

> Les scientifiques de la station biologique de Roscoff (SBR) travaillent depuis plusieurs dizaines d'années sur la régulation de la division cellulaire en utilisant, comme modèles, des organismes marins. Ceci a notamment conduit à l'étude de kinases dépendantes des cyclines (CDK) qui contrôlent le déroulement du cycle cellulaire. Ces cibles ont ensuite été utilisées afin de caractériser des inhibiteurs pharmacologiques, ou « touches » (*hits*), en mettant en place un criblage automatisé. Le mécanisme d'action des meilleures touches sélectionnées a également été étudié en les dérivant, afin de procéder à des approches de criblages inverses par chromatographie d'affinité. À l'interface entre biologie et chimie, le travail de cette plate-forme place au centre des recherches le composé chimique, qui est à la fois (1) une molécule d'intérêt thérapeutique et (2) un outil moléculaire permettant d'analyser la fonction cellulaire des kinases ciblées. À partir d'organismes marins, huit familles structurales d'inhibiteurs ont été caractérisées sur la plate-forme, et l'espoir est grand de voir la mer nous en apporter de nouveaux, encore plus puissants. >

La plate-forme de criblage KISSf de Roscoff, un site dédié à la recherche sur les inhibiteurs de kinases

En 1872, Henri de Lacaze-Duthiers, professeur à la Sorbonne, fonde à Roscoff le « laboratoire de zoologie expérimentale ». Ses objectifs sont la recherche, l'enseignement et l'accueil scientifique. Le choix de Roscoff s'explique, notamment, par la grande biodiversité végétale et animale, l'accessibilité au matériel biologique, rendue aisée grâce au phénomène de marée, mais aussi par la proximité avec Paris par le train. Plus de 140 ans

Cet article fait partie de la série « Chémobiologie » qui a débuté dans le n° 12, vol. 30, décembre 2014 (www.medecinesciences.org).

Vignette (éponge *Axinella verrucosa*, © Océanopolis, Brest, France). Organisme marin duquel a été extrait un puissant inhibiteur de kinase (l'hymenialdisine, représenté sur la Figure 2).

Chémobiologie (11) Le criblage à Roscoff

Une recherche d'inhibiteurs de kinases tournée vers la mer

Blandine Baratte, Benoît Serive, Stéphane Bach



CNRS/UPMC USR3151, plate-forme de criblage KISSf (*kinase inhibitor specialized screening facility*), station biologique de Roscoff, place Georges Teissier, CS 90074, 29688 Roscoff Cedex, France. bach@sb-roscoff.fr

plus tard, le site roscovite, dont l'effectif dépasse les 300 personnes, est un des centres de biologie marine parmi les plus importants en Europe¹. Au sein de cet institut se trouve une plate-forme de criblage spécialisée dans l'identification d'inhibiteurs chimiques de protéine kinases, la plate-forme KISSf (*kinase inhibitor specialized screening facility*) (Figure 1). Cette spécialisation prend racine dans les années 1970, une vingtaine d'années après la première observation d'une activité kinase assignée à une enzyme hépatique, la caséine kinase, par Eugene Kennedy [1]. En effet, les travaux pionniers de Pierre Guerrier et Marcel Dorée sur l'implication de la phosphorylation dans la reprise du processus de la méiose, notamment chez les ovocytes d'invertébrés marins, ont été réalisés à Roscoff [2]. Ces études ont conduit à la mise en évidence de l'inhibition d'activité de phosphorylation par de petits composés chimiques, tels que le 6-diméthylaminopurine (6-DMAP) [3]. Par la suite, Laurent Meijer poursuit ce travail sur différents modèles marins (*Arenicola marina*, *Urechis caupo*, *Marthasterias glacialis*, etc.). Il participa ainsi à la caractérisation des acteurs kinasiques contrôlant le cycle de division cellulaire, et notamment à la découverte de la kinase dépendante de cycline, CDK1/cycline B [4]. La conservation des acteurs régulant la division cellulaire a permis l'utilisation d'une grande variété de modèles cellulaires. Le choix des modèles marins a été judicieux pour les études biochimiques du fait de la division synchronisée des cellules, qui donne ainsi accès à des quantités importantes de protéines. Le laboratoire a alors développé des stratégies permettant de purifier, à partir d'ovocytes d'étoile de mer, des quantités

¹ <http://www.embrc.eu>

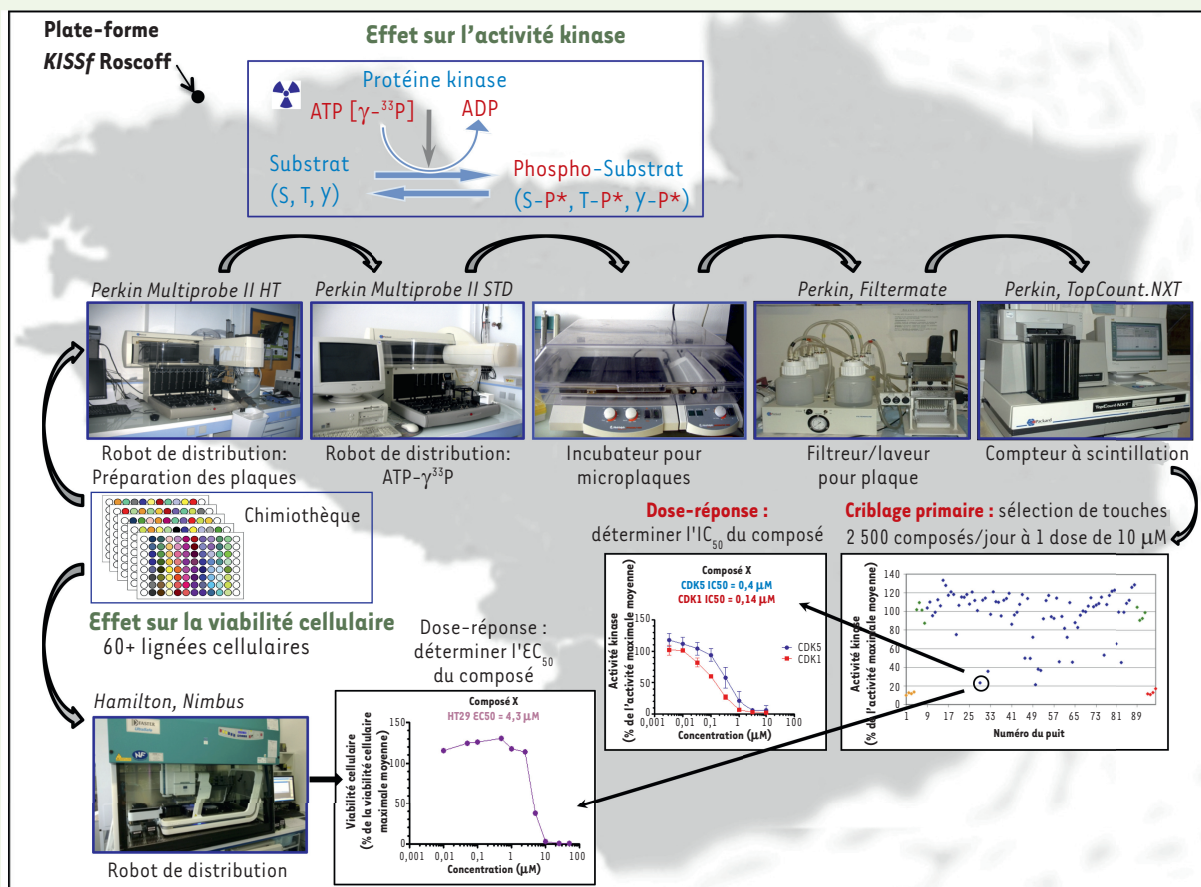


Figure 1. La chaîne robotique de la plate-forme KISSf de Roscoff. Les essais à moyen débit (2 500 composés/jour à une concentration de 10 μM), en criblage primaire, permettent d'identifier des touches. L'inhibition dépendante de la dose conduit au calcul de la concentration du composé nécessaire pour inhiber de moitié l'activité de la kinase (IC_{50}). L'analyse de l'effet des composés sur la viabilité cellulaire est également réalisée dans le cadre des applications « cancer ». L'obtention de courbes dose-réponse permet de déterminer la concentration effective maximale du composé pour laquelle 50 % de la population montre une réponse (EC_{50}). S : sérine ; T : thréonine ; Y : tyrosine ; P* : phosphate radioactif.

significatives d'enzymes natives, rendant ainsi possibles des approches à grande échelle, telles que le criblage moléculaire [5]. Depuis cette orientation thématique, l'équipe de Laurent Meijer soutenait l'idée que les acteurs contrôlant le cycle de division cellulaire pouvaient être des cibles thérapeutiques pertinentes pour le traitement de pathologies humaines – comme le cancer – basées sur un développement cellulaire anarchique. Le milieu des années 1990 marqua le début des approches d'analyse systématique de l'inhibition de kinases d'intérêt thérapeutique à Roscoff. Des inhibiteurs de faible poids moléculaire (environ 350 g/mole) furent caractérisés et, en particulier, une purine substituée en positions 2, 6 et 9, appelée roscovitine (structure représentée dans la Figure 2), pour rappeler l'origine de sa découverte. Elle est au moins 250 fois plus efficace que le 6-DMAP pour l'inhibition de CDK1/cycline B [6]. Des collaborations constantes avec des équipes de chimistes médicaux sont à l'origine de dérivés plus actifs, tels que le CR8, synthétisé en 2008 par l'équipe du Professeur Hervé Galons (université Paris Descartes, Paris, France) [7].

La (R)-roscovitine est à présent un des inhibiteurs de CDK le plus couramment utilisé en recherche fondamentale et appliquée². Sa faible toxicité et ses faibles effets secondaires sont le reflet d'une bonne sélectivité pharmacologique³. Des études ont montré que CDK1, -2, -5, -7 et -9 sont les protéines kinases les plus sensibles à la molécule [8]. Ainsi, exploitée par la société Cyclacel (Berkeley Heights, New Jersey, États-Unis) sous le nom de Seliciclib ou CYC202, elle a notamment atteint la phase 2 d'études cliniques pour le traitement du cancer du poumon non à petites cellules et, plus récemment, de la maladie de Cushing, dont les résultats sont attendus en 2017⁴. La roscovitine

² L'article décrivant son activité inhibitrice est cité plus de 875 fois (source Web of Sciences™).

³ L'estimation des cibles affectées par l'inhibiteur a été la plus exhaustive possible.

⁴ www.clinicaltrial.gov, NCT00372073 et NCT02160730.

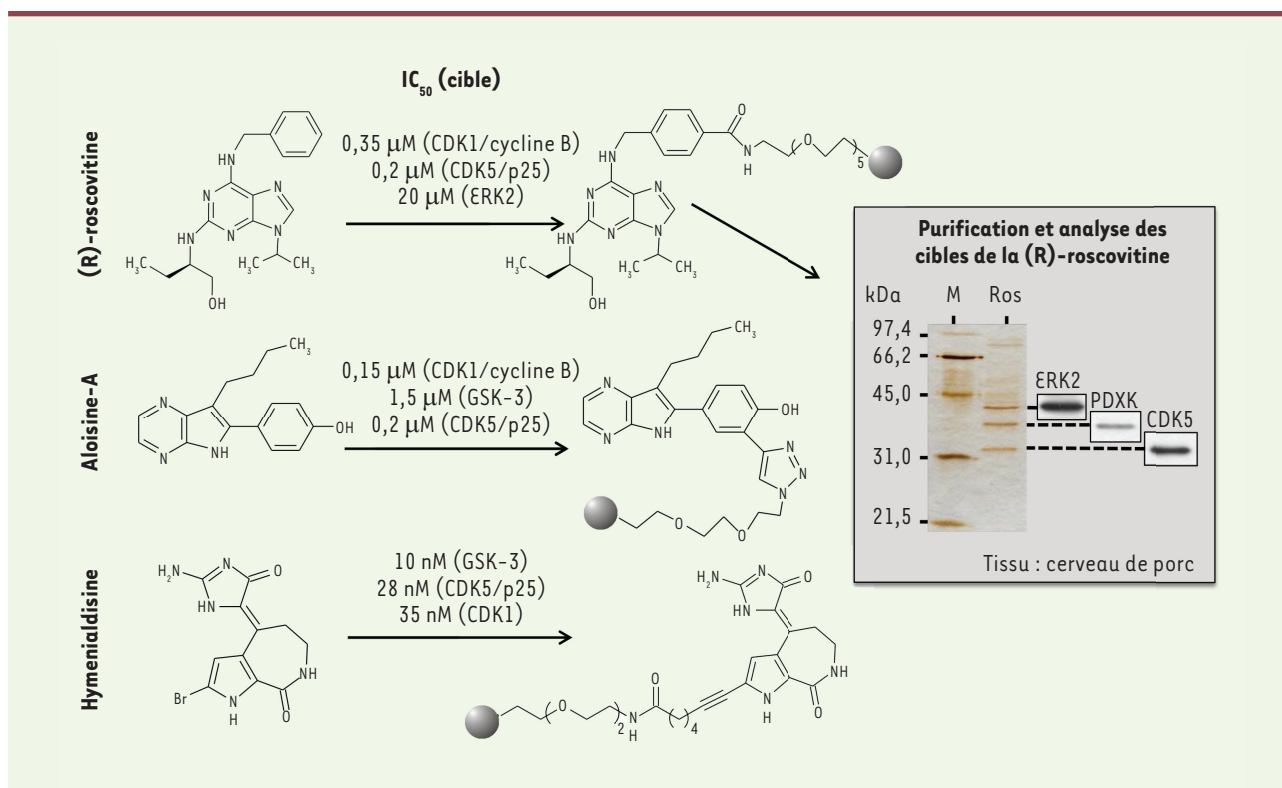


Figure 2. Exemples d'inhibiteurs de kinases « pheres » caractérisés à Roscoff. La sélectivité pharmacologique de ces molécules a été étudiée par chromatographie d'affinité après le greffage sur matrice solide en utilisant le mode de liaison indiqué sur la figure. Un profil caractéristique, obtenu après migration des cibles protéiques potentielles de la (R)-roscovitine sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) est présenté sur la droite de la figure. Comme indiqué, la présence des protéines ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase*), PDXK (*pyridoxal kinase*) et CDK5 peut être mise en évidence par *western blot* en utilisant des anticorps spécifiques. Cette identification peut également être réalisée par spectrométrie de masse. Les IC_{50} indiquées ont été déterminées avec 15 μ M final d'ATP et sont reprises pour la (R)-roscovitine de [8], pour l'aloisine-A de [12] et pour l'hymenialdisine de [15]. GSK-3 : glycogène synthase kinase 3 ; M : marqueur de poids moléculaire ; Ros : billes de (R)-roscovitine.

vitine appartient à une classe de molécules qui possèdent un mode d'inhibition par compétition avec l'ATP et présentent des caractéristiques structurales communes : système hétérocyclique hydrophobe plat, qui occupe la poche de fixation purine en y établissant des interactions hydrophobes et de Van der Waals, ainsi que deux ou trois liaisons hydrogène avec les acides aminés constituant cette poche (deux liaisons H sont établies par exemple entre la roscovitine et la leucine 83 de CDK2) [9, 10].

Les protéine kinases, des cibles thérapeutiques impliquées dans des pathologies multiples

La chaîne robotique de KISSf permet le criblage de 2 500 composés par jour (Figure 1). Une telle plate-forme académique centrée sur l'étude des protéine kinases est unique en France. Elle bénéficie ainsi des soutiens des réseaux IBISA (infrastructures en biologie, santé et agronomie) au niveau national, et de Biogenouest au niveau inter-régional. Au niveau européen, une structure de criblage d'inhibiteurs de kinases

existe, par exemple à l'université de Dundee⁵. Actuellement, des efforts sont réalisés au sein de l'Europe afin de mettre en réseau des acteurs du domaine de la chimobiologie (plates-formes de criblage et chimistes médicaux, publics et privés), tels que les programmes « EU-OPENSREEN » et *European Lead Factory*⁶. L'avenir tend vers une mutualisation des ressources de criblage afin d'optimiser les chances de découverte d'une molécule d'intérêt thérapeutique. C'est dans cette voie que la plate-forme KISSf s'impliquera au cours des prochaines années, au sein du laboratoire dirigé depuis juillet 2011 par le Dr Sandrine Ruchaud, dont la thématique principale est l'étude des kinases mitotiques, telles que l'haspine et la famille des protéines Aurora.

⁵ <http://www.kinase-screen.mrc.ac.uk>

⁶ <http://www.eu-openscreen.eu> et <http://www.europeanleadfactory.eu>

La quasi-omniprésence des protéine kinases dans de multiples pathologies humaines offre de grandes perspectives thérapeutiques [11]. Outre les stratégies d'inhibition des acteurs du cycle cellulaire impliqués en cancérologie, le laboratoire a par exemple exploré des stratégies d'inhibition de kinases impliquées dans des maladies neurodégénératives (dont la maladie d'Alzheimer [12]), des maladies parasitaires (dont la malaria [13]) et, plus récemment, dans la régulation d'une mort cellulaire programmée par nécroptose (en collaboration avec le Dr Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel, Inserm U1085, IRSET, Rennes [14]). La pertinence du choix des cibles kinases est d'une importance cruciale, car elle conditionne la modulation efficace du phénotype cellulaire désiré, par exemple un arrêt de la croissance cellulaire de lignées tumorales. Hormis leur application potentielle en thérapie humaine, ces inhibiteurs sont également des outils essentiels en recherche fondamentale, notamment pour l'étude des fonctions cellulaires des kinases ciblées. La plate-forme dispose ainsi d'une « bibliothèque » de plus de 20 kinases, associées aux essais enzymatiques permettant d'étudier leur activité. Outre la cible, un autre paramètre important en criblage est la diversité chimique des molécules à analyser. C'est notamment grâce à l'intégration de KISSf dans des réseaux thématiques, tels que les groupements de recherche du CNRS (GDR ChemBioScreen et BioChiMar) [31], ou encore l'axe « Valorisation des molécules marines en cancérologie » du cancéropôle Grand-Ouest, que des collaborations avec des équipes de chimistes ont pu être établies. Ces dernières nous permettent d'accéder à une grande variété de structures et d'obtenir des dérivés de sélectivité pharmacologique accrue [30]. Quelques molécules « phares » caractérisées à Roscoff sont représentées sur la *Figure 2*. C'est en collaboration avec le Dr George Pettit du *Cancer Research Institute (Arizona State University, États-Unis)* que l'hymenialdisine, extraite notamment de l'éponge *Axinella verrucosa*, a été caractérisée comme un puissant inhibiteur de kinases d'intérêt thérapeutique [15, 32]. La sélectivité pharmacologique de l'hymenialdisine, ainsi que celle d'autres inhibiteurs caractérisés à Roscoff (dont la roscovitine [8] et l'aloisine [16]), a été étudiée par chromatographie d'affinité (fonctionnalisation des structures représentée sur la *Figure 2*). Cette étude est cruciale pour mieux appréhender, voire expliquer, certains effets secondaires observables lors d'une utilisation chez l'homme (pour revue voir [17]).

La chimiodiversité marine, une ressource majoritairement inexplorée

Actuellement, sept molécules d'origine marine sont sur le marché du médicament, notamment pour le traitement du cancer⁷ [18]. Par exemple, le Yondelis[®] (PharmaMar, Madrid), utilisé pour le traitement de sarcomes des tissus mous évolués, est une molécule retrouvée chez le tunicier *Ecteinascidia turbinata*. Ces molécules font partie des 20 000 structures chimiques d'origine marine déjà connues, révélant une chimiodiversité importante pour les inhibiteurs de kinases. L'inhibition thérapeutique de protéine kinases est d'un intérêt majeur, en particulier

en cancérologie. La *Food and Drug Administration (FDA)* américaine a déjà approuvé la mise sur le marché de 27 inhibiteurs de kinases (dont 14 depuis 2013), principalement dans le cadre du traitement de cancers. En outre, plus de 500 autres inhibiteurs de kinases sont en phase d'étude clinique⁸ [19]. Il est à noter que depuis avril 2015, les premières prescriptions d'Ibrance (Palbociclib, Pfizer) sont effectives aux États-Unis pour le traitement de cancers du sein métastatiques. Il s'agit du premier inhibiteur de CDK (précisément des CDK4 et 6) entrant sur le marché, appartenant à cette classe d'enzymes historiques de la plate-forme KISSf.

De nombreuses pathologies humaines, notamment orphelines⁹ restent sans traitement. Il est donc nécessaire de poursuivre une recherche active de nouvelles structures chimiques d'intérêt thérapeutique. Cela passe, notamment, par une meilleure exploitation du milieu marin encore sous-étudié à ce jour. En effet, les océans sont le berceau prébiotique de notre planète, source d'une immense biodiversité. On compte 21 phylums exclusivement marins sur les 33 phylums connus [20]. On y retrouve, notamment, les invertébrés marins, source indéniable de molécules d'intérêt en thérapie humaine. La plate-forme KISSf est un acteur de cette bioprospection *via* des collaborations avec des chimistes des substances naturelles, tels que le Dr Mohamed Mehiri (institut de chimie de Nice). Leur travail, parfois sur quelques grammes de matériel biologique récolté dans le lagon néo-calédonien ou encore dans le bassin méditerranéen, est fondamental dans cette quête du composé original bioactif, bioactivité sélectionnée au cours de l'évolution pour son rôle (initial) d'ordre écophysio-logique. Ceci s'applique particulièrement aux métabolites extraits de plancton. Les écosystèmes planctoniques marins couvrent près de 98 % du volume de notre biosphère, et la France planctonique est 20 fois plus étendue que sa surface terrestre. Encore très peu étudiés, ces écosystèmes contiennent pourtant de 10 à 100 milliards d'organismes par litre d'eau de mer, une ressource conséquente en termes de formes de vie encore inconnues et de composés bioactifs inexplorés. On estime que 91 % des espèces marines de la planète n'ont pas encore été découvertes, décrites ou classées. Cette biodiversité traduit des formes adaptatives très diverses, pourvues de défenses contre des environnements biotiques et abiotiques généralement hostiles [21, 22]. Les interactions biologiques intraspécifiques ou interspécifiques développées sont pour certaines considérées comme de l'allélopathie (voir *Encadré*). L'étude de ces modes de communication sera peut-être à l'origine des

⁷ Données synthétisées et mises à jour sur le site <http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinPipeline.htm>

⁸ www.brimr.org/PKI/PKIs.htm

⁹ <http://www.orpha.net>

Interactions écologiques intra- et interspécifiques

Allélopathie : l'allélopathie est l'ensemble des interactions biochimiques directes ou indirectes, positives ou négatives, d'une plante sur une autre (microorganismes inclus), au moyen le plus souvent de métabolites secondaires, tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les terpénoïdes et les alcaloïdes. Cette définition initiale peut être élargie à tout organisme vivant, qu'il soit eucaryote ou procaryote, animal ou végétal, microscopique comme macroscopique, et les classes chimiques concernées ne se limitent pas à celles citées. Ces composés allélochimiques jouent un rôle important dans le besoin de développement des organismes en question. Cela passe par l'accès aux ressources environnementales (lumière, substances nutritives, espace vital), par l'armement chimique contre leurs prédateurs, mais aussi par la coopération intra- et interspécifique. Les interactions qui ne sont pas directement concernées par des échanges chimiques (allélopathie) sont la prédation, le parasitisme et le neutralisme. Les autres modes d'interactions (décrits ci-dessous) sont des niches potentielles pour l'identification de nouveaux composés actifs.

Mutualisme : le mutualisme est une association non obligatoire entre des organismes de deux espèces différentes dans laquelle chacun en récupère un bénéfice. Les arrangements mutualistes sont plus susceptibles de se développer entre organismes ayant des exigences de vie très différentes. C'est le cas du partenariat entre les amphiprions (poissons clown) et les anémones de mer.

Symbiose : la symbiose est un cas particulier de mutualisme entre deux organismes interagissant de manière spécifique, intime et obligatoire, qui s'inscrit dans la durée. Un rapprochement physique est généralement observé et, dans certains cas, il peut aller jusqu'à l'internalisation d'un des deux protagonistes, appelé(s) alors endosymbionte(s). Le bénéfice est bilatéral (exemple, le partenariat entre les bactéries chimio-autotrophes et le ver géant des sources hydrothermales *Riftia pachyptila*). Ces interactions mutualistes sont interdépendantes strictes, aucun des partenaires ne pouvant survivre sans l'autre dans des conditions naturelles.

Protocoopération : la protocoopération est une variante du mutualisme dans laquelle l'interaction favorable entre les deux organismes n'est nullement indispensable à leur survie.

Commensalisme : dans ce mode d'interaction, un seul des deux partenaires bénéficie d'un avantage. Le bénéfice est donc unilatéral. Le second partenaire n'est pas ou peu affecté.

Amensalisme : dans ce mode d'interaction, un seul des deux partenaires est affecté négativement. L'autre partenaire n'est pas ou peu affecté.

Compétition : la compétition intervient quand deux organismes d'un environnement donné mettent en œuvre des moyens pour acquérir une même ressource limitée, de nature spatiale (compétition pour l'habitat) ou trophique (compétition pour le régime alimentaire).

Syntrophie : la syntrophie caractérise l'aptitude de deux cellules ou deux souches bactériennes à se développer sur un milieu minimum, uniquement si elles sont en présence l'une de l'autre.

Quorum sensing : ensemble des mécanismes régulateurs qui contrôlent l'expression coordonnée de certains gènes bactériens au sein d'une même population bactérienne. Les bactéries produisent et relarguent des molécules de signal appelées auto-inducteurs, qui augmentent en concentration en fonction de la densité cellulaire.

Déréplication

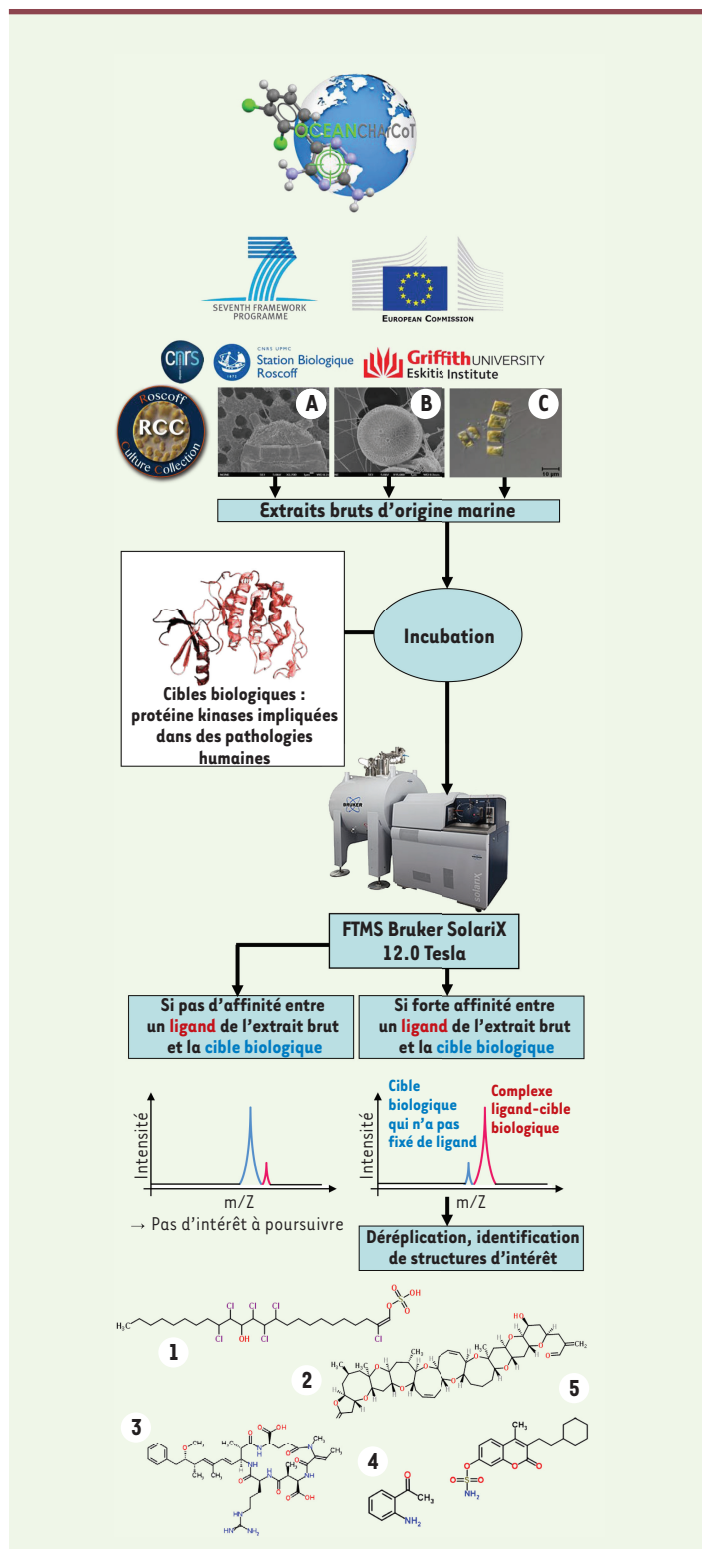
L'objectif de la déréplication est d'identifier le plus tôt possible, dans un mélange complexe (extrait naturel brut), la présence de composés déjà décrits dans la littérature avant même leur isolement physique, qui peut être long et coûteux. Cela implique : (1) d'utiliser des techniques analytiques de caractérisation physico-chimique adaptées aux molécules d'intérêt, et (2) de comparer les profils obtenus à des bases de données chimiques et/ou à une chimiothèque de standards. Ainsi, la probabilité d'arriver à l'élucidation structurale de molécules originales pendant un laps de temps donné est plus élevée que dans le cas d'une recherche de molécules d'intérêt de façon plus traditionnelle.

futurs médicaments d'origine marine. En effet, les biosynthèses qui en résultent conduisent à l'obtention de molécules appartenant, par exemple, aux classes des polycétides, des terpènes, des alcaloïdes, des oxylipines, des glycolipides, des peptides, des polysaccharides, des lectines, des isoprénoïdes, des macrolides et des microlides [23]. Dans le domaine de la pharmacognosie, la communauté scientifique s'accorde à dire que là où l'on trouve des biologies différentes, des chimies sont à découvrir et de nouvelles molécules sont à exploiter. Le potentiel d'exploration est donc très élevé et il est synonyme de découverte de nouveaux agents antitumoraux, antileucémiques, etc. [24, 25]. Néanmoins, seul un programme de criblage à haut débit optimisant les différentes étapes menant à l'identification de « touches » sera à la hauteur de la tâche.

C'est ce que le projet OCEANCHARCoT (*ocean chemodiversity against cell cycle targets*) (Figure 3) a pour ambition de réaliser. Cet acronyme a été choisi en mémoire de Jean-Baptiste Charcot (1867-1936), médecin français et explorateur des zones polaires, qui a organisé des expéditions océanographiques ayant permis de collecter de nombreux échantillons issus de la biodiversité marine.

Le projet OCEANCHARCoT

Le programme OCEANCHARCoT est dédié à la recherche de nouveaux inhibiteurs marins, qui ciblent des



kinases mitotiques (application notamment en cancérologie) et nécroptotiques (mort cellulaire impliquée notamment dans les ischémies cérébrales et cardiaques). OCEANCHARCoT s'appuie sur une méthode de criblage à haut débit innovante. Il s'agit de la spectrométrie de masse par bioaffinité qui utilise une technologie

Figure 3. Représentation simplifiée du programme OCEANCHARCoT (ocean chemodiversity against cell cycle targets), impliquant la plate-forme KISSf. Quelques images en microscopie de la biodiversité planctonique pouvant être explorée ; photographie A : *Odontella aurita* (RCC1977) ; photographie B : *Thalassiosira* sp. (RCC0950) ; photographie C : *Chaetoceros neogracile* (RCC2010). Le Bruker Solarix 12.0 Tesla FTMS est le modèle de spectromètre de masse utilisé pour le criblage par bioaffinité (pour plus de détails voir [27]). La structure protéique tridimensionnelle de CDK2 (code PDB 1aql) est une illustration des cibles kinases étudiées lors de ce programme. Quelques exemples de molécules d'origine planctonique et d'intérêt thérapeutique : (1) Malhamensilipine A, chloro-sulfolipide inhibiteur de tyrosine kinase ; (2) PbTx-1 Brévétaxine A, neurotoxine de type polyéther cyclique. Cette molécule peut se lier au récepteur Fas, induisant ainsi l'apoptose. Elle se lie également aux canaux sodiques et stimule, notamment, la croissance neuronale. Ainsi, elle module de nombreuses voies de signalisation cellulaire, ce qui en fait une molécule très étudiée pour son large panel d'applications cliniques. (3) Nodularine, cyanotoxine (hépatotoxine) de type peptide non ribosomique. Ses activités œstrogénique et d'inhibiteur des phosphatases 1 et 2A ont été mises en évidence. Un potentiel anticancéreux est envisageable. (4) o-aminoacétophénone, molécule génotoxique aromatisante de type cétone aromatique substituée par un groupement amino. Cette molécule a montré un potentiel dans le suivi des patients atteints de mucoviscidose, comme biomarqueur de *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie responsable des surinfections associées à l'aggravation de l'état de santé des patients. (5) STX118, sulfamate qui inhibe différentes enzymes, telles que la sulfatase stéroïdienne, et les anhydrases carboniques de type I et II. Ces dernières sont surexprimées dans les cellules tumorales, ce qui leur confère un avantage de croissance. STX118 possède donc un potentiel antitumoral. À notre connaissance, ces molécules ne sont pas encore développées au niveau clinique.

de pointe : la SEC-ESI-FTICR-MS (*online size exclusion chromatography electrospray ionisation Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*) [26]. L'identification d'un composé actif présent dans un extrait brut est bien souvent fastidieuse et chronophage. L'utilisation de cette technique demeure une des stratégies qui concourent à l'identification plus rapide de nouvelles molécules actives au même titre que d'autres méthodologies, telles que la déréplication (voir *Encadré*). Ce criblage sans *a priori* (interaction cible-ligand) permet d'identifier des inhibiteurs allostériques et non allostériques. En ciblant des zones moins conservées que la poche à ATP des kinases, les inhibiteurs allostériques offrent une meilleure sélectivité pharmacologique

[19]. Cette méthode est basée sur la détection d'une interaction entre une cible biologique (une kinase) et un éventuel ligand présent dans un extrait brut d'un organisme à cribler. Si une interaction est détectée, celle-ci peut être de nature inhibitrice ou activatrice. Dans les deux cas, cette interaction peut présenter un intérêt pharmaceutique à évaluer dans la suite des travaux. Cette détection d'interaction est rendue possible par la sensibilité de la technique, qui peut déterminer la masse d'un ligand avec une erreur de moins de 0,08 dalton, et identifier les composés bioactifs présents dans un extrait brut, même s'ils sont présents à moins de 0,02 % du poids sec de l'extrait [27]. Ce programme d'excellence est soutenu par la Commission européenne dans le cadre d'un financement Marie Curie. Il s'étend de 2014 à 2017 et implique le criblage d'une banque australienne d'extraits d'organismes marins (*Eskitis Institute*, Brisbane, Australie), ainsi que le criblage d'extraits d'une collection de souches marines présente à la station biologique de Roscoff (*Roscoff culture collection*, CNRS/UPMC). Ce programme rejoindra donc les thématiques abordées par le projet investissement d'avenir OCEANOMiCs (coordonné par le Dr Colombar de Vargas, SBR, Roscoff), qui comprend un volet d'exploration des métabolites de protistes marins en culture (pour revue voir [28]). Le criblage de la chimiodiversité des microorganismes est une tendance actuelle. Leur culture en (photo-)bioréacteurs contrôlés permet de s'affranchir de la récolte en milieu naturel, tout en rendant les quantités d'extraits compatibles avec la caractérisation de la bioactivité et la détermination des structures chimiques d'intérêt [29]. Il est, de plus, appréciable de pouvoir étudier et exploiter la plasticité cellulaire de ces microorganismes par des approches génomiques, transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques, ce qui sera le cas dans les programmes initiés à Roscoff. La plate-forme de criblage KISSf, historiquement ancrée dans la bioprospection marine au sein de la station biologique de Roscoff, poursuivra ainsi son travail d'exploration d'un réservoir moléculaire marin encore peu étudié. ♦

SUMMARY

Screening marine resources to find novel chemical inhibitors of disease-relevant protein kinases

Since the early 1970's, investigators at Station Biologique de Roscoff (SBR), France, have been using marine organisms as models to describe molecular pathways conserved through evolution in mammalian cells (e.g. the cyclin-dependent kinases involved in the control of the cell division cycle). Some kinases are misregulated in various human pathologies, including cancers. Using a specialized screening approach, chemical libraries were analysed, using on-site facilities at Roscoff, in order to identify small chemical inhibitors of protein kinases. Eight chemical scaffolds produced by marine organisms were characterized as candidate drugs by our screening facility, some of which are being considered as chemical tools to pinpoint specific cellular functions of the targeted kinases. In this review, we describe our existing screening facilities and we discuss new perspectives related to marine bioprospecting. ♦

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier le Dr Stéphane La Barre pour son aide dans la rédaction de cet article. Les auteurs remercient également : le Dr Sandrine Ruchaud, directrice de l'Unité de service et recherche USR3151 CNRS-UPMC « Phosphorylation de protéines et pathologies humaines », pour son soutien à la bioprospection marine ; le Prémérite André Toulmond pour son travail essentiel de mémoire sur l'histoire de la station biologique de Roscoff ; Céline Liret, Océanopolis, Brest, pour la photo d'*Axinella verrucosa* ; l'équipe de la Roscoff culture collection (RCC), pour les photographies de microalgues en microscopie ; la société Bruker Daltonics pour la photographie du FTICR-MS. La plate-forme de criblage KISSf bénéficie du soutien des réseaux Biogenouest (axe exploration fonctionnelle), IBISA, cancéropôle Grand-Ouest (axe valorisation des molécules marines en cancérologie), et des GDR CNRS « ChemBioScreen » et « BioChiMar ». KISSf est partenaire d'OCEANOMiCs, programme qui a bénéficié d'une aide de l'État gérée par l'Agence nationale de la recherche au titre du programme « Investissement d'avenir » ANR-11-BTBR-0008. Le Dr Stéphane Bach est soutenu par l'INCa (#2012-115) pour son travail sur la mort cellulaire programmée. Le Dr Benoît Serive est bénéficiaire d'une bourse postdoctorale IOF (international outgoing fellowships) « Marie Curie » #622735 de la Communauté européenne.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Burnett G, Kennedy EP. The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem* 1954 ; 211 : 969-80.
2. Guerrier P, Moreau M, Doree M. Hormonal control of meiosis in starfish: stimulation of protein phosphorylation induced by 1-methyladenine. *Mol Cell Endocrinol* 1977 ; 7 : 137-50.
3. Neant I, Guerrier P. 6-Dimethylaminopurine blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity. *Exp Cell Res* 1988 ; 176 : 68-79.
4. Arion D, Meijer L, Brizuela L, Beach D. Cdc2 is a component of the M phase-specific histone H1 kinase: evidence for identity with MPF. *Cell* 1988 ; 55 : 371-8.
5. Azzi L, Meijer L, Ostvold AC, et al. Purification of a 15-kDa cdk4- and cdk5-binding protein. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 13279-88.
6. Meijer L, Borgne A, Mulner O, et al. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 1997 ; 243 : 527-36.
7. Bettayeb K, Oumata N, Echalié A, et al. CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 2008 ; 27 : 5797-807.
8. Bach S, Knockaert M, Reinhardt J, et al. Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 31208-19.
9. Gray N, Detivaud L, Doerig C, Meijer L. ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Curr Med Chem* 1999 ; 6 : 859-75.
10. Meijer L, Raymond E. Roscovitine and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials. *Acc Chem Res* 2003 ; 36 : 417-25.
11. Cohen P. Protein kinases: the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* 2002 ; 1 : 309-15.

RÉFÉRENCES

12. Mettrey Y, Gompel M, Thomas V, et al. Aloisines, a new family of CDK/GSK-3 inhibitors. SAR study, crystal structure in complex with CDK2, enzyme selectivity, and cellular effects. *J Med Chem* 2003 ; 46 : 222-36.
13. Doerig C, Meijer L, Mottram JC. Protein kinases as drug targets in parasitic protozoa. *Trends Parasitol* 2002 ; 18 : 366-71.
14. Jouan-Lanhouet S, Arshad MI, Piquet-Pellorce C, et al. TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/ RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell Death Differ* 2012 ; 19 : 2003-14.
15. Meijer L, Thunnissen AM, White AW, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3beta and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. *Chem Biol* 2000 ; 7 : 51-63.
16. Corbel C, Haddoub R, Guiffant D, et al. Identification of potential cellular targets of aloisine A by affinity chromatography. *Bioorg Med Chem* 2009 ; 17 : 5572-82.
17. Guiffant D, Tribouillard D, Gug F, et al. Identification of intracellular targets of small molecular weight chemical compounds using affinity chromatography. *Biotechnol J* 2007 ; 2 : 68-75.
18. Martins A, Vieira H, Gaspar H, Santos S. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. *Mar Drugs* 2014 ; 12 : 1066-101.
19. Bharate SB, Sawant SD, Singh PP, Vishwakarma RA. Kinase inhibitors of marine origin. *Chem Rev* 2013 ; 113 : 6761-815.
20. Kornprobst JM. *Encyclopedia of marine natural products*. San Francisco : Wiley Blackwell, 2010 : 1680 p.
21. Paul VJ, Ritson-Williams R, Sharp K. Marine chemical ecology in benthic environments. *Nat Prod Rep* 2011 ; 28 : 345-87.
22. Poulson KL, Sieg RD, Kubanek J. Chemical ecology of the marine plankton. *Nat Prod Rep* 2009 ; 26 : 729-45.
23. Burgaud G, Meslet-Cladière L, Barbier G, Edgcomb VP. *Astonishing fungal diversity in deep-sea hydrothermal ecosystems: an untapped resource of biotechnological potential ?* San Francisco : Wiley Blackwell, 2014.
24. Gerwick H, Roberts MA, Proteau PJ, Chen JL. Screening cultured marine microalgae for anticancer-type activity. *J Appl Phycol* 1994 ; 6 : 143-9.
25. Bhatnagar I, Kim SK. Marine antitumor drugs: status, shortfalls and strategies. *Mar Drugs* 2010 ; 8 : 2702-20.
26. Poulsen SA, Davis RA, Keys TG. Screening a natural product-based combinatorial library using FTICR mass spectrometry. *Bioorg Med Chem* 2006 ; 14 : 510-5.
27. Vu H, Pham NB, Quinn RJ. Direct screening of natural product extracts using mass spectrometry. *J Biomol Screen* 2008 ; 13 : 265-75.
28. Abida H, Ruchaud S, Rios L, et al. Bioprospecting marine plankton. *Mar Drugs* 2013 ; 11 : 4594-611.
29. Kornprobst JM. Médicaments de la mer : un état de la question. *Biotendance* 2010 ; 10 : 1-25.
30. Prudent R, Soleilhac E, Barette C, et al. Les criblages phénotypiques ou comment faire d'une pierre deux coups. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 897-905.
31. Mahuteau-Betzer F. Chimiothèque Nationale : avancées et perspectives. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 417-22.
32. Da Silva P, Bendjeddou LZ, Meijer L. Recherche de substances naturelles à activité thérapeutique : George R. Pettit. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 319-28.





Toujours d'actualité
volume 25
www.medicinesciences.org

ANTICORPS MONOCLONAUX EN THÉRAPEUTIQUE

De la conception à la production
La réalité clinique
Un futur en développement

Coordinateurs : Alain Beck,
Jean-Luc Teillaud, Hervé Watier



Tout ce que vous avez toujours voulu savoir sur les anticorps monoclonaux en thérapeutique... dans M/S



Tout ce que vous avez toujours voulu savoir sur les anticorps monoclonaux en thérapeutique... dans *Médecine/Sciences*. Pourquoi un numéro spécial de *Médecine/Sciences* sur les anticorps monoclonaux thérapeutiques ? Il nous a semblé que le moment était venu de dresser un état des lieux de ces biomédicaments qui prennent désormais une place considérable - et croissante - dans les traitements de maladies souvent lourdes et désespérantes. Ce voyage que nous vous proposons à la découverte du monde des anticorps thérapeutiques nous a appris, ou plutôt rappelé, une évidence : les compétences en France sont fortes et nombreuses, qu'elles soient académiques ou industrielles, biotechnologiques ou cliniques. Le paysage français, trop longtemps discret, bruisse désormais de mille initiatives balayant de multiples aspects des anticorps thérapeutiques : études précliniques et cliniques menées avec de nouveaux anticorps dirigés contre des cibles originales, développement de nouveaux formats d'anticorps ou d'anticorps optimisés reposant sur des études structurales et fonctionnelles sophistiquées, recherche active de cibles pertinentes, mise au point de méthodologies de bioproduction, de couplage, etc. L'expansion industrielle rapide de ce champ est un défi que peut et doit relever notre pays, défi tant scientifique qu'économique, avec ses combats pour la propriété intellectuelle et pour l'emploi de nos jeunes scientifiques.

Alain Beck, Jean-Luc Teillaud, Hervé Watier

Bon de commande

À retourner à EDK, 109, avenue Aristide Briand, 92541 Montrouge Cedex, France

Tél. : 01 41 17 74 05 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir M/S n° 12 - décembre 2009 (Anticorps monoclonaux en thérapeutique) : 25 € + 3 € de port = 28 € TTC

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de EDK Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | |

Date d'expiration : | | | | | | | | N° de contrôle au dos de la carte : | | | | |

Signature :