2001). The Cyclin B1 gene is actively transcribed during mitosis in HeLa cells. *EMBO reports*, 2(11), 1018-1023.
49. Nourreddine, S. (2021). Rôle du complexe NF45-NF90 dans la régulation post-transcriptionnelle du cycle cellulaire.
50. Clute, P., & Pines, J. (1999). Temporal and spatial control of Cyclin B1 destruction in metaphase. *Nature cell biology*, 1(2), 82-87.

51. Glotzer, M., Murray, A. W., & Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, *349*(6305), 132-138.
52. Peters, J. M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Molecular cell*, *9*(5), 931-943.
53. Kramer, E. R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., & Peters, J. M. (2000). Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Molecular biology of the cell*, *11*(5), 1555-1569.
54. Rudner, A. D., & Murray, A. W. (2000). Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *The Journal of cell biology*, *149*(7), 1377-1390.
55. Jaspersen, S. L., Charles, J. F., & Morgan, D. O. (1999). Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Current Biology*, *9*(5), 227-236.
56. Visintin, R., Craig, K., Hwang, E. S., Prinz, S., Tyers, M., & Amon, A. (1998). The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of CDK-dependent phosphorylation. *Molecular cell*, *2*(6), 709-718.
57. Fung, T. K., & Poon, R. Y. (2005, June). A roller coaster ride with the mitotic Cyclins. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 16, No. 3, pp. 335-342). Academic Press.
58. Stieg, D. C., & Cooper, K. F. (2016). Parkin new cargos: a new ROS independent role for Parkin in regulating cell division. *Reactive oxygen species (Apex, NC)*, *2*(5), 315.
59. Draetta, G., & Beach, D. (1988). Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell*, *54*(1), 17-26.
60. Krek, W., & Nigg, E. A. (1991). Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *The EMBO journal*, *10*(2), 305-316.
61. Solomon, M. J., Lee, T., & Kirschner, M. W. (1992). Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Molecular biology of the cell*, *3*(1), 13-27.
62. Lolli, G., & Johnson, L. N. (2005). CAK—Cyclin-dependent activating kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs?. *Cell cycle*, *4*(4), 565-570.

63. Holmes, J. K., & Solomon, M. J. (2001). The role of Thr160 phosphorylation of CDK2 in substrate recognition. *European journal of biochemistry*, 268(17), 4647-4653.
64. Welburn, J. P., Tucker, J. A., Johnson, T., Lindert, L., Morgan, M., Willis, A., ... & Endicott, J. A. (2007). How tyrosine 15 phosphorylation inhibits the activity of Cyclin-dependent kinase 2-Cyclin A. *Journal of Biological Chemistry*, 282(5), 3173-3181.
65. Merrick, K. A., Larochelle, S., Zhang, C., Allen, J. J., Shokat, K. M., & Fisher, R. P. (2008). Distinct activation pathways confer Cyclin-binding specificity on CDK1 and CDK2 in human cells. *Molecular cell*, 32(5), 662-672.
66. Kaldis, P. (1999). The CDK-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55, 284-296.
67. Fisher, R. P. (2005). Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *Journal of cell science*, 118(22), 5171-5180.
68. Cheng, A., Kaldis, P., & Solomon, M. J. (2000). Dephosphorylation of human Cyclin-dependent kinases by protein phosphatase type 2C α and β 2 isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34744-34749.
69. De Smedt, V., Poulhe, R., Cayla, X., Dessauge, F., Karaiskou, A., Jesus, C., & Ozon, R. (2002). Thr-161 Phosphorylation of Monomeric Cdc2: REGULATION BY PROTEIN PHOSPHATASE 2C IN XENOPUS OOCYTES. *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), 28592-28600.
70. Gould, K. L., & Nurse, P. (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature*, 342(6245), 39-45.
71. De Bondt, H. L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H. D., Morgan, D. O., & Kim, S. H. (1993). Crystal structure of Cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, 363(6430), 595-602.
72. Atherton-Fessler, S., Parker, L. L., Geahlen, R. L., & Piwnicka-Worms, H. (1993). Mechanisms of p34cdc2 regulation. *Molecular and Cellular Biology*, 13(3), 1675-1685.
73. Marcote, M. J., Knighton, D. R., Basi, G., Sowadski, J. M., Brambilla, P., Draetta, G., & Taylor, S. S. (1993). A three-dimensional model of the Cdc2 protein kinase: localization of Cyclin- and Suc1-binding regions and phosphorylation sites. *Molecular and cellular biology*, 13(8), 5122-5131.

74. Endicott, J. A., Nurse, P., & Johnson, L. N. (1994). Mutational analysis supports a structural model for the cell cycle protein kinase p34. *Protein Engineering, Design and Selection*, 7(2), 243-257.
75. Thuriaux, P., Nurse, P., & Carter, B. (1978). Mutants altered in the control coordinating cell division with cell growth in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and General Genetics MGG*, 161, 215-220.
76. Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M., & Beach, D. (1991). mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell*, 64(6), 1111-1122.
77. Norbury, C., Blow, J., & Nurse, P. (1991). Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *The EMBO journal*, 10(11), 3321-3329.
78. Morla, A. O., Draetta, G., Beach, D., & Wang, J. Y. (1989). Reversible tyrosine phosphorylation of cdc2: dephosphorylation accompanies activation during entry into mitosis. *Cell*, 58(1), 193-203.
79. Krek, W., & Nigg, E. A. (1991). Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates. *The EMBO journal*, 10(11), 3331-3341.
80. Pomerening, J. R., Ubersax, J. A., & Ferrell Jr, J. E. (2008). Rapid Cyclin and precocious termination of G1 phase in cells expressing CDK1AF. *Molecular biology of the cell*, 19(8), 3426-3441.
81. Lorca, T., Bernis, C., Vigneron, S., Burgess, A., Brioudes, E., Labbé, J. C., & Castro, A. (2010). Constant regulation of both the MPF amplification loop and the Greatwall-PP2A pathway is required for metaphase II arrest and correct entry into the first embryonic cell cycle. *Journal of Cell Science*, 123(13), 2281-2291.
82. Igarashi, M., Nagata, A., Jinno, S., Suto, K., & Okayama, H. (1991). Wee1+-like gene in human cells. *Nature*, 353(6339), 80-83.
83. Watanabe, N., Broome, M., & Hunter, T. (1995). Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15- kinase during the cell cycle. *The EMBO journal*, 14(9), 1878-1891.
84. McGowan, C. H., & Russell, P. (1993). Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *The EMBO journal*, 12(1), 75-85.
85. Parker, L. L., Sylvestre, P. J., Byrnes 3rd, M. J., Liu, F., & Piwnica-Worms, H. (1995). Identification of a 95-kDa WEE1-like tyrosine kinase in HeLa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(21), 9638-9642.

86. McGowan, C. H., & Russell, P. (1993). Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *The EMBO journal*, *12*(1), 75-85.
87. Liu, F., Stanton, J. J., Wu, Z., & Piwnica-Worms, H. (1997). The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Molecular and cellular biology*, *17*(2), 571-583.
88. Kornbluth, S., Sebastian, B., Hunter, T., & Newport, J. (1994). Membrane localization of the kinase which phosphorylates p34cdc2 on threonine 14. *Molecular biology of the cell*, *5*(3), 273-282.
89. Booher, R. N., Holman, P. S., & Fattaey, A. (1997). Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not CDK2 activity. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(35), 22300-22306.
90. Liu, F., Stanton, J. J., Wu, Z., & Piwnica-Worms, H. (1997). The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Molecular and cellular biology*, *17*(2), 571-583.
91. Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A., & Dunphy, W. G. (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science*, *270*(5233), 86-90.
92. Coulonval, K., Kookan, H., & Roger, P. P. (2011). Coupling of T161 and T14 phosphorylations protects Cyclin B-CDK1 from premature activation. *Molecular biology of the cell*, *22*(21), 3971-3985.
93. Wells, N. J., Watanabe, N., Tokusumi, T., Jiang, W., Verdecia, M. A., & Hunter, T. (1999). The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G (2)/M progression. *Journal of Cell Science*, *112*(19), 3361-3371.
94. Booher, R. N., Holman, P. S., & Fattaey, A. (1997). Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not CDK2 activity. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(35), 22300-22306.
95. Russell, P., & Nurse, P. (1986). cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell*, *45*(1), 145-153.
96. Ducommun, B., Draetta, G., Young, P., & Beach, D. (1990). Fission yeast cdc25 is a cell-cycle regulated protein. *Biochemical and biophysical research communications*, *167*(1), 301-309.
97. Edgar, B. A., & O'Farrell, P. H. (1989). Genetic control of cell division patterns in the *Drosophila* embryo. *Cell*, *57*(1), 177-187.

98. Kumagai, A., & Dunphy, W. G. (1991). The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell*, 64(5), 903-914.
99. Jessus, C., & Beach, D. (1992). Oscillation of MPF is accompanied by periodic association between cdc25 and cdc2-Cycline B. *Cell*, 68(2), 323-332.
100. Millar, J. B., McGowan, C. H., Lenaers, G., Jones, R., & Russell, P. (1991). p80cdc25 mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34cdc2 kinase in fission yeast. *The EMBO journal*, 10(13), 4301-4309.
101. Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. F., & Kirschner, M. W. (1991). cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell*, 67(1), 197-211.
102. Lee, M. S., Ogg, S., Xu, M., Parker, L. L., Donoghue, D. J., Maller, J. L., & Piwnicka-Worms, H. (1992). cdc25+ encodes a protein phosphatase that dephosphorylates p34cdc2. *Molecular Biology of the Cell*, 3(1), 73-84.
103. Strausfeld, U., Labbe, J. C., Fesquet, D., Cavadore, J. C., Picard, A., Sadhu, K., ... & Doree, M. (1991). Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/Cycline B complex *in vitro* by human CDC25 protein. *Nature*, 351(6323), 242-245.
104. Millar, J. B., & Russell, P. (1992). The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell*, 68(3), 407-410.
105. Dunphy, W. G., & Kumagai, A. (1991). The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell*, 67(1), 189-196.
106. Sebastian, B., Kakizuka, A., & Hunter, T. (1993). Cdc25M2 activation of Cycline-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(8), 3521-3524.
107. Boutros, R., Lobjois, V., & Ducommun, B. (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets?. *Nature Reviews Cancer*, 7(7), 495-507.
108. Sadhu, K., Reed, S. I., Richardson, H., & Russell, P. (1990). Human homolog of fission yeast cdc25 mitotic inducer is predominantly expressed in G2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(13), 5139-5143.
109. Galaktionov, K., & Beach, D. (1991). Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type Cyclines: evidence for multiple roles of mitotic Cyclines. *Cell*, 67(6), 1181-1194.
110. Bertero, T., Gastaldi, C., Bourget-Ponzio, I., Mari, B., Meneguzzi, G., Barbry, P., ... & Rezzonico, R. (2013). CDC25A targeting by miR-483-3p decreases CCND-

- CDK4/6 assembly and contributes to cell cycle arrest. *Cell Death & Differentiation*, 20(6), 800-811.
111. Ferguson, A. M., White, L. S., Donovan, P. J., & Piwnica-Worms, H. (2005). Normal cell cycle and checkpoint responses in mice and cells lacking Cdc25B and Cdc25C protein phosphatases. *Molecular and cellular biology*, 25(7), 2853-2860.
 112. Lincoln, A. J., Wickramasinghe, D., Stein, P., Schultz, R. M., Palko, M. E., De Miguel, M. P. D., ... & Donovan, P. J. (2002). Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nature genetics*, 30(4), 446-449.
 113. Chen, M. S., Hurov, J., White, L. S., Woodford-Thomas, T., & Piwnica-Worms, H. (2001). Absence of apparent phenotype in mice lacking Cdc25C protein phosphatase. *Molecular and cellular biology*, 21(12), 3853-3861.
 114. Lee, G., White, L. S., Hurov, K. E., Stappenbeck, T. S., & Piwnica-Worms, H. (2009). Response of small intestinal epithelial cells to acute disruption of cell division through CDC25 deletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(12), 4701-4706.
 115. Gavet, O., & Pines, J. (2010). Activation of Cyclin B1-CDK1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *Journal of Cell Biology*, 189(2), 247-259.
 116. Gavet, O., & Pines, J. (2010). Progressive activation of CyclinB1-CDK1 coordinates entry to mitosis. *Developmental cell*, 18(4), 533-543.
 117. Heim, A., Tischer, T., & Mayer, T. U. (2018). Calcineurin promotes APC/C activation at meiotic exit by acting on both XErp1 and Cdc20. *EMBO reports*, 19(12), e46433.
 118. Norbury, C. (2010). Principles of Cell Cycle Control. *Comprehensive Physiology*, 819-842.
 119. Arellano, M., & Moreno, S. (1997). Regulation of CDK/Cyclin complexes during the cell cycle. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 29(4), 559-573.
 120. Borgne, A., & Golsteyn, R. M. (2003). The role of Cyclin-dependent kinases in apoptosis. *PROGRESS IN CELL CYCLE RESEARCH.*, 5, 453-460.
 121. Meikrantz, W., & Schlegel, R. (1996). Suppression of Apoptosis by Dominant Negative Mutants of Cyclin-dependent Protein Kinases (*). *Journal of Biological Chemistry*, 271(17), 10205-10209.

122. Ongkeko, W., Ferguson, D. J., Harris, A. L., & Norbury, C. (1995). Inactivation of Cdc2 increases the level of apoptosis induced by DNA damage. *Journal of Cell Science*, 108(8), 2897-2904.
123. Scatena, C. D., Stewart, Z. A., Mays, D., Tang, L. J., Keefer, C. J., Leach, S. D., & Pietenpol, J. A. (1998). Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and Taxol-induced growth arrest. *Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30777-30784.
124. O'Connor, D. S., Grossman, D., Plescia, J., Li, F., Zhang, H., Villa, A., ... & Altieri, D. C. (2000). Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), 13103-13107.
125. Kamb, A. (1998). Cycline-dependent kinase inhibitors and human cancer. *Cycline Dependent Kinase (CDK) Inhibitors*, 139-148.
126. Karp, J. E., & Broder, S. (1995). Molecular foundations of cancer: new targets for intervention. *Nature Medicine*, 1(4), 309-320.
127. Malumbres, M., & Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature reviews cancer*, 1(3), 222-231.
128. Wolowiec, D., & Ffrench, M. (1996). Kinases dépendantes des Cyclines: rôle biologique et implications dans la pathologie humaine.
129. Sofi, S., Mehraj, U., Qayoom, H., Aisha, S., Almilaibary, A., Alkhanani, M., & Mir, M. A. (2022). Targeting Cycline-dependent kinase 1 (CDK1) in cancer: molecular docking and dynamic simulations of potential CDK1 inhibitors. *Medical Oncology*, 39(9), 133.
130. Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *cell*, 88(3), 323-331.
131. Lim, S., & Kaldis, P. (2013). CDKs, Cyclines and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, 140(15), 3079-3093.
132. García-Reyes, B., Kretz, A. L., Ruff, J. P., Von Karstedt, S., Hillenbrand, A., Knippschild, U., ... & Lemke, J. (2018). The emerging role of Cycline-dependent kinases (CDKs) in pancreatic ductal adenocarcinoma. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3219.
133. Lane, D. P. (1992). p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381), 15-16.
134. Hainaut, P., & Hollstein, M. (1999). p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Advances in cancer research*, 77, 81-137.

135. Wijnen, R., Pecoraro, C., Carbone, D., Fiuji, H., Avan, A., Peters, G. J., ... & Diana, P. (2021). Cycline dependent kinase-1 (CDK-1) inhibition as a novel therapeutic strategy against pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). *Cancers*, *13*(17), 4389.
136. Geneva, S. (2014). Mécanismes du développement tumoral. IARC Publication. Lyon, France.
137. Bruno, S., Ghelli Luserna di Rorà, A., Napolitano, R., Soverini, S., Martinelli, G., & Simonetti, G. (2022). CDC20 in and out of mitosis: a prognostic factor and therapeutic target in hematological malignancies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *41*(1), 159.
138. Fischer, P. M., & Lane, D. P. (2000). Inhibitors of Cycline-dependent kinases as anti-cancer therapeutics. *Current medicinal chemistry*, *7*(12), 1213-1245.
139. Garrett, M. D., & Workman, P. (1999). Discovering novel chemotherapeutic drugs for the third millennium. *European Journal of Cancer*, *35*(14), 2010-2030.
140. Hardcastle, I. R., Golding, B. T., & Griffin, R. J. (2002). Designing inhibitors of Cycline-dependent kinases. *Annual review of pharmacology and toxicology*, *42*(1), 325-348.
141. Kaubisch, A., & Schwartz, G. K. (2000). Cycline-dependent kinase and protein kinase C inhibitors: a novel class of antineoplastic agents in clinical development. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, *6*(4), 192-212.
142. Knockaert, M., Greengard, P., & Meijer, L. (2002). Pharmacological inhibitors of Cycline-dependent kinases. *Trends in pharmacological sciences*, *23*(9), 417-425.
143. Mani, S., Wang, C., Wu, K., Francis, R., & Pestell, R. (2000). Cycline-dependent kinase inhibitors: novel anticancer agents. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *9*(8), 1849-1870.
144. Moen, M. D., McKeage, K., Plosker, G. L., & Siddiqui, M. A. A. (2007). Imatinib: a review of its use in chronic myeloid leukaemia. *Drugs*, *67*, 299-320.
145. Noble, M. E., Endicott, J. A., & Johnson, L. N. (2004). Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science*, *303*(5665), 1800-1805.
146. Rosania, G. R., & Chang, Y. T. (2000). Targeting hyperproliferative disorders with Cycline dependent kinase inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, *10*(2), 215-230.
147. Sausville, E. A. (2002). Complexities in the development of Cycline-dependent kinase inhibitor drugs. *Trends in molecular medicine*, *8*(4), S32-S37.

148. Toogood, P. L. (2001). Cycline- dependent kinase inhibitors for treating cancer. *Medicinal Research Reviews*, 21(6), 487-498.
149. Abate, A. A., Pentimalli, F., Esposito, L., & Giordano, A. (2013). ATP-noncompetitive CDK inhibitors for cancer therapy: an overview. *Expert opinion on investigational drugs*, 22(7), 895-906.
150. Pargellis, C., Tong, L., Churchill, L., Cirillo, P. F., Gilmore, T., Graham, A. G., ... & Regan, J. (2002). Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nature structural biology*, 9(4), 268-272.
151. Ohren, J. F., Chen, H., Pavlovsky, A., Whitehead, C., Zhang, E., Kuffa, P., ... & Hasemann, C. A. (2004). Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nature structural & molecular biology*, 11(12), 1192-1197.
152. Sharma, P. S., Sharma, R., & Tyagi, R. (2008). Inhibitors of Cycline dependent kinases: useful targets for cancer treatment. *Current cancer drug targets*, 8(1), 53-75.
153. Galons, H., Oumata, N., Gloulou, O., & Meijer, L. (2013). Cycline-dependent kinase inhibitors closer to market launch?. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 23(8), 945-963.
154. Cicenas, J., & Valius, M. (2011). The CDK inhibitors in cancer research and therapy. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 137, 1409-1418.
155. Fischer, P. M., & Gianella-Borradori, A. (2003). CDK inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Expert opinion on investigational drugs*, 12(6), 955-970.
156. Canavese, M., Santo, L., & Raje, N. (2012). Cycline dependent kinases in cancer: potential for therapeutic intervention. *Cancer biology & therapy*, 13(7), 451-457.
157. Diaz-Padilla, I., Siu, L. L., & Duran, I. (2009). Cycline-dependent kinase inhibitors as potential targeted anticancer agents. *Investigational new drugs*, 27, 586-594.
158. Lapenna, S., & Giordano, A. (2009). Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 8(7), 547-566.
159. Rialet, V., & Meijer, L. (1991). A new screening test for antimitotic compounds using the universal M phase-specific protein kinase, p34cdc2/Cycline Bcdc13, affinity-immobilized on p13suc1-coated microtitration plates. *Anticancer research*, 11(4), 1581-1590.

160. Borgne, A., & Meijer, L. (1999). Inhibiteurs chimiques des kinases dépendantes des Cyclines: recherche et applications thérapeutiques potentielles. *MS. Médecine sciences*, 15(4), 496-503.
161. Gray, N. S., Wodicka, L., Thunnissen, A. M. W., Norman, T. C., Kwon, S., Espinoza, F. H., ... & Schultz, P. G. (1998). Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science*, 281(5376), 533-538.
162. Phase, A. (3). Study Comparing Dinaciclib versus Ofatumumab in Patients with Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (P07714 AM2).
163. Speicher, A., Eicher, T., & Hauptmann, S. (2003). The Chemistry of Heterocycles: Structures, Reactions, Synthesis and Applications.
164. Paruch, K., Dwyer, M. P., Alvarez, C., Brown, C., Chan, T. Y., Doll, R. J., ... & Guzi, T. J. (2010). Discovery of dinaciclib (SCH 727965): a potent and selective inhibitor of Cycline-dependent kinases. *ACS medicinal chemistry letters*, 1(5), 204-208.
165. Booher, R. N., Hatch, H., Dolinski, B. M., Nguyen, T., Harmonay, L., Al-Asaad, A. S., ... & Strack, P. (2014). MCL1 and BCL-xL levels in solid tumors are predictive of dinaciclib-induced apoptosis. *PloS one*, 9(10), e108371.
166. Desai, B. M., Villanueva, J., Nguyen, T. T. K., Lioni, M., Xiao, M., Kong, J., ... & Herlyn, M. (2013). The anti-melanoma activity of dinaciclib, a Cycline-dependent kinase inhibitor, is dependent on p53 signaling. *PloS one*, 8(3), e59588.
167. Nguyen, T. K., & Grant, S. (2014). Dinaciclib (SCH727965) Inhibits the Unfolded Protein Response through a CDK1-and 5-Dependent MechanismSCH727965 Inhibits UPR. *Molecular cancer therapeutics*, 13(3), 662-674.
168. Wang, B., Wu, J., Wu, Y., Chen, C., Zou, F., Wang, A., ... & Liu, Q. (2018). Discovery of 4-(((4-(5-chloro-2-(((1s, 4s)-4-((2-methoxyethyl) amino) cyclohexyl) amino) pyridin-4-yl) thiazol-2-yl) amino) methyl) tetrahydro-2H-pyran-4-carbonitrile (JSH-150) as a novel highly selective and potent CDK9 kinase inhibitor. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 158, 896-916.
169. Wood, D. J., Korolchuk, S., Tatum, N. J., Wang, L. Z., Endicott, J. A., Noble, M. E., & Martin, M. P. (2019). Differences in the conformational energy landscape of CDK1 and CDK2 suggest a mechanism for achieving selective CDK inhibition. *Cell Chemical Biology*, 26(1), 121-130.

170. Martin, M. P., Olesen, S. H., Georg, G. I., & Schönbrunn, E. (2013). Cycline-dependent kinase inhibitor dinaciclib interacts with the acetyl-lysine recognition site of bromodomains. *ACS chemical biology*, 8(11), 2360-2365.
171. Coxon, C. R., Anscombe, E., Harnor, S. J., Martin, M. P., Carbain, B., Golding, B. T., ... & Cano, C. (2017). Cycline-dependent kinase (CDK) inhibitors: structure–activity relationships and insights into the CDK-2 selectivity of 6-substituted 2-arylamino-purines. *Journal of medicinal chemistry*, 60(5), 1746-1767.
172. PDB ID :6GU6.Ligand Interaction.

Résumé :

Le Complexe CDK1-CyclineB ou MPF est un complexe protéique permettant le passage G2/M du cycle cellulaire. Il active ou inhibe des protéines cibles par phosphorylation et contrôle ainsi leur expression. Il a été observé que le MPF est surexprimé dans divers types de cancer, ce qui lui considère comme une cible thérapeutique potentielle. Un des médicaments qui agissent en inhibant est le Dinaciclib. Il s'agit un inhibiteur de CDK1 se liant au poche ATP via le fragment pyrazolopyrimidine.

Le docking moléculaire par les logiciels Pyrx et UCSF Chemira été consacré, cette méthode a permis de réaliser un criblage virtuel de seuls 8 composés présentés une affinité supérieure envers le MPF.

À la fin du docking, les composés 71048607 et 95869569 sont les meilleurs inhibiteurs théoriquement plus sélectifs pour utiliser comme des candidats en médecine et pharmacologie.

Mot clés : MPF, CDK1, Cancer, Dinaciclib, Docking Moléculaire.

Abstract :

The CDK1-CyclineB Complex or MPF is a protein complex allowing the G2/M passage of the cell cycle. It activates or inhibits target proteins by phosphorylation and thus controls their expression. It has been observed that MPF is overexpressed in various types of cancer, which consider it as a potential therapeutic target. One of the drugs that act by inhibiting is Dinaciclib. It is a CDK1 inhibitor binding to the ATP pocket via the pyrazolopyrimidine moiety.

Molecular docking by Pyrx and UCSF Chemira software was dedicated, this method made it possible to carry out a virtual screening of only 8 compounds presenting a higher affinity towards MPF.

At the end of docking, the compounds 71048607 and 95869569 are the theoretically better and more selective inhibitors to use as candidates in medicine and pharmacology.

Keywords: MPF, CDK1, Cancer, Dinaciclib, Molecular Docking.

المخلص:

مركب CDK1-Cycline B او MPF عبارة عن مركب بروتيني يسمح بالانتقال G2/M لدورة الخلية. ينشط أو يثبط البروتينات المستهدفة عن طريق الفسفرة وبالتالي يتحكم في التعبير عنها. لقد لوحظ أن MPF يظهر بشكل مفرط في أنواع مختلفة من السرطان، وبالتالي يعتبر هدفاً علاجياً محتملاً. أحد الأدوية التي تعمل عن طريق التثبيط هو Dinaciclib. وهو مثبط CDK1 يرتبط بجيب ATP عبر جزء pyrazolopyrimidine . تم تخصيص الالتحام الجزيئي بواسطة برنامج Pyrx و UCSF Chemira، وقد أتاحت هذه الطريقة إمكانية إجراء فحص افتراضي لـ 8 مركبات فقط تمثل تقارباً أعلى تجاه MPF. في نهاية الالتحام، مركبتي الالتحام 71048607 و 95869569 هي أفضل من الناحية النظرية والمثبطات الأكثر انتقائية لاستخدامها كمرشحين في الطب والصيدلة.

الكلمات المفتاحية: MPF, CDK1, السرطان, Dinaciclib, الالتحام الجزيئي.