

| | |
|-------------------------|--|
| TITRE (Français) | CARACTERISATIONS BIOCHIMIQUES ET STRUCTURALES D'INHIBITEURS DE FACTEURS D'ECHANGES DES PETITES PROTEINES G ARF ET RHO |
| TITRE (English) | BIOCHEMICAL AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF GEF INHIBITORS |
| AUTEUR | Jean-Christophe ZEEH |

| | |
|---------------------------|--|
| UNIVERSITE | Université paris XI |
| DATE | 13 novembre 2008 |
| LABORATOIRE | Laboratoire d'Enzymologie et de Biochimie Structurales (LEBS-CNRS) |
| DIRECTION DE THESE | Jacqueline Cherfils et Mahel Zeghouf |
| PARRAINAGE | Jacqueline Cherfils |

Résumé en Français :

Les petites protéines G et les facteurs d'échange sont des cibles thérapeutiques potentielles dans de nombreuses pathologies. Leur inhibition reste un véritable défi du fait de la complexité biochimique et structurale de la réaction d'échange. C'est pourquoi il est critique d'identifier les « talons d'Achille » pour pouvoir ensuite guider la découverte de nouveaux inhibiteurs. Une étape importante est de caractériser le mécanisme des inhibiteurs actuellement connus et identifier, puis éventuellement manipuler, leur spécificité. A ce jour, six inhibiteurs des facteurs d'échange sont connus. Dans ce travail, je me suis intéressé à la caractérisation biochimique et structurale de quatre des six inhibiteurs actuellement connus. J'ai démontré, en combinant les données biochimiques et structurales disponibles et en utilisant des analogues de la BFA et des mutants d'Arf et de Sec7, que la BFA possède une double spécificité. Cette spécificité peut être cartographiée à un seul acide aminé sur le domaine Sec7, mais elle semble dépendre de paramètres dynamiques chez Arf. J'ai ensuite participé à la caractérisation de LM11, découvert par criblage *in silico*. J'ai montré que LM11 inhibe l'activation des Arf dans la cellule et j'ai identifié deux résidus du domaine Sec7 et un d'Arf qui permettent de moduler l'inhibition par le LM11. Les constructions d'Arf et de Sec7 établies pour ces deux études m'ont permis d'entreprendre une étude approfondie du mécanisme et de la spécificité *in vitro* de la SecinH3, un inhibiteur chimique découvert en 2007 par déplacement d'aptamères. De façon remarquable, ces trois inhibiteurs ont des mécanismes différents et des spectres de spécificité croisés mais distincts. Mes travaux ont également porté sur l'inhibition par un inhibiteur peptidique d'un autre couple petite protéine G/GEF, RhoA et Tgat, impliqués dans un processus de cancer. Ces travaux suggèrent qu'il devrait être possible, dans le futur,

Résumé en anglais :

Small GTPases and exchange factors are potential therapeutic targets in many diseases. Their inhibition is a challenge because of the biochemical and structural complexity of the exchange reaction. It is therefore critical to identify « Achilles' heel » that will help the discovery of new inhibitors. An important step is to characterize the inhibition mechanism and the specificity of known inhibitors. To date, six inhibitors of GEFs are known. In this work, I focused on the biochemical and structural characterization of four of them: BFA, LM11, SecinH3 and Tripa. In the first part of the work, I used Arf and Sec7 mutants and a BFA analogue to demonstrate the dual specificity of BFA for its GTPase and GEF targets. This specificity depends on a single Sec7 residue and may involve dynamics features of Arf. I was then involved in the characterization of LM11, an ArfGEF inhibitor discovered by in silico screening. I showed that LM11 inhibits Arf activation in cells and identified two residues in the Sec7 domain and one in Arf that are important for its activity. By using Arf and Sec7 constructs established for the BFA and LM11 studies, I went on to characterize the inhibition mechanism and specificity of SecinH3, an inhibitor of the cytohesin family of ArfGEFs discovered in 2007. Remarkably, we find that these three inhibitors act according to different mechanisms, and have different patterns of specificity for their Arf and ArfGEF targets. I finally studied the inhibition by a peptidic inhibitor of the activation of RhoA by an oncogenic RhoGEF called Tgat. These studies, altogether, suggest that GTPases and GEFs are suitable targets for inhibition, and that it should be possible to discover inhibitors that target specific small GTPase/GEF pairs involved in diseases.

* L'ensemble ne doit pas dépasser le bas de cete page.