



HAL
open science

Conception d'inhibiteurs du domaine SH3 de la protéine RasGAP à activité anti-tumorale potentielle

Jerome Samson

► **To cite this version:**

Jerome Samson. Conception d'inhibiteurs du domaine SH3 de la protéine RasGAP à activité anti-tumorale potentielle. Médicaments. Université René Descartes - Paris V, 2005. Français. NNT : 2005PA05P607 . tel-00596955

HAL Id: tel-00596955

<https://theses.hal.science/tel-00596955>

Submitted on 30 May 2011

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

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

UNIVERSITÉ PARIS 5

Faculté de Pharmacie

École Doctorale du Médicament

Année 2005

N°

THÈSE

Présentée
pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Paris 5
Spécialité : Sciences du Médicament

par

M. Jérôme SAMSON

Titre de la thèse :

Conception d'inhibiteurs du domaine **SH3** de la protéine RasGAP
à activité anti-tumorale potentielle

Soutenue le :

JURY : M. Gordon C. TUCKER *Rapporteur*
M. Christian WIDMANN *Rapporteur*
M. Pierre COLAS *Examineur*
M. Michel KOCHOYAN *Examineur*
M. Paul-Henri ROMÉO *Examineur*
M^{me} Christiane GARBAY *Directrice de thèse*

CONFIDENTIEL

I Avant-Propos

II Introduction

III Résultats

IV Annexes

© Jérôme SAMSON, Laboratoire de Pharmacochimie Moléculaire et Cellulaire,
INSERM U648 – CNRS FRE 2718 – Université Paris V
Écrit avec L^AT_EX – Impression le 1^{er} avril 2005

CONFIDENTIEL

Remerciements

Je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury chargé d'évaluer mes travaux de thèse pour l'intérêt qu'ils portent à mes travaux, et notamment, Paul-Henri ROMÉO qui avait guidé mes pas à la sortie de l'école vers une formation par la recherche et qui me fait l'honneur de participer à l'évaluation de cette thèse.

Je remercie également Gordon TUCKER et Christian WIDMANN, d'avoir accepté, en plus de leurs occupations que j'imagine très prenantes, d'examiner mes travaux en qualité de rapporteurs. J'espère que l'honneur que vous me faites sera compensé par l'intérêt que vous pourrez porter à ce manuscrit.

Je garderai un excellent souvenir d'étudiant et de représentant des étudiants au sein de l'École doctorale des Sciences du Médicament, dirigée par Daniel MANSUY. Je vous remercie de m'avoir si bien accueilli dans le Conseil de cette jeune École doctorale. Merci à Lise MUSSET, avec qui j'ai partagé cet honneur de représenter les doctorants, pour les bons moments passés et à venir.

Je souhaite également remercier très chaleureusement Marie-Claude LABASTIE qui a accompagné mes premiers pas dans la biologie expérimentale. Je te dois une grande part de ma connaissance de la biologie moléculaire et cellulaire, mais aussi une reconnaissance immense pour ton suivi attentif de mon parcours de biologiste et pour ton amitié sincère.

Depuis ma découverte de la biotechnologie, j'ai toujours rêvé d'en faire partie. Grâce à Pierre COLAS et à la petite communauté d'Aptanomiciens dont il est l'un des piliers, je suis entré dans ce rêve et pas prêt d'en ressortir. Mon estime et mon respect pour le courage et l'intelligence de votre démarche, et pour l'accueil si chaleureux que vous m'avez tous réservé lors de mes nombreux séjours à Lyon resteront pour longtemps un exemple de l'alliance entre *business*, *science* et *humanisme*.

Je souhaite à ce sujet souligner la richesse de mes relations avec Marc BICKLE, qui restera pour toujours mon gourou de la levure. Travailler avec toi Marc a été un réel plaisir, j'espère avoir été à la hauteur de ton attente même si dans mes mains les levures ne poussent pas si bien que dans les tiennes. Je garde un excellent souvenir de ces longues journées à staker des levures, à échanger beaucoup d'amitié avec tous les Aptanomiciens.

J'envoie également une mention toute spéciale à Nicolas HUGO, avec qui j'ai beaucoup discuté, et pas seulement de biochimie. Je n'oublie pas non plus les autres chercheurs d'Aptanomics, qui ont travaillé avec nous sur ce projet pendant de nombreux mois, qui m'ont toujours accordé écoute et conseils avec une immense bienveillance. J'espère pouvoir bientôt tous vous retrouver et aller « parler levure » au Ninkasi !

Le second laboratoire avec lequel nous avons collaboré dans le cadre de ce projet est le Centre de Biochimie Structurale de Montpellier. Une fois encore, j'ai été accueilli à bras ouverts, par l'hospitalité et la gentillesse sans limites de tous, le directeur des lieux Michel KOCHOYAN le pre-

mier. Vos savoir-faire dans l'étude biophysique des protéines m'ont réellement impressionné, avec une maîtrise à la fois des aspects expérimentaux les plus terre-à-terre et des concepts théoriques dont je ne suis pas encore tout à fait certain d'avoir saisi la quintessence. Votre patience à m'expliquer vos dispositifs expérimentaux et votre soutien dans la réalisation d'une grande partie des dernières expériences ont dépassé mes attentes. Cathy ROYER, un grand merci pour tes conseils et pour l'étude par fluorescence de nos peptides. Yinshan YANG, vous avez mon admiration et ma reconnaissance pour votre aide dans toute la partie RMN de cette thèse, sans vous je n'ose imaginer où en serait ma thèse. Merci de m'avoir toujours répondu si sympathiquement, même à mon n^e appel téléphonique.

Stéphanie PETHE et Perayot PAMONSINLAPATAM, je vous souhaite bonne chance pour continuer ce sujet, je suis sûr que vous arriverez à réaliser tout ce que j'ai mentionné dans les dernières pages de ce manuscrit, et même bien plus. J'ai une très grande confiance en vous pour cela, et je dois dire que c'est juste un peu dommage que vous ne soyez arrivés qu'en cette dernière année (ou que je parte si vite). Je crois très fermement qu'on aurait pu faire une équipe très efficace tous les trois. Stéphanie, une mention spéciale pour toi, merci pour ton soutien pendant la rédaction et pour ta relecture attentive et tes commentaires toujours judicieux (et bon courage pour solubiliser les cailloux que tu synthétises!). En un mot, โชคดี à tous les deux.

Brunilde GRIL, Jennifer DOURLAT, Marie-Priscille BRUN, Jean-Philippe LUZY, et tous les autres étudiants du labo, je vous dis merci, pour la bonne humeur qui a régné dans nos bureaux et labos, pour les petits coups de main aux moments critiques, pour la bonne humeur (encore une fois) et les « serrages de coudes » dans les petites baisses de régime.

Je remercie également tous les chercheurs et membres du laboratoire de Pharmacochimie Moléculaire et Cellulaire, avec quelques mentions spéciales. Tout d'abord à Wang-Qing LIU, pour sa gentillesse et sa patience à me faire partager sa maîtrise de la magie des peptides, pour toutes ses qualités humaines et sa bonne humeur permanente. Michel VIDAL, merci également pour les nombreuses discussions et bonnes parties de rigolade au labo, longue vie au jeune professeur! Enfin, Nohad GRESH, merci de m'avoir initié aux joies du calcul moléculaire, j'aurai aimé avoir plus de temps pour mieux appréhender les apports de la chimie quantique à la modélisation. Un grand merci aussi à Bruno BELLIER, camarade et ancien thésard du labo, pour nos nombreuses discussions et son amitié au long de cette thèse.

Je remercie infiniment Christiane GARBAY, directrice de mes travaux de recherche, pour ces trois années et quelques mois passés dans son équipe, puis dans son laboratoire. Merci de m'avoir pris sous votre aile, en me proposant un sujet presque sur mesure. En me permettant d'accéder à un grand nombre de techniques différentes, vous avez parfaitement saisi mes aspirations. Vous aviez dès le début accepté mes défauts, et notamment ma tendance à papillonner dans de nombreuses directions, et avez réussi à canaliser cette tendance pour m'aider à en faire un atout. Notamment, en initiant ce projet d'ACI, que vous avez soutenu jusqu'à ce qu'il soit accepté par les hautes instances, vous m'avez ouvert les portes de collaborations sur tout le territoire. J'ai énormément appris à vos côtés, notamment sur les qualités nécessaires, et que vous possédez, pour diriger des équipes possédant chacune des spécificités et des aspirations différentes. Vous représentez pour moi l'avenir de la recherche biomédicale, à la fois moderne et rationnelle, et tournée davantage vers les collaborations élargies que vers la course à la publication en équipes

isolées.

Enfin, je souhaite remercier de tout mon cœur ma femme Adeline, dont le soutien constant d'un bout à l'autre de cette thèse a joué un rôle très important dans sa réussite. Dans cette tâche difficile (une thèse ce n'est pas drôle tous les jours, alors l'humeur d'un thésard s'en ressent forcément un peu). Elle-même a été bien aidée par mes parents, mes frères, toute notre grande famille et tous nos amis : un grand *merci* à tous!

Ces travaux n'auraient pas pu être réalisés sans les soutiens financiers de nombreux organismes. Je souhaite notamment remercier l'INSERM, le CNRS et l'Université Paris V, sous la tutelle desquels notre laboratoire est placé. Nous sommes également reconnaissants envers la Ligue contre le Cancer, qui a accordé sa confiance depuis de nombreuses années aux divers projets de notre équipe. La collaboration multi-laboratoires dans laquelle s'est inscrit le sujet « Conception d'inhibiteurs du domaine **SH3** de RasGAP » a reçu le soutien irremplaçable du Ministère délégué à la Recherche, au travers de l'Action Concertée Incitative 2002 « Molécules et cibles thérapeutiques ». Je souhaite également remercier l'Université Paris V, et particulièrement la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, pour m'avoir offert la possibilité de réaliser ces travaux et d'avoir une première expérience d'enseignement en qualité d'Allocataire de Recherche / Moniteur.

Enfin, les derniers mois de bouclage des expériences et de la rédaction auraient été nettement moins sereins sans le concours de l'Association pour la Recherche sur le Cancer, et de tous les donateurs qu'elle représente. De tout cœur, j'espère par ce manuscrit avoir rempli ma part du « contrat de confiance » implicite dans son soutien, et m'être ainsi montré digne des nombreux patients qui espèrent beaucoup des avancées de la lutte contre le cancer.

*Je dédie respectueusement ce manuscrit
à tous ceux, patients et familles,
qui souffrent du cancer.*

Table des matières

Notes préliminaires	15
Contexte et objectifs	19
I Avant-propos	21
1 Cancer : origines moléculaires et traitements	23
1.1 Le cancer : une maladie à incidence mondiale très importante	23
1.2 Origines moléculaires du cancer	27
1.2.1 Mécanismes empêchant l'apparition de tumeurs	27
1.2.2 Nécessité de l'accumulation d'événements pour l'apparition d'une tumeur	28
1.2.3 Oncogènes et Gènes suppresseurs de tumeur	28
1.2.4 Caractère évolutif des tumeurs	30
1.2.5 Facteurs de risques	30
1.3 Stratégies thérapeutiques anti-tumorales	32
1.3.1 Thérapeutiques non médicamenteuses	32
1.3.2 Stratégies non ciblées : molécules cytotoxiques	33
1.3.3 Nouvelles stratégies : thérapeutiques ciblées	35
1.3.4 Le marché actuel de l'oncologie	38
II Introduction	41
2 Signalisation cellulaire et thérapeutique	43
2.1 Les signaux cellulaires : la base de la vie	43
2.1.1 Un modèle de la signalisation cellulaire	43
2.1.2 Signalisation inter-cellulaire	44
2.1.3 Signalisation intra-cellulaire	45
2.2 Signalisation inter-cellulaire	45
2.2.1 Voie endocrine	45
2.2.2 Voie paracrine	46
2.2.3 Neurotransmetteurs	46
2.2.4 Signalisation de contact	46
2.3 Les différents modes de signalisation intra-cellulaire	46
2.4 Les interactions protéine-protéine : de nouvelles cibles thérapeutiques	47
2.4.1 Généralités sur les domaines d'interaction protéine-protéine	47
2.4.2 Principes de la signalisation par interaction protéine-protéine	49

2.4.3	Conception d'inhibiteurs d'interactions protéine-protéine	49
2.5	La voie de signalisation liée aux protéines Ras	52
2.5.1	Généralités sur les protéines Ras et leur activité	52
2.5.2	La voie de signalisation de Ras	57
2.5.3	Dérégulations de la voie Ras et cancer	60
	Conclusion du chapitre 2	62
3	Les domaines SH3	63
3.1	Notion de domaine	63
3.2	Homologies de séquences et de structures	64
3.2.1	Homologie de séquence	64
3.2.2	Homologie de structure	65
3.3	Ligands de domaines SH3	66
3.3.1	Ligands conventionnels	66
3.3.2	Ligands non conventionnels	69
3.4	Conception d'inhibiteurs de domaines SH3	70
4	La protéine RasGAP	73
4.1	Généralités	73
4.2	Régulation	74
4.3	Activité GAP	74
4.4	La région N-Ter	77
4.4.1	La région N-terminale de RasGAP est responsable de son activité d'effec- teur de Ras	77
4.4.2	Clivage par les Caspases de la région N-ter de RasGAP	81
4.4.3	Les domaines SH2 et leurs ligands	83
4.5	Le domaine SH3	83
4.5.1	Généralités sur le domaine SH3	83
4.5.2	Ligands du domaine SH3	86
4.6	Conclusion du chapitre 4	92
III	Résultats	93
	Stratégie de conception d'inhibiteurs de RasGAP-SH3	95
5	Recherche d'aptamères peptidiques reconnaissant RasGAP-SH3	97
5.1	Principe général	97
5.1.1	Description simplifiée	97
5.1.2	Comparaison avec d'autres techniques de biologie combinatoire	100
5.2	Mise en œuvre du crible double-hybride	102
5.2.1	Description du système double-hybride utilisé pour le crible	102
5.2.2	Préparation du crible	105
5.2.3	Description du déroulement du crible	113
5.3	Séquences des aptamères obtenus	119
5.3.1	Aptamères issus de la banque de première génération	119
5.3.2	Aptamères issus de la banque de seconde génération	122

5.3.3	Étude des séquences des régions variables des aptamères	123
5.3.4	Vérification de la spécificité de l'interaction	126
5.4	Étude de l'importance de la plate-forme dans l'interaction	128
5.5	Étude des aptamères obtenus par mutagenèse dirigée du domaine SH3	128
5.5.1	Sites de mutagenèse retenus	128
5.5.2	Matrices d'interaction	131
6	Validation de l'approche et de la cible	135
6.1	Validation <i>in vitro</i> des interactions RasGAP- SH3 /aptamères	135
6.1.1	Expression et purification	136
6.1.2	Expériences de pull-down	137
6.2	Validation sur cultures cellulaires	138
6.2.1	Test de viabilité cellulaire	138
6.2.2	Evaluation de la capacité à former des colonies	140
6.2.3	Test double-hybride en cellules de mammifères	142
6.3	Sélection des aptamères pour étude ultérieure	145
7	Synthèse peptidique de régions variables	149
7.1	Peptides linéaires et cycliques : hypothèses de travail	149
7.2	Peptides issus de l'aptamère RG01	151
7.2.1	Peptides linéaires	151
7.2.2	Tentatives de cyclisation	153
7.3	Peptides issus de l'aptamère RG 27	155
7.3.1	Peptides linéaires	155
7.3.2	Peptides cycliques	157
8	Évaluation des affinités des peptides synthétisés	161
8.1	Expression et purification du domaine SH3 de RasGAP	161
8.1.1	Le vecteur d'expression	161
8.1.2	Expression et purification	162
8.2	Principe de la mesure d'affinité par polarisation de fluorescence	163
8.2.1	La polarisation de fluorescence	163
8.2.2	Aspects expérimentaux et méthodologiques	164
8.3	Résultats obtenus	165
8.3.1	Molécules utilisées dans les interactions	165
8.3.2	Mesures de K_d	166
8.4	Spectroscopie par corrélation de fluorescence	170
8.4.1	Objectifs	170
8.4.2	Principe expérimental	170
8.4.3	Résultats	171
9	Analyse structurale des complexes SH3-peptides issus d'aptamères	173
9.1	Obtention d'informations structurales par RMN	173
9.1.1	Expérience RMN 2D hétéronucléaire HSQC $^{15}\text{N}/^1\text{H}$	174
9.1.2	Résultats	175
9.2	Modélisation moléculaire du complexe RasGAP- SH3 /peptide SP 10	183
9.2.1	Introduction à la modélisation moléculaire	183

9.2.2	Données de départ pour la modélisation	184
9.2.3	Modélisation moléculaire	185
10	Publications	193
	Conclusion générale	215
	Annexes	221
A	Mise au point d'outils de mise en évidence du complexe RasGAP-Aurora	221
A.1	Un besoin à remplir	221
A.2	Synthèse d'un peptide se fixant spécifiquement sur le domaine SH2 de RasGAP .	222
B	Matériels et Méthodes	225
B.1	Biologie Moléculaire	225
B.2	Sélection d'aptamères peptidiques	225
B.3	Biologie cellulaire	225
B.3.1	Culture cellulaire	225
B.3.2	Expression des aptamères	226
B.4	Protéines recombinantes	226
B.4.1	Expression et Enrichissement isotopique	226
B.4.2	Purification	226
B.5	Synthèse peptidique	227
B.5.1	Synthèse en phase solide	227
B.5.2	Purification	229
B.6	Analyse biophysique	229
B.6.1	Mesures d'affinités par polarisation de fluorescence	229
B.6.2	Corrélation de fluorescence	232
C	Domaines SH3 dont la structure a été résolue	235
D	Données RMN	241
D.1	Attributions ^1H du domaine SH3 ²⁷⁵⁻³⁵⁰	242
D.2	Attributions ^1H du domaine SH3 ²⁷⁹⁻³⁴²	243
D.3	Attributions $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ du domaine SH3	244
E	Dynamique moléculaire	247
E.1	Lancement d'une dynamique moléculaire, en utilisant Discover	247
E.1.1	Préparation des fichiers	247
E.1.2	Protocoles de dynamique moléculaire	247

TABLE DES MATIÈRES	13
--------------------	----

Abbréviations et glossaire	254
----------------------------	-----

Bibliographie	280
---------------	-----

Table des Figures	283
-------------------	-----

Liste des Tableaux	285
--------------------	-----

Résumé	288
--------	-----

Jury de thèse

Gordon C. Tucker (*Rapporteur*)

Chercheur, Chef de Projet
Division de Recherches sur le Cancer
Institut de Recherches Servier SAS
Croissy-sur-Seine – France – gordon.tucker@fr.netgrs.com

Christian Widmann (*Rapporteur*)

Professeur d'Université
Directeur de l'Unité de Signalisation Cellulaire
Université de Lausanne – Institut de Biologie Cellulaire et de Morphologie
Lausanne – Suisse – christian.widmann@unil.ch

Paul-Henri Roméo (*Examineur*)

Directeur de Recherche INSERM
Co-Directeur de l'Institut Cochin de Génétique Moléculaire
Université Paris V – CNRS UMR 8104 – INSERM U 567
Paris – France – romeo@cochin.inserm.fr

Pierre Colas (*Examineur*)

Directeur Scientifique
Aptanomics SA
Lyon – France – pierre.colas@aptanomics.com

Christiane Garbay (*Directrice de thèse*)

Professeur d'Université
Directeur du Laboratoire de Pharmacochimie Moléculaire et Cellulaire
Université Paris V – INSERM U648 – CNRS FRE 2718
Paris – France – christiane.garbay@univ-paris5.fr

Michel Kochoyan (*Examineur*)

Professeur d'Université
Directeur du Centre de Biochimie Structurale
Université Montpellier I – INSERM U554 – CNRS UMR 5048
Montpellier – France – m.kochoyan@cbs.cnrs.fr

Notes préliminaires

Notations

Nous avons apporté un soin particulier à observer, autant que possible, un formalisme relativement strict concernant la nomenclature des gènes et protéines cités. Les tableaux qui suivent permettent de retrouver leurs références dans les bases de données (principalement celles du [NCBI](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) www.ncbi.nlm.nih.gov).

Organismes

Le tableau suivant présente les noms scientifiques complets des organismes modèles cités dans ce manuscrit. Pour leurs taxonomies complètes, on pourra notamment se reporter à la base de donnée Taxonomy du [NCBI](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Nom commun	Nom latin	Abréviation
Homme	<i>Homo sapiens</i>	hs
Souris	<i>Mus musculus</i>	mm
Rat	<i>Rattus norvegicus</i>	rn
Vache	<i>Bos taurus</i>	bt
Poule	<i>Gallus gallus</i>	gg
Poisson zèbre	<i>Danio rerio</i>	dr
Xénope	<i>Xenopus laevis</i>	xl
Drosophile	<i>Drosophila melanogaster</i>	dm
Nématode	<i>Caenorhabditis elegans</i>	ce
Arabette courbée	<i>Arabidopsis thaliana</i>	at
Maïs	<i>Zea mays</i>	zm
Riz	<i>Oryza sativa</i>	ot
Levure de boulanger	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	sc
Levure	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	sp
Colibacille	<i>Escherichia coli</i>	ec
Listeria	<i>Listeria monocytogenes</i>	lm
Plasmodium	<i>Plasmodium falciparum</i>	pf
Bactérie marine	<i>Synechococcus sp.</i>	sy.
VIH-1	<i>HIV type 1</i>	HIV-1
Virus du sarcome aviaire	<i>Avian sarcoma virus</i>	Asv

TAB. 1 – Organismes

Gènes et protéines

Dans la mesure du possible, ce manuscrit est rédigé en suivant les conventions habituelles de notations des noms de protéines et de gènes. Ainsi, les noms de gènes sont écrits en italique, et les noms de protéines en lettres droites. Dans le texte, ces noms seront écrits en police serif.

On fera précéder éventuellement les noms de gènes ou de protéines par les initiales de l'organisme considéré (hs pour *Homo sapiens* par exemple).

Les mutations ponctuelles sont notées par exemple a345t, pour la mutation de la 345^e base du gène considéré, transformant la base a en t. Les mutations protéiques sont notées en majuscules. Toutes ces mutations sont placées en exposant.

Exemples :

- hs_RasGAP désigne un produit protéique,
- *hs_RasGAP* désigne le gène codant pour cette protéine,
- hs_RasGAP^{W317K} désigne la mutation sur la protéine hs_RasGAP transformant le tryptophane 317 en une lysine.

Les domaines protéiques sont notés en gras et en serif. Par exemple : domaine **SH3**.

Références à des bases de données

<i>Protéine</i>	<i>Gène</i>	<i>OMIM</i>
Ras		
N-Ras		164790
H-Ras		190020
K-Ras		190070
Ras GTPase activating protein		
RasGAP	<i>RASA1</i>	139150
NF-1		162200
p100GAP		601589
Aurora		
Aurora A	<i>STK15</i>	603072
Aurora B	<i>STK12</i>	604970
Aurora C	<i>STK13</i>	603495
Grb2		108355
G3BP		608431

TAB. 2 – Références OMIM des protéines citées dans ce manuscrit. La base de données OMIM™ (*Online Mendelian Inheritance in Man*, www.ncbi.nlm.nih.gov) est un catalogue des gènes humains et des maladies génétiques associées à ces gènes. Elle contient également des liens bibliographiques et vers les différentes données associées à ces gènes : séquences de référence, ARNm, séquences protéiques, structures...

Types cellulaires utilisés

Le tableau 3 présente les différentes lignées cellulaires que nous avons utilisées dans ces travaux. En plus de ces lignées tumorales, nous avons également utilisé des cellules NHBE,

fibroblastes normaux de poumon humain. Les références ATCC renvoient à l'*American Type Culture Collection* (www.atcc.org).

Nom	ATCC	Type	Organe	Cellules	T	Caractéristiques
HeLa ¹	CCL-2	adenocarcinome	col utérin	épithéliales	✓	HPV-18 p53 ⁻ pRB normal forte aneuploïdie
MDA-MB-231	HTB-26	adénocarcinome	sein	épithéliales	✓	EGF ⁺ TGF- α ⁺ WNT7B ⁺
HCT116	CCL-247	carcinome	côlon	épithéliales	✓	TGF β -1 ⁺ TGF β -2 ⁺ Ras ^{G13C}
NCI-H460	HTB-177	carcinome	poumon	épithéliales	✓	p53 normal

TAB. 3 – Types cellulaires utilisés. T : tumorigène sur souris nude.

1. Initiales du nom de Henrietta Lacks (décédée en 1951), dont ces cellules ont été prélevées (Jones, 1997).

Contexte et objectifs

Contexte

En guise d'avant-propos, le *premier chapitre* présente le contexte dans lequel se placent nos travaux, en exprimant les besoins et les différentes approches thérapeutiques dans le domaine du cancer. À un niveau plus directement relié au sujet de cette thèse, les chapitres suivants présentent également les contextes cellulaires, moléculaires et bibliographiques dans lesquels elle s'inscrit : la signalisation cellulaire et son implication dans le processus tumoral (*chapitre 2*), les caractéristiques et l'importance des domaines **SH3** dans la signalisation cellulaire (*chapitre 3*), avant de revenir nous concentrer plus directement sur la protéine RasGAP et ses différents rôles dans la régulation de la division cellulaire (*chapitre 4*).

Objectifs

Les objectifs de ces travaux sont doubles :

- d'une part, il s'agit pour nous d'apporter de nouvelles pistes pour la conception de molécules anti-tumorales ciblant le domaine **SH3** de RasGAP, en proposant des peptides interagissant avec ce domaine et en identifiant précisément leur site de fixation.
- d'autre part, il s'agit également de démontrer sur un exemple particulièrement adapté que la technologie des aptamères peptidiques (*chapitre 5*) est parfaitement à même d'apporter des réponses tant sur le plan de la biologie cellulaire pour la validation d'une approche thérapeutique (*chapitre 6*), que sur le plan structural, en ouvrant de nouvelles voies d'accès à l'obtention de structures de sites d'intérêt thérapeutique (*chapitres 7 à 9*).

Première partie
Avant-propos

Chapitre 1

Cancer : origines moléculaires et traitements

L'objectif de ce premier chapitre est de donner un bref aperçu de l'incidence actuelle du cancer dans le monde, de dépeindre les principaux mécanismes moléculaires à l'origine de cette maladie et de présenter un état des lieux des stratégies thérapeutiques aujourd'hui à la disposition des médecins pour le traitement des patients.

1.1 Le cancer : une maladie à incidence mondiale très importante

La lecture du tableau 1.1, qui présente les incidences et taux de mortalité liés au cancer, impose immédiatement deux commentaires :

- le cancer est une maladie frappant principalement les populations des pays développés,
- le taux de mortalité est nettement supérieur dans les pays du monde les moins développés du fait du manque de moyens thérapeutiques offerts dans ces régions.

Regions	Gender	Cases	Deaths	
			Total	Per cases
Less developed	Male	113,8	82,3	72,3%
	Female	106,9	63,8	59,7%
More developed	Male	433,3	257,5	59,4%
	Female	356,5	189,7	53,2%

TAB. 1.1 – Cancer : incidences et taux de mortalités recensés dans les pays plus ou moins développés. Les nombres de cas sont donnés pour 100.000 habitants. Données mondiales 2000 ([Parkin et al., 2001](#))

En termes de pathologies, dans les pays les plus développés de la planète, la mortalité par maladies cardiovasculaires est en baisse continue depuis au moins une trentaine d'années. Cette baisse est principalement due d'une part à une meilleure prise en charge de l'hypertension et des autres facteurs de risques, et d'autre part à une meilleure prévention, notamment au niveau alimentaire. Les autres causes de mortalité, notamment par accident ou à la suite de maladies infectieuses, sont également soit en baisse légère, soit stables à un niveau très bas.

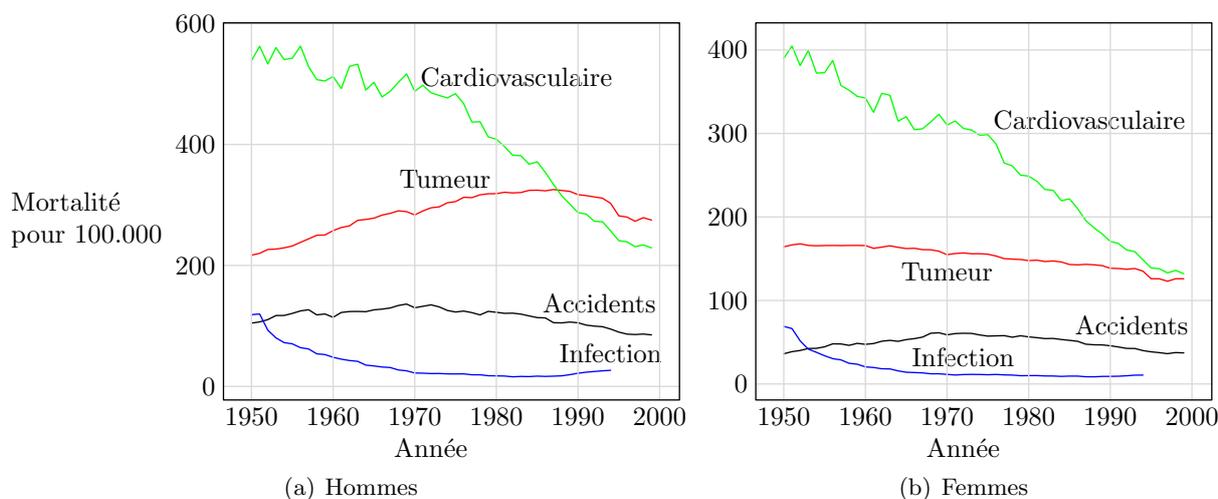


FIG. 1.1 – Évolution des causes de mortalité en Europe, entre 1950 et 2000, d'après Hill & Doyon (2004).

En revanche, la mortalité due au cancer ne diminue que très faiblement, et augmente même dans certains pays (voir figure 1.1 pour l'Europe), au point d'avoir dépassé celle due aux maladies cardiovasculaires, en dépit des efforts soutenus de recherche, de dépistage et prévention, et de traitements. Une première hypothèse pour tenter de justifier cet accroissement est l'augmentation de l'espérance de vie. Cependant, si cette explication est tout à fait en accord avec l'importante incidence du cancer chez les personnes âgées, elle n'est pas suffisante, comme le montre la lecture des graphiques de la figure 1.2. En effet, ces graphiques semblent montrer que le cancer n'est pas la première cause de mortalité des personnes très âgées, mais est responsable de plus de la moitié des décès des femmes âgées de 45 à 65 ans, et des hommes âgés de 55 à 65 ans.

L'accroissement de l'espérance de vie ne peut donc expliquer complètement l'augmentation de la mortalité due au cancer. Il faut rechercher d'autres justifications, et notamment essayer d'identifier les modifications d'exposition à des facteurs de risque comportementaux et environnementaux. L'augmentation de la consommation de tabac dans les pays développés entre les années 1940 et 1980 peut expliquer en partie l'augmentation de mortalité par cancer observée actuellement. L'échelle de temps de la latence des effets du tabac sur l'apparition de cancer étant de l'ordre de plusieurs dizaines d'années, la récente et relative diminution de consommation n'est probablement pas encore très visible au niveau de la mortalité due au tabac.

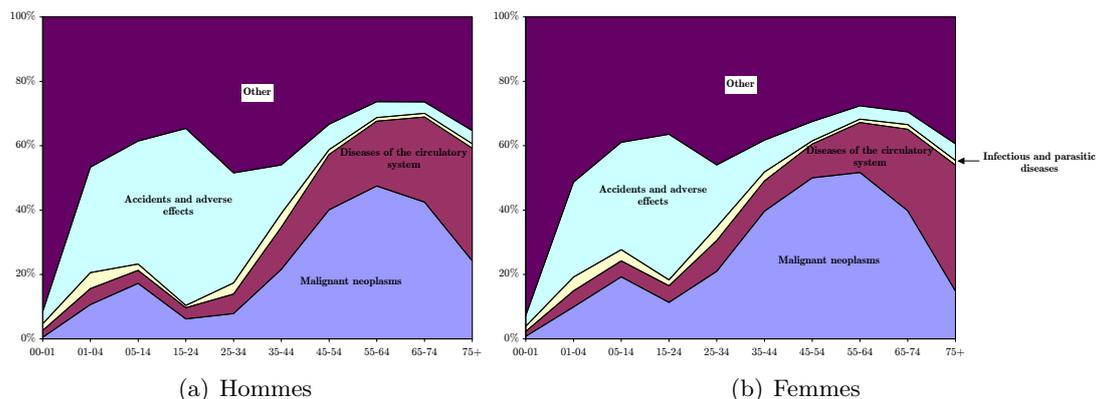


FIG. 1.2 – Mortalité en France en 1999 par classes d'âges, en pourcentages.

Les tableaux 1.2 présentent les dix localisations les plus fréquentes (en terme d'incidence) de cancer en France pour les hommes et les femmes. On y retrouve nettement les très fortes incidences des cancers liés au tabac (poumon, oesophage, gorge) pour les deux sexes, mais également la très importante incidence des cancers de la sphère gynécologique chez la femme (sein, utérus, ovaires).

D'autre part, il est intéressant de comparer dans ces tableaux la proportion de cas mortels selon l'incidence du type de cancer considéré. Notamment, chez la femme, le cancer du sein qui est à la fois le plus fréquent et celui occasionnant le plus de décès, est moins fréquemment mortel (environ 35% de cas mortels) que le cancer du poumon, pour lequel on retrouve un taux de mortalité à peu près similaire à celui des hommes (femmes : 86%, hommes 90%). Ainsi, le cancer du poumon qui ne représente que le quatrième type de cancer le plus fréquent chez les femmes, est le second en terme de nombre de décès.

(a) Hommes

Cancer	Cases			Deaths			
	#	Total	Per 100 000	#	Total	Per 100 000	Per case
All sites		5 317 905	174,4		3 522 366	115,5	66,2
Lung	1	901 746	29,6	1	810 419	26,6	89,9
Stomach	2	558 458	18,3	2	405 215	13,3	72,6
Prostate	3	542 990	17,8	6	204 313	6,7	37,6
Colon/Rectum	4	498 754	16,4	4	254 816	8,4	51,1
Liver	5	398 364	13,1	3	383 593	12,6	96,3
Oesophagus	6	278 985	9,2	5	226 901	7,4	81,3
Bladder	7	259 771	8,5	9	99 059	3,3	38,1
Oral cavity	8	169 524	5,6	11	80 839	2,7	47,7
Non-Hodgkin lymphoma	9	166 624	5,5	10	93 309	3,1	56,0
Leukaemia	10	144 321	4,7	8	109 309	3,6	75,7

(b) Femmes

Cancer	Cases			Deaths			
	#	Total	Per 100 000	#	Total	Per 100 000	Per case
All sites but skin		4 737 646	157,6		2 686 313	89,4	56,7
Breast	1	1 050 346	34,9	1	372 969	12,4	35,5
Cervix uteri	2	470 606	15,7	5	233 372	7,8	49,6
Colon/Rectum	3	445 963	14,8	4	237 595	7,9	53,3
Lung	4	337 115	11,2	2	292 700	9,7	86,8
Stomach	5	317 883	10,6	3	241 352	8,0	75,9
Ovary etc.	6	192 379	6,4	7	114 240	3,8	59,4
Corpus uteri	7	188 952	6,3	14	44 712	1,5	23,7
Liver	8	165 972	5,5	6	164 961	5,5	99,4
Oesophagus	9	133 342	4,4	8	110 600	3,7	82,9
Non-Hodgkin lymphoma	10	120 804	4,0	11	67 818	2,3	56,1

TAB. 1.2 – Incidences et taux de mortalité par types de cancer. Données mondiales 2000 (Parkin et al., 2001)

Plusieurs facteurs peuvent être invoqués pour tenter d'expliquer ces différences de taux de mortalité des patients atteints de cancers situés dans ces organes. La différence des fréquences d'évolution mortelle des cancers du sein et du poumon est probablement la plus facilement explicable, sans avoir besoin de considérer les différences évidentes entre les tissus. Premièrement, le dépistage, de plus en plus systématique, des cancers du sein chez les sujets à risques (âge, nombre d'enfants, antécédents familiaux...) permet un diagnostic plus précoce des tumeurs mammaires que des cancers pulmonaires, dont les premiers signes cliniques sont bien souvent ceux d'un cancer très avancé (forte douleur, fatigue, ganglions...) et métastatique. Sur un plan thérapeutique, la chirurgie mammaire est souvent très efficace, et permet la disparition quasi-complète de la tumeur, alors que la résection de tumeurs du poumon est une opération très lourde et dont l'efficacité est moins souvent totale.

Pour mieux appréhender ces disparités des taux de survie des patients atteints de différents types de cancers, il serait intéressant de comparer les évolutions historiques de ces taux avec les apparitions des nouvelles méthodes de diagnostic et des nouvelles thérapeutiques. Concernant les cancers du poumon et certains autres cancers (notamment gastro-intestinaux), les chimiothérapies classiques apparues depuis les années 1950 n'ont apporté que de faibles améliorations

des taux de survie. Ce n'est qu'aujourd'hui, avec la découverte des particularités moléculaires de ces cancers, et la mise au point de thérapies ciblées, que, dans certains cas, une amélioration de la prise en charge a pu être apportée¹.

1.2 Origines moléculaires du cancer

Sous l'appellation très générale de cancer, on désigne une pathologie, aux origines très variées, et qui se caractérise par l'échappement de certaines cellules de l'organisme aux mécanismes de régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Ces amas de cellules dérégulées prennent alors le nom de tumeur. Un individu atteint d'un cancer à un stade avancé est bien souvent porteur d'un grand nombre de tumeurs.

1.2.1 Mécanismes empêchant l'apparition de tumeurs

Les cellules de notre organisme sont programmées génétiquement pour se diviser et se différencier de façon très contrôlée. Certaines des multiples modalités de contrôle de ces régulations seront l'objet de développements ultérieurs dans ce manuscrit. Néanmoins, on peut citer ici très rapidement quelques mécanismes de cette régulation, et qui agissent *normalement* pour empêcher l'apparition de tumeurs.

Limitation du nombre de divisions La plupart des cellules sont capables de réaliser un nombre limité de divisions², en raison principalement de l'activité de diverses protéines réduisant à chaque division la longueur des télomères³. Ainsi, au delà d'un certain nombre de divisions, ces enzymes commencent à atteindre les parties codantes des extrémités des chromosomes, où de nombreux gènes vitaux sont placés. Les cellules qui se sont donc divisées un trop grand nombre de fois, et dont les télomères sont très raccourcis, meurent et ne peuvent donner naissance à une tumeur⁴. Pour des raisons évidentes, certaines cellules de notre organisme, notamment les cellules souches, ont besoin d'avoir un potentiel de division quasi illimité. Dans ces cellules, une protéine, la télomérase *hs_TERT*, est exprimée, et rétablit à chaque division les télomères à leur longueur normale (Nakamura & Cech, 1998). Il en est de même pour les cellules des lignées germinales, qui possèdent donc des télomères longs, permettant aux cellules issues d'une fécondation de démarrer le développement d'un organisme avec une capacité de division initiale rétablie à une valeur suffisante⁵. Les cellules cancéreuses sont susceptibles d'échapper à ce mécanisme en restaurant un niveau d'expression de la Télomérase rétablissant les télomères à leur longueur initiale à chaque division.

1. Les nouvelles indications de l'imatinib (Gleevec[®]) dans certaines tumeurs stromales gastro-intestinales et dans le dermatofibrosarcome protubérant sont probablement l'un des meilleurs exemples de ce type (Sawyers, 2002).

2. Cette limitation du nombre des divisions possibles a été constatée pour la première fois *in vitro* par Hayflick & Moorhead (1961).

3. Extrémités principalement non codantes des chromosomes, constituées essentiellement de répétitions successives d'un motif simple composé de la succession de bases : TTAGGG.

4. Cette limitation du nombre de divisions est appelée « sénescence » de premier stade M1 (Rangarajan & Weinberg, 2003). Une seconde étape de limitation des divisions (M2) intervient peu après si la première est dépassée (par l'inactivation de p53 par exemple) et donne lieu à une très importante mortalité cellulaire (« crise »). Cette seconde étape n'est dépassée que par les cellules qui auront acquis une inactivation de la télomérase *hs_TERT* (Cong et al., 2002)

5. Nous verrons plus loin que cette Télomérase est une cible majeure en cancérologie.

Inhibition de contact L'inhibition de la prolifération initiée par les contacts des cellules entre elles est un autre processus permettant d'empêcher l'apparition de tumeurs. Ce mécanisme repose à la fois sur des signaux transmis à distance, au travers de la matrice extracellulaire (molécules qui diffusent autour d'une cellule) et par des signalisations de contact direct entre cellules. C'est ce même mécanisme qui provoque l'arrêt de la division cellulaire de cultures primaires dans une boîte lorsque la confluence est atteinte. En revanche, la plupart des lignées tumorales adhérentes continuent leur prolifération même lorsque le fond de la boîte est couvert. Ce mécanisme semble être basé principalement sur la voie de signalisation β -catenin/Cadherin (Orford et al., 1999). Au niveau de l'organisme, ce système permet des réponses adaptées à différentes situations : déclenchement de la division cellulaire pour le remplacement de cellules détruites puis arrêt de la division cellulaire lorsque le remplacement est terminé.

Maintien de l'intégrité du génome De nombreux mécanismes, impliquant notamment les protéines p53 ou pRB⁶, permettent à une cellule de détecter une éventuelle altération de son génome, à la suite, soit d'une division cellulaire anormale, soit d'un autre événement (par exemple cassure de l'ADN par un rayonnement ionisant, stress de natures diverses). Cette détection provoque une cascade d'événements qui déclenchent l'entrée en apoptose de la cellule. Ce mécanisme a pour effet d'éliminer la plupart des cellules susceptibles de générer l'apparition de tumeurs (Olivier et al., 2002).

1.2.2 Nécessité de l'accumulation d'événements pour l'apparition d'une tumeur

Ces différentes régulations opèrent donc en parallèle pour empêcher l'apparition de tumeurs. Lorsqu'une cellule acquiert la capacité d'enfreindre l'une de ces limitations, en raison par exemple d'une agression extérieure, les autres cellules, restées normalement intactes, ne permettent pas à cette cellule de donner naissance à une tumeur. L'apparition d'une tumeur est donc un événement qui devrait être très rare, en raison précisément de cette nécessité d'accumulation de mutations au sein de mêmes cellules. Il a ainsi été démontré qu'il est nécessaire et suffisant (Hahn et al., 1999) de modifier l'expression de quelques gènes clés⁷ pour transformer des cellules normales en culture en une lignée tumorale.

1.2.3 Oncogènes et Gènes suppresseurs de tumeur

Les gènes impliqués dans ces mécanismes, tant pour empêcher une cellule de devenir cancéreuse que ceux qui permettent la progression tumorale ont été regroupés en deux familles : **oncogène** et **gène suppresseur de tumeur** (ou **anti-oncogène**).

Oncogènes et proto-oncogènes Les oncogènes ont d'abord été identifiés dans le génome de virus⁸ (murins ou aviaires principalement) provoquant des cancers suite à l'infection virale (voir par exemple le cas de la protéine Src Parker et al., 1981). Ce sont des gènes, qui lorsqu'ils sont exprimés dans une cellule, provoquent l'apparition d'une tumeur. Longtemps après leur identification dans ces virus, des gènes quasiment identiques et très conservés ont été identifiés

6. Proto-oncogène impliqué dans le rétinoblastome.

7. Expression de la télomérase *TERT*, d'un allèle oncogène de *Ras*, et de l'oncogène viral *SV40-T*.

8. J. Michael Bishop et Harold E. Varmus ont reçu le Prix Nobel de Médecine en 1989 pour leurs travaux sur les oncogènes issus de rétrovirus (Bishop, 1982).

chez les vertébrés. Ces gènes sont donc homologues à des oncogènes, mais leur expression dans une situation normale ne déclenche pas de processus tumoral (voir figure 1.3). Cependant, à la suite d'une mutation ou d'une expression dérégulée, ils peuvent donner naissance à une tumeur : ces gènes ont donc été appelés **proto-oncogènes**, car ils ne sont pas à proprement parler des **oncogènes** (toujours dans le cas de *Src*, voir par exemple [Irby et al., 1999](#)). Les protéines exprimées par ces gènes ont en général des rôles importants dans la division et la différenciation cellulaire.

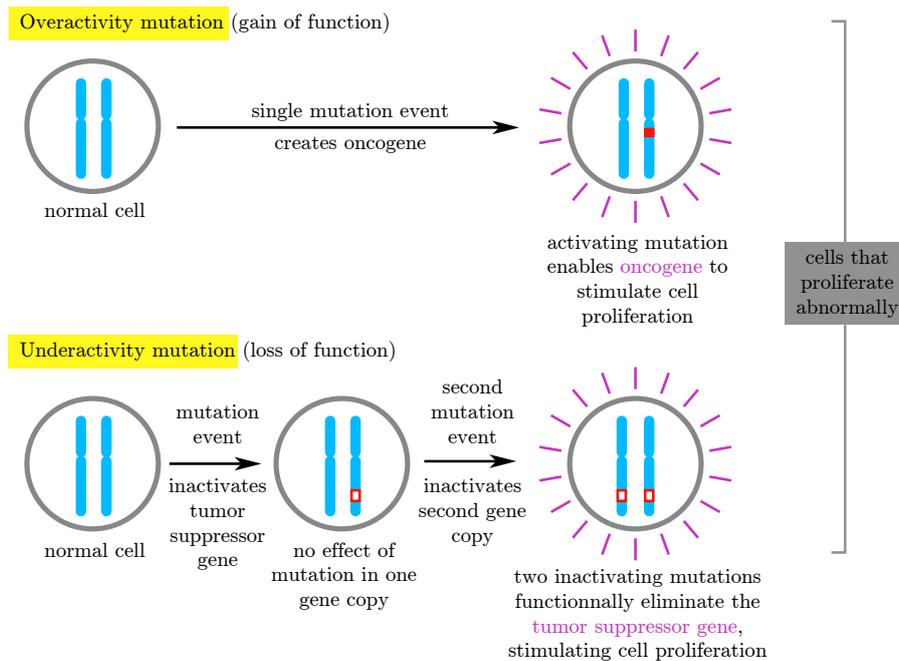


FIG. 1.3 – La transformation d'un proto-oncogène en oncogène actif est plus fréquente que la délétion des deux allèles d'un gène suppresseur de tumeur (d'après [Alberts et al., 2002a](#)).

Gènes suppresseurs de tumeur A l'opposé des oncogènes, il existe un certain nombre de gènes qui codent pour des protéines (notamment pRB et p53 [Vogelstein & Kinzler, 1992](#)) jouant un rôle de gardien et empêchant une cellule de devenir cancéreuse, même si elle exprime un oncogène. Pour qu'une cellule devienne cancéreuse, il faudra donc que cette activité ait disparu, ce qui ne peut arriver qu'après une inactivation des deux allèles de ce gène⁹. Un certain nombre de cancers héréditaires sont dus à l'expression, dans ces familles, d'un allèle inactif d'un tel gène suppresseur de tumeur : en cas de perte de fonction du second allèle, une cellule portant la mutation héritée peut devenir tumorale (voir figure 1.3). Cet événement étant nettement plus fréquent qu'une perte de fonction successive de deux allèles, les individus de ces familles développent fréquemment des cancers¹⁰.

9. Les protéines E6 et E7 du Papillomavirus se fixent et inhibent les protéines suppresseurs de tumeur p53 et pRB.

10. L'apparition d'une tumeur suite à l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur a donc un caractère récessif, alors que la modification d'un proto-oncogène en oncogène activée a un caractère dominant.

1.2.4 Caractère évolutif des tumeurs

Une tumeur apparaît tout d'abord sous la forme d'une seule cellule anormale, ayant acquis des caractères particuliers lui donnant un avantage sélectif (au sens de Darwin) sur les cellules voisines, et ayant perdu toutes les régulations qui lui donnaient un comportement « solidaire » du reste de l'organisme. De plus, les mécanismes qui ont donné naissance à ces mutations, ont « brisé les verrous » de maintien de l'intégrité du génome. La tumeur, au départ un simple clone (c'est-à-dire un amas de cellules identiques issues d'une seule cellule), va donc pouvoir évoluer. La rapidité des divisions cellulaires, les stress induits par l'hypoxie accompagnant le développement très rapide de la tumeur avec une néo-vascularisation insuffisante, ainsi que les éventuels traitements vont permettre une évolution accélérée avec une forte pression de sélection. Les nouvelles anomalies génétiques qui vont alors survenir ne vont plus être éliminées mais au contraire sélectionnées pour les éventuels avantages qu'elles apportent aux cellules de la tumeur.

Ce caractère très instable des tumeurs ne doit pas être perdu de vue lorsque l'on conçoit une nouvelle molécule anti-tumorale ciblée : il faudra trouver le juste équilibre entre la forte spécificité pour la cible afin d'éviter les effets secondaires (par action de la molécule sur d'autres protéines), et l'insensibilité à de faibles variations du site visé, suite par exemple, à des mutations ponctuelles de la cible¹¹.

1.2.5 Facteurs de risques

La recherche de facteurs de risques impliqués dans le processus tumoral a une grande importance, non seulement pour l'amélioration de la prévention du cancer et de la prise en charge des patients, mais également pour apporter des informations sur le processus menant à l'apparition des tumeurs.

Génétiques La prédisposition génétique au cancer est le premier facteur de risque à prendre en compte. Cependant, les cas avérés de cancer héréditaire sont relativement rares. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, il existe de nombreux mécanismes complémentaires empêchant l'apparition de tumeurs. Les éventuelles mutations transmises peuvent donc n'avoir que de rares expressions finales sous forme de cancer, en raison de la nécessité d'accumuler d'autres mutations sur des proto-oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur. L'augmentation du risque lié à ces mutations héritées n'est donc que rarement discernable à l'échelle de familles (la recherche de transmission mendélienne de ces cancers héréditaires ne donne de résultat que dans des cas très particuliers mais souvent très graves). En revanche, l'avènement de la génomique à grande échelle a permis d'identifier, au moyen de cohortes larges, des gènes dont certains allèles sont liés à une augmentation du risque de cancer. L'un des exemples les plus connus dans ce domaine est certainement la découverte par [Hall et al. \(1990\)](#) et [Claus et al. \(1991\)](#) du gène *BRCA1* dont un allèle provoque une augmentation du risque de développement de cancer du sein. Dans un cadre plus familial, l'étude de plus de quarante familles américaines et suédoises touchées par une forme particulière de cancer de la prostate, a permis à [Smith et al. \(1996\)](#) d'identifier un locus chromosomique portant plusieurs gènes très probablement impliqués dans cette augmentation du risque d'apparition de cancer.

11. [Gorre et al. \(2001\)](#) ont ainsi décrit un mécanisme de résistance à la molécule STI-571/Gleevec par une mutation au niveau de son site de fixation sur l'oncogène *Bcr/Abl*.

Comportementaux La majorité des facteurs de risques identifiés jusqu'à présent tient aux comportements des individus, en particulier à leurs statuts tabagique et alcoolique, à leurs habitudes alimentaires et à leur exposition au soleil.

Si l'exposition chronique au tabac et à l'alcool a été démontrée comme augmentant à terme le risque de développer un cancer, les effets carcinogènes de l'alimentation sont plus difficiles à mettre en évidence. On peut toutefois citer en exemple les populations des pays grands consommateurs de produits (poissons, viandes) fumés ou salés, dont les taux de cancers de l'appareil digestif sont supérieurs à ceux de la population mondiale (voir par exemple les travaux d'épidémiologie des cancers de Hill & Doyon, 2004). De même, certaines habitudes alimentaires de pays asiatiques ont un impact sur l'incidence des cancers des voies digestives de leurs populations (Kim et al., 2002, Lee et al., 1990). Enfin, on peut signaler que la cuisson des aliments en foyer ouvert au bois, à l'intérieur des habitations, pratiquée par une majorité de la population mondiale, représente un facteur de risque important pour les cancers des voies respiratoires (Band et al., 1990).

L'exposition au soleil des peaux blanches pose également un problème particulièrement aigu, notamment dans les pays très ensoleillés, telle l'Australie, dont une grande partie de la population est d'origine irlandaise (roux à peau très claire). L'absence de pigmentation augmentant l'exposition des couches internes aux actions carcinogènes des rayonnements ultraviolets, ces populations, peu adaptées à leur environnement, sont sujettes à de fréquents cancers de la peau (Diepgen & Mahler, 2002).

Environnementaux Les autres facteurs de risques de développement de cancers proviennent souvent d'agressions du milieu environnant : exposition chronique à des vapeurs de produits chimiques, à une radioactivité anormalement élevée (victimes de l'accident nucléaire de Tchernobyl, populations exposées à des explosions nucléaires...), ou même pollution atmosphérique industrielle ou urbaine. Il est certain que de nombreux produits ont une activité carcinogène. En revanche, il est très difficile de tirer de quelconques conclusions sur le plan thérapeutique et théorique (compréhension des mécanismes d'apparition) de ces cancers très souvent multifactoriels.

Cancers d'origine infectieuse Même s'il n'existe pas de virus oncogènes humains à proprement parler (tels que les virus murins ou aviaires, provoquant l'apparition de tumeurs dans près de 100% des animaux infectés), de nombreux cancers humains sont corrélés à une infection virale. L'exemple le plus notoire et le plus étudié est probablement celui de la très fréquente association entre infection par des papillomavirus (notamment *HPV 16*) avec les cancers de l'utérus (Bosch et al., 1995, Schiffman & Castle, 2003).

Le second exemple largement étudié concerne le lien entre l'infection chronique par *Helicobacter pylori* et adénocarcinome gastrique. Cette bactérie semble en effet être le principal facteur de risque de ce type de cancer, en modifiant au sein de l'hôte le niveau de réponse immunitaire ainsi que différentes voies de signalisation impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire (Stoicov et al., 2004).

1.3 Stratégies thérapeutiques anti-tumorales

Après avoir présenté les origines moléculaires du cancer et le problème de santé publique qu'il représente, sera décrit dans cette partie notre objectif : contribuer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ces nouvelles stratégies, ciblant des événements précis survenant au cours du processus tumoral, sont appelées à compléter les thérapeutiques traditionnelles (médicamenteuses ou non).

1.3.1 Thérapeutiques non médicamenteuses

Aborder les différentes options thérapeutiques proposées aux patients atteints de cancer sans commencer par les deux voies qui sont, de par l'histoire de la pratique clinique et, de par leurs fréquences d'usage encore les plus importantes, constituerait un oubli.

Chirurgie

Pour les tumeurs solides non (ou peu) métastasées, la chirurgie reste le traitement de référence dans la plupart des cas. En effet, lorsque la tumeur est circonscrite à un organe particulier, la résection de cet organe (tout ou partie, selon son importance et celle de la tumeur) est très efficace. Ce type d'intervention est pratiqué depuis fort longtemps et avec beaucoup de succès, notamment dans le cas des cancers du sein diagnostiqués très tôt. Lors de l'intervention proprement dite, le chirurgien doit s'assurer d'avoir complètement retiré les tissus cancéreux, sans avoir disséminé des cellules provenant de la tumeur : dans la plupart des cas, l'organe entier doit être retiré. Cependant, la chirurgie n'est qu'un traitement local de la maladie, dont l'extension dans l'organisme est souvent très difficile à évaluer. En effet, même si la tumeur primaire retirée par chirurgie est de très petite taille, il peut exister de nombreux îlots métastatiques plus petits que la taille minimale détectable cliniquement (même à l'aide de dispositifs complexes et adaptés tels que imagerie PET, scanner-X ou IRM).

Radiothérapie

Le principe de la radiothérapie consiste à exposer les cellules d'un organisme à des rayonnements ionisants à haute énergie. Le passage de ces rayons ionisants dans ces cellules va provoquer l'apparition de radicaux libres (notamment O^{\bullet} ou $O_2^{\bullet-}$). Ces radicaux vont ensuite réagir avec les différentes molécules de la cellule, et notamment avec l'ADN. Ce mécanisme peut provoquer des cassures double-brin de l'ADN, empêchant par la suite la division de la cellule et entraînant sa mort. C'est précisément l'effet que l'on recherche dans un traitement anti-tumoral : détruire la tumeur en empêchant les cellules de se diviser. Bien évidemment, pour les tumeurs internes, les rayonnements utilisés vont devoir traverser les tissus sains les entourant. Pour éviter l'apparition de lésions trop importantes sur les tissus sains, plusieurs techniques ont été développées. La première consiste à utiliser un rayonnement fortement focalisé sur la zone tumorale. La majeure partie de l'énergie administrée sera alors concentrée en un petit volume et donnera un effet toxique important sur la zone tumorale. En revanche, les tissus normaux environnant ne recevront qu'une dose faible, non toxique. Parmi les autres techniques permettant d'améliorer l'index thérapeutique¹², on peut citer le fractionnement de dose ou encore l'utilisation de

12. L'index ou fenêtre thérapeutique est le ratio entre le contrôle tumoral (*ie.* le pourcentage de cellules tumorales détruites) et les complications sur les tissus normaux.

produits radio-sensibilisant les zones hypoxiques. En effet, les tumeurs étant souvent mal vascularisées et donc en hypoxie, cette hypoxie entraîne une mauvaise réponse à la radiothérapie, de par la faible formation de radicaux O^{\bullet} .

Cependant, la chirurgie et l'utilisation de rayonnements ionisants ne sont maintenant plus jamais utilisées sans administration d'une chimiothérapie adjuvante. La pratique actuelle se dirige donc vers une combinaison des trois grandes classes de traitements : chirurgie (pour l'aspect local, la tumeur primaire), radiothérapie (local avant et/ou après résection, ou générale, selon l'importance de la tumeur et sa dissémination) et chimiothérapie (voie générale).

1.3.2 Stratégies non ciblées : molécules cytotoxiques

La chimiothérapie anticancéreuse classique utilise des molécules **cytotoxiques** non ciblées. Dans l'expression « non ciblées », il faut entendre que leur activité cytotoxique n'est pas liée au caractère tumoral ou non des cellules soumises à ce traitement. En revanche, les cibles moléculaires de ces agents sont très bien connues dans la plupart des cas. On trouvera dans le tableau 1.3 une liste des principales molécules disponibles sur le marché, regroupées par classes thérapeutiques. Ces molécules ont toutes pour objectif d'empêcher la division cellulaire et de détruire les cellules en division, par des mécanismes relativement différents. Le développement de ces thérapies a été basé sur la division permanente et très rapide des cellules tumorales, alors que la plupart des cellules de l'organisme sont quiescentes. Cependant, de nombreux tissus non tumoraux sont également en perpétuel renouvellement, et en premier lieu, les cellules sanguines, qui sont issues de divisions cellulaires permanentes à partir de cellules souches hématopoïétiques. Les effets secondaires des agents anti-cancéreux non ciblés sont donc concentrés sur ces types cellulaires et peuvent lors de traitements aigus provoquer une aplasie médullaire importante. Dans certains cas, on procède même à une auto-greffe de moelle osseuse après la chimiothérapie, afin de restaurer un système sanguin normal.

Agents alkylants		Agents antimétaboliques	
<i>Moutarde à l'azote</i>	Alkéran	<i>Analogues des purines</i>	Lanvis
	Caryolysine		Nipent
	Chloraminophène		Purinéthol
	Endoxan	Leustatine	
	Holoxan	Aracytine	
	Busulfan	Fluoro-uracile	
<i>Éthylènes imines</i>	Thiotépa	<i>Analogues des pyrimidines</i>	Floxuridine
<i>Esters sulfoniques</i>	Misulban		Gemcitabine
Agents proches des alkylants		<i>Analogues de l'adenine</i>	Fludara
<i>Nitroso-urées</i>	Bélustine	<i>Antagonistes des folates</i>	Méthotrexate
	Bicnu	<i>Inhibiteurs de la thymidilate synthase</i>	Tomudex
	Muphoran		Thymitaq
	Estracyt		
	Stéréocyt	Inhibiteurs de la formation du fuseau	
	Zanosar	<i>Alcaloïdes issus de la pervenche</i>	Eldisine
	Méthyl-CCNU		Navelbine
Déticène	Oncovin		
<i>Diakyltriazènes</i>	Cisplatyl		Velbé
<i>Sels de platine</i>	Oxalyplatine	<i>Taxoïdes</i>	Taxol
	Carboplatine		Taxotère
		Autres agents	
<i>Agents intercalants de l'ADN</i>	Aclacinomycine	<i>Inhibiteurs de la topoisomérase I</i>	Camptotécine
	Adriblastine		Topotécan
	Céribidine	<i>Inhibiteurs de la topoisomérase II</i>	Vehem
	Farmorubicine		Vépeside
	Rubidazone	<i>Autres agents</i>	Bléomycine
	Théprubicine		Hexastat
	Zavedos		Hydréa
<i>Autres agents intercalants</i>	Amsidine		Kidrolase
	Amétycine		Natulan
	Celiptium		Vesanoid
	Lyovac		Méthyl-gag
	Mithracine		
	Novantrone		

TAB. 1.3 – Principales classes de molécules anti-tumorales (sous leur dénomination commerciale)

Les différentes classes de ces molécules thérapeutiques sont présentées sur le tableau 1.3. Toutes ont pour objectif l'inhibition de la division cellulaire, de façon non ciblée. Les stratégies utilisées sont de différents types :

- Inhibition de la synthèse des bases de l'ADN : les anti-métabolites inhibent différentes enzymes des voies de biosynthèse des constituants de l'ADN, empêchant ainsi la réplication de l'ADN nécessaire à la division cellulaire (voir la revue [Elgemeie, 2003](#)),
- Inhibition de la réplication de l'ADN : les alkylants et intercalants, en se liant de façon covalente à l'ADN, empêchent sa réplication ([Izbicka & Tolcher, 2004](#)). Les inhibiteurs des Topoisomérases empêchent la régulation de la structure de la chromatine (surenroulement) nécessaire à la réplication de l'ADN, ([Larsen et al., 2003](#), [Holden, 2001](#)).
- Inhibition de la formation du fuseau mitotique : les alcaloïdes issus de la pervenche ([Budman, 1997](#)) et les taxoïdes ([Jordan & Wilson, 2004](#)) empêchent la formation des complexes protéiques nécessaires à la bonne ségrégation des chromosomes au cours de la division cellulaire en inhibant ou en favorisant la polymérisation de la Tubuline.

1.3.3 Nouvelles stratégies : thérapeutiques ciblées

Les nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées exploitent les différences moléculaires qui existent entre des cellules tumorales et des cellules normales, et tentent de générer un index thérapeutique en ciblant des gènes ou des protéines exprimées (mutées, surexprimées...) spécifiquement dans les tumeurs (voir par exemple les revues [Ross et al., 2004](#), [Sawyers, 2004](#)).

Molécules classiques (interagissant avec des protéines)

Bien souvent il s'avère que ces molécules n'ont pas d'activité [cytotoxique](#), mais plutôt une activité [cytostatique](#), réversible. Leur toxicité cellulaire pour les tissus non tumoraux est donc peu importante. Ces agents thérapeutiques sont de plus en plus souvent utilisés en synergie avec des molécules cytotoxiques. Les effets des deux types de traitement se complétant, ceci permet d'administrer des doses moins importantes de médicaments cytotoxiques dont les effets indésirables sont alors diminués.

Les objectifs de ces stratégies sont les suivants :

- **Proposer de nouvelles thérapeutiques** pour les cancers ne répondant pas à la chimiothérapie classique,
- **Diminuer les effets secondaires** des chimiothérapies, par rapport à ceux dus aux molécules cytotoxiques,
- **Éviter le développement de résistances** aux chimiothérapies,
- **Obtenir une meilleure adéquation du traitement** avec les caractéristiques intrinsèques du cancer présenté par le patient.

L'avènement de cette nouvelle ère de la thérapeutique anti-cancéreuse n'a été rendu possible que très récemment, grâce à la conjonction des événements suivants :

- **Développement exceptionnel des biotechnologies** : mise sur le marché de produits de nouveaux types (protéines recombinantes, anticorps monoclonaux humanisés...), utilisation de nouvelles techniques de conception de molécules actives,
- **Amélioration des outils diagnostiques**, arrivée dans les services hospitaliers de techniques jusque là réservées aux laboratoires de recherche : génotypage, PET-scan, puces à ADN/ARN...

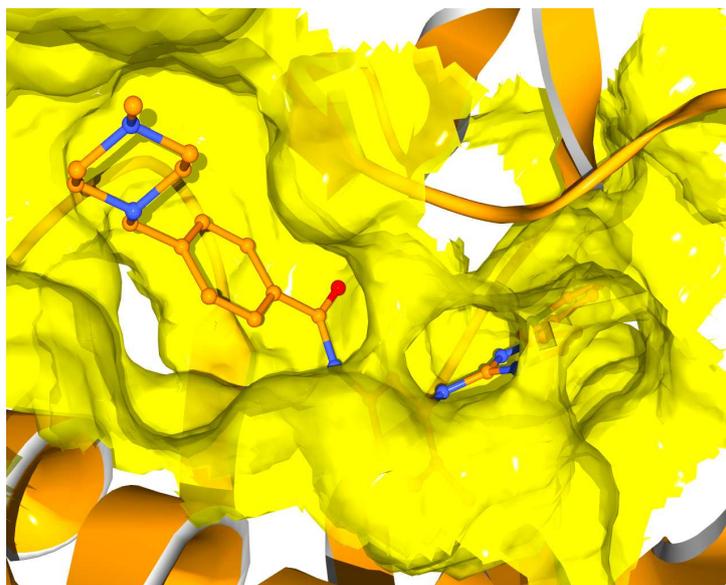


FIG. 1.4 – Imatinib inséré dans le site ATP de la kinase Abl. Structure PDB : 1IEP (Nagar et al., 2002).

Le choix des cibles constitue l'une des questions sous-jacentes les plus importantes à ces nouvelles stratégies thérapeutiques. L'idée de base consiste à identifier une protéine clé de l'état tumoral (dont l'activité ou le niveau d'expression est très spécifique de cet état), et à s'en servir comme cible thérapeutique : il s'agit donc d'inhiber l'activité de cette protéine à l'aide d'une molécule administrable au patient. Les stratégies basées sur le mécanisme même de la division cellulaire, exploitées par les chimiothérapies classiques, doivent être complétées par de nouvelles stratégies visant à inhiber des cibles dont la dérégulation joue un rôle crucial dans la division cellulaire incontrôlée. D'importantes recherches ont été menées pour concevoir des molécules inhibant les voies de signalisation impliquées dans la division cellulaire et dans l'apoptose, qui sont dérégulées dans les cancers. Ces molécules ont pour but d'annuler les effets des transformations de proto-oncogènes en oncogènes. De même, il serait également intéressant de restaurer l'activité des protéines suppresseurs de tumeurs, lorsque cela est possible¹³. La restauration de l'expression de ces gènes suppresseurs de tumeur par thérapie génique a donné de bons résultats aux cours d'essais cliniques récents (McNeish et al., 2004).

Principales cibles Les principales cibles qui ont jusqu'à présent été étudiées dans le cadre de la conception de nouvelles classes d'anti-cancéreux sont les suivantes :

1. **Récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase** L'objectif est soit d'empêcher la fixation du ligand sur ces récepteurs, soit d'inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase des récepteurs mutés oncogènes (Noble et al., 2004).
 - VEGFR (impliqué dans l'angiogénèse tumorale) :
 - **bevacizumab** (Avastin[®], anticorps monoclonal dirigé contre VEGF, Willett et al., 2004)

13. Par exemple dans le cas de l'infection par le Papillomavirus, dont les protéines E6 et E7 inhibent les protéines p53 et pRB, il peut être intéressant de chercher à empêcher cette inhibition. Dans le cas des délétions génomiques de ces gènes, une restauration de leur expression par thérapie génique serait également appropriée.

- **SU5416** (inhibiteur de l'activité kinase de Flk-1/KDR (VEGFR-2), abandonné en 2002, voir [Fong et al., 1999](#))
 - **PTK787/ZK 222584** (inhibiteurs de l'activité kinase de VEGFR-1 et VEGFR-2, en phase III de développement clinique, [Wood et al., 2000](#))
 - HER2 (membre de la famille des EGFR, impliqué dans certains cancers du sein et de la prostate, ou associé avec un mauvais pronostic) :
 - **trastuzumab** (Herceptin[®], anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le récepteur HER2, [Baselga et al., 1998](#), [Cho et al., 2003](#))
 - EGFR ([Yarden, 2001](#), [Harari, 2004](#))
 - **cetuximab** (Erbix[®], anticorps monoclonal, [Huang et al., 1999](#), [Ciardiello et al., 1999](#))
 - **gefitinib** (Iressa[®], [Ciardiello et al., 2000](#)), inhibiteur de l'activité tyrosine kinase,
 - **erlotinib** (Tarceva[®], [Ng et al., 2002](#)) inhibiteur de l'activité tyrosine kinase,
 - FGFR (plusieurs molécules sont en cours d'évaluation préclinique et clinique)
- 2. Protéines à activité kinase**
- Bcr/Abl (impliquée dans la leucémie myéloïde chronique à chromosome *de Philadelphie* t(9,22)) et c-Kit (impliquée dans les GIST, tumeurs stromales gastro-intestinales) sont inhibées au niveau du site de liaison à l'ATP de leur domaine kinase, par **imatinib** (Gleevec[®], [Druker, 2004](#))
 - PI3K : inhibé par la molécule Wortmannin ([Arcaro & Wymann, 1993](#))
 - Autres kinases de la signalisation cellulaire en cours de développement clinique en tant que cibles : Aurora (inhibiteurs : voir p. 92), Raf ([Rudin et al., 2001](#)), p38 MAPK ([Hideshima et al., 2003](#)), Akt ([Mitsiades et al., 2004](#)), CDKs ([Senderowicz, 2003](#)), PTEN ([Sansal & Sellers, 2004](#)), PDK-1 ([Storz & Toker, 2002](#), [Alessi et al., 2004](#))
- 3. Phosphatases** Certaines phosphatases impliquées dans la régulation de la progression du cycle cellulaire ont été validées comme cibles en oncologie : cdc25A/B ([Eckstein, 2000](#)) ou encore PTP1-B ([Yang et al., 1999](#)).
- 4. Protéines anti-apoptotiques** Le mécanisme carcinogène implique souvent une activation de facteurs anti-apoptotiques. Certaines protéines impliquées dans l'apoptose ont été validées comme cibles, et des molécules inhibant ces protéines sont actuellement en développement clinique :
- APO2L / TRAIL ([Nagane et al., 2001](#))
 - Trail-R1
 - Bcl-2 ([Zhang, 2002](#))
 - protéines de la famille des IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*)
- 5. Autres cibles**
- Hsp90 (protéine chaperone [Beliakoff & Whitesell, 2004](#))
 - HIF-1 (facteur de transcription impliqué dans la réponse à l'hypoxie [Yeo et al., 2004](#))
 - HDAC (histone dé-acétylase, protéine impliquée dans la modification de l'accessibilité à la transcription de l'ADN, voir par exemple [Vigushin & Coombes, 2004](#))
 - mTOR (cible de la Rapamycine, dont le rôle moléculaire est encore mal connu, [Yu et al., 2001](#), [Rowinsky, 2004](#), [Carraway & Hidalgo, 2004](#)).
 - Ras ([Cohen et al., 2000](#), [Lerner et al., 1995](#))
 - p53/MDM2 (MDM2 est une protéine exerçant une régulation négative de l'activité pro-apoptotique de p53 ; l'inhibition de l'interaction p53/MDM2 a été récemment validée comme étant une cible prometteuse, dans le cadre de la conception d'inhibiteurs d'in-

teractions protéine-protéine, voir notamment [Vassilev et al., 2004](#), [Klein & Vassilev, 2004](#))

I Inhibition ciblée de la traduction protéique

Une approche différente et relativement récente consiste en l'utilisation d'oligonucléotides pour inhiber la production de protéines particulières. La plupart des cibles citées ci-dessus se prêtent théoriquement à cette approche. Cette stratégie repose sur l'utilisation d'ARN anti-sens ou d'ARN interférents (*siRNA*, *shRNA*...). De courts fragments d'ARN, homologues à l'ARN_m codant pour la protéine ciblée, sont administrés (sous formes protégées pour éviter leur dégradation), pénètrent dans la cellule, et venant s'hybrider sur l'ARN_m, vont provoquer sa dégradation par un mécanisme récemment élucidé ([Hannon, 2002](#)). Cette technique s'apparente bien évidemment à celle développée notamment par [Hélène \(1994\)](#), qui repose sur l'utilisation d'oligonucléotides modifiés, également homologues à des ARN_m et dont l'hybridation sur cet ARN_m va provoquer l'arrêt de la transcription.

Ces nouvelles techniques consistent donc à utiliser un oligonucléotide comme agent permettant d'inhiber (de fait) la fonction d'une protéine. Cette approche n'est donc pas à proprement parler à classer dans la même catégorie que la thérapie génique, puisqu'elle n'a *a priori* pas d'effet transmissible génétiquement. Plusieurs essais cliniques de phases avancées sont actuellement en cours, utilisant une telle technologie.

1.3.4 Le marché actuel de l'oncologie

Le tableau 1.4 présente les principaux laboratoires commercialisant des médicaments anticancéreux, classiques ou ciblés, avec leurs chiffres d'affaires respectifs.

Rank	Company	M\$	%	Marketed products	Phase III
1	B. M. S.	2,751	16.0	Erbitux (cetuximab, '04) Taxol (paclitaxel, '92/'04) Ifex (ifosfamide, '92/'08) Paraplatin (carboplatin, '89)	Ixabepilone (a novel epothilone) Javlor (vinflunine)
2	AstraZeneca	1,929	11.2	Arimidex (anastrozole, '95/'09) Casodex (bicalutamide, '95/'08) Faslodex (fulvestrant, '02/'21) Iressa (gefitinib, '03/'13) Nolvadex (tamoxifen citrate, <'82/'05) Tomudex (raltitrexed) Zoladex (goserelin, '89/'05)	
3	Roche ^a	1,514	8.8	Bondronat (ibandronate) Furtulon (doxifluridine) Herceptin (trastuzumab, '98) Kytril (granisetron, '93) Mabthera/Rituxan (rituximab, '97) Roferon-A (interferon α -2a, '84) Xeloda (capecitabine, '98)	
4	G. S. K.	1,242	7.2	Myleran (busulfan, <'82) Purinethol (mercaptapurine, <'82) Hycamtin (topotecan, '96) Navelbine (vinorelbine, '94) Bexxar (¹³¹ I-tositumomab, '03)	
5	Amgen	1,224	7.1	Aranesp (darbepoietin α , '01) Neulasta (pegfilgrastim, '02) Neupogen (filgrastim, '91)	Palifermin Epratuzumab
6	Novartis	1,151	6.7	Gleevec (imatinib mesylate, '01/'13) Zometa (zoledronic acid, '01/'07) Femara (letrozole, '97/'11)	PTK787 (VEGF inhibitor)
7	Sanofi-Aventis	1,079	6.3	Eloxatin (oxaliplatin, '02) Campto (irinotecan) Taxotere (docetaxel, '96/'10)	tirapazamine
8	J. & J.	894	5.2	Doxil (doxorubicin, '95/'06) Leustatin (cladribine, '93)	
9	Abbott ^b	799	4.7	<i>mainly diagnostics</i>	Atrasentan
10	Pfizer ^c	795	4.6	Aromasin (exemestane, '99) Camptosar (irinotecan, '96/'07) Ellence (epirubicin, '99/'06)	SU5416
11	Eli Lilly	611	3.6	Gemzar (gemcitabine, '96/'10) Alimta (pemetrexed, '04/'11)	
12	Schering-P.	607	3.5	Caelyx (doxorubicin) Intron A (interferon α -2b, '83) Temodar (temozolomide, '99/'10) Ethyol (amifostine, '95/'12)	

a. including Genentech

b. including Takeda/Abbott (TAP)

c. including Pharmacia

TAB. 1.4 – Leaders du marché de l'oncologie, et leurs principaux produits, en 2004. Pour les molécules sur le marché, les dénominations commerciales sont données, suivies, entre parenthèses, de leur nom usuel et des dates d'approbation par la FDA et d'expiration des brevets (quand les données ont pu être obtenues). D'après (Featherstone & Griffiths, 2002), les sites internet de ces groupes pharmaceutiques, le site de la FDA www.accessdata.fda.gov et www.abpi.org.uk. Les chiffres d'affaires indiqués concernent les ventes en 2000 aux USA en millions \$, dans le secteur de l'oncologie.

I

La figure 1.5 présente les prévisions de ventes des nouvelles classes de molécules anti-tumorales ciblées pour 2005. Les ventes d'anticorps monoclonaux thérapeutiques, qui représentent à l'heure actuelle, avec les protéines recombinantes (érythropoïétine par exemple) une large part du chiffre d'affaire des produits d'origine biotechnologique, sont appelées à s'accroître encore dans les années à venir.

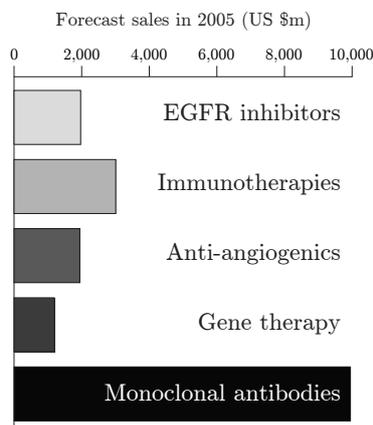


FIG. 1.5 – Prévisions des ventes en 2005 des nouvelles classes de médicaments anti-cancereux (d'après Featherstone & Griffiths, 2002)

Conclusion du premier chapitre

Ce chapitre, placé en avant propos, avait pour objectif de rappeler les principaux mécanismes moléculaires de tumorigénèse ainsi que les stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses les plus couramment utilisées ou encore en développement. De plus, il nous est apparu important, avant d'aborder plus concrètement le sujet de cette thèse, d'essayer de donner un ordre de grandeur de l'importance du marché représenté par ces molécules, marché auquel nos recherches visent à apporter de nouveaux produits.

Deuxième partie

Introduction

Chapitre 2

Signalisation cellulaire et thérapeutique

II

2.1 Les signaux cellulaires : la base de la vie

Quel que soit l'organisme que l'on considère, qu'il soit unicellulaire (bactéries, levures...) ou multicellulaire (... jusqu'à l'homme), toute la régulation de son cycle de vie est basée sur l'échange de signaux intra- et inter-cellulaires. Cette signalisation cellulaire prend les formes les plus variées que l'évolution a imaginées, mettant en œuvre des molécules messagères, des modifications chimiques, des changements conformationnels, etc. La molécule universelle porteuse de l'information génétique, l'ADN, est une forme de signal, permettant la transmission d'une quantité formidable d'information à la descendance d'une cellule ou d'un individu.

L'étude du signal véhiculé par l'ADN, signal que l'on pourrait qualifier de parfait, semble très avancée à l'heure actuelle, avec les publications récentes de génomes entiers d'organismes (et notamment le génome humain, publié en grande partie simultanément en 2001, [International Human Genome Sequencing Consortium, 2001](#), [Venter, 2001](#)), même si la compréhension de la régulation épigénétique de l'expression des gènes est encore très mal connue. En revanche, le recensement et la compréhension des mécanismes de régulation intra- et inter-cellulaire qui ont lieu dans tout organisme n'en sont qu'à leurs balbutiements.

On peut donc distinguer principalement deux formes de signalisation cellulaire : la signalisation extra ou intercellulaire, et la signalisation intracellulaire.

2.1.1 Un modèle de la signalisation cellulaire

Avant d'entrer dans les détails des différents modes de signalisation intra- et inter-cellulaire, la figure 2.1 propose un modèle plus général de cette signalisation.

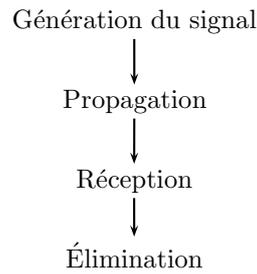


FIG. 2.1 – Modèle simplifié de signalisation

II

- **Génération d'un signal** : apparition d'un stress chimique (hypoxie, rayons ionisants...), synthèse d'une hormone, d'un neurotransmetteur, stimulus électrique le long d'un axone, libération d'ions au sein d'une cellule, transcription d'un gène, etc,
- **Propagation du signal** : au travers de la circulation sanguine, par diffusion à travers des membranes cellulaires, par modification chimique, etc,
- **Réception du signal** : ouverture de canaux ioniques transmembranaires, fixation d'une hormone sur un facteur de transcription, fixation d'un facteur de croissance sur un récepteur, etc,
- **Élimination du signal et retour à l'état initial** : dégradation active de molécules, disparition du stress, etc.

Sur la base d'un tel modèle, très simplifié, on peut envisager de créer des cellules virtuelles, voire des organismes entiers virtuels, en explicitant, en modélisant tous ces signaux et en « simulant la vie ». Mais l'enchevêtrement de l'ensemble de ces signaux, leur immense variété et les infinies nuances que l'on ne fait pour l'instant qu'imaginer ou apercevoir rend ce projet particulièrement difficile. Deux projets, américain et japonais, de modélisation complète de deux plantes, l'arabette courbée *Arabidopsis thaliana*, dicotylédone et le riz *Oryza sativa*, monocotylédone, sont en cours actuellement ([The Multinational Coordinated Arabidopsis 2010 Project, 2000](#), [Harris, 2002](#)). L'ensemble des gènes de ces organismes a été séquencé, et leurs fonctions sont peu à peu identifiées. L'objectif de ces projets est l'obtention *in silico* d'informations sur les modes de signalisation cellulaire, ce qui permettrait la découverte de nouvelles informations inaccessibles par l'expérimentation directe.

D'autres projets consistent en la création de bases de données (exhaustives à terme) des interactions entre les différentes protéines d'un organisme, pour essayer de tracer des réseaux de communication intra-cellulaires ([Aladjem et al., 2004](#), [Colland et al., 2004](#), [Brent, 2004](#), [Lok & Brent, 2005](#)).

2.1.2 Signalisation inter-cellulaire

Au sein des organismes unicellulaires, la signalisation extracellulaire est certes réduite, mais nécessaire pour la cellule qui doit s'informer des conditions de son environnement pour y réagir. Dans ce domaine, la conservation de certains mécanismes au long de l'évolution est ainsi parfois très surprenante : les gènes impliqués dans des réponses très complexes à des signaux intra-individu, au sein d'organismes très évolués, sont parfois issus de gènes dont on retrouve la trace dans des bactéries, avec une fonction proche.

La prochaine section de ce chapitre présente brièvement les différents modes de signalisation intercellulaire au sein des organismes eucaryotes supérieurs.

2.1.3 Signalisation intra-cellulaire

La conservation des protéines responsables de la signalisation intra-cellulaire au cours de l'évolution des espèces est très importante. Au fil des chapitres de cette introduction, pour chaque protéine étudiée, une brève présentation de ses **homologues** sera proposée. En effet, la signalisation intra-cellulaire repose sur des mécanismes dont les origines sont très anciennes, ce qui rend l'étude des homologies des protéines qui en sont responsables tout à fait pertinente.

2.2 Signalisation inter-cellulaire

2.2.1 Voie endocrine

La voie endocrine de signalisation cellulaire concerne les régulations les plus importantes de la vie des organismes très complexes : croissance générale de l'organisme, cycles sexuels... Les molécules vecteurs de ces signaux sont principalement des hormones circulant à grande distance dans l'organisme, au travers du sang. La plupart de ces hormones ont une forte capacité à traverser les membranes cellulaires, et jouent un rôle direct de cofacteurs de transcription, favorisant la fixation de complexes protéiques initiant la transcription de gènes. Ces hormones sont synthétisées puis sécrétées dans la circulation sanguine par des cellules spécialisées se trouvant principalement dans les différentes glandes endocrines de l'organisme (thyroïde, thymus, ovaires, testicules). Certaines de ces hormones sont de courts peptides, d'autres de petites molécules stéroïdiennes. Si les peptides, généralement hydrophiles, ne peuvent franchir les membranes cellulaires et sont reconnus par des récepteurs transmembranaires, en revanche les hormones stéroïdiennes, dont font partie la majorité des hormones sexuelles, sont hydrophobes et rentrent directement dans les cellules pour se fixer sur des récepteurs nucléaires ayant un rôle de facteurs de transcription.

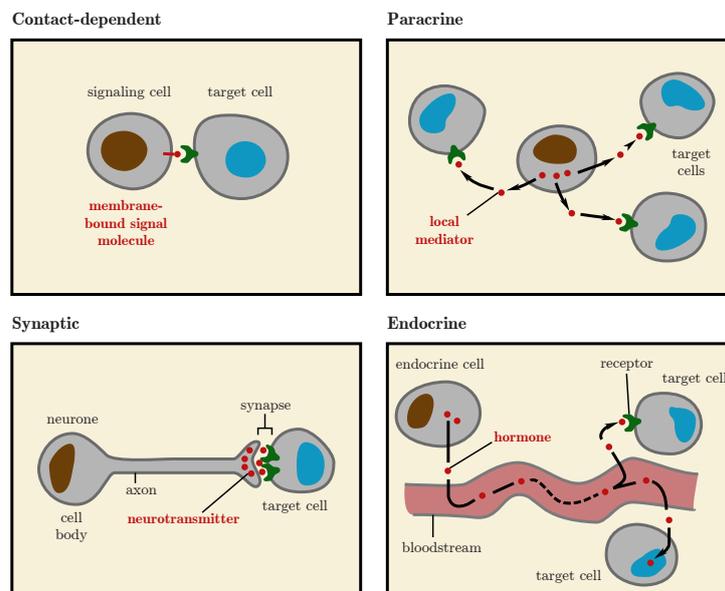


FIG. 2.2 – Différentes modalités de signalisation intercellulaire (d'après Alberts et al., 2002b)

2.2.2 Voie paracrine

Cette voie concerne des signaux à faible distance, transmis par sécrétion dans le milieu extracellulaire de diverses molécules, qui peuvent être reconnues par des récepteurs se trouvant soit à la surface de la cellule responsable de cette sécrétion directement, soit à la surface de cellules proches.

2.2.3 Neurotransmetteurs

Au sein des synapses, des transmissions de signaux sous la forme de sécrétion de neurotransmetteurs dans la fente synaptique, par l'extrémité de l'axone exciteur sont responsables d'une cascade de réactions enzymatiques au sein du neurone-cible, en aval de la synapse. Ces interactions vont permettre la transmission de l'influx nerveux.

2.2.4 Signalisation de contact

La signalisation de contact est particulièrement importante lors du développement et dans les différents mécanismes de la réponse immunitaire. Très schématiquement, il s'agit en fait d'une forme particulière de signalisation paracrine, dans laquelle la molécule messagère reste accrochée à la membrane de la cellule sécrétrice. Ainsi, lors de la présentation d'antigènes couplés aux protéines du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité, intervenant dans différentes phases de la réponse immunitaire), les fragments antigéniques exposés n'ont pas besoin de se désolidariser de la cellule présentatrice pour être reconnus par les différents lymphocytes.

2.3 Les différents modes de signalisation intra-cellulaire

Il existe une très grande diversité de modalités de communication intra-cellulaire. Nous ne nous intéresserons dans ce manuscrit qu'aux signaux transmis par des protéines, et ne discuterons pas des signaux transmis par des acides nucléiques ou d'autres molécules (ions, lipides, et autres molécules biologiques ni protéiques ni nucléiques).

La première et principale distinction que l'on peut faire entre les modes de signalisation impliquant des protéines est la suivante :

- Signalisation **par action enzymatique** : le signal est transmis d'une protéine A à une protéine B par modification de B, sous l'action d'une région de A¹,
- Signalisation **sans action enzymatique** : le seul contact entre les protéines A et B suffit à la transmission du signal, sans que A n'entraîne de modification durable de B².

Dans un souci de simplification, nous ne nous intéresserons ici qu'aux deux modes les plus répandus au sein de la voie de signalisation impliquant les protéines Ras : phosphorylation/déphosphorylation et interaction protéine-protéine. Les paragraphes suivants présentent brièvement la signalisation par phosphorylation/déphosphorylation, les kinases et phosphatases

1. Les activités enzymatiques sont elles-mêmes très variées : modifications post-traductionnelles (farnésylation, ubiquitination, acétylation, méthylation, hydroxylation), phosphorylation/déphosphorylation, clivage protéolytique (formation de fragments ayant différentes fonctions), modification de chaînes latérales, oxydation/réduction (notamment formations de ponts disulfures)...

2. L'interaction entre les deux protéines va cependant très probablement modifier temporairement la conformation de B, et par exemple activer ou modifier son état d'activation catalytique.

étant des cibles particulièrement intéressantes en cancérologie. Nous reviendrons plus longuement dans la section 2.4 sur la signalisation par interaction protéine/protéine, qui constitue le cadre fondamental des travaux présentés ici.

Phosphorylation / Déphosphorylation

Une grande partie de la signalisation intra-cellulaire est réalisée par des modifications des protéines au niveau de trois types d'acides aminés : sérines, thréonines et tyrosines. Ces trois résidus disposent sur leur chaîne latérale d'un groupement **-OH** libre, qui peut être phosphorylé sous l'action enzymatique d'une protéine. Cette activité enzymatique est appelée activité kinase. Cette phosphorylation provoque parfois des modifications relativement importantes de la conformation de la protéine entière, entraînant très souvent un passage d'un état actif à un état inactif (ou inversement) ou encore une modulation plus ou moins fine de l'activité catalytique de la protéine en question. Dans d'autres cas, la phosphorylation ne provoque pas de modification structurale importante, mais la présence d'un acide aminé phosphorylé va permettre la fixation d'une autre protéine par l'intermédiaire par exemple d'un domaine **SH2** ou **PTB** d'une protéine servant d'intermédiaire et appelée adaptateur.

L'état de phosphorylation des protéines est régulé par l'action conjointe de ces protéines kinases, et de leurs réciproques ayant une activité opposée, les phosphatases. Comme leur nom l'indique, ces protéines permettent l'hydrolyse des phospho-amino-acides et le retour à un état non phosphorylé de la protéine considérée.

Ces protéines à activité kinase et phosphatase sont très largement impliquées dans la transmission des signaux régulant la différenciation et la division cellulaire. Deux exemples de cascade de signalisation par phosphorylation / déphosphorylation parmi les plus connus sont les suivants :

- Régulation de la progression du cycle cellulaire, assurée par les différentes kinases *cdk* (*Cyclin Dependent Kinases*) et phosphatases *cdc*,
- Transmission des signaux de contrôle d'expression de gènes par la cascade des MAP kinases (*Mitogen Associated Kinases*). Cette voie de signalisation sera détaillée plus loin dans ce chapitre.

2.4 Les interactions protéine-protéine : de nouvelles cibles thérapeutiques

2.4.1 Généralités sur les domaines d'interaction protéine-protéine

Le sujet de cette thèse s'inscrit dans le cadre de la conception d'inhibiteurs d'interactions protéine/protéine par l'intermédiaire de domaines n'ayant pas d'activité catalytique intrinsèque³.

Il a été trouvé un nombre important de domaines protéiques de ce type, le tableau 2.1 présente les principaux.

3. Nous excluons donc de cette étude les interactions entre protéines – bien évidemment très fréquentes – nécessaires à l'exercice de leur activité catalytique. Nous nous intéressons principalement aux interactions protéine-protéine dont l'interaction est en elle-même le support de la transmission de signaux cellulaires.

Domaine	Taille	Ref.	Domaine	Taille	Ref.
PROLINE-RICH PEPTIDE BINDING ^a			PHOSPHO-TYROSINE BINDING		
SH3	~ 50	Musacchio et al. (1992)	SH2	~ 100	Waksman et al. (1992)
<i>Src-Homology 3 domain, cd00174</i> 			<i>Src-Homology 2 domain, cd00173</i> 		
WW	~ 40	Sudol et al. (1995)	PTB	~ 130	Kavanaugh & Williams (1994)
<i>Two conserved Trp domain, cd00201</i> 			<i>Phospho-Tyr Binding domain, cd00149</i> 		
OTHER DOMAINS			OTHER DOMAINS		
EH	~ 100	Fiore et al. (1997)	PH ⁴	~ 100	Haslam et al. (1993)
<i>Eps15-Homology domain, cd00052</i> 			<i>Plextrin-Homology domain, cd00821</i> 		

a. Kay et al. (2000)

TAB. 2.1 – Les principaux domaines d'interaction protéine/protéine (d'après Broutin & Ducruix, 2000). Les références cd(*xxxx*) se rapportent à la base de donnée des domaines d'homologie CDD hébergée par le NCBI (Marchler-Bauer & Bryant, 2004).

Tous les domaines présentés sur le tableau 2.1 participent à la transmission de signaux intracellulaires, sans modifier les protéines auxquelles ils se fixent. Ces domaines sont relativement fréquents dans les organismes évolués. On peut noter que ces interactions se font presque toujours de façon asymétrique⁵ : par exemple lors d'une interaction entre le domaine **SH2** d'une

4. On peut noter que les domaines **PH** interagissent également avec PIP3 (lipides phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate), et ne sont donc pas uniquement des domaines d'interaction protéine-protéine (Lockyer et al., 1999).

5. Les exemples d'interaction symétrique entre deux domaines d'interaction protéine-protéine sont relativement

protéine A et une seconde protéine B, la région de B impliquée dans l'interaction n'est pas nécessairement et probablement jamais un domaine **SH2**. En revanche, il peut s'agir d'une petite partie d'un domaine quelconque de B, et dont les propriétés vont être profondément modifiées par cette fixation. Il est également intéressant de remarquer que les domaines d'interaction présentés ici ont une taille relativement importante (50 à 100 acides aminés), alors que la longueur des peptides reconnus est souvent très faible (moins de 10 acides aminés).

2.4.2 Principes de la signalisation par interaction protéine-protéine

La compréhension du fonctionnement de cette transmission n'est pas encore parfaitement complète, et il est certain que plusieurs explications peuvent être données, notamment :

- Modification conformationnelle. Lors de la fixation sur le domaine d'interaction, les deux partenaires vont très certainement subir des modifications conformationnelles, activant ou désactivant, par exemple, leurs propriétés catalytiques respectives,
- Recrutement de protéines dans une localisation particulière de la cellule (par exemple à proximité des membranes nucléaires ou cellulaires, de chromosomes ou des centrosomes, d'organelles...). La modification de l'emplacement d'une protéine peut en effet lui permettre d'interagir avec d'autres protéines ou structures cellulaires et donc de transmettre à nouveau des signaux.

Les interactions protéine/protéine par l'intermédiaire de domaines d'homologie donnent souvent naissance à des complexes multiprotéiques. De ce fait, l'utilisation d'inhibiteurs de ces interactions peut avoir des effets non seulement sur l'interaction ciblée, mais également sur l'ensemble du complexe protéique, déstabilisé par la perte de l'une de ses interactions-clés. Les effets observés peuvent donc ne pas être seulement liés à l'interaction ciblée, mais à d'autres phénomènes impliquant des protéines proches.

2.4.3 Conception d'inhibiteurs d'interactions protéine-protéine

La recherche d'inhibiteurs d'interactions protéine-protéine est une approche relativement nouvelle dans le cadre de la conception de molécules thérapeutiques ciblées. Les revues récentes de [Pagliaro et al. \(2004\)](#) et de [Berg \(2003\)](#) présentent quelques interactions pour lesquelles de petites molécules ont été identifiées ainsi que de nouvelles techniques de criblage adaptées à cette problématique⁶.

Les difficultés de la conception d'inhibiteurs d'interaction protéine-protéine de petite taille

La conception de petites molécules inhibitrices d'interactions protéine-protéine est rendue difficile par les importantes surfaces protéiques impliquées dans ces interactions. Les surfaces mises en jeu sont de l'ordre de 800 \AA^2 sur chacune des protéines impliquées dans l'interaction (valeur moyenne citée par [Stites, 1997](#), [Jones & Thornton, 1996](#), [Toogood, 2002](#)). Pour des sites catalytiques ou des sites de liaison de nucléotides (ATP, GTP), qui sont souvent des cavités de petites tailles, il est relativement facile de concevoir des inhibiteurs mimétiques, requérant les

rare. On peut néanmoins citer les interactions entre domaines **DD**, **DED** ou **CARD**, qui se font de façon quasi symétrique (voir par exemple [Xiao et al., 2002](#)).

6. [Ockey & Gadek \(2002\)](#) ont également rédigé une revue des principales molécules inhibitrices d'interactions protéine-protéine sur le marché, en développement clinique ou en phases avancées de développement préclinique.

mêmes types d'interaction que le ligand naturel. A l'inverse, concevoir des molécules de faible masse (et respectant donc les règles de Lipinski, citées p. 70) inhibant les multiples interactions entre un domaine d'interaction protéine/protéine et son ligand est jusqu'à présent une approche qui n'a pas permis la mise sur le marché de nouvelles classes thérapeutiques (voir par exemple la revue de [Toogood, 2002](#)).

Anticorps inhibiteurs d'interactions protéine-protéine

En revanche, des anticorps à vocation thérapeutique, inhibiteurs d'interaction protéine/protéine ont d'ores et déjà été mis sur le marché avec succès. De par leur taille importante, les anticorps sont principalement utilisés pour inhiber des interactions extracellulaires. L'un des meilleurs exemples est probablement celui de l'inhibition de la liaison d'un ligand sur la partie extra-cellulaire de son récepteur. Cette stratégie a été utilisée pour différentes applications : anti-TNF- α dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde ([Elliott et al., 1993](#)), anti-VEGF en thérapeutique anti-cancéreuse ([Brekken et al., 2000](#))... Cependant, diverses méthodes permettent l'internalisation d'anticorps à visée thérapeutique et leur utilisation pour cibler des protéines intracellulaires. Notamment deux approches peuvent être distinguées :

- internalisation d'un anticorps dirigé contre une protéine intracellulaire par sa conjugaison à un peptide possédant des capacités d'internalisation active (voir par exemple la technologie développée par InNexus⁷, [Zhao et al., 2003](#)),
- internalisation d'un anticorps dirigé contre une protéine membranaire (par endocytose par exemple), l'anticorps lui-même étant couplé à une molécule thérapeutique. Cette molécule thérapeutique va donc être internalisée sélectivement dans les cellules exprimant la protéine membranaire reconnue par l'anticorps.

Inhibiteurs de domaines BH3

Des résultats très encourageants, tant sur le plan de la découverte de petites molécules ([Degterev et al., 2001](#)) que de peptides et peptidomimétiques ([Shangary & Johnson, 2002](#), [Walensky et al., 2004](#)) ont été obtenus récemment sur le modèle des interactions entre les domaines **BH3** et leurs partenaires. Les domaines **BH3** (*Bcl-2-Homology Domain 3* ou *Death domain*) et notamment ceux des protéines Bcl-2, Bad et Bcl-x_L sont impliqués dans la transmission des signaux inhibant ou favorisant l'apoptose ([Kelekar & Thompson, 1998](#), et voir la figure 2.3). Ces domaines **BH3** sont impliqués dans la transmission de signaux par interaction protéine/protéine ([Lutz, 2000](#)).

7. InNexus Biotechnology Inc., www.innexusbiotech.com

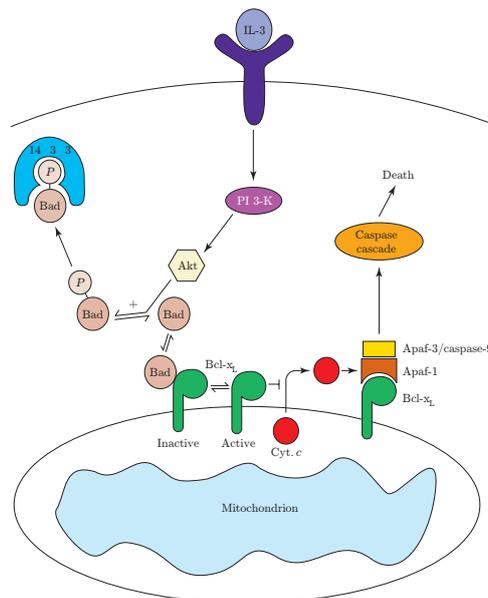


FIG. 2.3 – La voie de signalisation impliquant la protéine Bad (porteuse d'un domaine **BH3**) dans l'apoptose liée aux Caspases (d'après Kelekar & Thompson, 1998).

Modulateurs de la polymérisation de la tubuline

Les vinca-alcaloïdes (alcaloïdes issus de la pervenche) ont un mode d'action anti-tumorale par inhibition de la polymérisation de la Tubuline, en empêchant l'interaction Tubuline- α /Tubuline- β . On peut donc les classer parmi les premières molécules utilisant l'inhibition d'une interaction protéine-protéine comme mode d'action, dans le contexte de la thérapeutique anti-tumorale (voir les revues de Gadek, 2003, Gadek & Nicholas, 2003).

Inhibiteurs des domaines **SH2** et **SH3** de **Src**

L'inhibition des interactions des domaines **SH2** et **SH3** de la kinase Src est une voie thérapeutique d'intérêt dans le traitement de l'ostéoporose (Susva et al., 2000). Plusieurs petites molécules dirigées contre son domaine **SH2** sont actuellement en évaluation préclinique (Shakespeare et al., 2000). En revanche aucune petite molécule dirigée contre son domaine **SH3** n'a pu être découverte jusqu'à ce jour.

Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons plus particulièrement aux domaines **SH3**, celui de RasGAP étant au cœur de nos travaux, et plus modestement aux domaines **SH2** et **PH** (la protéine RasGAP possédant, en plus de son domaine **SH3**, deux domaines **SH2** et un domaine **PH**, voir p. 77).

Inhibiteurs des domaines **SH2** et **SH3** de **Grb2**

La recherche d'inhibiteurs des deux domaines **SH3** (Vidal et al., 2004) de la protéine Grb2 et également de son domaine **SH2**⁸ (Liu et al., 2004, 1999) a permis d'identifier des molécules possédant des activités anti-tumorales intéressantes. Certaines d'entre elles sont actuellement en

8. Machida & Mayer (2005) ont publié récemment une revue des différentes approches dans le cadre de la conception d'inhibiteurs de domaines **SH2**.

test sur des modèles de tumeurs xénogreffées sur souris *nude*, en synergie avec des molécules cytotoxiques classiques (Gril et al., 2004).

2.5 La voie de signalisation liée aux protéines Ras

2.5.1 Généralités sur les protéines Ras et leur activité

Pour des revues très complètes, on pourra se reporter par exemple aux travaux de Campbell et al. (1998) et de Vojtek & Der (1998).

La voie de signalisation liée aux protéines Ras a depuis de nombreuses années été identifiée comme une cible pertinente en cancérologie (Downward, 2003b, Reuter et al., 2000, Garbay et al., 2000, Liu et al., 2000, Vidal et al., 1998). En effet, et comme nous allons le détailler ci-après, les protéines Ras constituent des points de passage obligés pour de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la division cellulaire et la différenciation.

Les protéines Ras

Ce sont de petites GTPases⁹ d'environ 190 acides aminés et 21 kDa codées par trois gènes différents : *N-Ras*, *H-Ras*, et *K-Ras*¹⁰ (ces deux derniers gènes donnent chacun lieu à deux alternatives d'épissage ; se reporter à Taparowsky et al., 1983, Barbacid, 1987). La famille des protéines Ras appartient à la superfamille des petites protéines GTPases monomériques, qui comprend également les protéines Rho, Rab, et Ran (voir la figure 2.4 et les revues Bar-Sagi & Hall, 2000, Colicelli, 2004). Les autres GTPases de cette superfamille sont impliquées dans des voies de signalisation semblables à celle de Ras, mais sans avoir la même importance dans le processus tumoral. On peut cependant noter l'importante contribution de Rho et Rac à la motilité cellulaire, mécanisme dont l'importance dans la formation de métastases est cruciale (Keely et al., 1997, Schmitz et al., 2000).

Dans tout ce manuscrit et sauf mention contraire, il ne sera pas fait de distinction entre les différents produits de ces gènes, et ils seront regroupés sous l'appellation commune Ras : l'identité de séquence entre ces protéines est de plus de 95% pour les 160 premiers acides aminés, et les différences fonctionnelles sont quasiment inconnues (pour un alignement de ces différents orthologues de Ras, se reporter à la figure 2.5).

9. L'activité GTPase intrinsèque des protéines Ras, bien que très faible, est significative. Elle consiste en l'hydrolyse du GTP lié à cette protéine, en une molécule de GDP et un phosphate.

10. Les noms de ces trois gènes ont été donnés d'après des virus : *N-Ras* est homologue à une protéine d'un virus à neuroblastome ; *H-Ras*, du virus du sarcome de Harvey du rat ; *K-Ras*, du virus du sarcome de Kirsten du rat.

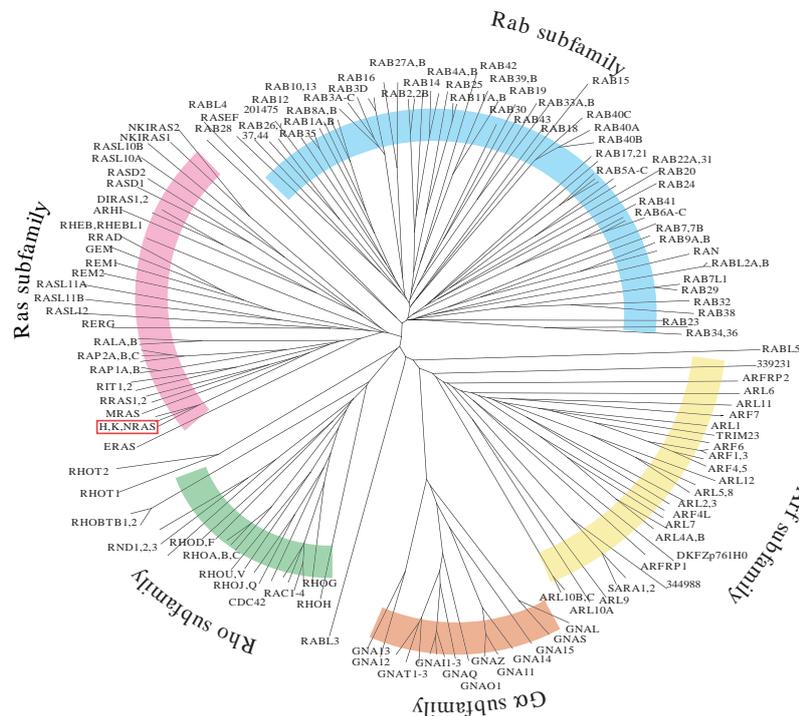


FIG. 2.4 – La superfamille des petites GTPases Ras. (d'après la revue de Colicelli, 2004)

Ras : le prototype du proto-oncogène

Les différents gènes *Ras* sont mutés en moyenne dans 30% des tumeurs humaines, et dans certains cas bien plus fréquemment. Ainsi, certains cancers du pancréas sont liés à des mutations rendant *Ras* oncogénique dans 70 à 90% des cas (Banerjee et al., 2000, Kimura et al., 1999, Pabst et al., 1999). La fréquence de l'apparition de *Ras* oncogénique est également très importante dans les cancers colorectaux et pulmonaires (Dancey, 2002, Adjei, 2001, Minamoto et al., 2000, Schroy et al., 1995, Tortola et al., 1999). La figure 2.5 présente un alignement des différentes protéines de la famille *Ras*, ainsi que les principales positions fréquemment trouvées mutées dans les cancers humains. Les deux sites de mutation portés sur cette figure [G₁₂, G₁₃] et [T₃₅ E₃₇ Y₄₀] correspondent, comme on peut le voir sur la figure 2.8, à l'interface *Ras*/*RasGAP* : ces acides aminés sont impliqués dans l'interaction avec le domaine **GAP**¹¹ de *RasGAP*.

11. GAP : GTPase Activating Protein

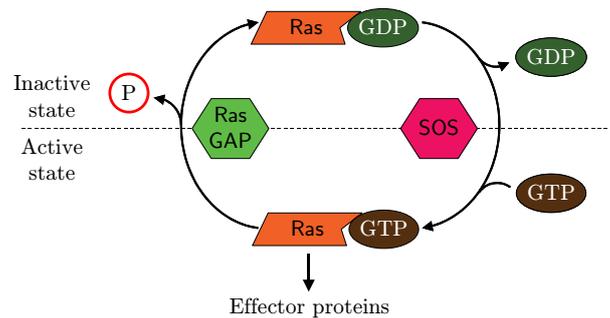


FIG. 2.7 – Le cycle d’activation / inactivation de Ras

Cycle Ras-GDP / Ras-GTP

La protéine Ras sous forme active correspond à sa conformation liée au GTP. Dans son état inactif, Ras est liée au GDP. Suite à l’action de facteurs d’échange (Guanidine Exchange Factors ou GEF), et notamment des protéines Sos, la molécule de GDP liée à Ras va être remplacée par une molécule de GTP. Cet échange va placer Ras dans une conformation active. Le retour à l’état inactif, par hydrolyse du GTP en GDP peut se faire suivant deux modes : hydrolyse par Ras seul ou par le complexe Ras-RasGAP. En effet, la protéine Ras possède une très faible activité GTPase intrinsèque. Son efficacité est nettement améliorée par l’action catalytique d’une protéine à activité **GAP** (GTPase Activating Protein). Chez les mammifères, plusieurs protéines possèdent cette activité vis à vis de Ras, notamment les protéines RasGAP et NF-1 (voir p. 74). Différentes mutations de Ras (par exemple sur les codons 12, 13, 35, 37 ou 61, voir les figures 2.5 et 2.9) conduisent à des protéines dont l’inactivation par RasGAP n’est plus possible, et qui restent donc liées au GTP et constitutivement actives. Ces dérégulations dues à une seule mutation ponctuelle donnent lieu à l’activation permanente de toutes les voies de signalisation en aval de Ras. La structure cristalline du complexe Ras-RasGAP a été résolue, et montre bien la localisation de ces résidus à proximité du site de fixation de RasGAP (Scheffzek et al., 1997, voir également la figure 2.8).

II

II



FIG. 2.8 – Complexe Ras/RasGAP. Seul le domaine **GAP** de RasGAP est présenté. Ont été représentés sur cette figure les résidus de Ras fréquemment mutés dans les cancers humains, ainsi que le résidu R₇₈₉ de RasGAP, jouant un rôle crucial dans l'activité GAP. (PDB : 1WQ1, [Scheffzek et al., 1997](#))

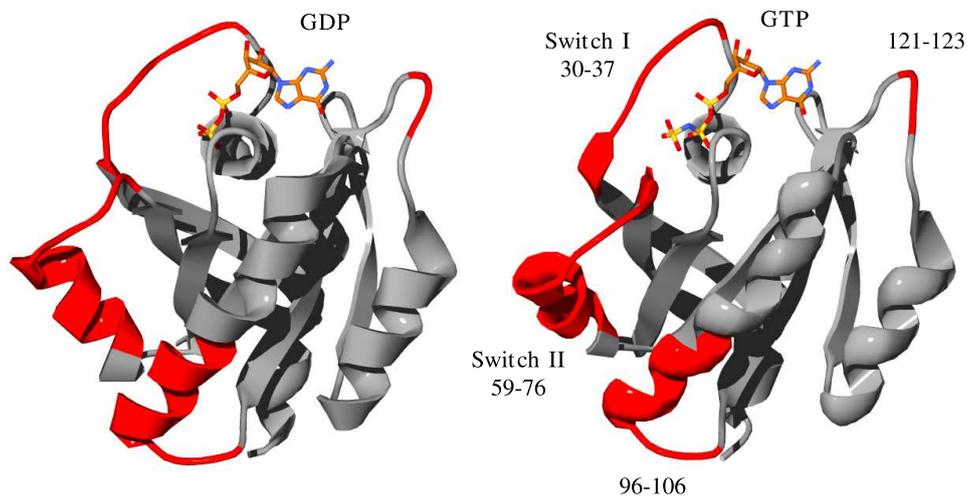


FIG. 2.9 – Ras GDP / GTP. Structures de Ras^{A59G} en présence de GDP (à gauche) ou de GTP (à droite). Les acides aminés dont la distance moyenne (entre la forme liée au GDP et la forme liée au GTP est supérieure à 1Å) sont portés en rouge sur cette représentation schématique en ruban. Les régions notées **Switch I** et **Switch II** sont les plus modifiées et sont impliquées dans les interactions avec les effecteurs de Ras. Structures PDB 1LF0 et 1LF5 ([Hall et al., 2002](#)).

2.5.2 La voie de signalisation de Ras

Ras joue le rôle d'un nœud de signalisation, intégrant des signaux en provenance de différents récepteurs ou protéines intracellulaires, et retransmettant ces signaux vers d'autres protéines. Une cascade relativement longue et complexe de transmission de signaux est donc activée par Ras. A la fin de cette chaîne, le signal est transformé le plus souvent en transcription de gènes au niveau du noyau. Il y a donc un transfert à distance relativement longue à l'intérieur de la cellule, depuis la membrane où se trouvent Ras et la plupart des protéines en amont de cette voie de signalisation, jusqu'au noyau, où des facteurs de transcription vont être activés et provoquer la transcription de gènes spécifiques.

Activation de Ras

Ras est donc un médiateur central pour la transmission de signaux cellulaires générés par un grand nombre de protéines. On peut citer par exemple, dans certaines voies de signalisation initiées par des récepteurs à sept hélices transmembranaires couplées aux protéines G (GPCR), l'implication de Ras (Gutkind, 1998). Cependant, les principaux mécanismes à l'origine de l'activation de Ras sont initiés par des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase, notamment des récepteurs aux facteurs de croissance (VEGFR, EGFR, PDGFR...). La fixation de leur ligand sur la partie extracellulaire de ces récepteurs donne lieu à leur homo ou hétéro-dimérisation et à leur trans-auto-phosphorylation par l'activité tyrosine kinase portée par leur partie intracellulaire. Ces tyrosines phosphorylées vont alors recruter le complexe Grb2-Sos à proximité de la membrane plasmique. Ce recrutement se fait soit directement, par l'intermédiaire du domaine **SH2** de Grb2, qui reconnaît les différentes tyrosines phosphorylées des récepteurs, soit par le recrutement antérieur de la protéine Shc. Cette protéine est composée d'un domaine **PTB** (*Phospho-Tyrosine Binding*, voir p. 48) et est elle-même phosphorylée sur un résidu tyrosine. Shc joue donc le rôle de protéine adaptatrice entre les récepteurs phosphorylés et le complexe Grb2-Sos qui va alors se fixer sur la phospho-tyrosine de Shc.

En définitive, l'activation de ces récepteurs aux facteurs de croissance va permettre une localisation du facteur d'échange Sos à la membrane plasmique, à proximité de Ras qui y est ancré. C'est cette proximité qui va être à l'origine de l'activation de Ras.

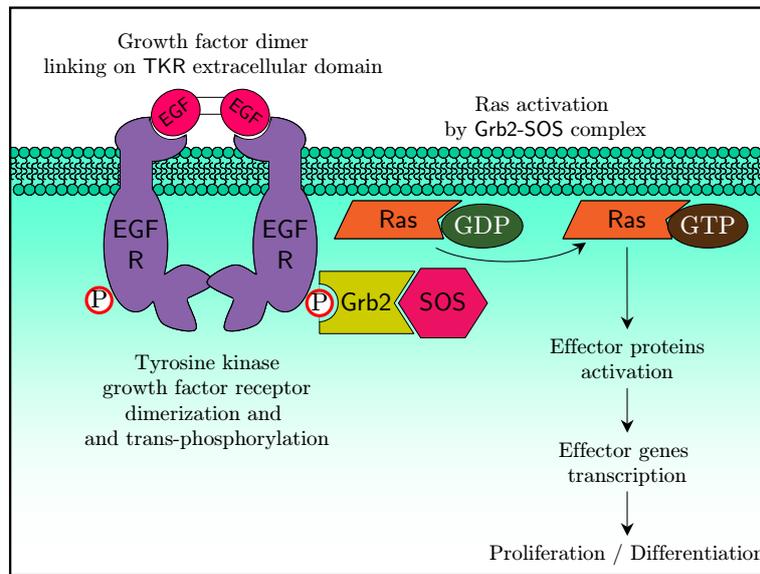


FIG. 2.10 – La voie de signalisation activée par la fixation de l'EGF sur EGF-R.

Mécanismes à l'origine de l'activation de Ras

Comme nous l'avons déjà signalé, de nombreuses voies de signalisation en amont de Ras sont impliquées dans son activation. On peut notamment citer :

- **Récepteurs aux facteurs de croissance à activité Tyrosine kinase** : la fixation des facteurs de croissance EGF¹⁴, VEGF¹⁵, PDGF¹⁶, FGF¹⁷, TGF- α ¹⁸ ou - β , sous forme dimérisée sur leurs récepteurs respectifs, provoque leur homo- ou hétéro-dimérisation, et leur trans-auto-phosphorylation sur plusieurs résidus Tyrosine. La voie d'activation impliquant le EGF, présentée sur la figure 2.10, est probablement la mieux décrite (Egan & Weinberg, 1993, Khosravi-Far & Der, 1994, Williams, 1992, Mayer & Baltimore, 1993, Schlessinger, 1993, Campbell et al., 1998),
- **Protéines cytosoliques à activité Tyrosine kinase**, notamment la tyrosine kinase Abl¹⁹,
- **Récepteurs à sept hélices transmembranaires couplés aux protéines G** : cette voie d'activation de Ras n'est pas encore parfaitement identifiée. En particulier il semble que l'activation de Ras par des RCPG passe par l'intermédiaire de protéines diverses (Downward, 2003a, Rubio & Downward, 2001).

L'activation de Ras se traduit par une augmentation locale (à proximité des protéines responsables de cette activation) et temporaire (l'inactivation de Ras par des protéines à activité GAP intervenant relativement rapidement) de la proportion des protéines Ras liées au GTP

14. *Epidermal Growth Factor*

15. *Vascular Endothelial Growth Factor*

16. *Platelet-Derived Growth Factor*

17. *Fibroblast Growth Factor*

18. *Transforming Growth Factor*

19. Abl est un proto-oncogène très fréquemment muté, notamment sous forme d'une protéine chimère Bcr/Abl dans plus de 90% des leucémies myéloïdes chroniques suite à une translocation t(9q34;22q11) (de Klein et al., 1982, Heisterkamp & Groffen, 2002).

par rapport à celles liées au GDP. C'est cette augmentation qui va permettre l'activation des différentes protéines effectrices de Ras.

Effecteur de Ras	PKC	NF-1 ^a	MEKK1 ^b	RalGDS ^c	Raf ^d	PI3K ^e	RasGAP
Interagit avec Ras-GTP	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
L'interaction avec Ras active l'effecteur et provoque des modifications biochimiques				✓	✓	✓	✓
La délétion de l'effecteur inhibe une partie de la voie de signalisation de Ras					✓	✓	✓

- a. Ballester et al. (1990)
- b. Russell et al. (1995)
- c. Albright et al. (1993)
- d. Warne et al. (1993), Vojtek et al. (1993)
- e. Nimnual et al. (1998)

TAB. 2.2 – Critères de définition des effecteurs de Ras (d'après Tocqué et al., 1997, Campbell et al., 1998)

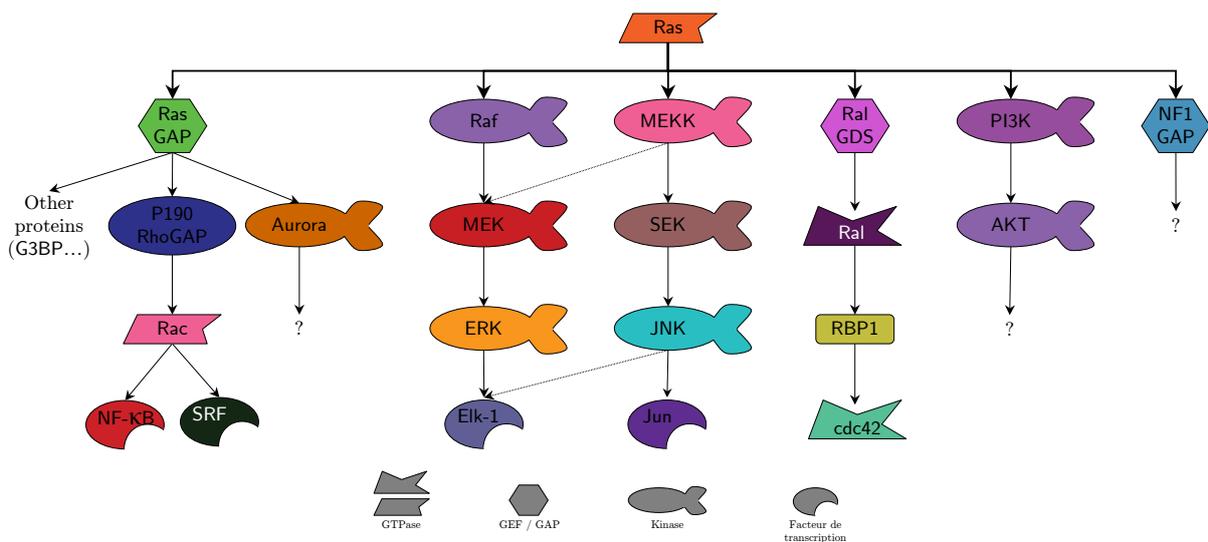


FIG. 2.11 – Voies de signalisation amorcées par les différents effecteurs de Ras (optimisation d'un schéma de Tocqué et al., 1997, Campbell et al., 1998)

Les effecteurs directs de Ras

Il existe un grand nombre de protéines effectrices capables de se fixer à Ras-GTP. Ces protéines effectrices transmettent le signal relayé par Ras, et amorcent différentes voies de signalisation, jusqu'à l'activation de facteurs de transcription.

L'existence de ce grand nombre de protéines effectrices pose la question de la définition exacte de cette propriété. Pour préciser cette définition, Tocqué et al. (1997) ont défini plusieurs critères expérimentaux présentés dans le tableau 2.2.

L'une des premières protéines effectrices décrite pour Ras est la kinase Raf. Cette kinase appartient à la famille des MAPK (*Mitogen Associated Protein Kinases*) : il s'agit d'une famille

de protéines²⁰ dont les phosphorylations en cascade vont transmettre un signal. Cette famille comprend les protéines Raf, MEK et ERK-1/2 (*Extracellular Regulated Kinase*).

D'autres protéines activées par Ras ont ensuite été identifiées. Le tableau 2.2 présente ces différentes protéines, qui sont donc principalement PKC, NF-1²¹, MEKK1, RaIGDS, Raf, PI3K et RasGAP. La figure 2.11 présente quant à elle les principales voies de signalisation, très simplifiées, activées par Ras.

Il est important de remarquer que les seules protéines Ras servent à la transmission de signaux provenant d'un grand nombre de protéines, et qu'elles transmettent ces signaux à nouveau à un grand nombre de protéines. Cependant, il est certain que ces signaux, bien qu'ayant une nature très simple (binaire) et commune au niveau de Ras (sa liaison au GDP ou au GTP), ne provoquent pas les mêmes effets selon le récepteur par lequel ils sont activés. Il existe donc nécessairement d'autres modes de signalisation affinant largement le modèle très simplifié que nous allons supposer ici. Dans la mesure où il a été démontré que les protéines Ras jouent un rôle primordial dans cette transduction de signaux, cette simplification semble justifiée.

2.5.3 Dérégulations de la voie Ras et cancer

A tous les niveaux au sein de cette voie de signalisation, de nombreuses protéines peuvent être considérées comme des proto-oncogènes :

- en amont, les protéines responsables de l'activation initiale de Ras sont fréquemment dérégulées : mutations de récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase les rendant constitutivement activés, fusion de protéines kinases cytosoliques, etc,
- au niveau de Ras, fréquentes mutations rendant son activation constitutive,
- en aval de Ras, nombreuses altérations de ses effecteurs (notamment Raf, voir [Rudin et al., 2001](#)).

De nombreuses protéines²² ont déjà été choisies comme cible pour la conception d'inhibiteur de la voie des protéines Ras à visée antitumorale. Les paragraphes qui suivent présentent les principaux cancers dont les causes moléculaires impliquent des modifications de protéines de la voie Ras.

Cancers du sein

La fréquente surexpression de l'oncogène HER2 dans des tumeurs mammaires est l'une des principales causes de dérégulation de la voie Ras dans les cancers du sein. Néanmoins, dans un nombre significatif de cas, d'autres proto-oncogènes de la voie Ras sont également impliqués (notamment VEGFR, voir [Kaklamani & O'Regan, 2004](#), [Li & Sparano, 2003](#)). Le ciblage de la voie Ras est donc une approche appropriée dans le cas de ces cancers.

Tumeurs gastro-intestinales

Les cancers gastro-intestinaux (notamment les GIST, *Gastro-Intestinal Stromal Tumors*) ont longtemps été les cancers les plus mal pris en charge par les outils thérapeutiques à la disposition

20. Concernant ces protéines regroupées sous l'appellation MAPK, il s'agit davantage d'une famille au sens fonctionnel que d'une famille de protéines homologues.

21. Cette protéine est impliquée dans de nombreuses pathologies, par des mutations ou délétions ([De Raedt et al., 2003](#)).

22. Notamment, les MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) ont été largement étudiées dans ce cadre ([Sebolt-Leopold & Herrera, 2004](#)).

des praticiens. Depuis peu, l'identification de la surexpression de protéines de la voie Ras (EGFR et c-kit notamment) a offert l'opportunité du développement de nouvelles thérapeutiques pour ces cancers en utilisant des inhibiteurs de la voie Ras (utilisation notamment d'anticorps monoclonaux, d'inhibiteurs de tyrosine kinase²³ ou d'inhibiteurs de farnésyl-transférase, Gill et al., 2003).

Leucémies

Le tableau 2.3 présente les principales leucémies pour lesquelles des protéines de la voie Ras modifiées dans de fréquents cas ont été identifiées.

<i>Malignancy</i>	<i>Proteins involved</i>	<i>Frequency (%)</i>
<i>Point mutations of Ras</i>		
Multiple myeloma	N-, K-Ras	30-40
Plasma cell leukemia	N-, K-Ras	60-70
<small>Hallek et al. (1998), Neri et al. (1989), Tanaka et al. (1992), Corradini et al. (1993)</small>		
Acute myeloid leukemia (AML)	N-, K-Ras	20-30
<small>Bos (1989)</small>		
Childhood AML	N-, K-Ras	20-40
<small>Farr et al. (1988), Vogelstein et al. (1990)</small>		
Acute lymphoblastic leukemia	N-, K-Ras	20
<small>Browett et al. (1989), Browett & Norton (1989), Neri et al. (1988)</small>		
Chronic myelomonocytic leukemia (CMML)	N-, K-Ras	50-70
<small>Padua et al. (1988), Hirsch-Ginsberg et al. (1990), Sawyers & Denny (1994)</small>		
Juvenile myelomonocytic myeloid leukemia (JMML)	N-Ras	30
<small>Miyauchi et al. (1994)</small>		
<i>Mutation of c-Kit/c-FMS receptor family</i>		
Myeloproliferative disorder, mastocytosis	c-kit	10
<small>Nakata et al. (1995), Büttner et al. (1998), Nagata et al. (1995)</small>		
AML	FLT-3	20
<small>Dosil et al. (1993)</small>		
	CSF-1 (c-FMS)	10-20
<small>Tobal et al. (1990), Padua et al. (1998)</small>		
<i>Fusion tyrosine kinases</i>		
Chronic myeloid leukemia	Bcr-Abl, t(9;22)	95
<small>Kurzrock et al. (1988), Faderl et al. (1999), Zou & Calame (1999)</small>		
CMML	Tel-PDGFR β , t(5;12)	
<small>Jousset et al. (1997), Golub et al. (1994)</small>		
AML	Tel-Abl, t(12;9)	
<small>Papadopoulos et al. (1995), Golub et al. (1996)</small>		
Anaplastic large cell lymphoma	Npm-Alk, t(2;5)	30-40
<small>Elmberger et al. (1995), Waggott et al. (1995)</small>		
<i>Inactivation of tumor suppressors</i>		
JMML	NF-1, Ras-GAP	
<small>Niemeyer et al. (1997), Shannon et al. (1994), Stiller et al. (1994), Side et al. (1997), DeClue et al. (1992), Kalra et al. (1994)</small>		
<small>Bollag et al. (1996), Largaespada et al. (1996), Miyauchi et al. (1994), Birnbaum et al. (2000)</small>		

TAB. 2.3 – Les différentes modification de protéines de la voie Ras impliquées dans les cancers sanguins, et leurs fréquences d'apparition pour différents types de tumeurs sanguines (d'après Reuter et al., 2000).

23. Récemment, une nouvelle indication de imatinib (Gleevec[®]) a été accordée, pour le traitement des GIST exprimant c-kit (Joensuu, 2002, Joensuu et al., 2001).

Autres cancers

Dans les mélanomes et certains cancers du poumon (Brose et al., 2002), ainsi que dans certains cancers du pancréas (Yanagisawa et al., 1993, Hruban et al., 1993), Ras et d'autres oncogènes liés à Ras sont fréquemment surexprimés.

Conclusion du chapitre 2

La signalisation cellulaire est l'un des mécanismes fondamentaux dirigeant la vie, la mort et bien sûr la division des cellules. Les dérégulations de ces voies de signalisation étant à l'origine du processus tumoral, elles ont fait l'objet d'investigations soutenues, tant pour la compréhension de la tumorigénèse que pour la recherche de molécules anti-tumorales ciblant ces dérégulations précisément. Parmi ces voies de signalisation, celle impliquant les protéines Ras est à ce jour la plus étudiée et celle pour laquelle le plus grand nombre de molécules ciblées sont sur le marché ou en cours de développement clinique.

Ces études ont permis de montrer que les protéines de la voie Ras sont fréquemment dérégulées dans les tumeurs humaines, induisant une suractivation de cette voie. La conception d'agents thérapeutiques ciblant des protéines situées dans cette voie devrait donc permettre d'obtenir des médicaments à *large spectre*, c'est à dire susceptibles d'avoir une efficacité dans un grand nombre de cancers, indépendamment des proto-oncogènes activés en amont. C'est dans ce contexte que se placent nos travaux.

Chapitre 3

Les domaines **SH3**

II

3.1 Notion de domaine

Comme déjà mentionné (chapitre 2), les domaines sont des régions protéiques, que l'on définit suivant plusieurs caractéristiques qui se superposent parfaitement :

- sur le plan de l'évolution des protéines, les domaines sont les éléments conservés (par exemple, au sein d'une famille de kinases homologues, bien souvent seul le domaine responsable de l'activité kinase est très conservé, les autres régions de ces protéines, pourtant de la même famille, peuvent être très différentes),
- sur le plan fonctionnel, les domaines sont les sous-parties assurant les différentes activités élémentaires des protéines (domaines d'interaction, domaines à activité catalytique, domaines de liaison à l'ADN...), l'activité finale d'une protéine résultant de la combinaison des activités apportées par les différents domaines la composant,
- sur le plan structural, les domaines sont, au sein des protéines, séparés les uns des autres, et résultent chacun du repliement complexe de la chaîne polypeptidique. En revanche les domaines sont indépendants structurellement les uns des autres, et un fragment issu d'un domaine n'intervient pas dans la structure secondaire d'un autre domaine. Cependant, les différents domaines d'une même protéine peuvent interagir entre eux et moduler leurs activités respectives en fonction d'événements cellulaires,
- sur le plan de l'étude des protéines, il est généralement possible de construire des chimères en réalisant des protéines de fusion composées de domaines de différentes protéines, et d'expliquer les résultats de ces combinaisons nouvelles de fonctions élémentaires. Il est également très courant et justifié d'étudier structurellement les différents domaines d'une même protéine indépendamment les uns des autres¹.

Il existe un grand nombre de types de domaines protéiques différents. Le tableau 2.1 (p. 48) présente les principaux domaines d'interaction protéine-protéine impliqués dans la signalisation cellulaire : **SH2**, **PTB**, **SH3**, **WW**, **PH**, **BH3** et **EH**. Le sujet de cette thèse concernant tout particulièrement l'étude de RasGAP-**SH3**, seuls les domaines **SH3** sont décrits spécifiquement, et font l'objet de ce chapitre.

Les **domaines SH3** (pour *Src Homology Domain type 3*) sont de petits domaines protéiques d'environ 50 à 75 acides aminés, très structurés et compacts. Ils présentent de fortes homologies de structure entre eux.

1. C'est précisément sur ce principe qu'est basée la technologie du double-hybride utilisée dans ce projet (voir p. 97).

La conception d'agents thérapeutiques ciblant ces domaines a fait l'objet de nombreuses publications (Dalgarno et al., 1997, Vidal et al., 2001).

3.2 Homologies de séquences et de structures

3.2.1 Homologie de séquence

Les domaines SH3 ont une faible homologie de séquence : parmi les 170 domaines présents dans les protéines humaines, après alignement de séquence, on ne trouve en moyenne que 30% de similarité.

La matrice présentée en annexe à la figure C.1 est issue de la base de données PROSITE. Elle représente pour chaque position de la séquence d'un domaine **SH3**, les acides aminés les plus fréquents. L'étude de cette matrice permet de conclure que seuls cinq acides aminés sont très conservés : une Tyrosine au début de la boucle R_t , deux Tryptophanes sur le brin S_3 , une Glycine sur le brin S_4 et une Proline qui joue un rôle très important dans la boucle 3_{10} (qui est en fait dans la plupart des domaines **SH3** un début d'hélice α). Sur cette figure, on trouve également la séquence consensus des domaines **SH3**, qui représente donc, pour chaque position de l'alignement de l'ensemble des séquences des **SH3** connus, l'acide aminé le plus fréquemment rencontré. Étant donné la faible similarité de séquence entre ces domaines SH3, la pertinence des conclusions que l'on peut tirer de cette séquence consensus est relativement faible.

La figure 3.1 présente un alignement de différents domaines **SH3** de protéines impliquées dans la signalisation cellulaire, en mettant l'accent sur les différents éléments de structure secondaire, ainsi que sur les acides aminés les plus conservés.

II

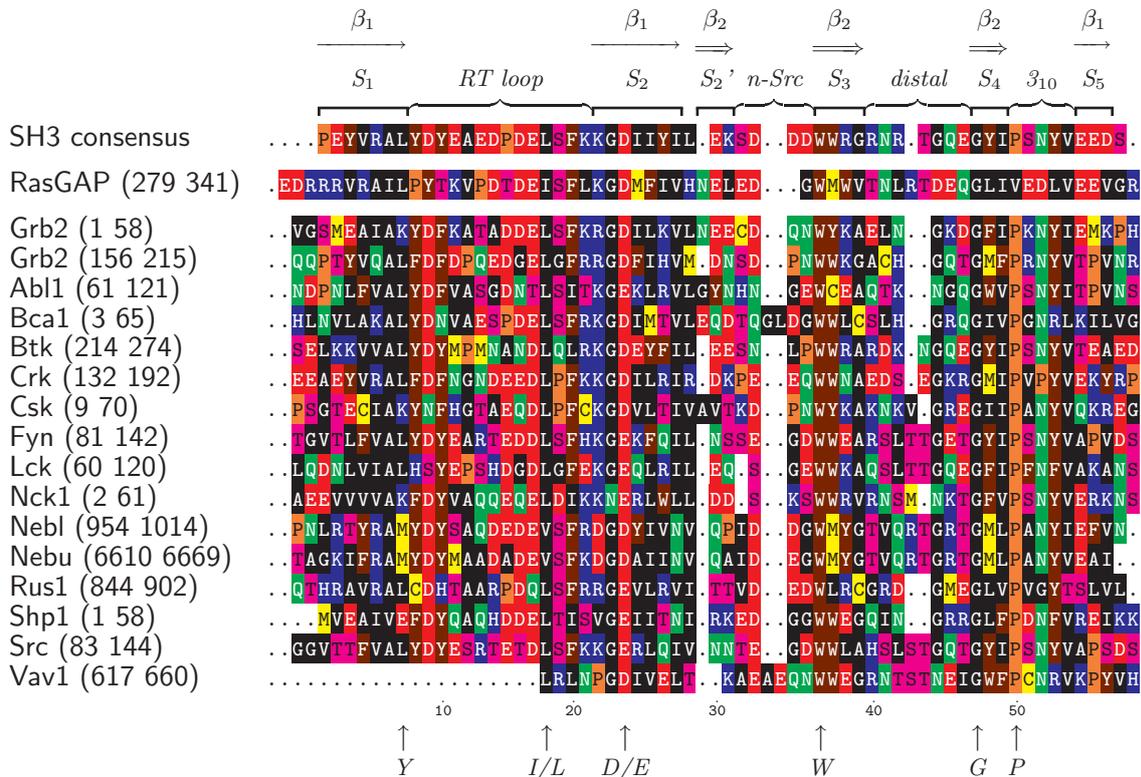


FIG. 3.1 – Alignement des domaines SH3 de différentes protéines. La première ligne correspond à la séquence consensus de la définition des domaines SH3.

3.2.2 Homologie de structure

La structure type d'un domaine SH3 est « un tonneau β » composé de deux feuillets β anti-parallèles. Les principales différences de structure entre les domaines SH3 que l'on peut rencontrer, proviennent des différentes boucles reliant les brins β , dont les longueurs et positionnements sont très variables.

La topologie des domaines SH3 a été très bien caractérisée. Le tonneau β est constitué de deux feuillets, qui sont notés ici β_1 et β_2 . Le feuillet β_1 est lui même constitué des trois brins S_1 , S_2 et S_5 . Le second feuillet β_2 , quant à lui, est composé du brin S_2' (qui prolonge sans rupture réelle le brin S_2) et des brins S_3 et S_4 . Cette topologie particulière, qui implique le brin S_5 C-terminal dans le premier feuillet donne à ce domaine une très grande stabilité de par ce repliement presque semblable à un nœud (figure 3.2).

La forte compacité des domaines SH3, leur importance dans la signalisation cellulaire, et leur faible taille en font des modèles de choix pour la modélisation moléculaire : de nombreux travaux de détermination de structures *ab-initio*, et de détermination de modes de repliements ont pris pour cible des domaines SH3 (Borreguero et al., 2004).

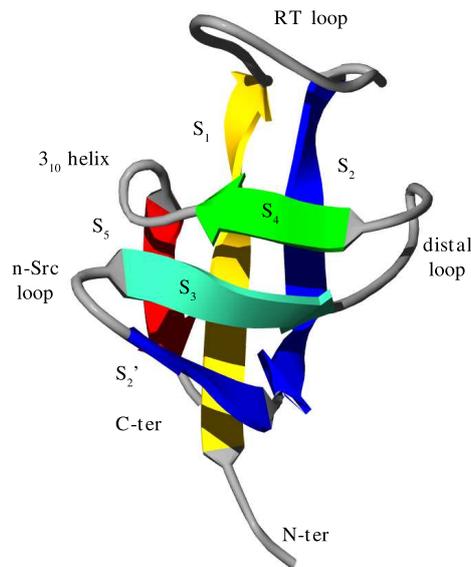


FIG. 3.2 – Le domaine **SH3** de RasGAP

Ainsi, au sein de la PDB² (Berman et al., 2000), on trouve plus de 100 structures de différents domaines **SH3**, les plus étudiés jusque là étant certainement ceux de la protéine Grb2 et de ses paralogues (notamment Sem5, du nématode *C. elegans*, qui compte également deux domaines **SH3** entourant un domaine **SH2**).

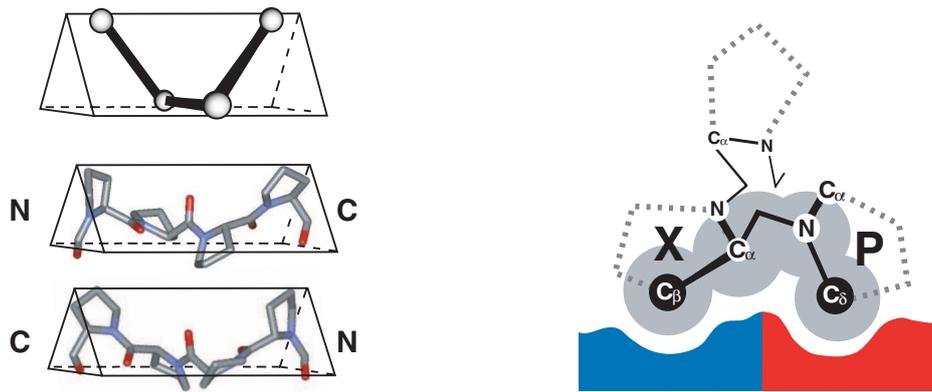
Nous avons placé en annexe un tableau récapitulatif de toutes les structures de domaines **SH3** publiées à ce jour dans la PDB (voir p. 235).

3.3 Ligands de domaines **SH3**

3.3.1 Ligands conventionnels

Les domaines **SH3** interagissent conventionnellement avec des motifs de type hélice polyproline de type II (hélice PPII, Zarrinpar et al., 2003). Une hélice de ce type est une structure en hélice tournant à gauche, avec trois acides aminés par tour et une allure générale ressemblant à un prisme à base triangulaire. Ces hélices sont structurées par la présence en leur sein de plusieurs prolines, dont la substitution de l'azote induit une contrainte structurale importante favorisant la conformation en hélice PPII (Creamer & Campbell, 2002). La figure 3.3 présente schématiquement les caractéristiques de ces hélices.

2. Protein Data Bank, www.rcsb.org/pdb, Berman et al. (2000)



(a) Une hélice PPII s'inscrit parfaitement dans un prisme à base triangulaire. (b) Sur cette vue dans l'axe de l'hélice, on note parfaitement que les carbones β , ainsi que les substitutions des azotes de la chaîne principale jouent des rôles prépondérants dans la conformation de l'hélice et dans sa reconnaissance par un domaine SH3.

FIG. 3.3 – Structure schématique des hélices polyprolines de type II. D'après (Zarrinpar et al., 2003)

Ligands de classe I et de classe II

Deux modes de reconnaissance de peptides riches en prolines ont été identifiés :

- **I** : le peptide reconnu a son extrémité N-terminale au niveau de la boucle *RT-loop* du SH3. Sa séquence consensus est de type $RxhPPhP^3$,
- **II** : le peptide reconnu a son extrémité C-terminale au niveau de la boucle *RT-loop* du SH3. Sa séquence consensus est de type $PxhPxR$.

Bien qu'un grand nombre de structures de domaines SH3 ait été résolu, en présence ou non de leurs ligands, les déterminants essentiels de la reconnaissance de ligands de classe I ou de classe II ne sont pas encore parfaitement identifiés. Certains domaines SH3 (comme par exemple le domaine SH3 de Fyn) reconnaissent des ligands de chacune des deux classes. En revanche, il semble que d'autres domaines ne reconnaissent que des ligands de classe II. Fernandez-Ballester et al. (2004) ont proposé comme explication à cette spécificité de reconnaissance des différences de conformation du tryptophane très conservé (en position 43 dans notre numérotation du SH3 de RasGAP). D'après ces auteurs, l'acide aminé en position 56, qui se trouve à proximité directe du tryptophane, joue un rôle particulier dans la stabilisation de la conformation de ce W_{43} : la mutation de cet acide aminé (Y_{132}) dans la protéine Fyn en isoleucine abolit la reconnaissance par Fyn de peptides de classe I, alors que la fixation de peptides de classe II reste possible.

Plate-forme de reconnaissance des domaines SH3 de Grb2

Sur les domaines SH3 de Grb2, dont les structures en présence de ligands peptidiques riches en prolines ont été résolues, il a été très nettement identifié une plate-forme de reconnaissance pour ces peptides. Cette plate-forme comporte des poches de reconnaissance de deux prolines et d'un acide aminé basique (arginine souvent), suivant un motif consensus $PxxPxR$. De façon assez intéressante, suivant les protéines qui se fixent sur ces domaines SH3, ces motifs sont présents soit dans le sens $NH_3-PxxPxR-COOH$, soit dans le sens $NH_3-RxPxxP-COOH$. La structure en

3. x : acide aminé quelconque, h : acide aminé hydrophobe

hélice polyproline place les deux prolines des positions i et $i + 3$ d'un même côté de l'hélice et leur permet d'entrer dans deux poches adjacentes à la surface du domaine **SH3** (sur la figure 3.4, ces deux poches sont notées S_0 et S_1).

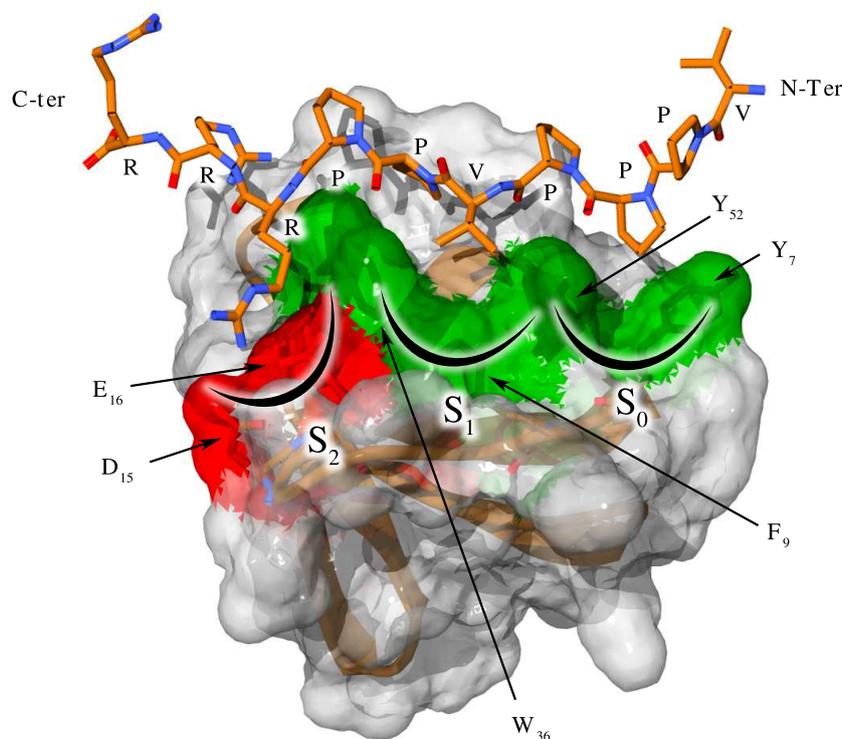


FIG. 3.4 – Le domaine **SH3** N-terminal de Grb2 complexé par le peptide VPPPVPPIRRR (Vidal et al., 1998, PDB : 1AZE)

Affinité des peptides riches en prolines pour les domaines **SH3**

Les K_d de peptides riches en prolines pour des domaines **SH3** ont été mesurées. Toutes ces valeurs se trouvent dans la gamme 0,2–100 μM . Le tableau 3.1 présente différents résultats de mesures de K_d de peptides riches en prolines pour différents domaines **SH3**.

Protéine à SH3	Ligand	K_d	Ref.
Grb2	VPPPVPPIRRR	$\frac{2,6 \mu M \text{ (N-term.)}}{40 \mu M \text{ (C-term.)}}$	Cussac et al. (1994)
Sem5 C-term	YEVPPPVPPIRRR	$28 \mu M$	Lim et al. (1994a)
Abl	APTYSPPPPP	$0,4 \mu M$	Pisabarro & Serrano (1996)
	PPAYPPPPVP	$5 \mu M$	Viguera et al. (1994)
PI3K	RKLPPPIRRR	$7,6 \mu M$	Chen et al. (1993)
Src	SFRPLPLPQFLPMY	$185 \mu M$	Cheadle et al. (1994)
	KGGGAAPLPPRNRPRL	$0,24 \mu M$	Rickles et al. (1995)
Crk N-term	PPPALPPKKR	$1,89 \mu M$	Knudsen et al. (1995)

TAB. 3.1 – Affinités de différents peptides riches en prolines pour des domaines **SH3**. Voir également Yu et al. (1994), Lim et al. (1994b), Alexandropoulos et al. (1995), Wittkind et al. (1994)

Dimère de peptides à forte affinité

La détermination de la structure complète de la protéine Grb2, et en particulier des positions relatives de ses deux domaines **SH3** a permis la conception par modélisation moléculaire d'une molécule se fixant simultanément sur ces deux domaines, constituée du dimère des peptides VPPPVP⁴PRRR relié par un espaceur. Alors que chacun des deux peptides ne possède qu'une affinité de 2, 6 et 40 μM (respectivement pour les domaines N-ter et C-ter), le dimère a pour la protéine entière une affinité de 40 nM (Cussac et al., 1999) et possède une activité anti-tumorale sur différents modèles tumoraux : in vitro (Garbay & Roques, 1999) et in vivo sur tumeurs xénotransplantées sur souris nude, en synergie avec le docetaxel (Taxotère[®], Gril et al., 2004). La modification de certains résidus de ce « peptidimère », en les remplaçant par des acides α -aminés N-alkylés a même permis d'augmenter considérablement l'affinité de ces molécules (Vidal et al., 2004).

Un second site de reconnaissance sur le domaine **SH3** N-ter de Grb2

Vidal et al. (1998) ont montré que les acides aminés 36 à 45 du domaine **SH3** N-terminal de Grb2 constituaient un second site de liaison avec certains de ses ligands, en complément de la conventionnelle plate-forme de reconnaissance des peptides riches en prolines.

En effet, la protéine Sos possède une forte affinité pour Grb2 (de l'ordre de quelques dizaines de nanomolaire), acquise grâce à une reconnaissance simultanée des deux domaines **SH3** de Grb2 (l'interaction entre Sos et un seul domaine **SH3** de Grb2 est bien moins forte). En revanche, la protéine Dynamine interagit de façon bien plus forte avec un seul domaine **SH3** de Grb2, et cette meilleure affinité est due à l'utilisation de ce second site de fixation, qui complète la plate-forme conventionnelle commune à Sos et Dynamine.

Cette propriété de ce domaine **SH3** semble être partagée avec des domaines **SH3** d'autres protéines, notamment Src (Schumacher et al., 1996) ou Vav (Romero et al., 1996).

3.3.2 Ligands non conventionnels

Un certain nombre de domaines **SH3** reconnaissent des ligands n'appartenant pas aux classes mentionnées ci-dessus. Le tableau 3.2 présente différents domaines **SH3** qui ont été identifiés à ce jour comme reconnaissant des peptides ne suivant pas la séquence consensus PxxP. La comparaison des séquences de ces domaines avec celle de RasGAP n'apporte pas d'informations convenables pour la définition de nouveaux motifs de reconnaissance pour cette protéine qui nous intéresse particulièrement.

Même s'il en avait été autrement et par exemple s'il avait été possible d'obtenir par ces alignements de séquences (entre le domaine **SH3** de RasGAP et d'autres domaines **SH3** non conventionnels dont des ligands peptidiques sont connus) une première idée d'une séquence consensus de peptides inhibiteurs de RasGAP-**SH3**, la relative imprécision des données structurales disponibles ne permettrait pas de mener des calculs de modélisation moléculaire suffisamment précis pour la conception de peptides interagissant avec RasGAP-**SH3**.

SH3	<i>Ligand</i>	<i>Motif</i>	<i>Ref</i>
Fyn	SKAP55	RKxxYxxY	Kang et al. (2000)
Vav	Ku-70	?	Romero et al. (1996)
Pex13p	Pex5p	WxxQF	Barnett et al. (2000)
Eps8	synthetic (phage display)	PxxDY	Mongioví et al. (1999)
Gads	SLP-76	RxxK	Liu et al. (2003)
Hrs-BP	UBPY	Px(V/I)(D/N)RxxKP	Kato et al. (2000)

TAB. 3.2 – Domaines **SH3** non conventionnels et motifs de reconnaissance proposés

3.4 Conception d'inhibiteurs de domaines **SH3**

L'importante surface d'interaction entre les domaines **SH3** et leurs ligands⁴ rend très difficile la conception de petites molécules pouvant, selon les critères des « *Cinq Règles de Lipinski*⁵ » être utilisées comme molécules thérapeutiques. Bien évidemment, les peptides que nous avons conçus et qui sont présentés dans ce manuscrit ne respectent pas ces règles.

Cependant, une meilleure connaissance des caractéristiques des sites d'interaction impliqués dans ces reconnaissances devrait permettre dans certains cas d'identifier de petites molécules inhibitrices de domaines **SH3**.

De plus, l'obtention de peptides possédant une activité anti-tumorale (sur modèles cellulaires par exemple) ciblant une interaction donnée est un très bon moyen de valider cette cible⁶.

En prenant pour cible non pas le domaine **SH3**, mais son ligand, [Oneyama et al. \(2002\)](#) ont identifié une petite molécule, UCS15A, capable d'inhiber l'interaction Sam68/Src, qui reconnaît non pas le domaine **SH3** de Src, mais la région riche en proline de Sam68 (voir également la figure 3.5 et [Oneyama et al., \(2003\)](#)).

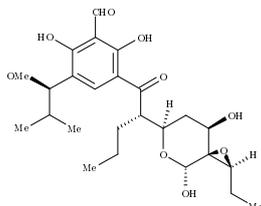


FIG. 3.5 – UCS15A : inhibiteur de l'interaction Sam68/Src, se fixant sur la région riche en proline de Sam68

4. Voir par exemple la figure 3.4, sur laquelle apparaissent nettement que trois poches de reconnaissance sont impliquées dans l'interaction.

5. Les cinq règles de [Lipinski et al. \(2001\)](#), qui sont proposées pour écarter en première instance certaines molécules avant tout développement préclinique ou clinique, sont :

- masse moléculaire inférieure à 500,
- $clog P < 5$ (critère d'hydrophobicité, obtenue par mesure ou par calcul),
- nombre de sites donneurs de liaisons hydrogènes inférieur à 5,
- nombre de sites accepteurs de liaisons hydrogènes inférieur à 10,
- nombre de cycles fusionnés inférieur à 5.

6. Pour une liste relativement complète de peptides ayant ce type d'activité, on pourra par exemple se reporter à la revue de [Janin \(2003\)](#). [Berg \(2003\)](#) a également publié une revue des différentes méthodes ayant permis d'identifier ou de concevoir de petites molécules inhibitrices d'interactions protéine-protéine.

La recherche d'inhibiteurs non peptidiques de domaines **SH3** par criblage à haut débit de chimiothèques est en cours actuellement. Les premiers résultats ont été publiés par plusieurs équipes (voir notamment [Inglis et al., 2004](#)). L'approche rationnelle, par modification de peptides issus de protéines connues pour leur interaction avec des domaines **SH3** a donc pour l'instant été privilégiée⁷. On peut notamment citer d'importants travaux de modification sélective des différents acides aminés de l'hélice poly-proline du peptide issu de *Sos* reconnaissant les domaines **SH3** de *Grb-2*⁸ ([Nguyen et al., 1998, 2000](#)). Le principe de ces travaux consiste principalement à tenter d'améliorer à la fois l'affinité et la spécificité de l'inhibition de ces interactions par des peptoïdes (peptides dont certains acides aminés sont non naturels). Ainsi, l'utilisation d'acides aminés N-substitués en remplacement des prolines en positions P₂ et P₋₁ (voir figure 3.6) s'est révélée une voie de recherche intéressante.

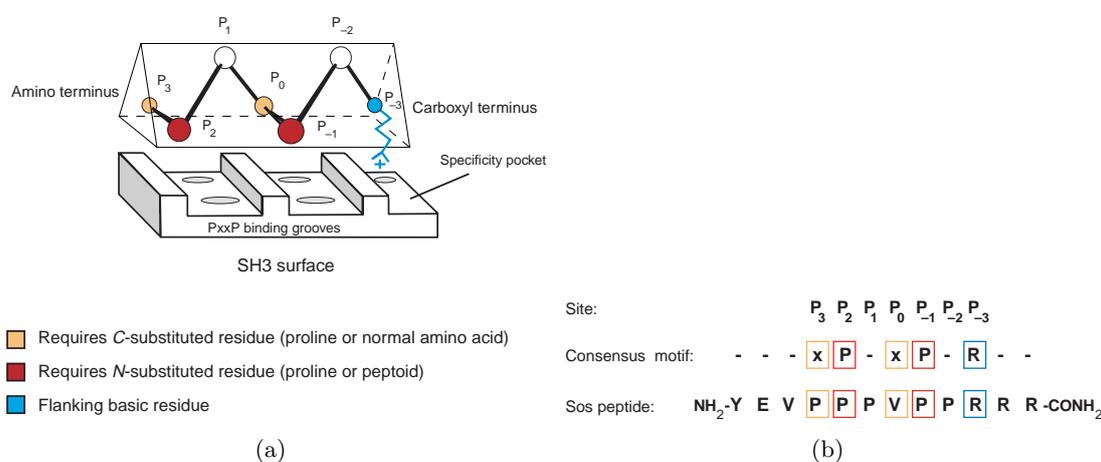


FIG. 3.6 – [Nguyen et al. \(2000\)](#) ont proposé des modifications des prolines en positions P₂ et P₋₁, en les remplaçant par des acides aminés N-substitués non naturels.

[Feng et al. \(1996\)](#) ont obtenu par chimie combinatoire plusieurs familles de modifications de ligands peptidiques du domaine **SH3** de *Src* (voir figure 3.7). [Chen et al. \(1993\)](#) avaient déjà réalisé des travaux semblables, mais concernant la recherche d'inhibiteurs peptidiques du domaine **SH3** de *PI3K*.

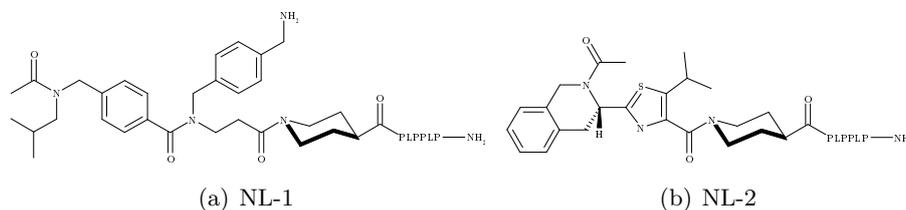


FIG. 3.7 – Quelques molécules proposées par [Feng et al. \(1996\)](#) comme inhibiteurs du **SH3** de *Src*.

7. Dans ce cadre, on peut également citer les travaux de [Brannetti et al. \(2000\)](#), qui ont mis au point un algorithme permettant de prédire (à partir des nombreuses données de la littérature), connaissant la structure cristallographique d'un quelconque domaine **SH3**, la séquence et la structure de peptides interagissant avec ce domaine.

8. L'interaction *Grb2/Sos* est probablement l'interaction **SH3**/« peptide riche en proline » la plus étudiée (voir par exemple le tableau C.1).

Conclusion du chapitre 3

Les domaines **SH3** constituent donc des cibles d'un type nouveau dans le cadre à la fois de la conception rationnelle et du criblage à haut débit de chimiothèques, dans l'objectif d'obtenir des inhibiteurs de la signalisation à visée thérapeutique. Cependant, leur forte compacité et leur petite taille devraient permettre le succès de telles démarches.

Chapitre 4

La protéine RasGAP

II

4.1 Généralités

La protéine RasGAP (Ras GTP-ase Activating Protein) est une protéine de 120kDa¹, composée principalement d'un domaine **GAP** C-terminal, et d'une région N-terminale comprenant plusieurs domaines : notamment un domaine **SH3** encadré par deux domaines **SH2**, un domaine **PH** (*Plextrin Homology Domain*) et un domaine **C2** (*pKC-conserved region 2* également dénommé **CaLB**, pour *Ca²⁺-dependent Lipid Binding Domain*). Cette protéine est exprimée dans tous les types cellulaires.

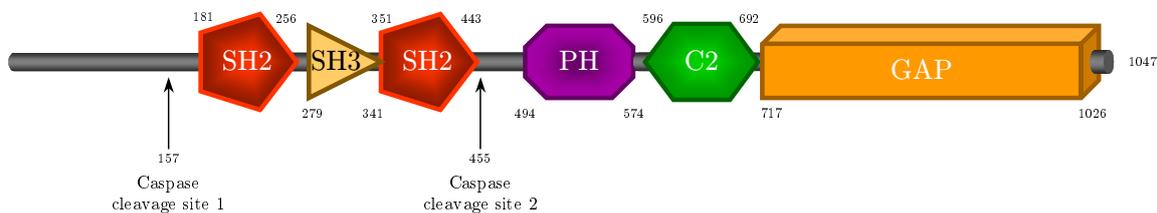


FIG. 4.1 – Les différents domaines composant la protéine RasGAP

Localisation chromosomique Le gène *RASA1* dont RasGAP est le principal produit est porté par le locus 5q13 (Hsieh et al., 1989).

Le syndrome CM-AVM Ce locus a récemment été identifié par Eerola et al. (2002) comme étant impliqué dans des cas d'anomalies familiales du développement vasculaire (« taches de vin »). Ce même groupe a démontré peu après que le gène *RASA1* était directement responsable de ce phénotype, par des mutations inactivantes hétérozygotes (Eerola et al., 2003). Ce syndrome lié à *RASA1* a été appelé par ces auteurs « CM-AVM » (*capillary malformation-arteriovenous malformation*). Les phénotypes observés s'expliquent par l'implication de RasGAP dans de nombreuses voies de signalisation liées à des récepteurs aux facteurs de croissance, contrôlant la prolifération, la migration et la survie de différents types cellulaires, et notamment des cellules endothéliales vasculaires. Il s'agit de la seule maladie génétique héréditaire liée à *RASA1* décrite.

1. Une autre isoforme de 100kDa (différant par sa partie N-terminale et possédant également une activité GAP) est exprimée dans certains tissus, notamment le placenta, mais nous n'en discuterons pas ici, étant donné que son implication dans des cancers n'a jamais été mise en évidence (Zhang et al., 1993).

Mutations de RASA1 et cancer Ras est muté dans un grand nombre de cancers, principalement au niveau d'acides aminés impliqués dans l'activité GTPase intrinsèque de Ras ou dans la liaison de Ras à RasGAP. Ces protéines mutantes ne sont alors plus capables d'hydrolyser le GTP, même avec le concours d'une protéine à activité GAP telle que RasGAP et restent donc constitutivement actives. [Friedman et al. \(1993\)](#) ont recherché dans une large collection de tumeurs des mutations non pas des gènes *Ras*, mais de *RASA1*, qui auraient pour effet de placer RasGAP dans l'incapacité de jouer son rôle de catalyseur de la faible activité GTPase de Ras, et qui auraient la même conséquence : l'activation quasi permanente de Ras et de sa voie de signalisation. De façon assez surprenante, les mutations qu'ils ont identifiées se trouvent dans le domaine **SH2** C-terminal et sont de simples mutations ponctuelles (L398R, G400K et V401I). Ils n'ont donc pas trouvé de mutations au sein du domaine catalytique **GAP**. Ces résultats ont été corroborés par la suite, en montrant l'absence de mutations importantes de ce domaine **GAP** dans un grand nombre de tumeurs du poumon² ([Mitsudomi et al., 1994](#)).

Souris knock-out RASA1^{-/-} [Henkemeyer et al. \(1995\)](#) ont obtenu des souris *RASA1^{-/-}*. Cette mutation affecte notamment la capacité des cellules endothéliales à développer un réseau vasculaire complexe, et entraîne une importante mortalité neuronale. Ce même phénotype a été obtenu par transfection de cellules ES par un *siRNA* dirigé contre l'ARN_m de RasGAP ([Kunath et al., 2003](#)).

Clonage et caractérisation La protéine RasGAP a tout d'abord été identifiée comme une protéine cytosolique capable de catalyser l'activité GTPase de Ras ([Trahey & McCormick, 1987](#), [Gibbs et al., 1988](#)).

4.2 Régulation

Régulation par protéolyse La régulation principale des différentes activités de RasGAP provient de la régulation de l'abondance de cette protéine. Si certaines autres protéines à activité GAP sont dégradées par la voie de l'Ubiquitine et du protéasome (notamment NF-1, [Cichowski et al., 2003](#)), il semble que RasGAP soit principalement régulée par clivage par les Caspases (voir p. 81 et [Yang & Widmann, 2002a, 2001](#)).

Régulation par des protéines virales Lors de l'infection de cellules humaines par le virus HSV-2 (*Herpes Simplex Virus type 2*), la protéine kinase virale ICP10 phosphoryle et provoque l'inhibition de RasGAP, entraînant une subséquente suractivation de la voie Ras/MAPK ([Smith et al., 2000, 1994](#)). De même, l'infection par *Coxsackievirus B-3* provoque une inhibition de RasGAP par une dégradation n'impliquant pas les Caspases.

4.3 Activité GAP

L'activité GAP de la protéine RasGAP consiste en la catalyse de l'hydrolyse du GTP en GDP, ce nucléotide étant lié à une petite GTPase, Ras. A ce jour, cinq autres protéines ont été identifiées chez l'homme comme possédant cette activité :

- NF-1 (Neurofibromin-1), identifiée par [Xu et al. \(1990\)](#),

2. Tumeurs pulmonaires à petites cellules (SCLC) / non à petites cellules (NSCLC)

- SynGAP, protéine GAP synaptique, isolée par [Chen et al. \(1998\)](#),
- p100GAP³, produit du gène *Gap1^m*, identifiée par [Maekawa et al. \(1994\)](#),
- GAP1IP4BP, identifiée par [Maekawa et al. \(1994\)](#)⁴,
- IQGAP1, identifiée par [Weissbach et al. \(1994\)](#).

Ces cinq protéines possèdent un domaine **GAP** ayant une assez grande homologie avec celui de RasGAP, et ces domaines ont tous une activité GAP vis à vis de Ras-GTP (figure 4.2). En revanche, les autres domaines diffèrent de ceux de la protéine qui nous intéresse particulièrement ici, et leur implication dans la voie de signalisation de Ras en tant qu'effecteur n'a pas été envisagée⁵. Un alignement des séquences des domaines **GAP** de ces différentes protéines est présenté par la figure 4.2.

Le site catalytique responsable de l'activité GAP est constitué en définitive par le complexe Ras/domaine **GAP** de RasGAP. Ce site actif a été très largement étudié, et sa structure a été résolue par cristallographie aux rayons X ([Scheffzek et al., 1997](#), PDB : 1WQ1). La figure 2.8 (p. 56) présente cette structure.

La conception de molécules inhibitrices de Ras, réalisant une modulation négative de la voie de signalisation Ras en empêchant la fixation des effecteurs de Ras sur sa forme active tire parti d'informations issues de cette structure. Notamment, [Zeng & Treutlein \(1999\)](#), ainsi que d'autres équipes ont proposé l'utilisation non seulement du site de fixation des effecteurs de Ras, mais également du site de liaison à RasGAP pour la fixation de tels inhibiteurs, permettant ainsi d'accroître le nombre d'interactions disponibles pour augmenter l'affinité de ces molécules pour Ras activé. Il a ainsi été proposé de développer des molécules possédant une double spécificité, d'une part reconnaissant le domaine effecteur de Ras en s'inspirant de la structure du complexe Ras/Raf, et d'autre part en s'inspirant du complexe Ras/RasGAP⁶.

3. A ne pas confondre avec l'isoforme de 100kDa de RasGAP

4. Cette protéine n'est pas représentée sur la figure 4.2.

5. Mis à part pour la protéine NF-1, pour laquelle quelques indices semblent avoir été donnés concernant son rôle d'effecteur ([McCormick, 1995](#), [Andersen et al., 1993](#), [The et al., 1993](#), [Johnson et al., 1993, 1994](#)).

6. Il s'agit bien évidemment d'éviter d'obtenir des inhibiteurs de l'interaction Ras/RasGAP seule, qui auraient une activité inverse de celle recherchée, en empêchant l'inactivation par RasGAP de la voie Ras.

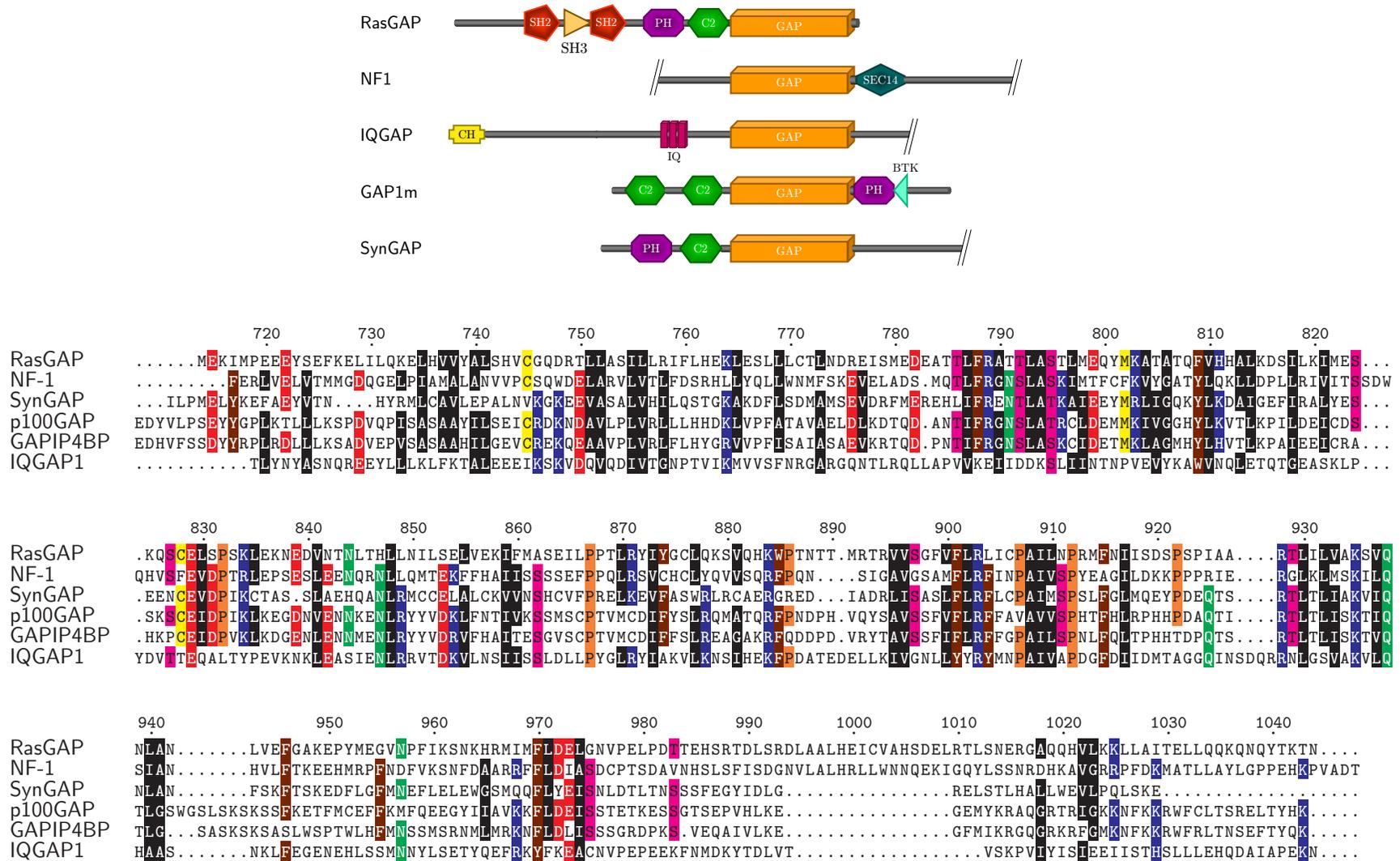


FIG. 4.2 – Alignement des séquences des domaines **GAP** identifiés chez l’homme. Les domaines alignés sont les suivants : RasGAP_{714–1044} ; NF-1_{1205–1536} ; SynGAP_{352–647} ; p100GAP_{317–642} ; GAPI4BP_{289–610} ; IQGAP1_{921–1234}

4.4 La région N-Ter

Comme nous l'avons vu, la région C-terminale de RasGAP correspond au domaine à activité GAP vis à vis de Ras, et regroupe à la fois les résidus impliqués dans la liaison à Ras et dans l'activité catalytique GAP.

En revanche, la région N-terminale de RasGAP ne participe pas à l'activité GAP. Cependant, de nombreuses expériences soutiennent l'hypothèse d'une modification conformationnelle de cette région lorsque RasGAP interagit avec Ras activé (voir notamment [Martin et al., 1992](#)). On peut donc tout à fait supposer que cette région joue un rôle d'effecteur de Ras, c'est à dire que cette interaction entraîne, en parallèle du rôle de régulateur négatif joué par le domaine **GAP**, un rôle de transmission de signaux.

4.4.1 La région N-terminale de RasGAP est responsable de son activité d'effecteur de Ras



Mise en évidence de ce rôle d'effecteur

Le tableau 4.1 présente les différentes expériences démontrant l'implication de RasGAP en tant qu'effecteur de Ras. Nous allons détailler les principales ci-dessous.

Les premiers indices du rôle d'effecteur de RasGAP, dont l'activité GAP est *par définition* de désactiver Ras, ont été donnés par [Adari et al. \(1988\)](#) et [Calés et al. \(1988\)](#). Ils ont montré que RasGAP interagit avec Ras au niveau de sa « région de liaison aux effecteurs ». Ces premières expériences ont tout d'abord été contredites par l'étude de mutants de Ras au niveau de ce site de liaison à RasGAP, qui n'ôtent pas le potentiel oncogénique de Ras ([Marshall & Hettich, 1993](#)). Cependant, il semble que Ras implique différents effecteurs suivant le type d'effet observé.

Ainsi, il a été montré que l'ouverture de canaux ioniques à potassium consécutive à l'activation de récepteurs muscariniques est dépendante de la formation du complexe Ras/RasGAP, et que cette ouverture peut être obtenue par le seul domaine N-terminal de RasGAP ([Yatani et al., 1990](#), [Martin et al., 1992](#)).

<i>Description</i>	<i>Ref.</i>
Ouverture de canaux K^+ : – activée par les récepteurs muscariniques, – normalement dépendante de Ras et RasGAP, – obtenue par domaine N-ter de RasGAP seul.	Yatani et al. (1990), Martin et al. (1992)
Maturation d'ovocytes de <i>Xenopus laevis</i> : – déclenchée par l'expression de Ras ^{G12V} (provoque également l'activation des MAPK), – inhibée par la micro-injection de RasGAP- SH3 (n'inhibe pas les MAPK).	Pomerance et al. (1996), Tocqué et al. (1997), Hartwell (1992)
L'expression du domaine N-ter de RasGAP : – bloque l'activité oncogénique de H-Ras ^{onc} , – ne bloque pas l'activité oncogénique de Raf.	Clark et al. (1993)
L'expression du domaine N-ter de RasGAP : – bloque l'activation de JNK par Ras, – ne bloque pas l'activation des MAPK par Ras.	Clark et al. (1997)
L'expression du domaine N-ter de RasGAP : – altère la morphologie cellulaire, – altère l'organisation du cytosquelette.	McGlade et al. (1993)

TAB. 4.1 – Expériences montrant le rôle de RasGAP en tant qu'effecteur de Ras

Le domaine **SH3** de RasGAP au cœur de son activité effectrice

L'identification de ce rôle joué par la région N-terminale de RasGAP a conduit plusieurs équipes à rechercher au sein de cette région, comptant cinq domaines d'homologie et près de 700 acides aminés, la partie responsable de cette activité effectrice de Ras.

Les premiers résultats ont été obtenus par l'équipe de B. TOCQUÉ, et ont montré que la micro-injection de l'anticorps monoclonal mAb200⁷, dirigé contre RasGAP, permettait d'obtenir une inhibition de la maturation d'ovocytes de *Xenopus laevis* induite par l'activation de la voie Ras (induction hormonale ou par H-Ras^{G12K}, Duchesne et al., 1993). La recherche de l'épitope de cet anticorps a permis à cette équipe de montrer qu'il reconnaissait spécifiquement le domaine **SH3** de RasGAP, au niveau des acides aminés 277 à 287 et 313 à 317 (une série de décapeptides chevauchant, recouvrant la région 273-351 de RasGAP a permis par test ELISA de montrer ce résultat).

De plus, la même équipe a montré que l'inhibition par l'anticorps α -RasGAP-**SH3** mAb200 de la maturation d'ovocytes de *X. laevis* déclenchée par l'expression du mutant oncogène Ras^{G12V} n'empêche pas l'activation par Ras des MAPK (Pomerance et al., 1996, Tocqué et al., 1997). Ce résultat très important démontre pour la première fois l'existence d'une voie de signalisation propre à RasGAP, indépendante *a priori* des autres voies de signalisation classique activées par

7. L'obtention de cet anticorps (IgG γ_1 , k) a été décrite par Mollat et al. (1992). Il était alors appelé GP200.

Ras.

Ces travaux sur le modèle des ovocytes de batracien ont ensuite été complétés par des expériences sur cellules murines et humaines. Notamment, la micro-injection de cet anticorps α -RasGAP-**SH3** mAb200 dans des cellules Swiss 3T3 (fibroblastes de souris transformés par le virus de Moloney) provoque l'inhibition de la réorganisation du microscopie d'actine et en particulier de la formation de fibres de stress, normalement consécutives à l'activation de la voie Ras par l'action de facteurs de croissance ou par la co-injection de H-Ras^{G12K}. De plus, la co-injection de Rho permet la réversion de ce phénotype d'inhibition de la formation de fibres de stress d'actine, montrant donc que la voie de signalisation impliquant RasGAP-**SH3** active celle de Rho (Leblanc et al., 1998).

Enfin, Leblanc et al. (1999) ont montré que la micro-injection de cet anticorps mAb200 provoque l'entrée en apoptose de cellules tumorales humaines, et que ce phénotype n'est pas observé dans des cellules normales. Les lignées cellulaires tumorales utilisées par ces auteurs sont NCI-H460 (cellules humaines de cancer du poumon non à petites cellules), HCT116 (cancer du colon) et HeLa (cancer du col de l'utérus), et les cellules contrôles normales sont des cellules NHDF (*Normal Human Dermal Fibroblast*) et NHBE (*Normal Human Bronchial Epithelial*). Ce résultat est tout à fait cohérent avec la régression tumorale obtenue sur des cellules HCT116 greffées sur souris *nude*, par l'expression du fragment neutralisant de l'anticorps α -Ras Y13-259 (sous forme de *scFv single chain Fv*, Cochet et al., 1998).

Ces expériences impliquent donc le domaine **SH3** de RasGAP dans la régulation de différents mécanismes jouant un rôle particulièrement important dans le développement tumoral : ajustement de l'équilibre survie/apoptose d'une part, et également organisation du cytosquelette, dont on connaît l'importance dans la migration cellulaire nécessaire à la formation de métastases.

Ces expériences constituent donc, avec l'identification récente des partenaires de ce domaine au sein de cette nouvelle voie de signalisation⁸, le socle d'informations ayant fondé l'intérêt que nous avons porté à ce domaine **SH3** en tant que cible thérapeutique pour la conception de molécules anti-tumorales.

Comment ce rôle d'effecteur peut-il s'expliquer ?

Le modèle couramment admis maintenant explique cette transmission par une modification structurale de la région N-terminale de RasGAP consécutives à la fixation de Ras-GTP, rendant les domaines **SH2** et **SH3** accessibles aux protéines susceptibles de s'y fixer. Hu & Settleman (1997) ont proposé une modification de ce modèle, en montrant que l'accessibilité du domaine **SH3** de RasGAP est dépendante de la fixation des deux domaines **SH2** qui l'entourent sur la protéine p190-RhoGAP. Cette protéine est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine, celui-ci jouant un rôle très important dans la motilité cellulaire et la différenciation (van der Geer et al., 1997, Leblanc et al., 1998, McGlade et al., 1993). Ces mécanismes, largement impliqués dans la capacité des tumeurs à former des métastases, confortent l'hypothèse du rôle du domaine N-terminal de RasGAP dans les processus tumoraux.

8. Notamment l'identification des protéines de la famille *Aurora*, impliquées dans la régulation de la division cellulaire et dans de nombreux cancers, voir p. 88.

II

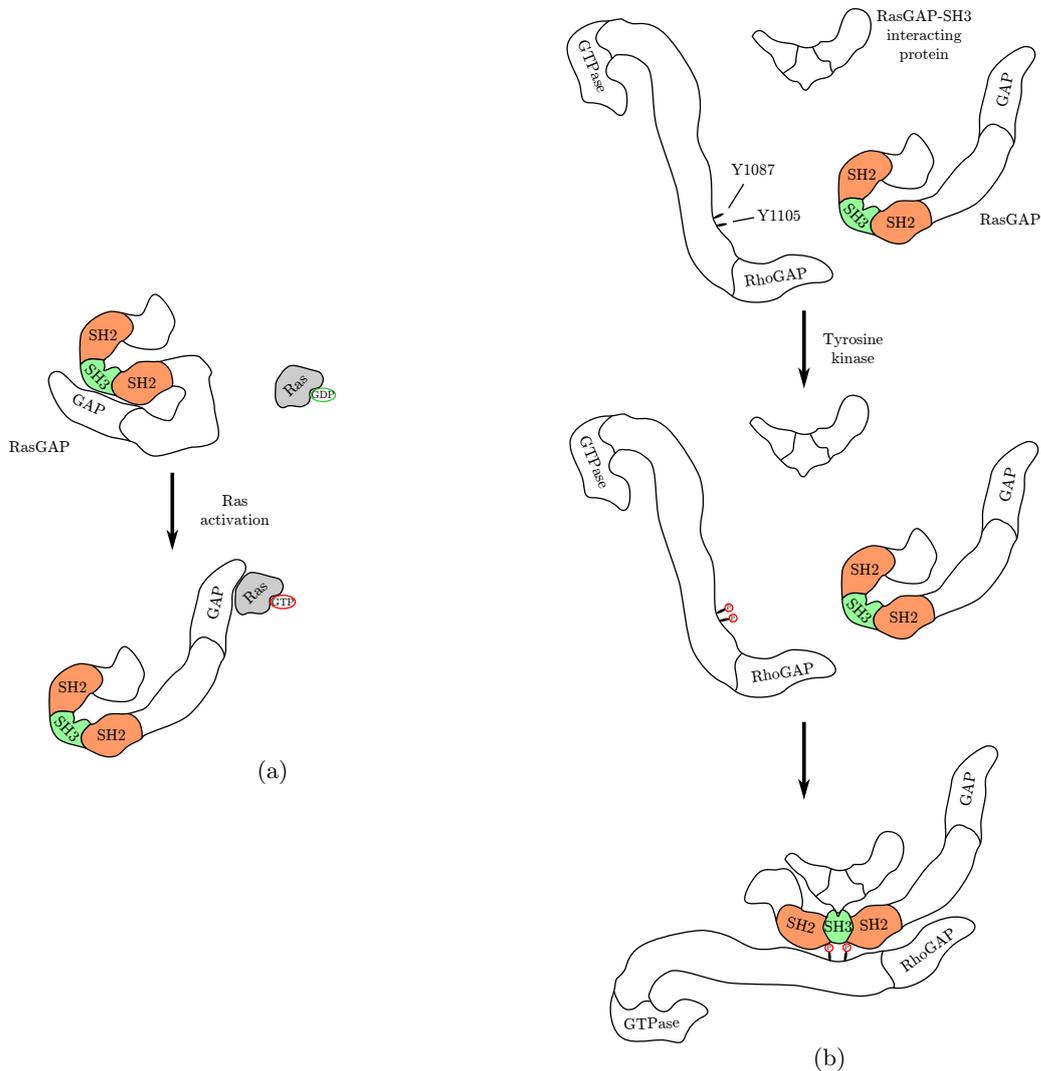


FIG. 4.3 – Modèles décrivant les conditions de l’accessibilité de RasGAP-SH3. (a) Le modèle que nous proposons pour compléter le modèle (b) formulé par [Hu & Settleman \(1997\)](#). D’après cette figure, l’accessibilité du domaine **SH3** de RasGAP serait conditionnée tout d’abord par l’activation de Ras (ce qui permet donc d’expliquer le caractère effecteur de Ras joué par RasGAP-SH3, et dans un second temps par la liaison des deux domaines **SH2** entourant le domaine **SH3** à la protéine p190-RhoGAP, phosphorylée sur les tyrosines 1087 et 1105.

Le modèle de [Hu & Settleman \(1997\)](#) suppose que l’accessibilité du domaine **SH3** de RasGAP dépend de la liaison de p190-RhoGAP sur les deux **SH2** (figure 4.3(b)). Cependant, pour expliquer totalement le rôle de RasGAP en tant qu’effecteur de Ras, il faut ajouter une contrainte supplémentaire. En conséquence, ce nouveau modèle supposerait en complément que la liaison d’une protéine sur les domaines **SH2** ne serait possible qu’après liaison de RasGAP sur Ras activé (lié au GTP ou rendu oncogène par mutation). Ce modèle avait été partiellement formulé par [Martin et al. \(1992\)](#). La figure 4.3(a) présente donc l’étape initiale de modification de la conformation que nous proposons comme étant le résultat de la fixation de RasGAP sur Ras activé (lié au GTP), qui va permettre l’inactivation de Ras et la levée de l’inhibition des domaines **SH2** de

RasGAP. Dès lors que RasGAP se trouve dans un état « activé », cette protéine va pouvoir jouer son rôle d'effecteur de Ras.

4.4.2 Clivage par les **Caspases** de la région N-ter de **RasGAP**

La compréhension de l'activité de la région N-terminale de la protéine RasGAP constitue très certainement le cœur de la problématique soulevée par les paragraphes précédents. Dans ce cadre, l'étude des différents rôles joués par le clivage de RasGAP par les protéines **Caspases**, impliquées dans l'apoptose est particulièrement intéressante et fait l'objet des paragraphes suivants.

Régulation de l'apoptose par le clivage de **RasGAP**

Widmann et al. (1998) ont étudié la régulation de l'équilibre apoptose/survie, qui serait, selon leur modèle, régulée par le clivage de protéines impliquées dans la signalisation cellulaire par les protéases de la famille des **Caspases** (voir également Yang & Widmann, 2002b). En effet, de nombreuses expériences ont démontré que la survie cellulaire dépendrait de la permanence de signaux anti-apoptotiques, qui empêchent la cellule d'entrer en apoptose. Le clivage protéolytique de protéines impliquées dans ces signaux anti-apoptotiques serait donc un moyen de provoquer l'apoptose cellulaire.

Dans le cas de cellules tumorales, l'inhibition de l'apoptose⁹, qui devrait normalement survenir en conséquence des altérations cellulaires et chromosomiques, est probablement l'un des mécanismes clés sur lesquels la conception de molécules d'intérêt thérapeutique pourrait s'appuyer. Cette approche a notamment été suivie en essayant de provoquer l'apoptose par inhibition de domaines **BH3**, que nous avons déjà citée dans la section 2.4 (p. 50).

Dans ce contexte, le clivage de RasGAP sur plusieurs sites de la région N-terminale par les **Caspases** (Wen et al., 1998) et la régulation de l'apoptose liée à la présence des fragments issus de ce clivage sont des points tout à fait importants pour la compréhension du rôle de cette région. En effet, cette région comporte également les domaines impliqués dans le rôle d'effecteur de Ras, et notamment le domaine **SH3** qui nous intéresse particulièrement ici.

9. Cette inhibition peut par exemple avoir pour origine l'inactivation de certains gènes suppresseurs de tumeurs.

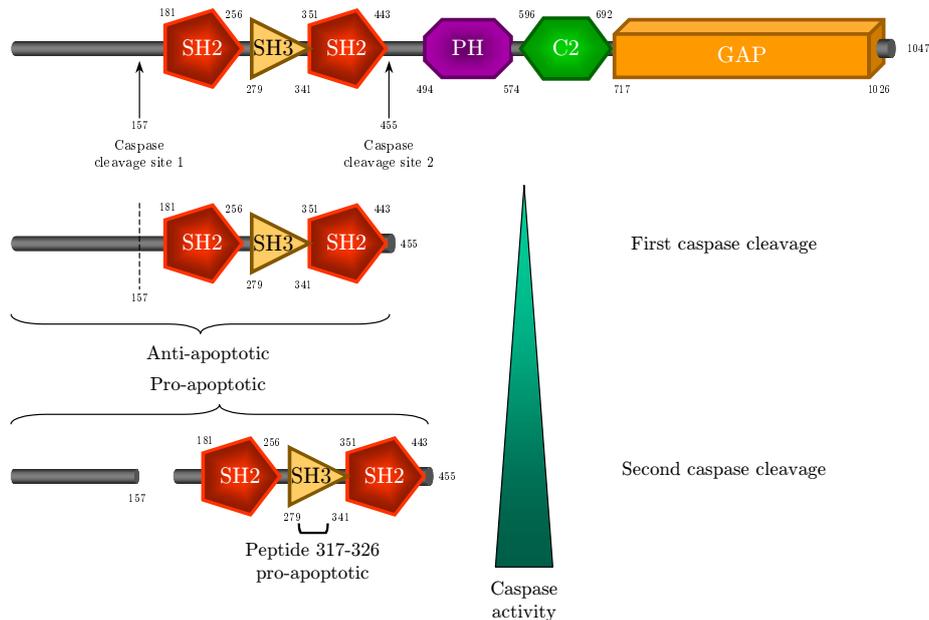


FIG. 4.4 – Clivage de RasGAP par les Caspases en deux positions. Les séquences des deux sites de clivage sont DEGD|S et DTVD|G, suivent la séquence consensus de clivage par les Caspase-3/-7. Cette figure est adaptée d'une figure du site web de l'équipe de Christian WIDMANN (www-ibcm.unil.ch/research/widmann).

RasGAP est clivé successivement en deux positions par les Caspases (Wen et al., 1998, Yang et al., 2004, Yang & Widmann, 2002a, 2001, voir également la figure 4.4). Tout d'abord, RasGAP est clivé en position 455, libérant deux fragments : un long fragment C-terminal comprenant les domaines **GAP**, **PH** et **C2**, et un autre fragment N-terminal comprenant le domaine **SH3**, les deux **SH2**, ainsi que la partie tout à fait à l'extrémité N-terminale de RasGAP. Ce fragment relativement long n'a pas d'activité pro-apoptotique. Ensuite, et seulement si le niveau d'activation de Caspase-3 est important, RasGAP est clivé une seconde fois à la position 157, libérant deux fragments, dont l'un ne contient que les trois domaines **SH2-SH3-SH2**.

Peptide RasGAP-SH3₃₁₇₋₃₂₆ Ce fragment possède une activité pro-apoptotique : transfecté dans des cellules, il potentialise l'action de molécules pro-apoptotiques (notamment le cis-platine, Yang & Widmann, 2001). Michod et al. (2004) ont recherché au sein de ce fragment, par transfection de parties de cette séquence, le plus petit fragment conservant cette propriété. Ces auteurs ont ainsi démontré que la région 317-326 (₃₁₇WMWVTNLRD₃₂₆) de RasGAP constituait le fragment minimal conservant cette propriété pro-apoptotique. Ce fragment correspond à une partie du domaine **SH3** de RasGAP tout à fait susceptible d'être le site de reconnaissance des ligands de ce domaine. De plus, le traitement de cultures cellulaires par un peptide synthétique identique à ce fragment minimal, vectorisé par le peptide TAT₄₈₋₅₇ de *HIV-1*, augmente très significativement la sensibilité de cellules tumorales à différentes molécules¹⁰ anti-cancéreuses provoquant l'apoptose. Cette « potentialisation » n'advient pas dans le cas de cellules normales. De façon très intéressante (et probablement très logique), il s'agit du même peptide que celui utilisé par Parker et al. (1996), qui ont précédemment montré sa capacité à inhiber l'interaction RasGAP-

10. Les molécules testées par Michod et al. (2004) sont cis-platine, mitoxanthrone et adriamycine.

SH3/G3BP.**Le clivage de RasGAP suite à une infection virale provoque une activation de la voie des MAPK**

Huber et al. (1999) ont mis en évidence le clivage de RasGAP suite à l'infection de cellules par le virus *Coxsackievirus B3*. Selon ces auteurs, ce clivage ne dépendrait pas de l'activité des Caspases, et résulterait de l'activité d'une protéase virale. Un fragment non identifié de RasGAP de 104 kDa est produit par ce clivage. Pour ces auteurs, cette protéolyse serait à l'origine de la suractivation de la voie des MAPK qu'ils ont observée.

4.4.3 Les domaines SH2 et leurs ligands

Les deux domaines **SH2** de RasGAP sont impliqués dans le rôle d'effecteur de Ras joué par RasGAP, tout comme le domaine **SH3** étudié dans la section 4.5.

Ces deux domaines reconnaissent, comme tous les domaines **SH2** des protéines tyrosine-phosphorylées. Le nombre important de ligands, et en particulier de récepteurs à activité tyrosine kinase, qui ont été identifiés, laisse penser que ces domaines jouent des rôles de modulateurs des autres activités de la région N-terminale de RasGAP.

Ligand de domaine SH2	N/C-ter	Ref.
β -PDGFR		Kazlauskas et al. (1990)
EGFR		Margolis et al. (1990)
IR β		Medema et al. (1996)
Src		Brott et al. (1991)
Lck		Amrein et al. (1992)
Bcr-Abl		Druker et al. (1992)
p190 RhoGAP ¹¹	N/C	Ellis et al. (1990)
p70		Medema et al. (1996)
p62 dok	N/C	Ellis et al. (1990), Kashige et al. (2000)
p602C4		Ogawa et al. (1995)
ICP10 (<i>Hsv-2</i>)	N	Smith et al. (2000)

TAB. 4.2 – Les ligands des domaines **SH2** de RasGAP (d'après Tocqué et al., 1997)

4.5 Le domaine SH3**4.5.1 Généralités sur le domaine SH3**

Le domaine **SH3** de RasGAP présente une structure secondaire tout à fait semblable au modèle qui a été présenté au chapitre 3, en tonneau β bien structuré. En revanche, la plupart des acides aminés impliqués dans la plate-forme de reconnaissance des peptides riches en proline (par exemple sur le domaine **SH3** de Grb2) ne sont pas conservés (figure 4.5).

11. Tsubouchi et al. (2002) ont montré par l'inhibition de son expression par siRNA que RasGAP était nécessaire à l'activation de p190 RhoGAP.

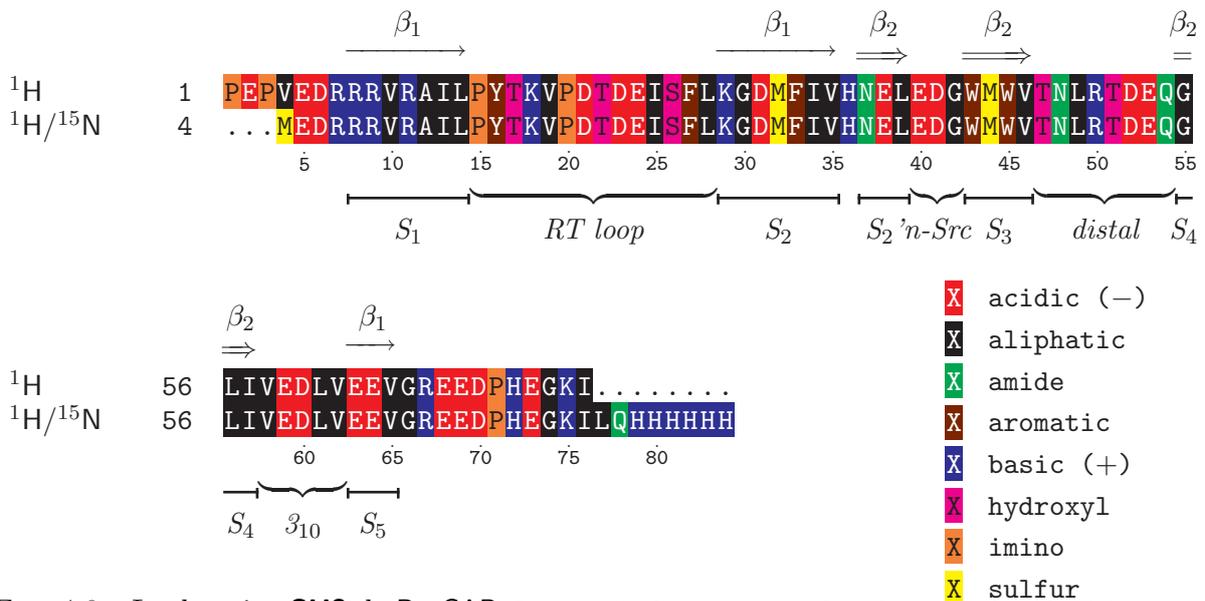


FIG. 4.6 – Le domaine **SH3** de RasGAP. La première ligne correspond au domaine tel qu'il a été exprimé pour la première résolution de sa structure par RMN ¹H (Yang et al., 1994) et la seconde ligne correspond au domaine tel que nous l'avons exprimé récemment pour une étude par RMN ¹H/¹⁵N et pour des mesures d'affinité par anisotropie de fluorescence (portant le tag [His]₆).

La figure 4.7 présente la structure secondaire de ce domaine, telle qu'elle a été déterminée dans notre laboratoire par Yang et al. (1994). On remarque l'importance relative de la longueur de la boucle *RT*, dont la position est déterminée par des liaisons entre certains résidus de cette boucle et les deux feuillets β qui constituent le cœur de ce domaine.

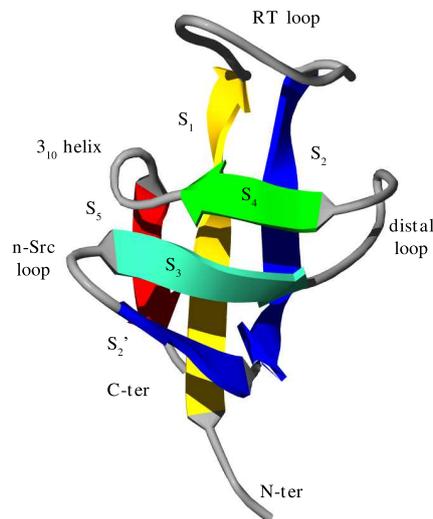


FIG. 4.7 – Structure secondaire du domaine **SH3** de RasGAP. Topologie présentée suivant le modèle proposé dans Agrawal & Kishan (2001)

Le tableau 4.3 montre que certains acides aminés (identiques ou de même nature) de la plate-forme de reconnaissance des peptides riches en proline de Grb2 sont également présents à

des positions semblables sur RasGAP. En revanche, on note que d'autres acides aminés ne sont pas conservés, ce qui explique que le domaine **SH3** de RasGAP ne reconnaisse pas de peptide riche en proline.

<i>Protéines</i>	<i>Acides aminés équivalents Grb2/RasGAP</i>					
Grb2	Y ₇	F ₉	E ₁₆	W ₃₆	P ₄₉	Y ₅₂
RasGAP	L ₁₄	Y ₁₆	D ₂₃	W ₄₃	V ₅₈	L ₆₁
Similarité	✗	✓	✓	✓	✗	✗

TAB. 4.3 – Acides aminés de RasGAP-**SH3** potentiellement impliqués dans la reconnaissance de ligands.

Nous pouvons d'ores et déjà identifier une poche hydrophobe entourée de résidus acides susceptibles de former des interactions avec d'éventuels ligands, sur la surface du domaine **SH3** de RasGAP. Cette poche est définie par les acides aminés suivants : D₂₁, D₂₃, L₃₉, E₄₀, D₄₁, W₄₃, M₄₄, W₄₅, L₅₆ et I₅₇ (cette poche avait déjà été présentée par [Yang et al., 1994](#)).

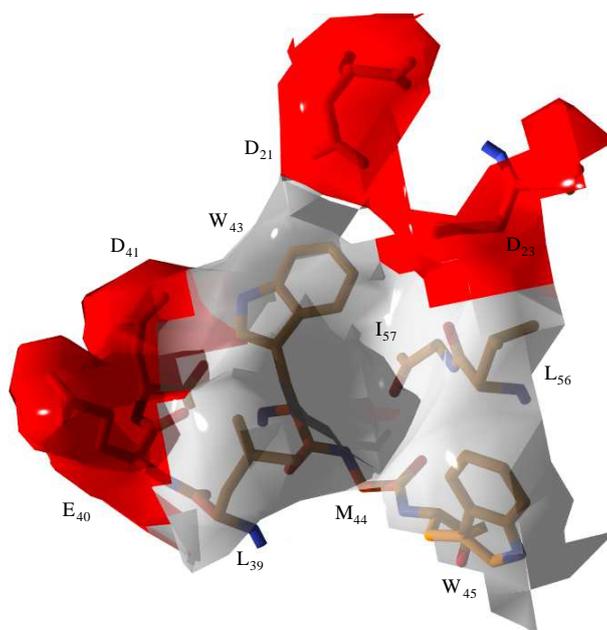


FIG. 4.8 – Poche hydrophobe sur le domaine **SH3** de RasGAP

4.5.2 Ligands du domaine **SH3**

Depuis l'identification du domaine **SH3** de RasGAP comme cible thérapeutique, de nombreuses équipes ont recherché les ligands de ce domaine, pour essayer de mieux comprendre la chaîne de signalisation dont la région N-terminale de RasGAP est un maillon central.

Lors de la recherche des partenaires de ce domaine **SH3**, il est nécessaire de garder à l'esprit qu'il est tout à fait possible qu'il existe, à la surface de ce domaine, plusieurs sites d'interaction possédant chacun des caractéristiques propres et reconnaissant différents ligands. Cette hypothèse est étayée par les travaux de différentes équipes ([Vidal et al., 1998](#), [Schumacher et al.,](#)

1996, Weng et al., 1995, voir également p. 69).

GAP-SH3 binding protein G3BP

Parker et al. (1996) ont identifié, à l'aide de plusieurs itérations de [purification / test de reconnaissance par RasGAP-SH3], une protéine de 68 *kDa* interagissant avec ce domaine, qu'ils ont dénommée G3BP. Après microséquençage, ils ont pu identifier cette protéine et vérifier par différentes techniques la spécificité de la reconnaissance. De plus, ces auteurs ont également démontré que la liaison RasGAP/G3BP est dépendante de l'activation de Ras sous forme liée au GTP. Par compétition d'interaction sur membrane (Far-Western Blot), ils ont montré que le peptide issu de RasGAP-SH3 WMWVTNLRD¹² est capable d'inhiber l'interaction RasGAP/G3BP.

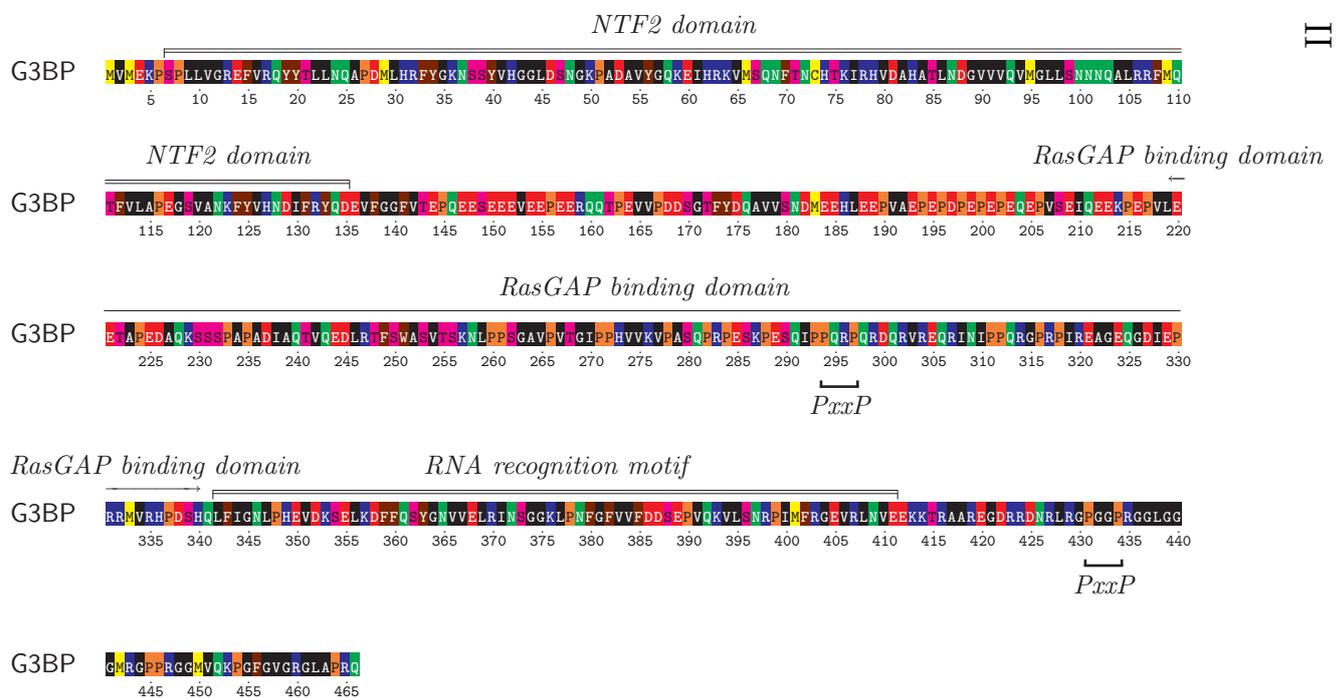


FIG. 4.9 – Séquence de la protéine G3BP.

Inconnue avant son identification par Parker et al. (1996), cette protéine est impliquée dans la modification de topologie de molécules d'ARN et d'ADN et dans la formation de granules de stress en réponse à divers stimuli (Candé et al., 2004, Costa et al., 1999, Gallouzi et al., 1998, Kennedy et al., 2001, Tourrière et al., 2003). Plus généralement, G3BP assure une régulation des ARN cytosoliques en exerçant une activité de dégradation, due à son domaine **RRM** (*RNA Recognition Motif*, résidus 342 à 411 Tourrière et al., 2001).

La protéine G3BP possède deux séquences PxxP (voir figure 4.9) : PQRP (294-297) et PGGP (431-434). Ce second motif, à cause de ses deux Glycines, n'est probablement pas un bon candidat pour une reconnaissance par un domaine **SH3** (Lim et al., 1994b). Tourrière et al. (2003, p. 827) précisent que la région riche en acides aminés acides de G3BP, entre les résidus 220 et 340, constitue le domaine de liaison à RasGAP-SH3¹³. Cette région très longue contient effectivement

12. Positions 317-326 dans la numérotation de la protéine entière, ou 43-52 dans la numérotation du domaine **SH3**.

13. Il semble que les expériences soutenant cette affirmation n'ont jamais été publiées.

le premier motif PxxP cité ci-dessus. Cependant, l'absence de publication reprenant ces résultats et présentant un court peptide interagissant avec RasGAP nous permet de supposer que le site reconnu par RasGAP-**SH3** sur G3BP est constitué d'acides aminés non juxtaposés, et donc qu'un simple peptide issu de la séquence de G3BP ne permet pas d'obtenir un inhibiteur efficace de l'interaction RasGAP/G3BP.

p14

Hu & Settleman (1997) ont mis en évidence l'interaction de RasGAP-**SH3** avec une protéine inconnue de 14 *kDa*¹⁴. Cette démonstration a été faite par précipitation de protéines issues de lysats de cellules Rat-src marquées avec de l'isotope radioactif ³⁵S, à l'aide de colonnes d'affinité constituées par la fixation de protéines de fusion GST/RasGAP-**SH3** sur des billes glutathion-sépharose. La faible quantité de protéines ainsi précipitées n'a pas permis d'identifier cette protéine par micro-séquençage ou spectrométrie de masse.

La famille des protéines Aurora

Plus récemment, les kinases de la famille Aurora ont été identifiées comme cibles de RasGAP-**SH3** dans notre laboratoire, au cours d'un crible double-hybride, en utilisant le domaine **SH3** de RasGAP comme appât (Gigoux et al., 2002, Garbay et al., 2003). Ayant participé aux expériences de validation de cette interaction sur lysats cellulaires, je figure parmi les inventeurs sur la demande de brevet que nous avons déposée (Garbay et al., 2003). Les expériences que j'ai réalisées dans ce cadre pendant une première partie de mes travaux de thèse n'étant pas directement au cœur du sujet de ce manuscrit sont présentées en annexe (*cf.* Annexe A, p. 221).

Découverte des protéines Aurora La famille des protéines Aurora a tout d'abord été découverte chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, où le gène *lpl-1*¹⁵ provoque, lorsqu'il est altéré, une modification de la ploïdie (*Increase In Ploidy*, Chan & Botstein, 1993, Francisco & Chan, 1994), et chez la drosophile, où la délétion du gène *Aurora* provoque des anomalies de la mitose¹⁶ (Shevelyov, 1993). Des gènes paralogues à *lpl-1* et *Aurora* ont par la suite été identifiés dans tous les organismes eucaryotes étudiés, et en particulier chez l'homme (Kimura et al., 1997). Très rapidement, une surexpression dans certains cancers du sein de l'homologue humain des protéines Aurora a été mise en évidence (Sen et al., 1997).

La famille des protéines Aurora La figure 4.10 présente l'arbre phylogénétique de ces protéines présentes dans différents organismes. Cette figure permet d'établir un historique de l'évolution de la famille des protéines Aurora : un seul orthologue chez les levures, deux orthologues chez la drosophile, le nématode et les dicotylédones. En revanche, les vertébrés possèdent trois orthologues Aurora-A, -B et -C. Cette figure montre l'origine commune de ces trois orthologues, et leur non appariement quelconque avec les deux orthologues d'autres espèces telles que la drosophile.

14. Les travaux de Gigoux et al. (2002) permettent de supposer que cette protéine est en fait la Survivin. Nous avons détaillé cette supposition plus loin (p. 90).

15. *lpl-1* est le paralogue chez cette levure des gènes de la famille *Aurora*.

16. La dénomination de ce gène provient de la ressemblance des clichés obtenus par marquage du fuseau mitotique et des chromosomes chez le mutant *Aurora*⁻, qui rappellent les aurores atmosphériques.

La figure 4.10(c) présente un alignement simplifié des différentes protéines *Aurora* de vertébrés. On constate une très forte conservation de la partie C-terminale, qui comporte le domaine kinase. En revanche, la région N-terminale (dont *Aurora-C* est quasiment dépourvue) diffère largement entre *Aurora-A* et *-B*.

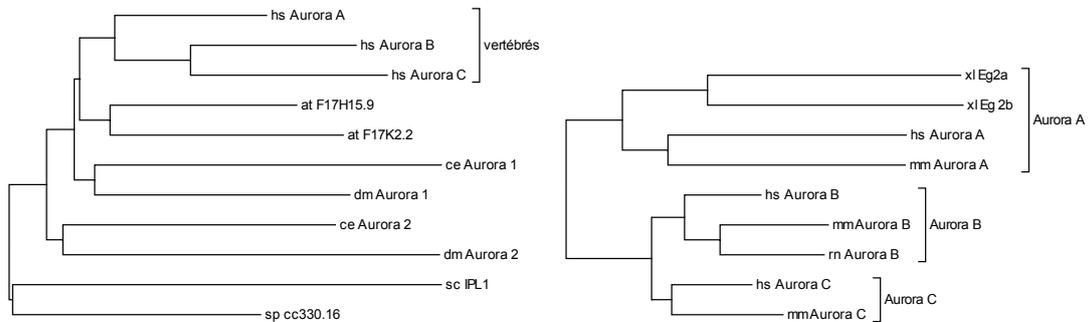


FIG. 4.10 – La famille des protéines *Aurora*. On remarque que le domaine kinase C-terminal est très conservé entre toutes les espèces et les différents paralogues au sein de chaque espèce. En revanche les régions N-terminale diffèrent nettement entre les différentes protéines *Aurora-A*, *-B* et *-C*.

Dans toute la suite de ce manuscrit, nous ne nous intéresserons qu'aux homologues humains de la famille *Aurora*.

Rôles des protéines *Aurora* et cancer Les protéines *Aurora* sont impliquées dans la régulation de la division cellulaire¹⁷. Une quelconque anomalie de l'expression (inhibition, surexpression ou mutation) des protéines *Aurora-A* ou *-B* provoque des anomalies de la mitose, entraînant bien souvent une ségrégation anormale des chromosomes et une modification de la ploïdie de la cellule. En parallèle, cette aneuploïdie est depuis longtemps considérée comme un marqueur

17. Adams et al. (2001), Carmena & Earnshaw (2003) et Nigg (2001) ont récemment publiés des revues récapitulantes la biologie des kinases *Aurora*.

important des cancers de grade II ou III¹⁸.

La figure 4.11 présente schématiquement les localisations de Aurora-A et -B au cours du cycle¹⁹. Les niveaux d'expression de Aurora-A et -B varient de façon importante au cours du cycle cellulaire, avec des maximums d'expression en fin de phase S et G2 pour Aurora-A, et un peu plus tardivement (phases G2/M) pour Aurora-B. Ces deux protéines sont impliquées dans les *checkpoint* de contrôle de l'avancement du cycle cellulaire, et cette activité est liée à leur localisation cellulaire et à leur capacité à phosphoryler leurs substrats.

Concernant Aurora-A, son principal régulateur semble être TPX2, une protéine du complexe centrosomal, impliquée dans la régulation de la ségrégation des chromosomes (Kufer et al., 2002, 2003). La phosphorylation de INCENP par Aurora-A est requise pour la progression de la mitose et pour la fonctionnalité des kinétochores (Kunitoku et al., 2003). Aurora-B a pour substrat notamment Vimentin, l'une des principales protéines des filaments intermédiaires. La phosphorylation de cette protéine par Aurora-B joue un rôle particulièrement important dans la cytokinèse (Goto et al., 2002).

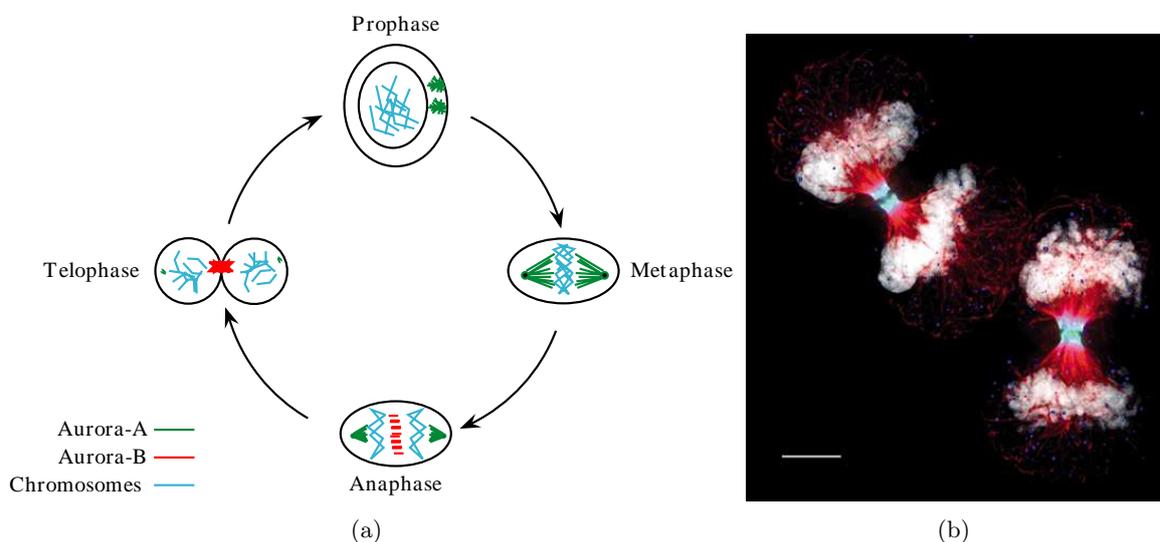


FIG. 4.11 – Localisation des protéines Aurora-A et -B au cours du cycle cellulaire. (a) d'après (Nigg, 2001); (b) d'après (Andrews, 2003). Localisation de la protéine Aurora B dans des cellules HeLa en télophase. Les microtubules sont marqués en rouge, la protéine INCENP en bleu, Aurora B-GFP en vert et l'ADN en blanc. Image obtenue par projection de données 3D obtenues par déconvolution d'images d'un microscope optique. La barre d'échelle représente 5µm.

Aurora-B participe à l'assemblage protéique centrosomal, et y existe sous forme d'un complexe regroupant également INCENP et Survivin²⁰ (Bolton et al., 2002). Cette dernière protéine, d'en-

18. Le grade histopronostique de Scarff, Bloom et Richardson (Elston & Ellis, 1991) est fondé sur le degré de différenciation de la tumeur, le pléiomorphisme de ses noyaux et son activité mitotique. Chacun de ces éléments est noté de 1 à 3, ce qui permet un classement en trois catégories en fonction de la somme de ces notes: I (3, 4, 5), II (6, 7) et III (8, 9). On trouve habituellement deux tiers de cellules aneuploïdes dans les tumeurs de grade II, aucune dans celles de grade I. En revanche, les cellules des tumeurs de grade III sont toutes aneuploïdes.

19. Aurora-C n'est exprimée normalement que dans certains tissus testiculaires, où il semblerait qu'elle joue un rôle dans la méiose de la spermatogénèse (Giet & Prigent, 1999, Adams et al., 2001).

20. Survivin est une protéine de la famille des IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*), exprimée pendant le développement foetal, et inexistante dans presque tous les types cellulaires adultes sains. Son rôle d'inhibiteur de l'apoptose, élucidé notamment par des modèles d'animaux transgéniques, et sa très fréquente expression dans de

viron 16,5 *kDa* pourrait très bien être la p14 citée par [Hu & Settleman \(1997\)](#). En effet, [Gigoux et al. \(2002\)](#) décrivent la co-précipitation d'un complexe tripartite RasGAP/Aurora-A/B/Survivin dans un lysat de cellules HeLa.

Ce complexe pourrait donc permettre d'expliquer l'implication du domaine **SH3** dans la régulation de l'apoptose, et dans le processus tumoral. Les très fréquentes expressions des protéines Aurora (-A, -B, -C [Bischoff et al., 1998](#), [Giet & Prigent, 1999](#)) et Survivin dans des tumeurs humaines soutiennent cette hypothèse.

Il a été rapporté une présence relativement fréquente d'un mutant Aurora-A^{F31I}, dont l'expression est associée à une forte aneuploïdie de cancers du côlon chez l'homme, et qui augmente, chez la souris, la fréquence d'aggravation de cancers de la peau suite à infection par *Papilloma Virus* ([Ewart-Toland et al., 2003](#))

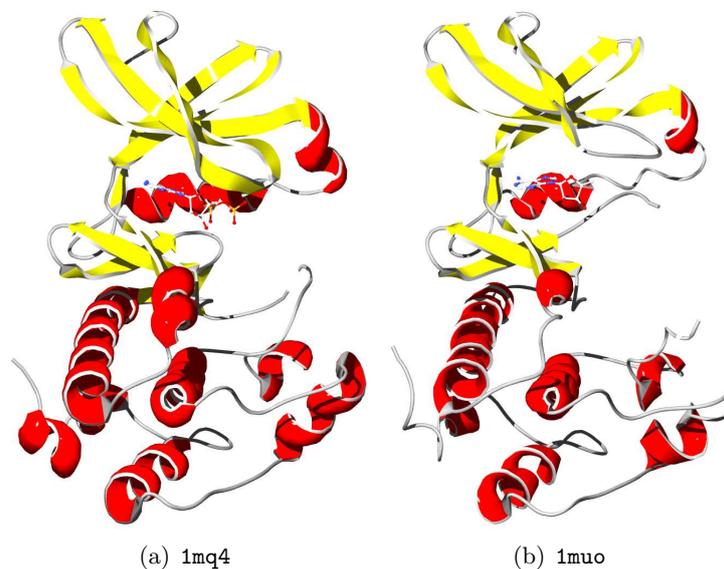


FIG. 4.12 – Structures cristallographiques du domaine kinase d'Aurora-A (107-403). (a) [Cheetham et al. \(2002\)](#); (b) [Nowakowski et al. \(2002\)](#). Sur ces deux structures, on note de légères différences, notamment au niveau de la boucle de régulation du site actif kinase. Figure sur ces structures le nucléotide ATP.

Inhibiteurs des kinases Aurora Plusieurs molécules inhibitrices de Aurora ont été identifiées très récemment par différents groupes pharmaceutiques, ce qui prouve bien, s'il était encore besoin, que ces protéines sont largement reconnues comme étant des cibles judicieuses en cancérologie. La figure 4.13 présente les trois molécules actuellement en essais cliniques. Les découvertes de ces molécules se sont appuyées très largement sur un travail de modélisation moléculaire poussé, qui a été rendu possible par la résolution de la structure cristallographique du domaine kinase d'Aurora-A par deux groupes presque simultanément (PDB : 1MU0 et 1MQ4, voir figure 4.12, [Cheetham et al., 2002](#), [Nowakowski et al., 2002](#)). Une récente revue de [Keen & Taylor \(2004\)](#) détaille les différentes stratégies de conceptions de molécules ciblant Aurora dans le

nombreux cancers de stade avancé en font une cible pertinente pour d'éventuelles thérapeutiques anti-tumorales ([Altieri, 2003a, b](#), [Li, 2005](#)). Son interaction avec les protéines Aurora permet d'imaginer des relations étroites entre les régulations du cycle cellulaire et de l'apoptose ([Lens & Medema, 2003](#)).

but de concevoir des molécules anti-tumorales (voir également [Sausville, 2004](#), [Ditchfield et al., 2004](#), [Fancelli et al., 2005](#)).

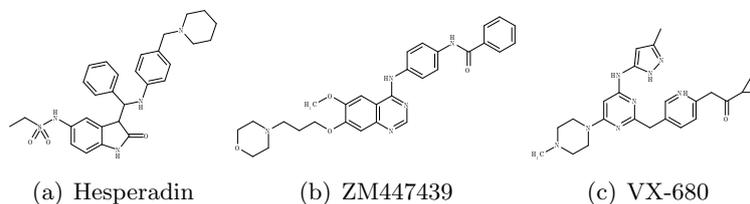


FIG. 4.13 – Inhibiteurs des kinases Aurora : Hesperadin (Boehringer Ingelheim, [Hauf et al., 2003](#)), ZM447439 (AstraZeneca, [Ditchfield et al., 2003](#)) et VX-680 (Vertex, [Harrington et al., 2004](#))

II

4.6 Conclusion du chapitre 4

Dans le cadre de l'étude de l'activité effectrice de Ras joué par le domaine **SH3** de RasGAP, l'interaction entre ce domaine **SH3** et les protéines Aurora est donc tout à fait pertinente. On peut notamment supposer que cette interaction aurait un rôle important dans la régulation de l'activité kinase de cette protéine, et donc permettrait ainsi la transduction du signal mitogène initié par l'activation de Ras.

En effet, comme nous l'avons vu, les protéines Aurora, kinases impliquées dans la régulation du cycle cellulaire sont très fréquemment surexprimées dans des tumeurs humaines. De plus, de par leur interaction avec la protéine Survivin, dont les protéines Aurora sont très certainement responsables de la régulation par phosphorylation, elles sont donc directement impliquées dans la régulation de l'apoptose.

La découverte de l'interaction entre RasGAP et Aurora a donc apporté de nouveaux éléments particulièrement intéressants dans le cadre de l'étude de RasGAP-**SH3** en tant que cible thérapeutique en oncologie.

Le projet de conception de molécules thérapeutiques que nous avons construit et qui fait l'objet de cette thèse, se base donc sur ces nouveaux éléments, qui renforcent de façon très importante les autres éléments déjà présents dans la littérature depuis de nombreuses années (*cf.* p.79).

Troisième partie
Résultats

Stratégie de conception d'inhibiteurs de RasGAP-SH3

L'ensemble des résultats de la littérature présentés dans l'introduction suggèrent fortement que la protéine RasGAP, et en particulier son domaine **SH3** constitue une cible très prometteuse pour le développement d'inhibiteurs de ses interactions dans le but de concevoir de nouvelles classes d'agents thérapeutiques à activité anti-tumorale. Nous avons conçu un projet en plusieurs phases autour de cet axe de recherche. L'objectif initial consiste à obtenir des données structurales de complexes formés par le domaine **SH3** de RasGAP comme base de départ pour concevoir des inhibiteurs, et pour cela, nous avons cherché à construire une première série de molécules peptidiques se fixant spécifiquement sur RasGAP-**SH3**.

Le domaine **SH3** de RasGAP étant non conventionnel (il ne reconnaît pas de peptide contenant la séquence consensus de type PxxP) et aucune structure de complexe avec un ligand simple n'étant connu, nous avons utilisé la technique des aptamères peptidiques pour obtenir de premiers peptides de référence.

La stratégie que nous avons choisie se décompose ainsi :

1. **Sélection d'aptamères peptidiques** : cette technique permet, par un crible génétique en levure, l'obtention de peptides, contraints conformationnellement par une plate-forme protéique, reconnaissant sélectivement RasGAP-**SH3**. Des expériences complémentaires permettent une première évaluation de la qualité de ces aptamères peptidiques : étude de leur spécificité, de leur affinité, et recherche du site de fixation par mutagenèse.
2. **Validation de l'utilisation des aptamères peptidiques et de la cible** : l'observation de phénotypes résultant de l'expression des aptamères dans des modèles cellulaires confirme la validité de la cible. La confirmation des interactions RasGAP-**SH3**/aptamères en utilisant des protéines purifiées devrait permettre de conforter les résultats obtenus sur cellules.
3. **Synthèse et évaluation de l'affinité de peptides** issus des régions variables des aptamères peptidiques.
4. **Analyse structurale** de complexes RasGAP-**SH3**/peptides synthétiques issus des régions variables des aptamères, par RMN ou RX.
5. **Recherche de molécules non peptidiques** : *drug design* et/ou criblage *in silico* et *in vitro* de chimiothèques.

Les étapes 1 à 4 ont été réalisées en grande partie dans ce travail, et les résultats obtenus sont exposés dans les chapitres suivants. L'étape 5, ainsi que les essais sur cultures cellulaires des molécules obtenues seront poursuivis au laboratoire.

Chapitre 5

Recherche d'aptamères peptidiques reconnaissant RasGAP-SH3

La première étape de notre stratégie de conception d'inhibiteurs du domaine **SH3** de RasGAP consiste à obtenir des ligands peptidiques simples de ce domaine.

Le domaine **SH3** de RasGAP n'étant pas « conventionnel » et aucun ligand simple n'étant décrit dans la littérature, nous avons identifié différentes techniques combinatoires susceptibles de fournir assez rapidement ces premiers ligands. Notamment la technique du *phage display* et des aptamères ADN/ARN, ainsi que le criblage à haut débit de chimiothèques nous ont ainsi paru pertinentes. Cependant, la technique plus récente des aptamères peptidiques est certainement la plus adaptée à notre problématique, puisqu'elle permet rapidement la sélection de ligands peptidiques courts, au cours d'un crible dont le critère de sélection est une interaction intracellulaire. L'objet de ce chapitre est de détailler le principe et les avantages relatifs de cette technique vis à vis des autres méthodes envisagées, avant de présenter les aptamères peptidiques que nous avons obtenus et les premières étapes de leur étude.

|| Ces travaux ont été réalisés en étroite collaboration avec la start-up *Aptanomics*¹.

5.1 Principe général

5.1.1 Description simplifiée

Aptamère peptidique : définition

Un aptamère² peptidique est une protéine possédant une boucle variable comportant un petit nombre d'acides aminés quelconques, et qui a été sélectionnée vis à vis de son affinité pour une protéine donnée (Colas et al., 1996, Norman et al., 1999, Geyer & Brent, 2000).

Le concept des aptamères peptidiques est donc relativement proche du concept d'anticorps, dans la mesure où la boucle variable d'un aptamère peut tout à fait être comparée aux régions variables des anticorps. L'intérêt présenté par ce concept réside principalement dans la petite taille de l'aptamère peptidique et de sa région variable, ainsi que dans la facilité de détermination

1. *Aptanomics SA*, M. Pierre COLAS, Directeur Scientifique, 181-203, avenue Jean Jaurès 69007 Lyon – FRANCE

2. Aptamère : mot formé du latin *aptus*, « adapté à », et du suffixe *-mer*, venant du grec *μερος*, « partie ».

de la séquence peptidique de cette région variable (le séquençage d'un plasmide suffit). [Hoppe-Seyler et al. \(2004\)](#) ont récemment publié une revue présentant les aspects théoriques et pratiques de la mise en œuvre de la technique des aptamères peptidiques.

Le caractère combinatoire des aptamères peptidiques permet des cribles très simples

Ce concept se classe dans la catégorie des outils de biologie combinatoire. La principale difficulté, lorsque l'on réalise un crible de plusieurs millions de molécules combinatoires différentes, consiste à obtenir l'identité du composé possédant la caractéristique recherchée par le crible, et à s'assurer que l'effet obtenu est bien dû à ce composé (voir par exemple [Colas, 2000](#)). La maîtrise actuelle des techniques de manipulation de fragments d'ADN a permis de contourner dans une certaine mesure cette difficulté. Il s'agit alors de concevoir des systèmes de criblage permettant de ne pas dissocier le fragment d'ADN de la molécule criblée dont il porte l'identité. La plupart des systèmes imaginés jusqu'à présent ne permet de cribler que deux types de molécules : nucléotidiques (ARN ou ADN) ou protéiques (fragments ou protéines entières). Cependant, de nouvelles idées commencent à émerger, consistant par exemple à utiliser à la fois les outils de chimie combinatoire à haut débit et les technologies de puces à ADN (la molécule chimique porterait alors, directement greffée sur elle, un court oligonucléotide qui lui servirait de traceur, [Melkko et al., 2004](#)).

Champ d'application de la technique des aptamères peptidiques

Le champ d'application des aptamères peptidiques est immense. De par la grande taille des banques qu'il est possible de cribler, parmi les différents aptamères sélectionnés, la probabilité d'obtenir des aptamères reconnaissant différemment la protéine d'intérêt est très importante. Les tests réalisés ultérieurement doivent permettre d'identifier les fonctions liées aux différentes régions de la surface de la protéine criblée.

Exemples d'utilisation de la technique des aptamères peptidiques

Inhibiteurs de la division cellulaire Les aptamères peptidiques ont tout d'abord été utilisés pour identifier des ligands de Cdk2, dont certains ont une affinité nanomolaire et une activité inhibitrice ([Colas et al., 1996](#), [Cohen et al., 1998](#)). Toujours dans le cadre des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, [Fabbri et al. \(1999\)](#) ont identifié des aptamères peptidiques inhibiteurs du facteur de transcription E2F1, dont certains, exprimés dans des cellules en culture, possèdent la capacité à bloquer la division cellulaire en phase G1.

Inhibiteurs de voies de signalisation cellulaire Plusieurs équipes ont utilisé la technique des aptamères peptidiques pour obtenir des inhibiteurs de la signalisation cellulaire. Ainsi, [Xu & Luo \(2002\)](#) ont obtenu des aptamères peptidiques reconnaissant spécifiquement des formes mutées oncogéniques de Ras (en utilisant le crible à double appât, [Xu et al., 1997](#)), capables d'inhiber l'interaction Ras/Raf. De même, des inhibiteurs de Trio (protéine à activité GEF – *Guanidine Exchange Factor* – pour Rho, [Schmidt et al., 2002](#)) et des inhibiteurs de EGFR ([Buerger et al., 2003](#)) ont été identifiés. Dans ce dernier exemple, certains des aptamères peptidiques possèdent des activités cellulaires intéressantes dans le cadre de la conception d'agents anti-tumoraux : inhibition de la phosphorylation de EGFR et de l'activation de Stat3 notamment.

Très récemment, [Cui et al. \(2005\)](#) ont utilisé la plate-forme de présentation Thiorédoxine pour contraindre et exprimer des fragments de protéines interagissant avec la protéine Smad de la voie

de signalisation liée au facteur TGF- β , et ainsi étudier les interactions de ces différents fragments. Ces travaux n'utilisent pas la capacité combinatoire des aptamères peptidiques qui nous intéresse particulièrement, mais seulement leur propriété permettant de contraindre spatialement des peptides.

Inhibiteurs de protéines virales (HPV et HBV) Butz et al. (2000) ont obtenu des inhibiteurs de la protéine E6 responsable de l'inhibition du suppresseur de tumeur p53 dans l'infection par certains HPV (*papilloma virus*). De même, Nauenburg et al. (2001) ont obtenu des inhibiteurs de la protéine E7 de ces mêmes virus. Dans les deux cas, ces aptamères peptidiques provoquent l'apoptose de cellules infectées dans lesquelles ils sont exprimés, et cette apoptose n'intervient pas dans des cellules non infectées.

Enfin, Butz et al. (2001) ont développé des aptamères peptidiques dirigés contre la protéine de capsid du virus de l'hépatite B (HBV), dont l'expression dans des cellules infectées réduit la capacité de réplication virale et d'assemblage de nouvelles capsides.

Technique de sélection : le crible double-hybride

La technique de sélection qui a été retenue par les inventeurs du concept d'aptamères peptidiques a dès le début été un crible de type double-hybride³ en levure tout à fait classique, relativement proche du système conçu par Fields & Song (1989). Le système que nous avons mis en œuvre consiste donc à exprimer, au moyen de plasmides transfectés dans une levure, une protéine appelée « Appât » (fusion de la protéine d'intérêt, ici RasGAP-SH3, pour laquelle on souhaite obtenir des aptamères et du domaine de liaison à l'ADN LexA, voir notamment Brent & Ptashne, 1985) et une seconde protéine, la « Proie » (fusion de la protéine plate-forme, portant la région variable, et du domaine d'activation de la transcription B42). Dans le système que nous avons utilisé, la plate-forme de présentation est constituée par la Thioredoxine bactérienne, enzyme dont le site actif est précisément remplacé par la boucle variable de composition sélectionnée par le crible. Les critères de choix de cette plate-forme sont multiples : solubilité importante, compacité, taille relativement faible, structure parfaitement connue, et enfin, importantes contraintes structurelles sur les deux extrémités de la boucle variable.

3. L'appellation double-hybride pour cette technique vient du fait qu'elle nécessite de transformer les levures avec deux plasmides différents, exprimant deux protéines hybrides dont on va tester l'interaction. La description originale de ce système (appelé alors « *interaction trap* » a été publiée par Gyuris et al. (1993).

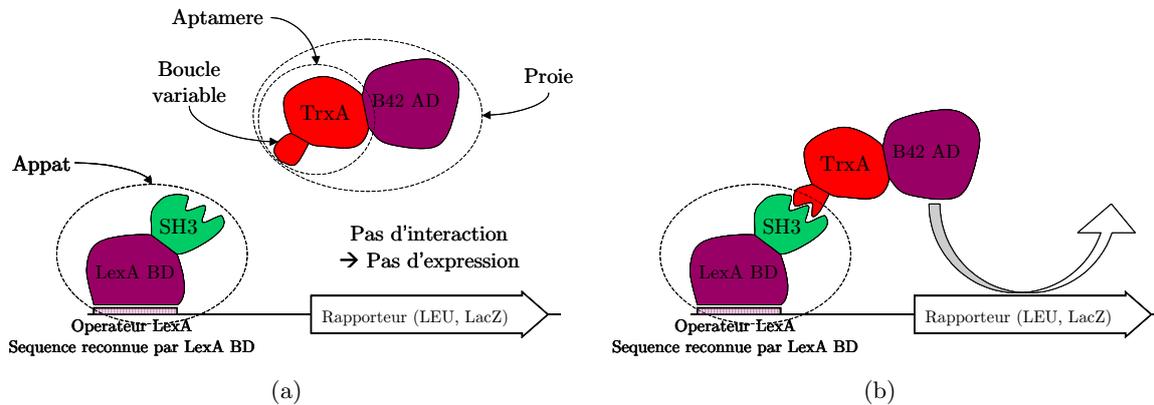


FIG. 5.1 – Principe du criblage en double hybride d’aptamères peptidiques. Au sein d’une même levure, trois plasmides sont introduits : deux servant à l’expression des deux protéines hybrides « Appât » et « Proie », et le troisième portant le gène rapporteur. (a) : lorsqu’il n’y a pas interaction entre la Proie et l’Appât, l’expression des rapporteurs n’est pas induite. (b) : en revanche, lorsqu’il y a interaction entre la Proie et l’Appât, l’expression est induite, et la levure peut donc être sélectionnée positivement (par sa survie sur un milieu déprivé en Leucine ou par sa coloration bleue).

5.1.2 Comparaison avec d’autres techniques de biologie combinatoire

La technologie des aptamères peptidiques et leur crible par double hybride en levure permettent de réaliser très rapidement, en « un seul tube » (*one-pot*) la sélection de quelques éléments à l’aide d’un test simple (par exemple : interaction avec une molécule donnée), présents au sein d’une banque *très* large, et surtout de les identifier avec certitude très rapidement après le crible.

Les techniques dites de « crible à haut débit » de chimiothèques (quelques milliers à quelques centaines de milliers de produits différents) se basent sur un principe tout autre : les différents produits (constituant la banque à cribler) sont placés un à un dans des puits séparés et identifiés de centaines de plaques et le test est répété dans chaque puits. En effet, si on mélangeait tous ces produits (en supposant que leurs effets soient indépendants et qu’ils ne réagissent pas entre eux), et que l’on réalisait le test dans « un seul tube », même si le test s’avérait positif, il serait impossible de déterminer le produit responsable de cet effet ⁴.

Les différentes techniques présentées ici reposent toutes sur l’utilisation d’un organisme vivant pour produire et amplifier à la fois la molécule à tester et l’information permettant de l’identifier.

Aptamères ADN / ARN

La molécule la plus simple actuellement à identifier est bien sûr l’ADN, dont le séquençage est une activité routinière de laboratoire. Il est donc tout à fait logique d’avoir cherché dans un premier temps des molécules d’ADN ou d’ARN dont la structure, après repliement, permet d’obtenir une interaction avec une protéine cible ⁵, et d’envisager d’utiliser cette séquence d’ADN

4. Il semble cependant qu’Astex ait développé une technologie permettant de réaliser ce type d’expérience, en identifiant par cristallographie le composé (parmi plusieurs) inséré dans le site actif de la protéine dont on cherche des inhibiteurs (Tickle et al., 2004).

5. Deux essais cliniques de phase III sont en cours avec des ARN dirigés contre VEGF et E2F (voir la revue de Nimjee et al., 2005).

(ou ARN) en thérapie « génique ».

De nombreuses expériences de ce type ont été publiées. On peut notamment citer la découverte d'aptamères ARN inhibiteurs de l'interaction Raf-1/Ras, inhibant la voie de signalisation liée aux protéines Ras (Kimoto et al., 2002).

La sélection des aptamères ARN se fait principalement *in vitro*, et en cela possède certains avantages et défauts communs aux molécules identifiées par *phage display*. La technique de sélection de ces aptamères nucléiques a été brevetée sous l'appellation *SELEX* (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*, Gold & Tuerk, 1993).

Phage display

La technique du *phage display* est sensiblement comparable à celle du crible d'aptamères peptidiques par double hybride. Les bactériophages (ou phages) sont des virus rudimentaires infectant des bactéries. La manipulation génétique de ces phages étant maîtrisée depuis un certain nombre d'années, et il est ainsi possible de faire exprimer à la surface du phage une protéine génétiquement modifiée.

Cette protéine chimérique exprimée par le phage possède un fragment de quelques acides aminés exposés aléatoires. Les phages sont alors séparés sur colonne d'affinité (composée par exemple de billes Sépharose-glutathion chargées avec une protéine d'intérêt fusionnée à la GST). Les phages n'exprimant pas une protéine reconnaissant cette protéine sont lavés, et après élution (par exemple avec un tampon de force ionique plus importante), les phages sélectionnés sont amplifiés par infection de bactéries et soumis à un nouveau cycle de sélection.

Le principal avantage de cette technique tient à la taille des banques qu'il est possible de cribler et à la facilité de mise en œuvre du crible. La génétique des bactériophages permet en effet d'avoir des efficacités de transformation de la banque permettant d'obtenir jusqu'à $10^{10}/10^{11}$ clones indépendants (contre environ 10^8 pour les cribles en levure). De même il est possible, en réalisant plusieurs cycles de sélection/purification/amplification, d'enrichir significativement la population de phages en clones exprimant une protéine se fixant avec une très grande affinité sur la protéine criblée. De plus, la sélection *in vitro* permet très facilement de rechercher des compétiteurs d'interactions, en ajoutant dans la suspension de phages différentes molécules dont on connaît les caractéristiques d'interaction avec la protéine criblée.

Exemples d'utilisation du *phage display* Mori (2004) a récemment publié une revue des différentes recherches de ligands peptidiques par *phage display* ciblant des interactions protéine-protéine intervenant dans le processus tumoral (voir également Sidhu et al., 2003). On peut notamment citer par exemple les travaux de Ferguson et al. (2004), qui ont réalisé une recherche de ligands du domaine SH3 de la protéine Sem-5 (homologue chez *C. elegans* de Grb2) par *phage display*, et ont obtenu des peptides sensiblement équivalents aux peptides déjà identifiés pour leur interaction avec Grb2 (voir p. 68).

Anticorps thérapeutiques sélectionnés par *phage display* L'une des extensions les plus intéressantes de la technique de *phage display* est certainement l'utilisation de banques composées de fragments de gènes codant pour les régions variables d'anticorps humains (*scFv/Fab*⁶, pour une revue : Kretzschmar & von Rüden, 2002). Actuellement, plus de 30% des anticorps

6. *scFv* : single chain variable fragment, *Fab* : fragment d'anticorps.

monoclonaux en cours de développement clinique ont été isolés par cette technique, sans immunisation d'animaux. Les anticorps ainsi conçus sont entièrement humains, et provoquent donc moins de réactions allergiques (voir par exemple le cas de l'anticorps α -TNF $_{\alpha}$, actuellement en essai clinique dans le cadre du traitement de la polyarthrite rhumatoïde, [Elliott et al., 1993](#)).

Avantage du crible d'aptamères peptidiques en levure : interactions intracellulaires

Caractéristique commune à la plupart des techniques de criblage *in vitro*, le *phage display* ne permet pas d'écartier des résultats du crible les peptides qui auraient une activité particulière sur d'autres processus intracellulaires.

Au contraire, avec le crible double-hybride en levure, toutes les interactions ayant lieu dans le milieu intracellulaire, et de plus dans un organisme eucaryote *relativement* proche des cellules humaines, toute molécule interférant avec le fonctionnement de la cellule peut rapidement être identifiée, soit lors du crible directement (molécules cytotoxiques), soit dans la toute première phase de validation. En effet, nous cherchons à identifier des molécules inhibitrices de la prolifération cellulaire, mais par une interaction spécifique avec une protéine donnée, et non par une simple toxicité cellulaire quelconque. Lors de la sélection d'aptamères par double-hybride, l'ensemble des expériences permettent d'éliminer toutes les molécules qui auraient une telle toxicité non spécifique : ces molécules seraient automatiquement éliminées par leur toxicité pour les levures.

III

5.2 Mise en œuvre du crible double-hybride

5.2.1 Description du système double-hybride utilisé pour le crible

Les levures que nous avons utilisées pour cette étude sont de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Les différentes souches que nous avons employées sont :

- EGY48 α MAT α , $\Delta trp1$, $\Delta his3$, $\Delta ura3$, $\Delta leu2$, 3 ColE1 LexA $_{op}$::*leu2*,
- EGY191 α MAT α , $\Delta trp1$, $\Delta his3$, $\Delta ura3$, $\Delta leu2$, 1 ColE1 LexA $_{op}$::*leu2*,
- EGY42a MAT α , $\Delta trp1$, $\Delta his3$, $\Delta ura3$, $\Delta leu2$.

Ces trois souches sont donc **auxotrophiques** pour quatre métabolites vitaux : Tryptophane, Histidine, Leucine et Uracile. Si ces levures peuvent croître de façon tout à fait normale sur un milieu leur apportant ces quatre nutriments essentiels, en revanche sur un milieu minimum ne contenant pas l'ensemble de ces nutriments, les levures ne peuvent se multiplier. Ce type de sélection est utilisé de façon tout à fait similaire à la sélection par antibiotique pour d'autres modèles, mais il a l'avantage d'être très simple d'emploi et de permettre des combinaisons très complexes que l'on ne pourrait pas obtenir avec des combinaisons d'antibiotiques et de gènes de résistance à des antibiotiques.

Le système double-hybride que nous avons utilisé comporte plusieurs plasmides d'expression :

- Plasmide appât pEG-202 (*his3*) (figure 5.2)
- Plasmide proie pJG4-5, pJM-1 ou pWP-2C (*trp1*) (figures 5.3(a) et 5.9)
- Plasmide rapporteur β -galactosidase pSH18-34 ou pRB18-40 (*ura3*) (figure 5.3(b))

Chacun de ces plasmides, lorsqu'il est transfecté dans une levure, restaure la voie de biosynthèse de l'un des nutriments essentiels et permet donc la survie de la levure sur un milieu sélectif ne contenant pas ce nutriment.

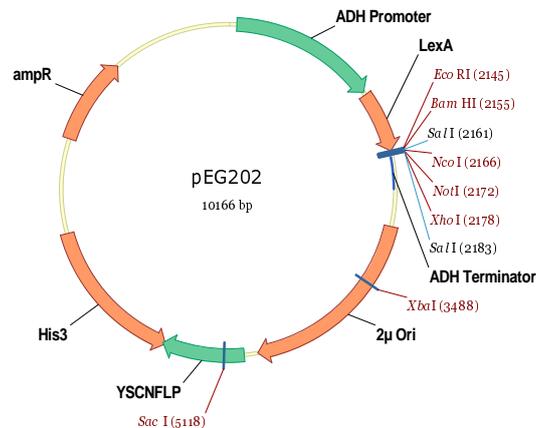
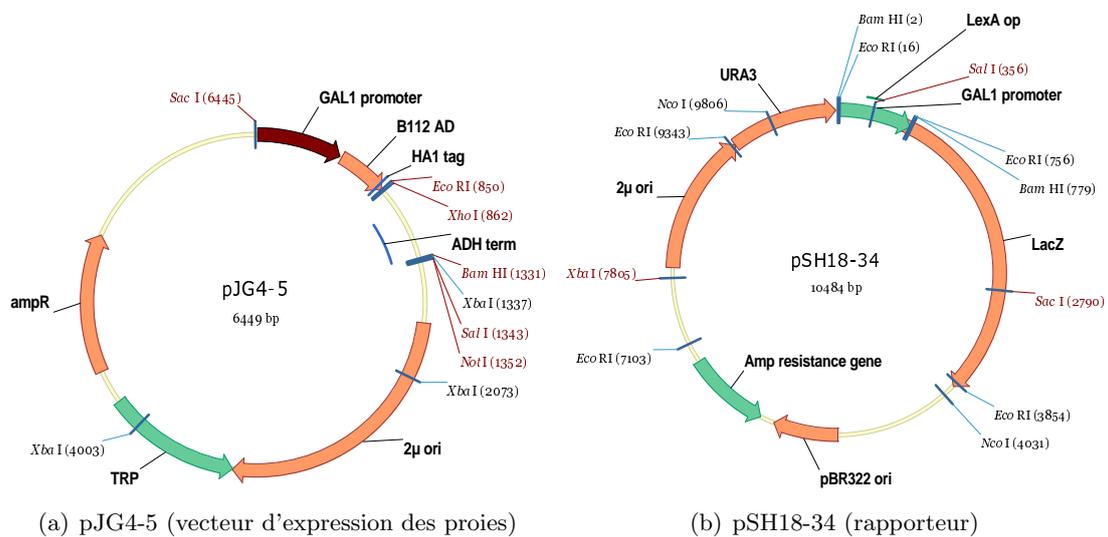


FIG. 5.2 – Vecteur d'expression des appâts pEG-202



(a) pJG4-5 (vecteur d'expression des proies)

(b) pSH18-34 (rapporteur)

FIG. 5.3 – (a) : Vecteur d'expression des proies pJG4-5; (b) : Vecteur rapporteur β -galactosidase pSH18-34

Pour le dernier nutriment, la Leucine, dont un gène de la voie de biosynthèse a été inactivé, les souches **EGY48 α** et **EGY191 α** portent ce gène *leu2* intégré dans leur génome mais dont le promoteur a été remplacé par des opérateurs LexA_{op} (respectivement en trois et en un exemplaires consécutifs dans ces deux souches).

L'opérateur LexA_{op} est issu du promoteur de différents gènes bactériens, notamment *ColE1* ou *RecA*. La régulation de ces gènes, dans *E. coli*, est réalisée par la fixation de deux protéines LexA sur cet opérateur, sur des séquences consensus CTGTATATNNANNCAG (Ebina et al., 1983). Toujours dans *E. coli*, lorsque la protéine LexA est fixée sur ce promoteur, elle a un effet inhibiteur sur la transcription du gène *ColicinE1*. Cet effet inhibiteur peut s'expliquer par la fixation à très forte affinité de LexA sur sa séquence consensus, en 3' du site de recrutement du complexe de transcription, ce qui empêche ainsi l'avancée de ce complexe sur la région codante du gène, et donc une inhibition de sa transcription.

Niveau d'expression des transgènes

Les plasmides que nous avons utilisés dans ces expériences possèdent tous comme origine de réplication le centromère du plasmide naturel de la levure appelé 2μ . Cette origine de réplication assure un niveau d'expression relativement élevé des gènes portés par ces plasmides, notamment en raison de l'important nombre de copies des plasmides assuré par ce centromère. L'utilisation du second système de réplication de plasmides, basé sur les deux éléments *CEN* (centromère) et *ARS* (*Autonomously Replicating Sequence*) aurait pu nous permettre, si cela s'était avéré nécessaire, de moduler l'expression de certains gènes. En effet, le système *CEN/ARS* implique un faible nombre de copies de plasmides par cellule (environ 1 à 4 copies) et donc un niveau d'expression de transgènes nettement plus faible qu'avec l'origine 2μ (Clarke & Carbon, 1985, Tschumper & Carbon, 1983, Broach & Hicks, 1980).

Le système LexA / B42

La première idée du système double-hybride que nous avons utilisé est de placer en guise de promoteur d'un gène rapporteur un ou plusieurs opérateurs LexA_{op}, et d'exprimer des protéines susceptibles de s'y fixer et de contrôler l'expression de ce gène rapporteur. La seconde idée consiste à reconstituer un facteur de transcription à partir de deux protéines distinctes, la fonctionnalité de ce facteur de transcription étant dépendante de la capacité de ces deux protéines à **interagir** ensemble. L'une des deux protéines sera appelée « Appât » (*bait* en anglais), et constituée de la fusion du domaine d'interaction avec l'ADN de la protéine LexA et d'une première protéine (ou fragment d'une première protéine) X et l'autre « Proie » (*prey*), constituée de la fusion du domaine d'activation de la transcription de la protéine B42 et d'une seconde protéine Y.

Dès lors, si les deux protéines X et Y sont susceptibles d'interagir, un facteur de transcription complet va être reconstitué, et permettre la transcription d'un gène rapporteur placé sous le contrôle des opérateurs LexA.

La figure 5.1 (p. 100) présente l'adaptation de ce système à notre problème précis. Dans ce cas, la protéine X fusionné à LexA est bien évidemment le domaine **SH3** de RasGAP, et les protéines Y fusionnées au domaine d'activation de la transcription B42 sont les aptamères peptidiques, dont une boucle variable est responsable de la diversité de la banque de protéines criblées.

De nombreuses variations sont possibles sur ce système⁷, pour s'adapter à des difficultés particulières aux protéines testées. Notamment, le choix du nombre d'opérateurs LexA que compte le promoteur permet d'obtenir différentes sensibilités de ce système double-hybride : la souche EGY48 α , qui compte trois opérateurs LexA dans le promoteur du rapporteur *leu2*⁸ permet de mettre en évidence des interactions plus faibles que la souche EGY191 α (un opérateur LexA).

7. D'autres systèmes de double-hybride en levure existent également. On peut notamment citer ceux utilisant le domaine de liaison à l'ADN (*DNA-binding domain* **DBD**) et le domaine d'activation de la transcription (*activating domain* **AD**) de la protéine GAL4 (Brent & Ptashne, 1985). Dans ce système, ce sont des UAS (*upstream activating sequence*) qui tiennent lieu d'opérateurs LexA_{op}. Bien évidemment, l'utilisation de ce système ne peut se faire que dans des souches de levures dont le gène endogène *GAL4* a été inactivé.

8. Kohlhaw (2003), Bryan (1980)

Expression de la proie induite par la présence de galactose

Le système que nous avons utilisé possède également l'avantage d'utiliser, pour l'expression de la proie, un promoteur inductible dont l'activation dépend de la présence de galactose dans le milieu de culture des levures. En fait, la présence de ce galactose à la place du glucose induit l'activation d'une nouvelle voie métabolique dans la levure, par l'activation d'un facteur de transcription spécifique, GAL4, dont on place la séquence spécifique de recrutement dans la région promotrice du gène codant pour la protéine proie.

5.2.2 Préparation du crible

Description de l'appât RasGAP-SH3

Deux plasmides appâts ont tout d'abord été construits, basés sur le vecteur pEG-202 (voir figure 5.2). Ces deux plasmides appâts destinés au criblage contiennent soit le domaine **SH3** de RasGAP seul (tel qu'il est présenté sur la figure 4.6, p. 85), soit l'ensemble des domaines **SH2-SH3-SH2**, tels qu'ils sont présents au sein de la protéine entière. Ce second appât a été construit avec plusieurs objectifs : servir de contrôle vis à vis de l'appât **SH3** seul, mais également replacer le domaine **SH3** dans un contexte ressemblant plus fidèlement au contexte natif, au sein de l'ensemble de la protéine RasGAP.

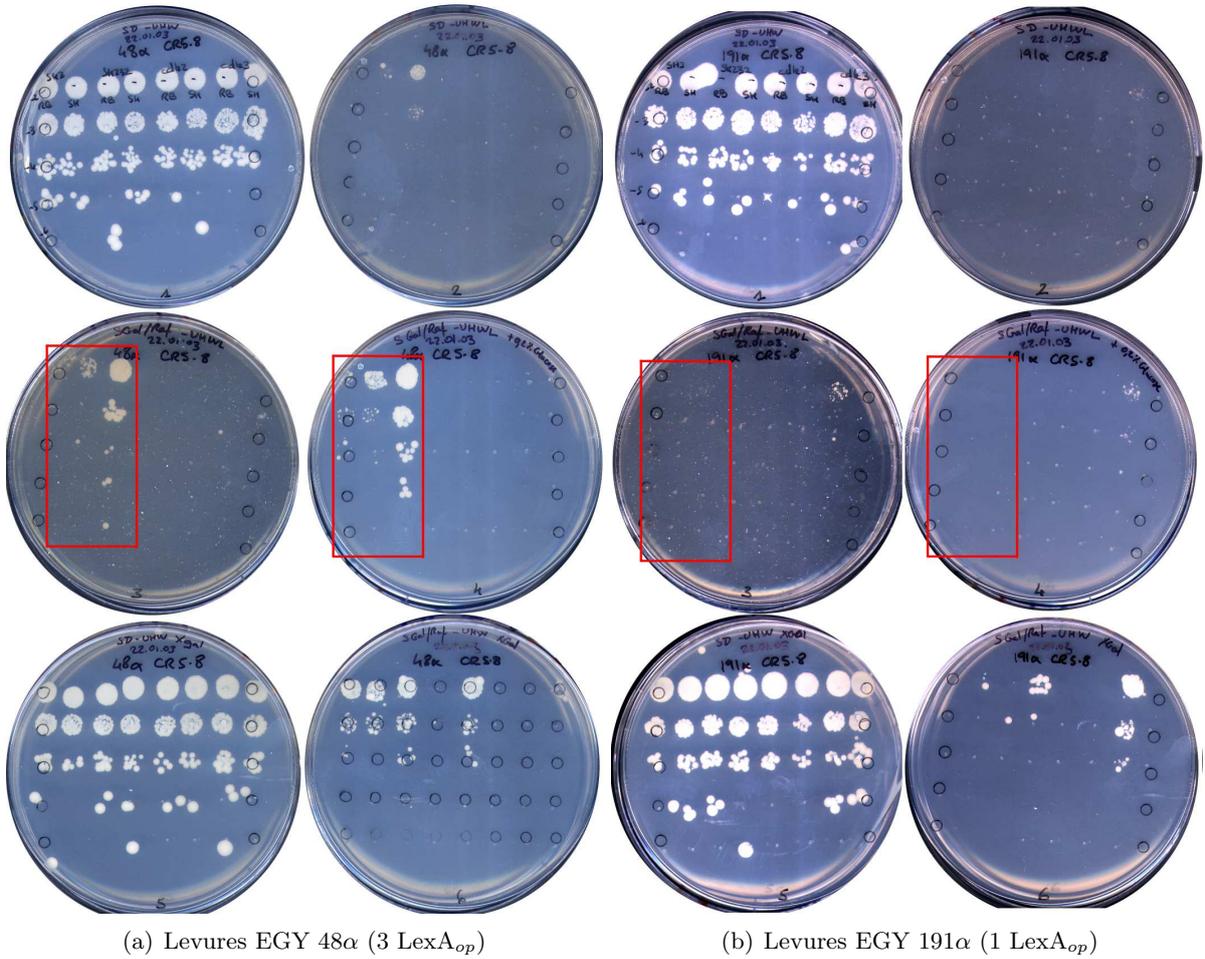
Contournement de l'auto-activation

Pour la sélection d'aptamères interagissant avec le domaine **SH3** de RasGAP, nous avons d'abord cherché à optimiser les paramètres du système double-hybride. Nous avons choisi d'utiliser comme appât précisément ce domaine **SH3**, cloné dans le vecteur pEG-202. Les premiers tests que nous avons réalisés nous ont permis de mettre en évidence la capacité, faible mais non négligeable de cet appât à auto-activer la transcription. Nous avons donc cherché à diminuer cette auto-activation de manière à pouvoir utiliser cet appât dans des conditions d'auto-activation suffisamment faibles pour obtenir, lors du crible, un rapport signal/bruit satisfaisant.

Les différentes solutions que nous avons explorées pour obtenir un niveau d'auto-activation suffisamment faible pour permettre un criblage ont été les suivantes :

- *Souche employée* : nous avons choisi d'utiliser la souche EGY191 α qui ne possède qu'un opérateur LexA_{op} au lieu de la souche EGY48 α qui en possède trois,
- *Rapporteur β -galactosidase* : nous avons testé deux constructions différentes. Le plasmide pSH18-34 nous est apparu tout à fait satisfaisant,
 - pSH18-34 : 4 ColE1 LexA_{op}::LacZ,
 - pRB18-40 : 1 recA LexA_{op}::LacZ,
- *Ploïdie* : les levures sont des organismes qui peuvent être soit haploïdes, soit diploïdes. Chacune de ces deux situations donne lieu à des changements métaboliques profonds. Nous avons finalement choisi de réaliser les cribles dans la configuration diploïde, obtenue par croisement (*mating*) de levures EGY191 α et EGY42a. En effet, on voit nettement sur la figure 5.4 que l'autoactivation est importante en cellules haploïdes. En revanche, la figure 5.5 montre clairement que l'autoactivation dans des levures diploïdes EGY191 α :42a est très faible⁹.

9. On pourra s'appuyer également sur la figure 5.11, page 115, pour d'autres détails concernant l'interprétation de ces figures.



(a) Levures EGY 48α (3 LexA_{op})

(b) Levures EGY 191α (1 LexA_{op})

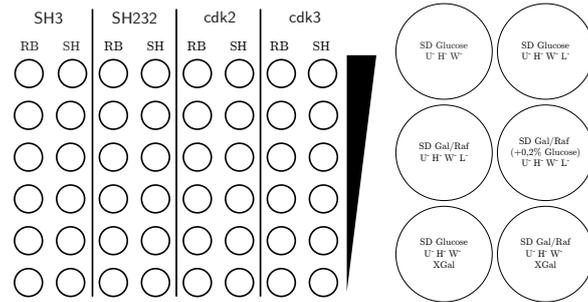
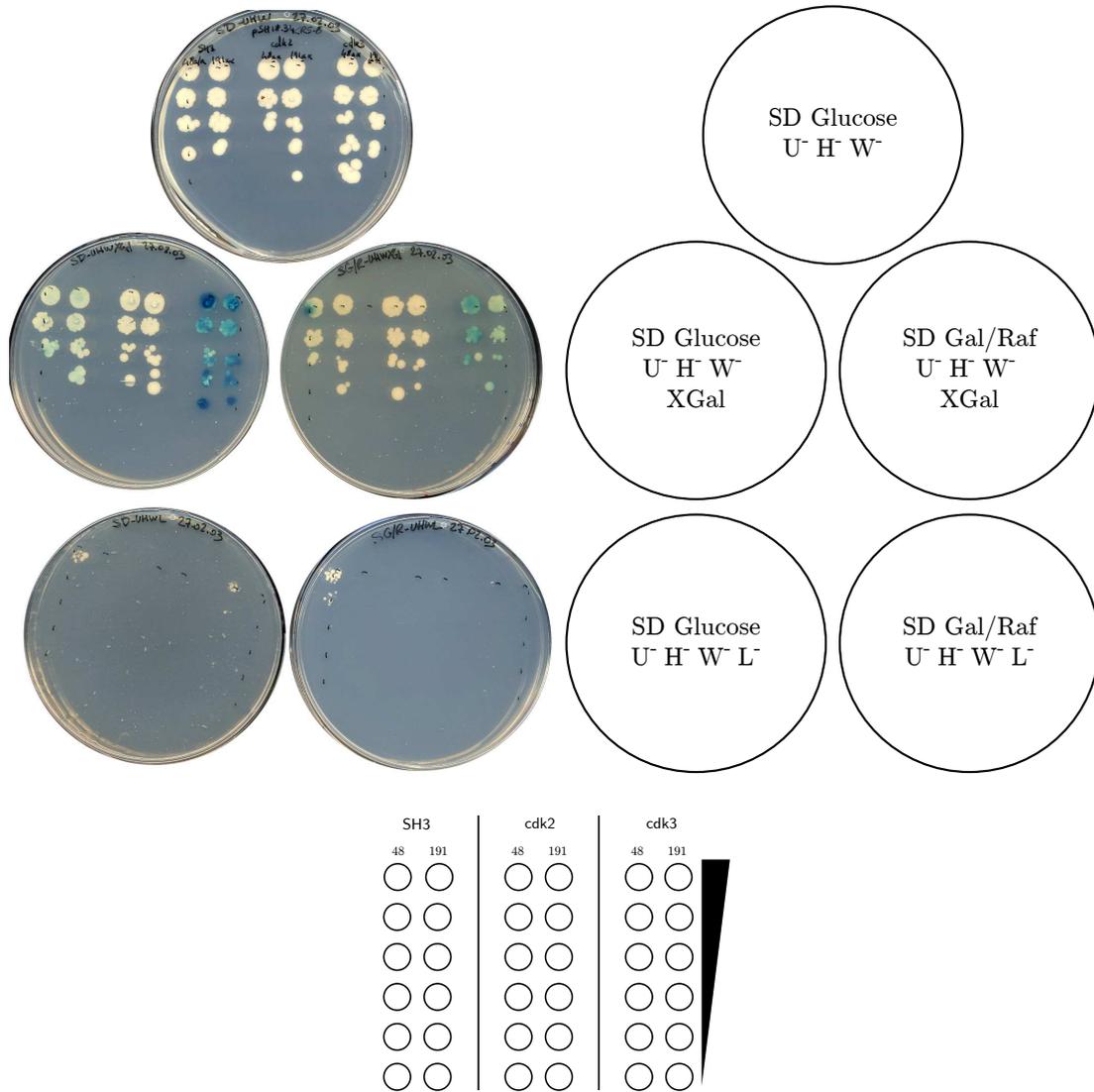


FIG. 5.4 – Tests d’autoactivation en levures haploïdes. Pour chacune des deux souches EGY 48α et EGY 191α, différents appâts sont testés : pEG202 SH3, pEG202 SH232, pEG202 cdk2 et pEG202 cdk3. Deux rapporteurs β-gal différents pRB18-40 et pSH18-34 sont utilisés, et les levures portent toutes l’ap-tamère contrôle pJM-1 CR5-8 (n’interagissant avec aucun des appâts). Pour chaque combinaison [souche + appât + rapporteur], des dilutions aux 1/10^e d’une suspension de levures sont déposées successivement sur chaque milieu de culture, permettant de mettre en évidence l’autoactivation des rapporteurs. Les schémas en bas de la figure expliquent les positions des dépôts levures exprimant différentes combinaisons de vecteurs, et les milieux de culture utilisés. Les cadres rouges entourent les conditions dans lesquelles de l’autoactivation est visible (en levures EGY 48α) ou invisible (en levures EGY 191α).



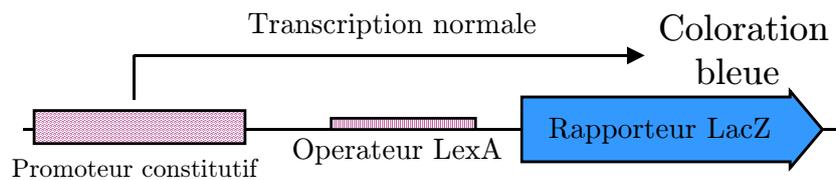
III

FIG. 5.5 – Test d’autoactivation sur levures diploïdes. Les levures notées 48 (respectivement 191) sont issues du croisement entre des levures EGY 42a et EGY 48α (resp. EGY 191α). Les protéines cdk2 et cdk3 sont utilisées comme contrôles, cdk2 n’entraînant presque pas d’autoactivation, alors que cdk3 entraîne fréquemment de l’autoactivation. Cette expérience, conjointement avec l’expérience présentée sur la figure 5.4 a permis de déterminer les conditions optimales de criblage : choix de la souche diploïde EGY 191α × EGY 48a.

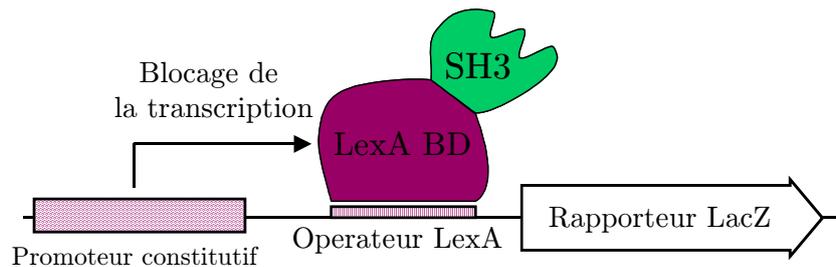
Validation de l’appât pEG-202 RasGAP-SH3

La validation d’un nouvel appât est une étape importante et nécessaire avant tout début de crible double-hybride. En effet, il peut arriver que les constructions de protéines fusion aboutissent à un repliement incorrect du domaine LexA ou de la protéine d’intérêt à cribler, ou encore que cette protéine de fusion adopte des conformations inactivant l’une ou l’autre de ses parties.

Validation de l'entrée dans le noyau et de la fonctionnalité du domaine LexA fusionné à RasGAP-SH3 La fonctionnalité de notre système double-hybride impose que les protéines Appât et Proies soient transportées dans le noyau. Pour cela, elles portent toutes les deux un tag NLS. À l'aide d'un plasmide comportant dans la région promotrice d'une cassette rapporteur β -galactosidase des opérateurs LexA_{op}, placés entre l'ATG du rapporteur et le site de fixation du complexe de transcription d'un promoteur constitutif (figure 5.6), nous avons vérifié que l'expression de notre appât RasGAP-SH3 induit bien une inhibition de l'expression de ce rapporteur. Cette expérience montre bien que l'appât est capable de se fixer de façon fonctionnelle sur des opérateurs LexA_{op}.



(a) En l'absence de protéine se fixant sur l'opérateur LexA_{op}, l'expression du rapporteur est constitutive, et les levures sont colorées en bleu sur milieu contenant de l'X-Gal.



(b) Lorsqu'une protéine comprenant le domaine de fixation à l'ADN de LexA est exprimée et fonctionnelle, la transcription initiée par le promoteur est bloquée et la coloration bleue disparaît.

FIG. 5.6 – Principe de l'expérience de validation de la fonctionnalité de l'appât

Utilisation du contrôle positif d'interaction Aurora¹⁰ Après avoir construit le vecteur Appât et déterminé les conditions optimales de visualisation du phénotype double-hybride, nous avons cherché à valider nos constructions (en utilisant les protéines Aurora comme proies contrôles, seules protéines dont l'interaction avec le domaine SH3 de RasGAP a pu être mise en évidence par double-hybride, Gigoux et al., 2002). Nous avons donc construit des vecteurs proies exprimant les protéines Aurora-A et -B, pour les utiliser en qualité de contrôle positif de notre système double-hybride et essayer de montrer que notre appât RasGAP-SH3 est bien fonctionnel.

Le système double-hybride utilisé par Gigoux et al. (2002) repose sur le couple GAL4/UAS (cf. p. 104), et l'ensemble des vecteurs utilisés diffère. Notamment, le vecteur d'expression des proies (et des banques de cDNA) est un vecteur à expression constitutive, et possède le gène

10. Il aurait également été intéressant d'utiliser d'autres protéines, telles que G3BP comme contrôle positif d'interaction avec RasGAP-SH3. Cependant, l'interaction SH3-G3BP n'ayant jamais pu être visualisée en double-hybride, probablement en raison de problèmes d'expression de G3BP dans la levure, nous avons préféré utiliser seulement Aurora comme contrôle positif.

LEU2 pour son maintien dans les levures. Rappelons que dans notre système LexA/LexA_{op}, l'expression des proies est conditionnée par la présence de galactose dans le milieu de culture.

Après avoir construit les vecteurs pJG4-5 *Aurora-A* et pJG4-5 *Aurora-B*, nos essais de validation de l'Appât se sont heurtés à une importante toxicité des protéines exprimées par ces vecteurs Proies, lors de l'induction de leur expression par le dépôt des levures sur un milieu contenant du galactose. La visualisation du phénotype double-hybride par survie sur milieu sélectif déprivé en Leucine n'a donc pas été concluante, et l'apparition d'une faible coloration bleutée des colonies déposées sur milieu contenant du X-Gal ne nous a pas semblé suffisante pour conclure à la validité de notre Appât RasGAP-SH3.

Cette toxicité des protéines *Aurora* pour les levures n'avait pas été observée par Gigoux et al. (2002), puisque ces auteurs avaient réussi à identifier cette protéine dans un crible double-hybride. Cependant, Kiat et al. (2002) l'avaient rapportée¹¹. Ces auteurs ont précisément exploité cette toxicité dans un crible double-hybride (dans le même système LexA/LexA_{op} que celui que nous avons utilisé) pour identifier d'éventuelles protéines interagissant avec *Aurora-A* et inhibant sa toxicité pour les levures. Cette toxicité, constatée par Kiat et al. (2002) et par nous-mêmes, semble donc en contradiction avec les résultats de Gigoux et al. (2002). Cependant, elle peut certainement s'expliquer par la différence entre les deux systèmes d'expression utilisés, l'un inductible, l'autre non. Lors de la transformation des levures par le plasmide exprimant constitutivement *Aurora*, il est très probable que seules des cellules possédant un niveau d'expression du transgène faible soient sélectionnées. Inversement, dans notre système inductible, au moment de l'induction, les cellules ayant été préalablement sélectionnées pour l'expression importante de leur gène de prototrophie vont très probablement exprimer une quantité létale d'*Aurora*.

Pour contourner cette toxicité et continuer la validation de notre Appât, nous avons donc utilisé deux stratégies :

- construction de mutants (mutagenèse ciblée et/ou aléatoire) d'*Aurora* ne possédant pas de toxicité pour les levures,
- utilisation des vecteurs d'expression constitutive de la proie du système GAL4, et qui ne provoquent pas la mort des levures.

La première stratégie de recherche de mutants non toxiques d'*Aurora* n'ayant pas donné de résultats rapidement, nous avons utilisé le vecteur pAct2 *Aurora* exprimant *Aurora* fusionnée au domaine d'activation de la transcription de GAL4.

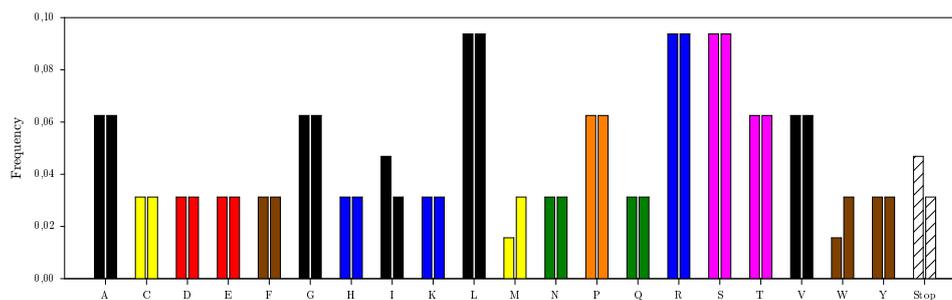
La figure 5.7 présente les résultats de ces tests d'interaction RasGAP-SH3/*Aurora*, dans les lignées EGY48 α ou EGY191 α conjuguées avec EGY42 a . Le vecteur pAct2 exprimant le gène *LEU2* pour son maintien, nous n'avons pas pu utiliser le rapporteur *LEU2* de notre système double-hybride, mais seulement le rapporteur β -galactosidase.

11. Ces auteurs citent également l'article de Bischoff et al. (1998) à ce sujet.

dans le crible double-hybride. La présence dans la première banque du domaine d'activation de la transcription en N-terminal de la Thiorédoxine nous a permis d'isoler plusieurs aptamères dont la séquence de la région variable comporte un codon stop. Leur analyse ultérieure est impossible, étant donné qu'on ne peut alors plus distinguer le rôle de la boucle variable de celui de la Thiorédoxine incomplète et donc structurellement modifiée dans la reconnaissance de l'appât.

Construction des banques et inéquiprobabilité des acides aminés La construction de telles banques, codant pour des chaînes peptidiques dont une région est souhaitée aléatoire, est réalisée en sous-clonant des fragments d'ADN synthétiques au sein du vecteur d'intérêt. C'est lors de la synthèse de ces fragments que le caractère aléatoire est introduit.

La synthèse d'oligonucléotides se faisant base par base sur support solide, avec des étapes de protection/déprotection comparables à celles de la synthèse de peptides en phase solide (Merri-field, 1986, 1963, Prix Nobel de Chimie 1984), il suffit donc de coupler un mélange des quatre bases différentes simultanément à chaque position où l'on souhaite obtenir une base aléatoire (ces oligonucléotides sont dits dégénérés).



(a) Fréquences théoriques (sans et avec réduction du biais)

		Second position							
		T	C	A	G				
T	TTT	F	TCT	S	TAT	Y	TGT	C	T
	TTC	F	TCC	S	TAC	Y	TGC	C	C
	TTA	L	TCA	S	TAA	end	TGA	end	A
	TTG	L	TCG	S	TAG	end	TGG	W	G
C	CTT	L	CCT	P	CAT	H	CGT	R	T
	CTC	L	CCC	P	CAC	H	CGC	R	C
	CTA	L	CCA	P	CAA	Q	CGA	R	A
	CTG	L	CCG	P	CAG	Q	CGG	R	G
A	ATT	I	ACT	T	AAT	N	AGT	S	T
	ATC	I	ACC	T	AAC	N	AGC	S	C
	ATA	I	ACA	T	AAA	K	AGA	R	A
	ATG	M	ACG	T	AAG	K	AGG	R	G
G	GTT	V	GCT	A	GAT	D	GGT	G	T
	GTC	V	GCC	A	GAC	D	GGC	G	C
	GTA	V	GCA	A	GAA	E	GGA	G	A
	GTG	V	GCG	A	GAG	E	GGG	G	G

(b) Le code génétique standard

FIG. 5.8 – Le biais introduit par l'utilisation d'oligonucléotides dégénérés. Ce biais est dû à la non équiprobabilité des acides aminés dans le code génétique standard. Les barres de droite sur la figure (a) représentent les fréquences relatives des codons après réduction du biais en utilisant seulement les bases G/T pour la dernière base de chaque codon. Sur la figure (b), sont grisées les combinaisons du code génétique qui ne sont plus possibles si on utilise une telle technique de réduction du biais.

Le code génétique étant biaisé (chacun des 20 acides aminés naturels n'a pas la même fré-

quence au sein des 64 codons possibles différents, comme on peut le voir sur la figure 5.8), les peptides obtenus par cette technique sont également biaisés. Pour réduire la probabilité d'obtenir des codons stop (TAA, TAG ou TGA), les concepteurs de ces banques ont utilisé pour la dernière base des codons un mélange des bases G/T seulement. Cette artifice réduit d'un tiers la fréquence des codons stops, et augmente par la même occasion les fréquences relatives des méthionines et tryptophanes, sans sacrifier la représentation des autres acides aminés. Cependant, on note que les Leucines, Arginines et Sérines devraient être trois fois plus fréquentes que la majorité des autres acides aminés, même avec cette réduction du biais (figure 5.8).

La figure 5.9 présente le vecteur pJM-1 d'expression de la banque de première génération. Le vecteur pWP2-C dans lequel a été construit la banque de seconde génération est tout à fait similaire à ce vecteur pJM-1. Ce vecteur diffère principalement par l'ajout de sites de clonage en 5' du domaine d'activation de la transcription, qui ont permis la construction de proies contenant ce domaine en C-terminal de l'aptamère (ce qui permet d'écartier les aptamères contenant un codon stop dans leur région variable).

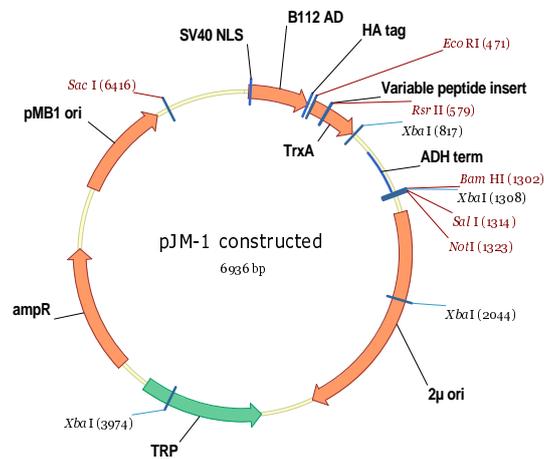


FIG. 5.9 – Vecteur d'expression de la banque pJM-1

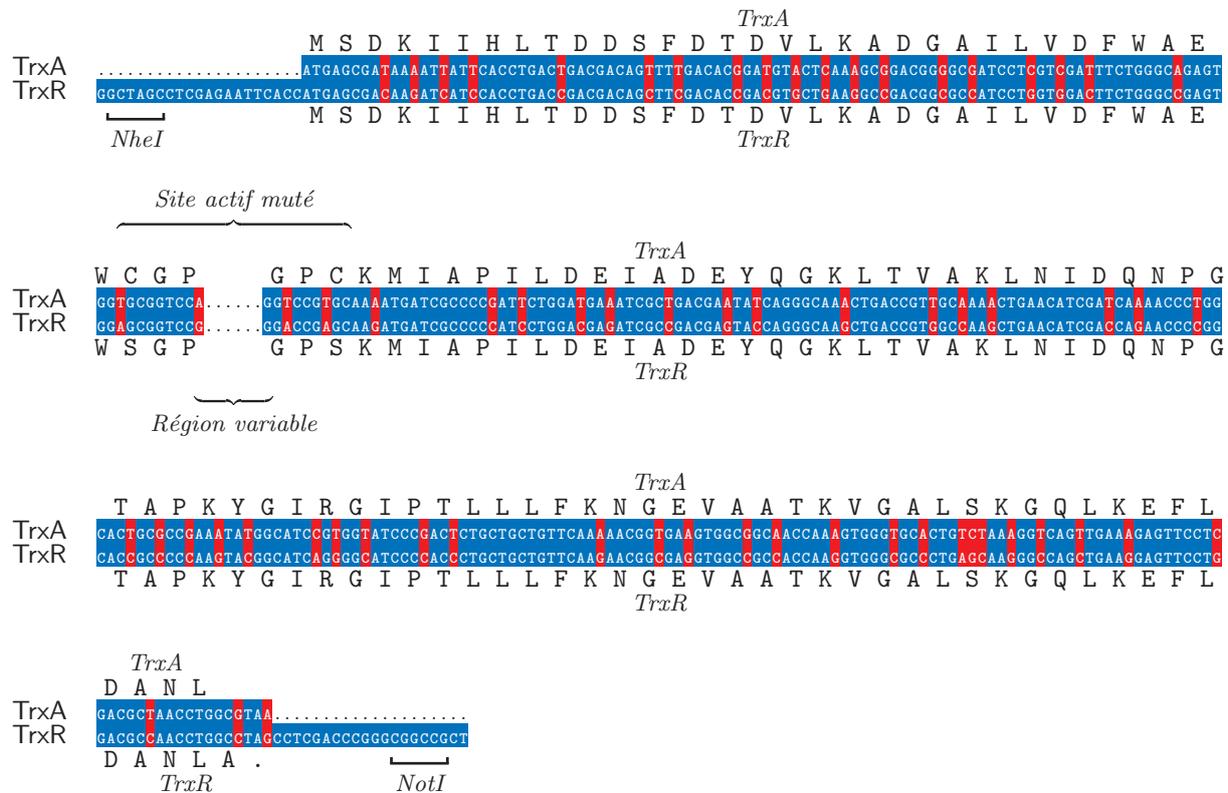


FIG. 5.10 – Séquence de la Thioredoxin native TrxA et recodée TrxR. La première ligne présente la séquence nucléique native de la Thioredoxine bactérienne TrxA. La seconde ligne présente la version optimisée de cette séquence nucléique, qui code naturellement pour la même séquence protéique, mais dont les choix de codons sont plus adaptés à l'expression dans des cellules humaines. Les bases nucléiques conservées sont colorées en bleu, les modifiées en rouge. Par exemple, pour le codon 3, codant pour un acide aspartique D₃, le codon de TrxR est GAT, et sa version optimisée dans TrxR est GAC.

5.2.3 Description du déroulement du crible

Les paragraphes suivants détaillent la découverte du premier aptamère obtenu (RG 01). Ces étapes ont été reproduites pour chacun des autres aptamères dont nous ne présentons ensuite que les dernières phases de validation.

Protocole de criblage

Le protocole de criblage que nous avons utilisé comporte les tâches suivantes :

1. **Transformation de la banque d'aptamères** dans la souche EGY191 α , et congélation d'aliquots de ces levures transformées,
2. Décongélation d'un aliquot de la banque transformée, vérification de la qualité de la transformation,
3. **Transformation du vecteur Appât pEG-202 RasGAP-SH3** et du Rapporteur pSH18-34 dans la souche EGY42 α ,

4. Décongélation de la banque transformée et **conjugaison** avec les levures contenant l'Appât et le Rapporteur,
5. **Étalement** sur milieu sélectif (milieu minimum SD *Selective Dropout Medium*) :
 - contenant du Galactose (pour induire l'expression des aptamères-proies),
 - ne contenant ni Uracile, Histidine et Tryptophane (pour le maintien des trois plasmides),
 - ne contenant pas de Leucine (pour la sélection des levures exprimant un aptamère interagissant avec l'appât),
6. À partir de 48h après l'étalement des diploïdes, **des colonies apparaissent** sur ce milieu sélectif. Ces colonies sont recueillies et *streakées* (étalées sous forme de petits bâtonnets) sur milieu SD U⁻/H⁻/W⁻ (pour la conservation des plasmides),
7. 24h après récupération des colonies positives, les levures sont répliquées sur quatre milieux différents pour une première vérification du phénotype double-hybride en utilisant les deux systèmes de rapporteur :
 - rétablissement du caractère **prototrophique** vis à vis de la Leucine (milieux SD U⁻/H⁻/W⁻/L⁻, Glucose ou Galactose),
 - visualisation de l'expression de la β -galactosidase par apparition d'une coloration bleue lorsque le milieu de culture contient de l'**X-Gal** (milieux SD U⁻/H⁻/W⁻ / X-Gal, Glucose ou Galactose)
8. Récupération des régions variables des aptamères possédant un phénotype double-hybride net dans le test précédent. Cette récupération se fait soit :
 - par récupération des plasmides (transformation dans des bactéries après lyse des levures, *miniprep...*),
 - par PCR (amplification des régions variables) et recombinaison homologue en levure pour la reconstitution du plasmide,
9. **Reconfirmation** par retransformation des aptamères et dernière vérification du phénotype double-hybride,
10. **Extraction** des plasmides et **séquençage** de la région variable,
11. Études de spécificité : vérification que l'aptamère interagit bien spécifiquement avec le domaine **SH3** et non directement avec l'opérateur LexA_{op} ou avec le domaine d'interaction avec l'ADN LexA.

||| *Nous avons délibérément choisi de détailler seulement les expériences qui nous ont permis d'isoler le premier aptamère dirigé contre le domaine **SH3** de RasGAP. L'obtention des aptamères suivants s'est faite de façon tout à fait similaire, en renouvelant les étapes décrites, et en optimisant certains paramètres.*

Première vérification du phénotype double-hybride

La figure 5.11 présente la première étape de vérification du phénotype de double-hybride. Environ 850 clones positifs (parmi les 10⁷ à 10⁸ transformants criblés) issus de la sélection sur milieu sans Leucine sont isolés et *streakés* sur une boîte originale, qui est ensuite répliquée sur les quatre milieux de visualisation du phénotype double-hybride. Cette étape a pour objectif d'éliminer les clones dont le phénotype « survie sur milieu sans Leucine » ne provient pas de l'interaction entre les protéines Proie et Appât. En effet, le stress induit sur les levures par leur étalement sur un milieu ne permettant pas *a priori* leur survie, crée une forte pression de sélection pouvant stimuler la restauration de la prototrophie vis à vis de la Leucine.

Le **phénotype double-hybride** que l'on cherche donc à vérifier doit avoir les caractéristiques suivantes :

- | | | |
|--|-----------|--------------------------------------|
| - SD U ⁻ H ⁻ W ⁻ X-Gal | Glucose | <i>absence de coloration bleue</i> |
| - SD U ⁻ H ⁻ W ⁻ X-Gal | Galactose | <i>forte coloration bleue</i> |
| - SD U ⁻ H ⁻ W ⁻ L ⁻ | Glucose | <i>absence de croissance</i> |
| - SD U ⁻ H ⁻ W ⁻ L ⁻ | Galactose | <i>croissance (levures blanches)</i> |

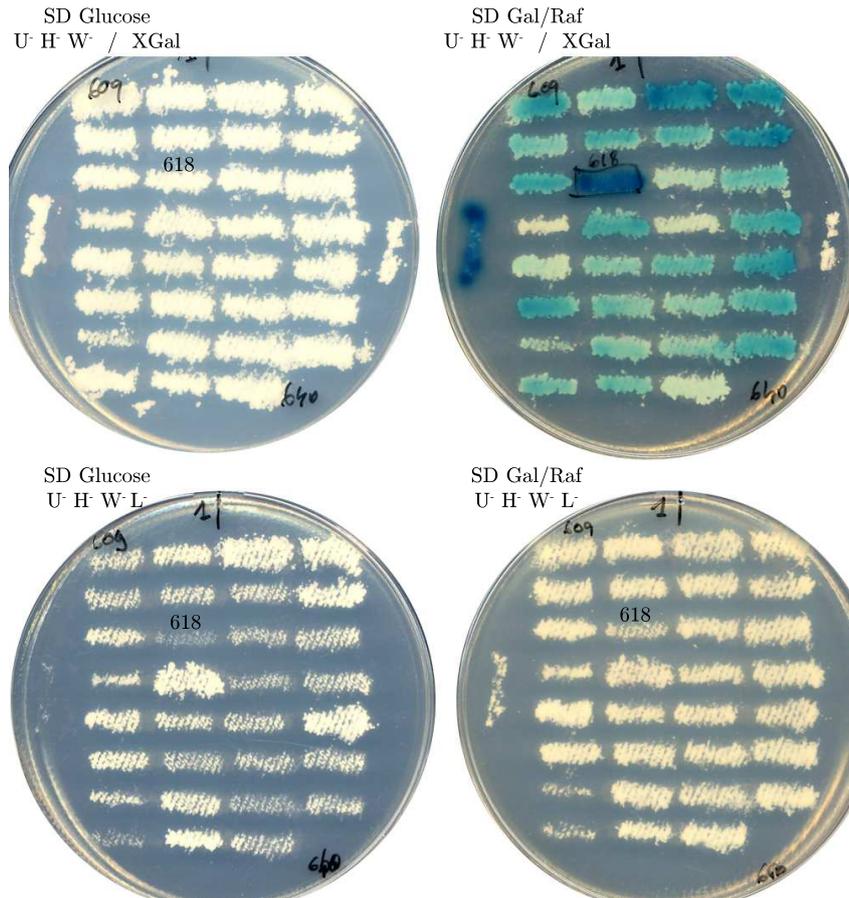


FIG. 5.11 – Vérification du phénotype double hybride après récupération de clones positifs. Sur chacune des boîtes, des contrôles positifs et négatifs d'interaction sont présentés (respectivement à gauche et à droite des boîtes). Les clones sur ces boîtes sont numérotés de 609 à 640, de gauche à droite et de haut en bas.

Sur la figure 5.11, on montre que seul l'aptamère n° 618 possède un phénotype double-hybride parfait. De nombreux autres clones présentent une faible expression de la β -galactosidase, et surtout ont une survie sur Leucine indépendante de l'expression de leur aptamère conditionnée par la présence de Galactose dans le milieu de culture.

Les colonies possédant ce type de phénotype double-hybride sont récupérées pour analyser plus en détail les aptamères exprimés.

Extraction des fragments codant pour les régions variables et reconstruction des vecteurs exprimant les aptamères

L'étape suivante consiste à vérifier si ce phénotype double-hybride est reproductible à partir de la séquence nucléotidique codant pour les aptamères exprimés dans ces colonies. Pour cela nous avons utilisé principalement¹³ l'amplification par PCR de la région variable directement à partir de levures entières. Après amplification, ces produits de PCR sont analysés par électrophorèse. La figure 5.12 présente le résultat de ce type d'amplification. On note que sur cette figure, les fragments amplifiés n'ont pas tous la même longueur : il s'agit ici d'aptamères issus d'un crible utilisant la banque de première génération, dont les régions variables ont une longueur théorique de 16 acides aminés, mais en pratique souvent beaucoup plus longue.

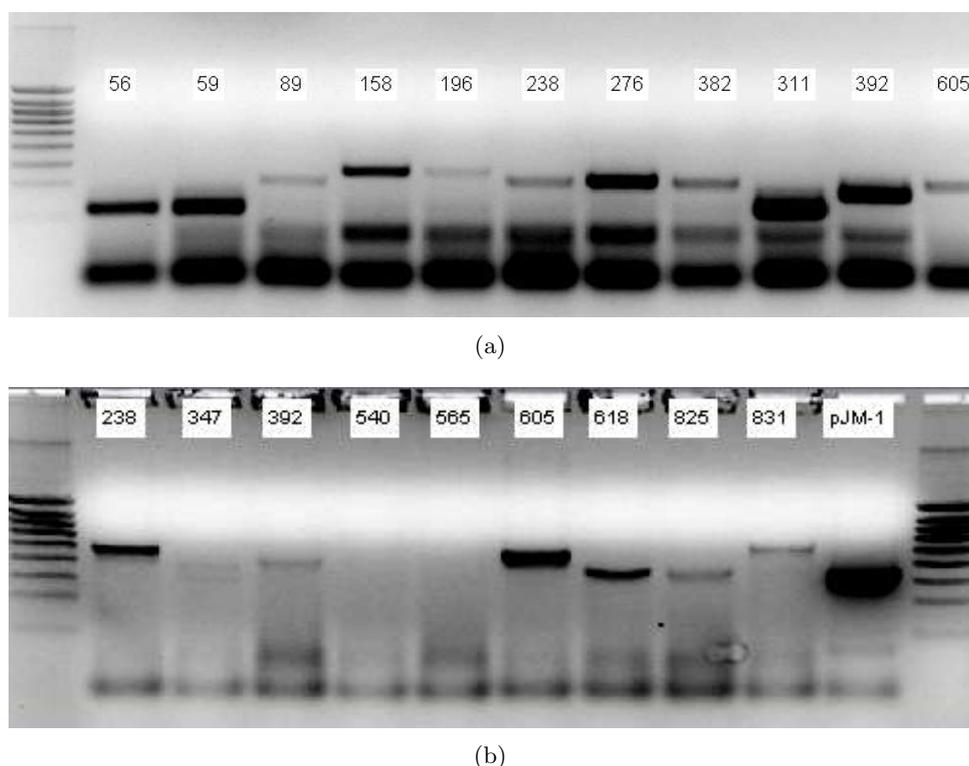
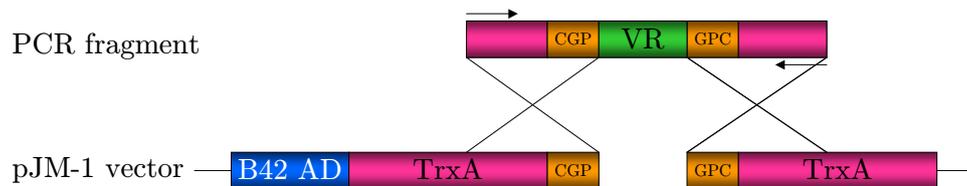


FIG. 5.12 – Dépôt des produits de PCR obtenus à partir des aptamères isolés au cours du crible. Le vecteur pJM-1 contenant un aptamère quelconque avec une région variable de 16 acides aminés est utilisé comme contrôle positif et de marqueur de taille (b, dernière colonne). Les PCR dont les produits sont présentées sur les figures (a) et (b) ont été réalisées avec deux couples d'oligonucléotides différents. Les longueurs des fragments amplifiés qui comportent, en plus de la région variable, une partie de la Thiorédoxine TrxA, sont donc logiquement différentes. Gel d'agarose/TBE 2%, marqueurs de taille de 100 bp DNA ladder.

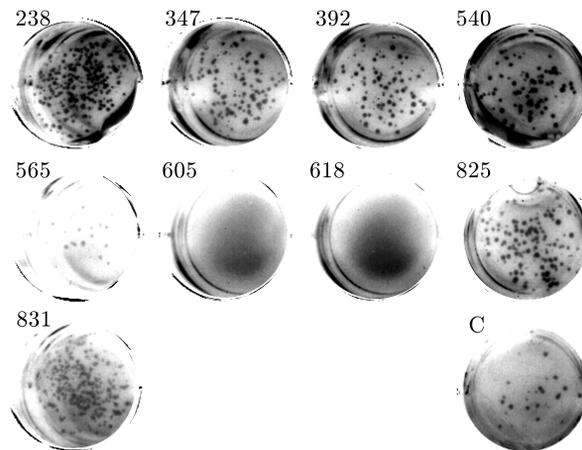
La figure 5.13(b) présente les résultats de transformation de levures EGY191 α pour la reconstitution des vecteurs d'expression des aptamères par recombinaison homologe (voir figure 5.13(a)). Dans chacun des puits de cette plaque standard à douze puits, nous avons transformé des levures « fraîches » avec le plasmide pJM-1 vide et ouvert par digestion (qui ne peut donc se

13. Dans certains autres cas, nous avons lysé les levures pour récupérer le contenu plasmidique, et amplifié ces plasmides en bactéries.

maintenir dans les levures) au niveau du site d'insertion des régions variables, et avec les fragments des aptamères amplifiés par PCR (obtenus sur la figure 5.12). Les levures qui survivent sur le milieu de culture déprivé en Tryptophane sont donc celles qui portent un vecteur pJM-1 refermé par recombinaison homologue du fragment amplifié par PCR. Cette technique permet en effet la construction de plasmides très aisément et très précisément au sein même de la levure (Oldenburg et al., 1997).



(a) Principe de la recombinaison homologue : la co-transformation dans les levures du vecteur ouvert (et qui donc ne peut se maintenir en l'état) et du fragment amplifié par PCR va conduire à la sélection sur milieu adéquat des levures possédant le plasmide refermé avec la région variable (VR).



(b) Dans chaque puits, des colonies porteuses du vecteur reconstitué par recombinaison homologue apparaissent.

FIG. 5.13 – Reconstitution des aptamères pour reconfirmation ou recombinaison homologue à partir des fragments amplifiés par PCR. Le puits noté C et comptant un très faible nombre de colonies correspond au contrôle où seul le plasmide vide ouvert est transfecté. Les puits n° 605 et 618 semblent ne pas contenir de colonies, mais en fait, se trouvant au centre de la boîte, leur milieu de culture reste très humide et les colonies fusionnent rapidement par dispersion dans des gouttelettes.

Cette étape d'extraction des régions variables et de réinsertion dans un vecteur « propre » permet de s'affranchir de toutes les modifications qui ont pu avoir lieu dans les levures lors de la phase initiale du crible et ainsi d'écartier certains faux positifs.

Reconfirmation des aptamères après reconstitution des vecteurs

La figure 5.14 présente les résultats des évaluations des interactions entre ces aptamères reconstitués par recombinaison homologue et le domaine SH3 de RasGAP.

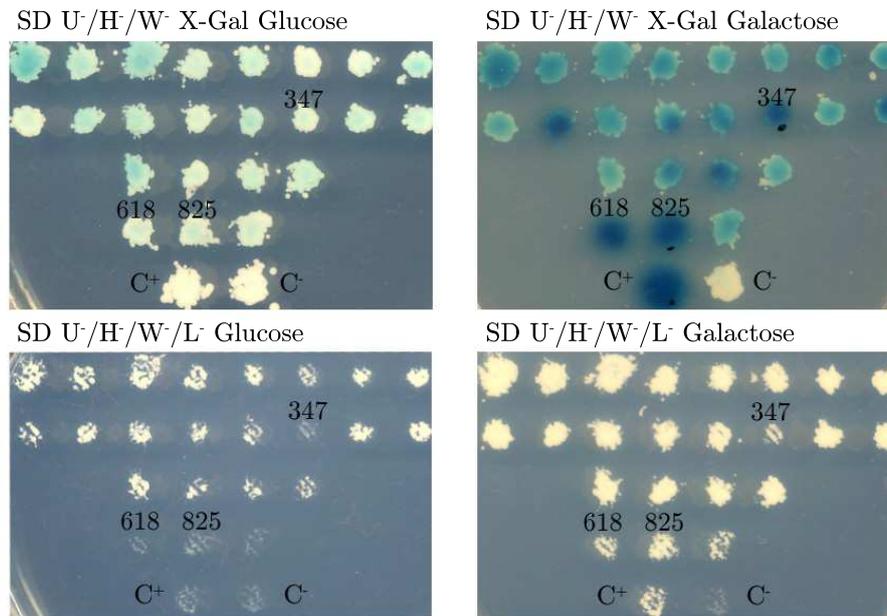


FIG. 5.14 – Reconfirmation des aptamères obtenus dans le premier crible : levures EGY191 α \times EGY42a, rapporteur pSH18-34, appât pEG202 RasGAP-**SH3**.

La lecture de cette figure laisse apparaître que seules les interactions avec le domaine **SH3** de RasGAP des aptamères 347, 618 et 825 sont effectivement reconfirmées en double-hybride.

Vérification de la spécificité de l'interaction

La figure 5.15 présente le premier test de vérification de la spécificité de l'interaction entre ces aptamères et l'appât RasGAP-**SH3**. Pour cela, nous avons utilisé une matrice d'interaction pour comparer les interactions entre différents aptamères (Proies) et différents Appâts. Les Appâts transformés dans des levures EGY42a (avec le vecteur rapporteur pSH18-34) sont étalés sous forme de lignes, et conjugués avec des levures transformées par les différentes proies. A chaque intersection ligne/colonne, les diploïdes formés sont sélectionnés par un milieu de culture adéquat (sélectionnant les triples transformants). Cette technique de matrices permet donc de tester très rapidement les interactions entre plusieurs protéines.

Sur la figure 5.15, les aptamères n° 618, 825 et 831 et Aurora-B, une cible de RasGAP-**SH3** trouvée par double hybride, ont été testés pour leur interaction avec quatre appâts (en fin de ligne, la notation adoptée dans cette figure) :

- pEG202 RasGAP-**SH3** (l'appât utilisé pour le crible) SH3
- pEG202 RasGAP-**SH3**^{W317K} SH3^{W317K}
(mutant du domaine **SH3**, au niveau du Tryptophane 317 très conservé)
- pEG202 Nck (protéine contenant également un domaine **SH3**) Nck
- pEG202 cdk2 (contrôle interne) cdk2

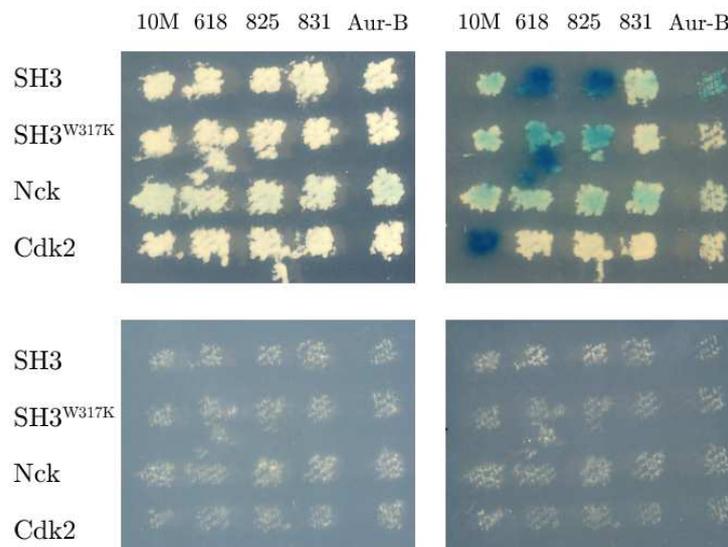


FIG. 5.15 – Première vérification de la spécificité des aptamères 618, 825 et 831. L'aptamère noté 10M reconnaît spécifiquement cdk2. Aur-B désigne Aurora-B (insérée dans le vecteur pJG4-5).

Le résultat de cette première vérification de la spécificité a donc permis d'établir que les aptamères 618 et 825 interagissent spécifiquement avec le domaine **SH3** de RasGAP.

5.3 Séquences des aptamères obtenus

5.3.1 Aptamères issus de la banque de première génération

Le séquençage des régions variables issues des colonies 618 et 825 a permis de montrer qu'il s'agissait en fait du même aptamère, qui a alors été rebaptisé RG 01 (pour « aptamère RasGAP 01 »).

La même technique de criblage a été reconduite plusieurs fois avec cette même banque de première génération, donnant lieu à l'identification de onze aptamères différents reconfirmés et reconnaissant spécifiquement le domaine **SH3** de RasGAP. Les longueurs et nombres d'occurrences de ces aptamères sont rapportées sur le tableau 5.1. Les séquences nucléiques et protéiques de ces aptamères sont reproduites sur la figure 5.16.

On note que les régions variables de la majorité des aptamères obtenus sont bien plus longues que 16 acides aminés, ce qui correspond à une caractéristique déjà connue de cette banque. De façon plus surprenante, l'aptamère RG 01 est plus court, sa région variable étant constituée de seulement 11 acides aminés, et le début de cette région variable ne contient pas le motif **-CGP-**, mais seulement la Cystéine **-C-** (rappelons que les régions variables des aptamères de cette banque doivent normalement être de la forme **-CGP-[X]₁₆-GPC-**).

Ces nombreuses altérations de la longueur des aptamères issus du crible de la banque de première génération nous ont conduit à chercher à obtenir une banque de nouvelle génération ne présentant pas ces inconvénients (cf. p. 110).

<i>Nom</i>	<i>Longueur</i>	<i>Séquence</i>	<i>Occurrences</i>
RG 01	11	LWGISSCELVL	2
RG 02	16	SGRPLKVCSGMVRGWA	22
RG 03	34		8
RG 04	54		16
RG 05	16	GLSSRVHRVSRLWQCT	1
RG 06	16	VWPTLVVRTGVLQVSY	1
RG 07	15 + stop		1
RG 08	52		1
RG 09	52		1
RG 10	16	PYRRAFTVKGAGCYGR	1
RG 11	70		3

TAB. 5.1 – Longueurs et occurrences des aptamères obtenus à partir de la banque de première génération. Les séquences des régions variables d’aptamères de longueur raisonnable sont également présentées sur ce tableau.

Nombre d’occurrences d’un aptamère

Il est tout à fait légitime de s’interroger sur la signification du nombre d’occurrence d’un aptamère issu du crible. Comme le montre le tableau 5.1, la plupart des aptamères n’ont été isolés qu’un nombre de fois très faible dans le crible (une à trois fois) mais beaucoup plus fréquemment pour d’autres (jusqu’à 22 fois). Les valeurs concernant les aptamères issus de la banque de nouvelle génération diffèrent peu (tableau 5.2).

Il est évident que les cribles réalisés n’ont pas pour objectif de cribler de façon exhaustive les 20^{16} ou 20^{13} combinaisons possibles (en supposant qu’elles aient toutes été représentées de façon équiprobable dans les banques d’oligonucléotides initiales). Nous avons estimé à environ 10^8 le nombre de levures transformées indépendamment par les plasmides de la banque lors de la première phase du crible. L’objectif des phases ultérieures est d’éviter que d’éventuels aptamères positifs ne soient perdus dans les différentes opérations ultérieures, en particulier la conjugaison des levures transformées par la banque et des levures exprimant l’appât. Pour cela, nous avons préalablement estimé le taux de réussite de cette opération, ainsi que le taux de survie d’une levure seule porteuse d’un aptamère interagissant avec l’appât (capacité de cette levure à former une colonie visible). Nous avons donc amplifié les levures porteuses de la banque pour compenser les pertes ultérieures, et assurer ainsi une certaine redondance du crible (de l’ordre de $4\times$).

Au vu des résultats obtenus, on peut donc s’interroger sur la signification des valeurs élevées du nombre d’occurrence d’un faible nombre d’aptamères. Cependant, les expériences que nous avons réalisées en marge de ce crible ne nous ont pas permis de conclure sur cette question, et la prise en compte de l’expérience acquise par Aptanomics au cours de nombreux cribles sort du cadre de ce manuscrit.

RG01

TGCCTGTGGGGTATTCTTCGTGTGAGCTTGTGCTTGGTCCGTGC
 C L W G I S S C E L V L G P C

RG02

TGCGGTCCAAGTGGGCGCCTTTGAAGGTGTCTTCTGGGATGGTCCGGGGTGGCCGGTCCGTGC
 C G P S G R P L K V C S G M V R G W A G P C

RG03

TGCGGTCCAAGTGTGTTGGTACTCAGTTGGGTGTGCCTCGTATCCGATGATTCCGTGGTCCAATTGTGAGGTGGGGCGTAGGGCGTCTTGTCCGGAGGGGTTTCAGGTGGTCCGTGC
 C G P V C C G T Q L G V P R I P M I R G P L V R W G R R A S C R E G F Q V G P C

RG04

TGCGGACCAACCCGTCCACTGCGCACCCACAATACGAGACCCGTCCTCAAGACGCATCTGGAGTCACTGCAATGGCGTTCTCCGGGGGGAGAGGCATTTGTGTTAGTATGTCGTTGGTCCATTGAGTGGGTTGGTTTTGAGAGGGGGTGTGAGCTTGTGGTGTGGTGGTCCGTGC
 C G P P V H C A P T I R D A V Q D A S G V S P W R S P R G E R H F V F S M S F G P L S G V G F E R G C Q L V V V G G P C

RG05

TGCGGTCTTGGTCTGTCTAGTAGGGTGCATAGGGTGTCTCGTTTTGTGGCAGTGTACGGTCCGTGC
 C G P G L S S R V H R V S R L W Q C T G P C

RG06

TGCGGTCCAAGTTGGCCTACGTTGGTTGTTCCGACGGGGTGTTCAGGTGAGTTATGGTCCGTGC
 C G P V W P T L V V R T G V L Q V S Y G P C

RG07

TGCGGTCCAAGTGGAGCTGTCTGAGGGGGTCTTGGTCCGATTGGGAGTGTGCTTAGGGTCAAGCTGTGAGGGGTGAGGGGGTTCGTCCGGTGTGCGGTTTTATGGCGGGTCCGTGC
 C G P V E L S E A G S W S D W E C A . G P . L E G E G V R R V M A V F M A G P C

RG09

TGCGGACCTTAGTCGACAGCCGAGCACACACCCGACCCAGAAGCAAACCCATTCTCTGGACCAACCTTATACAAACGCCGCCCTCAGCACAAACCTTAATCGGCGGAAGTGGTCCAGTTTGTATTTTACGAGGGGAGTGTGGAAGCGGTGGTTTTGTAGGGTCCGTGC
 C G P L V D S R A H T A P E A N P F S G P T L Y K R R P S A Q T L I G G S G P R L Y F T Q G S A W K R W F C R G P C

RG10

TGCGGTCCAACCGTATAGGAGGGCTTTTACGGTTGGTAAGCGGGGTGTTATGGGAGGGTCCGTGC
 C G P P Y R R A F T V G K A G C Y G R G P C

RG11

TGCGGTCCAAGTGGATAGTAGGATGCGGTATAAGAGGAGTTTGGTTTGGATTGCTGCGGGTCCAGAGTGGCTGTATCGTAGTTTTGGGTGGATGTGATTGGGTTGTTGTTGGTCCATGTGCTATGAGTCCGATTACTGTGGCTATGGTTCCGACGACAGTGGTTGGTCCA
 C G P V D S R M R Y K R S L V W I R A G P E W L Y R S F G W M C D W V V V G P C A M S A I T V A M V R Q Q W F G P
 ATTCGTTCCGGGGGCTTCCGCCCGGTGATTGTGATTGGGTTGGGGTCCGTGC
 I R S G G L A P R W I V I W V G G P C

FIG. 5.16 – Séquences des aptamères obtenus lors de cribles de la banque de première génération (boucle variable de 16 acides aminés, avec possibilité de répétitions de 16-mers, insérée dans la thioredoxine native TrxA).

5.3.2 Aptamères issus de la banque de seconde génération

Lorsque la nouvelle banque réalisée par Aptanomics a été disponible (p. 110), elle a également été criblée contre le domaine **SH3** de RasGAP. Comme prévu, tous les aptamères obtenus avec cette banque ont bien une région variable de 13 acides aminés exactement.

Le tableau 5.2 présente les séquences peptidiques et les nombres d'occurrences de ces aptamères dans les différents cribles réalisés avec cette nouvelle banque.

<i>Nom</i>	<i>Séquence</i>	<i>Occurrences</i>
RG 17	WYIRGKWVTGGES	15
RG 18	VWLACNRVCGSRG	3
RG 19	TMHEKVVSPINSF	8
RG 20	QHLTRGSPEFYHV	3
RG 21	RNPNGCMPRYYHR	5
RG 23	RPAKSACPHTPHL	6
RG 25	CTWSYNAQGRIWV	1
RG 26	ASTFPKPPRFYHV	1
RG 27	KWVVSHARLMYSF	2
RG 28	EGACPWEVRRLLRF	2
RG 29	RRLSRMCPSRYFT	1
RG 30	GVAPWGTTTCRRF	1

TAB. 5.2 – Séquences et occurrences des aptamères issus de la banque de seconde génération

La figure 5.17 présente les séquences nucléiques et protéiques des régions variables des aptamères issus de cette nouvelle banque.

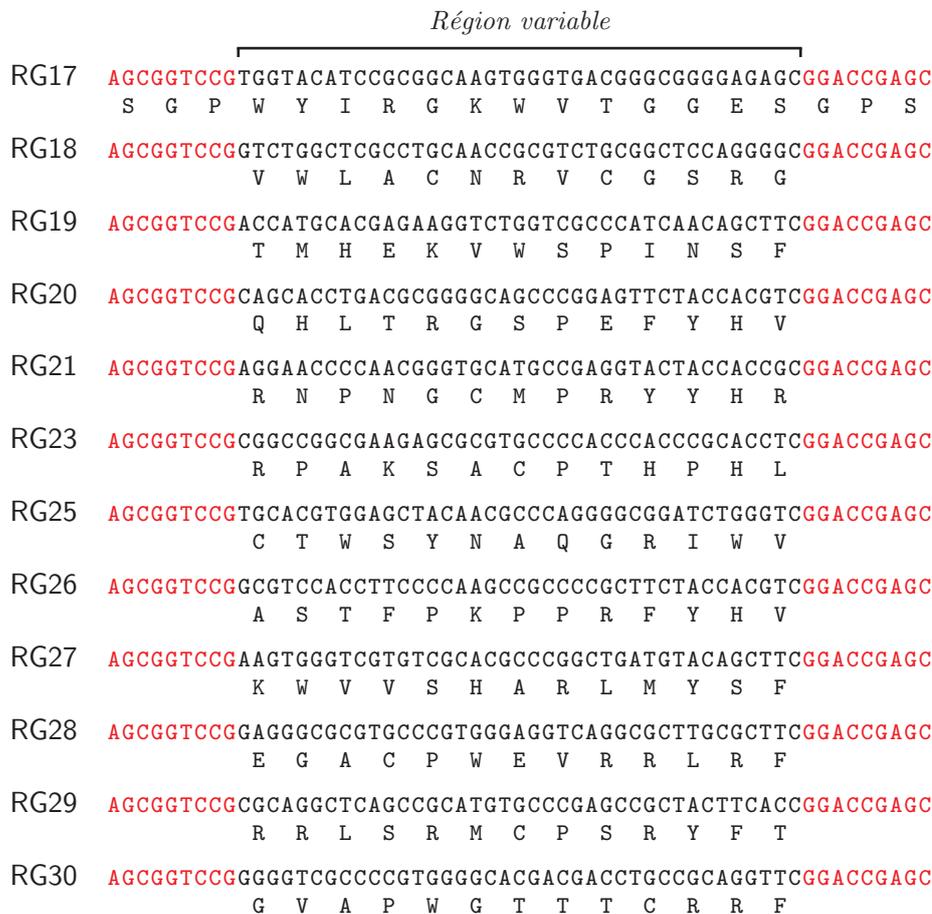


FIG. 5.17 – Séquences des aptamères obtenus lors du second crible

5.3.3 Étude des séquences des régions variables des aptamères

BLAST

La première étude que nous avons réalisée dès l'obtention de ces séquences a consisté à les comparer avec l'ensemble des séquences protéiques déposées dans les banques de données. Notamment, nous avons utilisé le logiciel BLAST (Altschul et al., 1990), hébergé par le serveur du NCBI¹⁴, qui permet très facilement l'utilisation de paramètres prédéfinis pour la recherche de fortes similarités au sein de courts fragments de séquence (*Search for short, nearly exact matches*).

Cette recherche a pour objectif de déterminer si les aptamères que nous avons identifiés peuvent être très similaires à des séquences de protéines, qui seraient alors susceptibles d'interagir elles-même avec le domaine **SH3** de RasGAP.

Le seul résultat relativement significatif a été obtenu avec l'aptamère RG 01, dont l'alignement avec l'isoforme 3 de la Livine semble pertinent (figure 5.18).

14. www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/

RG_01	1	LWGTSSCELVL
Livin_3	57	LWGTCSQFLL

FIG. 5.18 – Alignement de la région variable de RG 01 et d’une partie de l’isoforme 3 de Livine.

Bien que le cDNA (Genbank : BF727035) correspondant à cette isoforme rare de la Livine nous ait été transmis par M. G. WISTOW¹⁵, nous n’avons pas pu réaliser l’expérience d’évaluation par double-hybride de son éventuelle interaction avec le domaine **SH3** de RasGAP, en raison d’une grande difficulté à sous-cloner ce fragment dans le vecteur pJG4-5. De plus, bien que la Livine soit une protéine de la famille des IAP (*Inhibitor of Apoptosis*, famille qui compte également la Survivin notamment avec RasGAP-**SH3** et Aurora), il s’agit d’une isoforme très rare (une seule EST dans les banques de données). De plus, ce fragment similaire à RG 01 se situe précisément dans la région qui n’est pas commune aux autres isoformes 1 et 2, exprimées dans certains cancers (Kasof & Gomes, 2001, Gazzaniga et al., 2003). Ces différents arguments ne nous ont pas poussés à développer davantage ces travaux.

Recherche de similarités de séquences avec les partenaires connus de RasGAP

De façon plus spécifique, nous avons recherché au sein des différentes protéines identifiées comme interagissant avec le domaine **SH3** de RasGAP (voir p. 86) des fragments semblables aux différentes régions variables des aptamères que nous avons obtenus. Cette recherche n’a pas permis d’identifier de quelconques régions susceptibles d’être impliquées dans l’interaction avec RasGAP-**SH3**. Ceci suggère fortement que les motifs reconnus par RasGAP-**SH3** ne sont pas composés d’acides aminés adjacents, mais sont plutôt des « épitopes conformationnels ».

Composition des aptamères

La figure 5.19 présente la comparaison des fréquences attendues (voir figure 5.8) et des fréquences observées pour chacun des vingt acides aminés, sur l’ensemble des régions variables des aptamères.

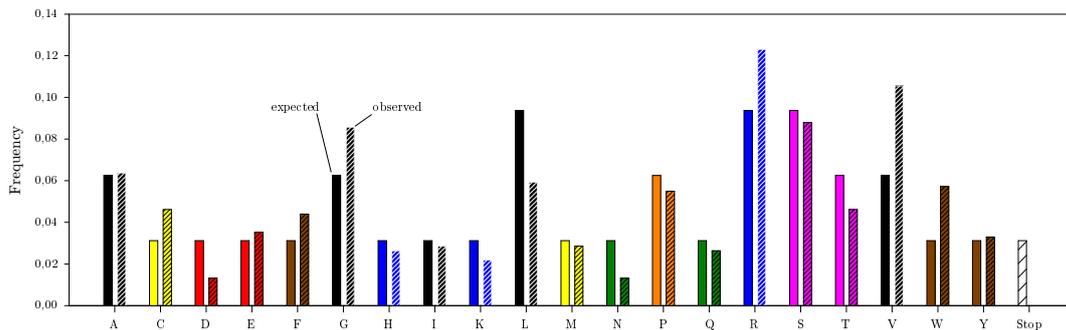


FIG. 5.19 – Comparaison des distributions théoriques et observées des compositions en acides aminés des régions variables de l’ensemble des aptamères obtenus (hors motifs CGP/GPC). Les barres pleines correspondent aux fréquences attendues, les barres hachurées aux fréquences observées.

15. National Eye Institute, NIH, Bethesda, MD, USA.

L'observation de cette figure permet de noter une relativement bonne adéquation entre les distributions théoriques et observées des acides aminés, ce qui permet d'estimer que l'échantillon issu de la banque que nous avons sélectionné pour son interaction avec RasGAP-SH3 n'a pas provoqué d'enrichissement en tel ou tel acide aminé particulier. En effet, en utilisant le test statistique de Kolmogorov-Smirnov (Lilliefors, 1967), on ne peut conclure à une différence significative entre ces deux distributions ($p=0.09>0.05$, calculs réalisés en utilisant le logiciel R, www.r-project.org, Ihaka & Gentleman, 1996). On peut cependant noter une relative modification des fréquences de certains acides aminés : Glycine, Valine, Arginine et Tryptophane (augmentation de la fréquence), Leucine, Asparagine (diminution). Les augmentations des fréquences de résidus basiques et hydrophobes permettent de penser que ces types de résidus jouent un rôle important dans l'interaction avec le domaine SH3 de RasGAP.

Alignements de séquence et motifs consensus

Nous avons également réalisé de nombreux alignements de séquence entre les différents aptamères. Les résultats les plus significatifs sont présentés sur la figure 5.20 (également p. 132), et définissent des groupes d'aptamères partageant des motifs relativement conservés.

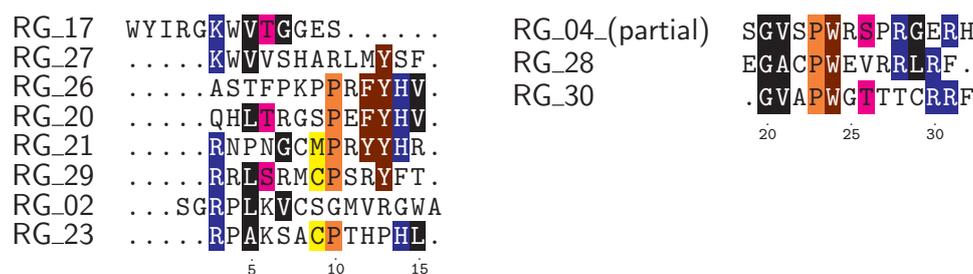


FIG. 5.20 – Alignements les plus significatifs de séquences de régions variables d'aptamères. La séquence de l'aptamère RG04 a été tronquée. La séquence complète de cet aptamère est : CGP PVHCA PTIRD AVQDA SGVSP WRSR GERHF VFSMS FGPLS GVGFE RGCQL VVVG GPC.

Ainsi, nous avons mis en évidence deux motifs conservés, présentés ici en utilisant le formalisme utilisé par le logiciel ScanProsite¹⁶ :

$$[\text{KR}] - \text{x} - [\text{VLA}] - \text{x}(4) - \text{P} - \text{x}(2) - \text{Y}$$

et

$$\text{G} - [\text{VA}] - \text{x} - \text{P} - \text{W}$$

A l'aide du logiciel ScanProsite¹⁷, nous avons recherché dans les banques de séquences des protéines possédant l'un de ces motifs, mais sans succès.

Il est toutefois intéressant de noter qu'un grand nombre de ces aptamères possèdent au moins une proline dans leur région variable, et on trouve même dans plusieurs aptamères (RG 20, 21, 26 et 29) un motif P-x-x-Y. Plusieurs domaines SH3 non conventionnels possédant également un motif consensus comportant une proline et une tyrosine (tableau 3.2, p. 70), il serait intéressant de poursuivre l'étude de ce motif, par exemple en synthétisant un grand nombre de peptides de type x-P-x-x-Y-x, et d'étudier leur interaction avec RasGAP-SH3.

16. (Gattiker et al., 2002, Sigrist et al., 2002).

17. www.expasy.org/tools/scanprosite

On peut également remarquer que seul l'aptamère RG 26 possède une région riche en prolines présentant le motif P-x-x-P :

ASTFPKPPRFYHV

Cependant, étant donné qu'une seule région variable présente un tel motif riche en proline, il est difficile de conclure sur la pertinence de ce motif.

5.3.4 Vérification de la spécificité de l'interaction

Après obtention de l'ensemble de ces 23 aptamères, pour lesquels, au fur et à mesure de leur identification nous avons déjà réalisé des tests de spécificité de routine (voir par exemple la figure 5.15), nous avons rassemblé tous ces aptamères pour des études plus complètes de leur spécificité. Les résultats de cette évaluation de la spécificité sont présentés sur la figure 5.21.

Dans ces études de spécificité, nous avons utilisé comme contrôles des appâts composés de protéines possédant des domaines **SH3** et impliquées dans la signalisation cellulaire : Grb2 et Nck.

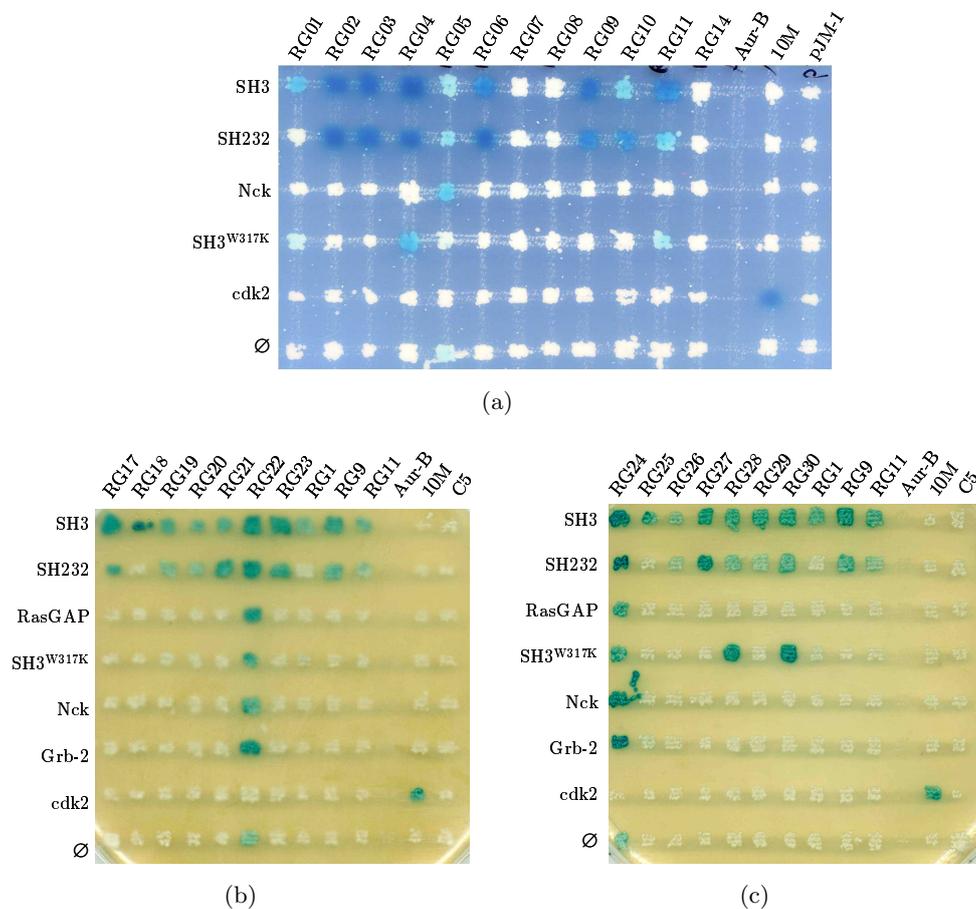


FIG. 5.21 – Vérification de la spécificité de l'interaction des différents aptamères obtenus vis à vis de différents appâts. RasGAP désigne une construction comprenant l'ensemble de la protéine RasGAP insérée dans le vecteur pEG202. Seules les boîtes correspondant au milieu de culture SD U⁻/H⁻/W⁻/X-Gal Galactose sont présentées ici. Les trois autres boîtes permettant de valider le phénotype double-hybride, non présentées, confirment les résultats vus sur cette figure.

Les conclusions que l'on peut tirer de la figure 5.21 sont les suivantes :

- les aptamères RG 05, 07, 08, 14, 22 et 24 ne reconnaissent pas spécifiquement le domaine **SH3** de RasGAP, puisqu'ils reconnaissent également d'autres constructions « appâts » contrôles,
- les aptamères RG 04, 28 et 30 reconnaissent le domaine **SH3** de RasGAP, y compris lorsque son Tryptophane 43 (très conservé) est muté en Lysine, alors que les autres aptamères ne reconnaissent pas ce mutant. Cela semble signifier que l'on soit en présence d'au moins deux classes d'aptamères : ceux dont le site d'interaction avec RasGAP-**SH3** comprend ce W⁴³, et ceux qui ne le comportent pas¹⁸,
- la construction présentant l'ensemble de la protéine RasGAP comme appât n'est reconnue par aucun des aptamères caractérisés.

Cette dernière remarque est à considérer dans le cadre de la régulation de l'accessibilité du domaine **SH3** de RasGAP (dont des modèles ont été présentés p. 79). Dans le cadre de cette

18. L'approfondissement de ce type d'étude est précisément l'objet de la section 5.5.

régulation, il serait tout à fait logique que l'interaction de ligands quelconques du domaine **SH3** soit impossible en l'absence de « l'activation » de RasGAP par Ras-GTP ou une forme oncogène de Ras.

5.4 Étude de l'importance de la plate-forme dans l'interaction

Le fondement même du crible que nous avons utilisé a pour but de sélectionner des aptamères dont la région variable est responsable de leur interaction avec le domaine **SH3** de RasGAP. Le choix de la Thiorédoxine bactérienne TrxC comme plate-forme de présentation avait été fait en raison de son intéressante solubilité, mais surtout en raison de la contrainte structurale imposée par cette plate-forme sur la région variable insérée au sein d'une de ses boucles. Cette contrainte se traduit par une grande proximité des extrémités de la région variable. Dès lors, on peut imaginer que la transposition de ces régions variables dans n'importe quelle autre plate-forme reproduisant cette contrainte conformationnelle devrait permettre de conserver l'interaction entre la région variable contrainte et le domaine **SH3** de RasGAP.

En particulier, le transfert des régions variables dans l'homologue humain de la Thiorédoxine, TrxH, devrait permettre le maintien de cette interaction.

Nous avons donc construit un vecteur similaire aux vecteurs pJM-1 (banque de 1^{re} génération) et pWP2-C (banque de 2^e génération), exprimant la Thiorédoxine humaine, et inséré par recombinaison homologue les régions variables de différents aptamères obtenus^{19 20}.

Nous avons notamment obtenu un signal positif d'interaction en double hybride très fort avec l'aptamère humanisé à partir de RG 27.

5.5 Étude des aptamères obtenus par mutagénèse dirigée du domaine **SH3**²¹

5.5.1 Sites de mutagénèse retenus

Dans l'attente de l'obtention d'informations structurales (par RMN notamment) sur les différents aptamères obtenus et de leur interaction avec le domaine **SH3** de RasGAP, nous avons cherché à identifier les sites de fixation de ces aptamères par mutagénèse dirigée du domaine **SH3**. La sélection des mutations à réaliser a été faite²² en s'appuyant largement sur la structure de ce domaine, obtenue par Yang et al. (1994). Ces mutations ont porté principalement sur des

19. Nous avons appelé ce transfert de région variable « *humanisation* d'aptamère ».

20. En plus de l'intérêt en termes de « preuve de concept » de cette humanisation, le transfert de ces régions variables dans une plate-forme d'origine humaine apporte également des bénéfices en terme de développement éventuel ultérieur. Notamment, on peut citer deux avantages à l'utilisation à visée thérapeutique de protéines d'origine humaine, par rapport à l'utilisation de protéines issus d'organismes différents. Tout d'abord, une éventuelle toxicité inter-espèce peut découler de l'administration de protéines : l'origine de cette toxicité peut être très diverse, mais l'apparition de nouvelles interactions entre protéines peut entraîner des dysfonctionnements cellulaires. Également, la minimisation du caractère « non-soi » (au sens immunitaire) doit être recherchée dans le cadre de la conception de molécules peptidiques à visée thérapeutique. Le développement récent d'anticorps monoclonaux thérapeutiques a déjà conduit à la constatation qu'il était nécessaire, pour donner à ces produits de bonnes qualités de sécurité et de tolérance, que la majorité de leur séquence protéique soit d'origine humaine (voir par exemple Carter et al., 1992).

21. Cette technique est appelée *AptaPrint*TM.

22. Cette étude a été notamment réalisée par l'équipe de biologie moléculaire d'Aptanomics et par M. Schapira.

acides aminés susceptibles de former des interactions fortes avec les ligands du domaine **SH3** de RasGAP : résidus acide glutamique et aspartique, Arginine, histidine.

La figure 5.22 présente les localisations de ces mutations. Sur cette figure, on perçoit nettement que ces mutations devraient permettre d'obtenir une analyse relativement exhaustive des sites d'interaction. L'objectif de ces expériences de mutagenèse est double : obtenir une première empreinte par biologie moléculaire des aptamères peptidiques, qui permet de préfigurer les informations obtenues par des méthodes plus structurales (RMN notamment), et également de permettre une classification des aptamères en les regroupant par *clusters* d'aptamères partageant les mêmes sites d'interaction. Cette classification, si elle recoupe les alignements de séquences réalisés (cf. p. 5.3.3), renforce les informations (notamment motifs consensus...) issues de ces alignements.

5.5.2 Matrices d'interaction

La figure 5.23 présente les matrices d'interaction obtenues avec les différents aptamères présentés précédemment, ainsi que les différents mutants ponctuels du domaine **SH3** de RasGAP.

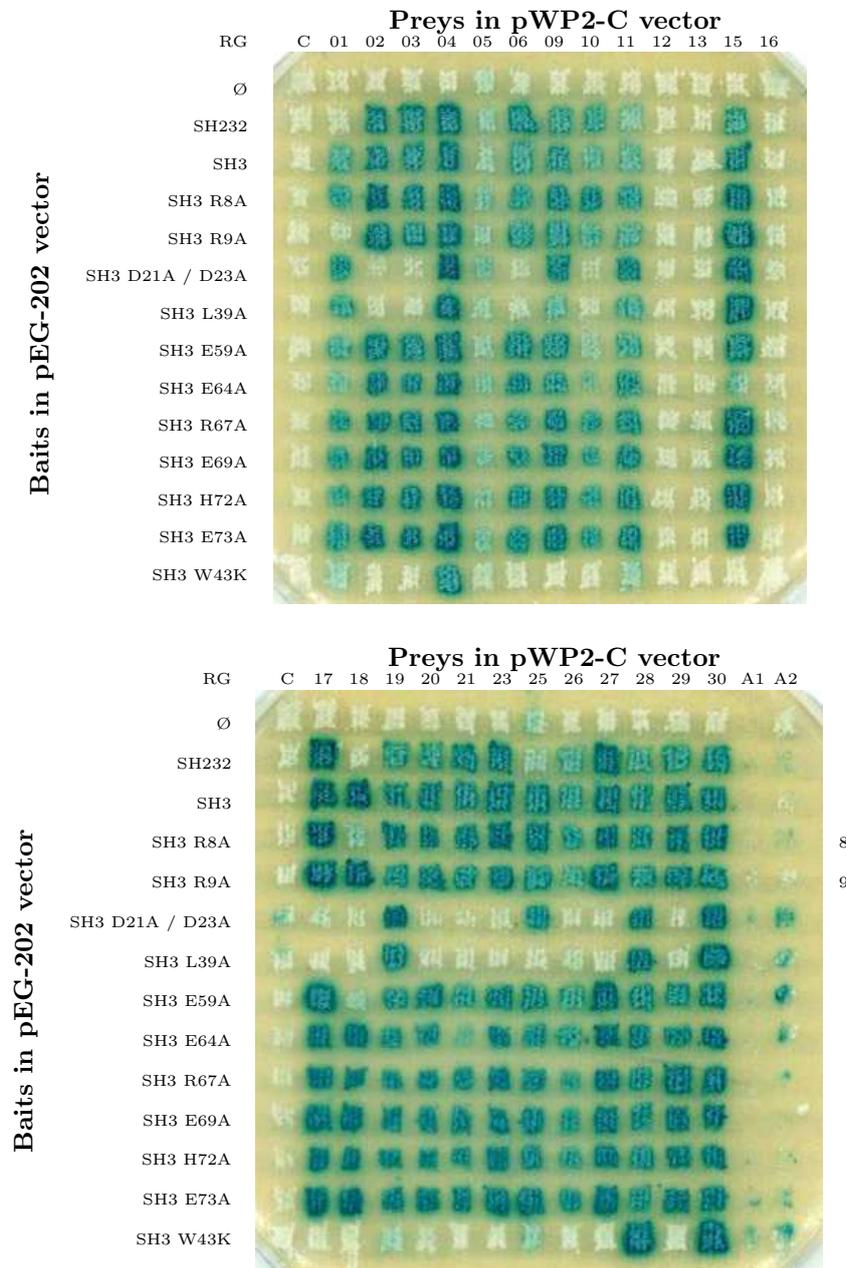


FIG. 5.23 – Analyse par mutagenèse ponctuelle du domaine **SH3** de RasGAP des sites de reconnaissance des différents aptamères obtenus. Plasmide rapporteur utilisé : pSH18-34. Matrices obtenues après 48h de croissance des levures sur milieu SD Ura-, Trp-, His-, Galactose 2%, X-Gal. La construction appât SH232 correspond à l'expression du domaine **SH3** de RasGAP entouré de ses deux domaines **SH2**. Les constructions proies A1 et A2 correspondent aux vecteurs pJG4-5 hs_Aurora_A et pJG4-5 hs_Aurora_B. La numérotation des acides aminés du domaine **SH3** de RasGAP est utilisée ici.

Cette figure s'interprète de la façon suivante. Prenons l'exemple de l'aptamère RG 27, d'après la matrice d'interaction, il n'interagit pas (absence de coloration bleue) avec les constructions exprimant les mutants **SH3**^{D21A/D23A}, **SH3**^{L39A} et **SH3**^{W43K}. Ceci signifie donc que le site d'interaction de cet aptamère comprend les acides aminés D₂₁, D₂₃, L₃₉ et W₄₃.

Pour réaliser une interprétation plus globale des résultats de ces matrices (figure 5.23), ce qui est complexe, nous avons quantifié la réponse obtenue (par une simple mesure de l'intensité de bleu sur ces matrices) et procédé à des regroupements de profils d'interactions similaires. La figure 5.24 présente les résultats de ces regroupements. Nous avons ainsi pu déterminer sept *clusters* (groupes) d'aptamères possédant chacun des profils d'interactions spécifiques.

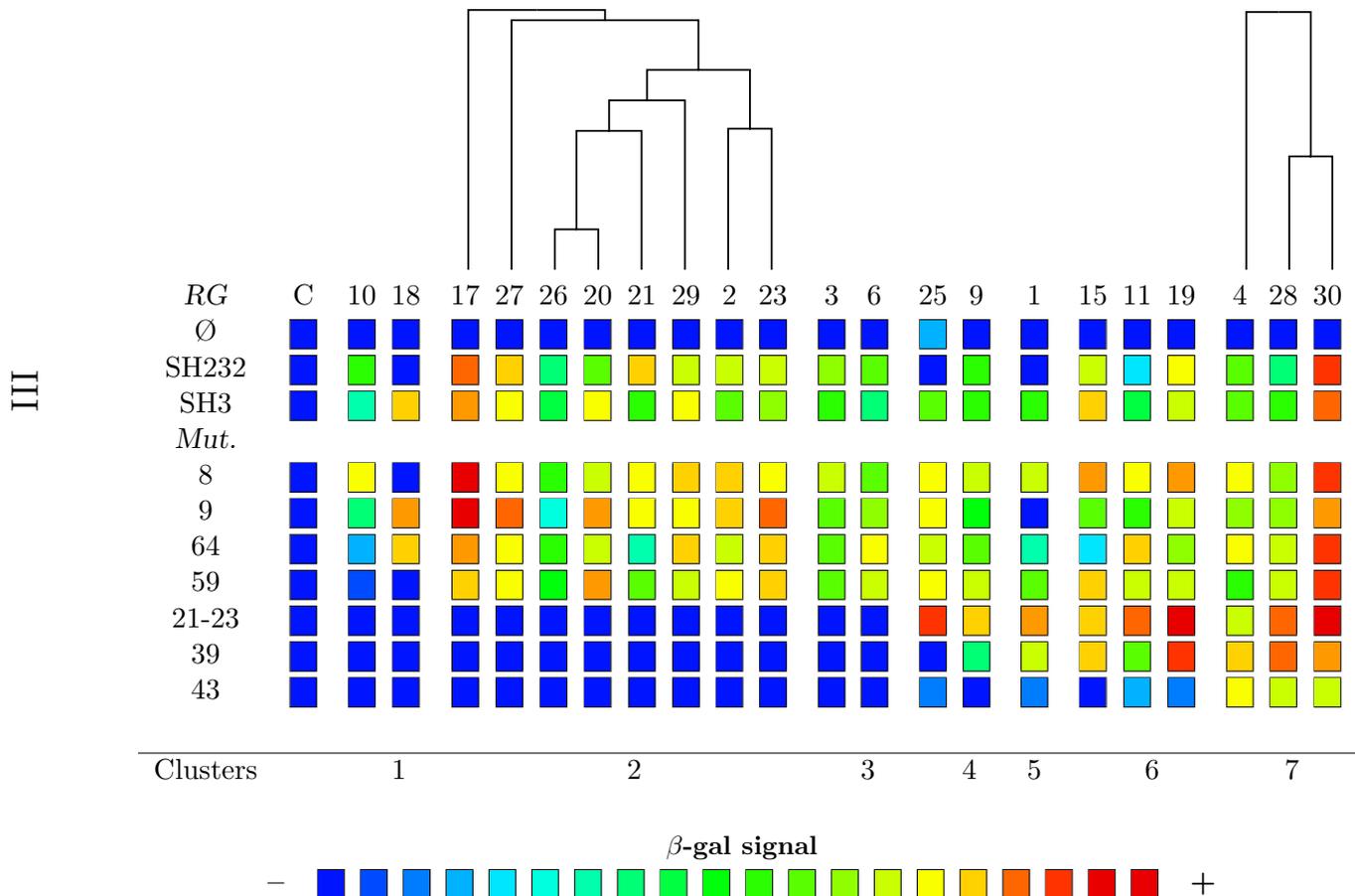


FIG. 5.24 – Analyse des profils d'interaction des aptamères sélectionnés contre le domaine **SH3** de RasGAP par mutagenèse dirigée. La matrice d'interaction présentée sur la figure 5.23 a été analysée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image et les aptamères partageant des profils d'interaction semblables ont été rassemblés. Sept *clusters* ont donc ainsi pu être définis, en recoupant également les informations issues d'alignements multiples des séquences des régions variables de ces aptamères. Pour les cluster 2 et 7, pour lesquels les similarités de séquences sont les plus fortes, les arbres phylogénétiques obtenus à l'aide du logiciel MEGA (Kumar et al., 2004) sont présentés. Les alignements de séquence ont été réalisés à l'aide de l'algorithme CLUSTAL (Higgins et al., 1996).

Concernant les *clusters* 2 et 7, nous avons même pu établir une relation « séquence/profil d'interaction ». En effet, au sein de ces deux groupes d'aptamères, les similarités de séquences sont relativement importantes, comme en témoignent les alignements des séquences de ces ap-

tamères présentés sur la figure 5.25.

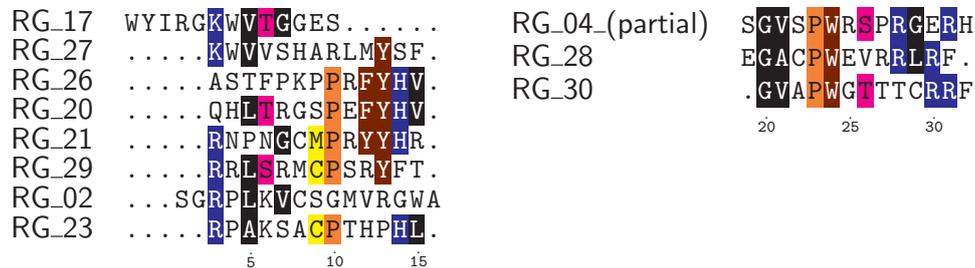


FIG. 5.25 – *Clusters* 2 et 7. La séquence de l'aptamère RG04 a été tronquée. La séquence complète de cet aptamère est : CGP PVHCA PTIRD AVQDA SGVSP WRSRPR GERHF VFSMS FGPLS GVGFE RGCQL VVVG GPC.

|| Nous avons déjà discuté (p. 125) des alignements de séquences et des motifs consensus que l'on peut tirer de cette figure.

Nous avons complété les résultats de cette étude par mutagenèse par une étude structurale, portant sur l'un des aptamères du *cluster* n° 2, l'aptamère RG 27. Cette étude structurale est l'objet du chapitre 9. La comparaison des résultats obtenus par mutagenèse et par RMN y sera notamment détaillée et discutée.

Chapitre 6

Validation de notre approche et de la cible **RasGAP-SH3** à l'aide des aptamères

Nous présentons dans ce chapitre les expériences que nous avons réalisées pour valider les hypothèses suivantes :

- les aptamères que nous avons obtenus interagissent spécifiquement avec le domaine **SH3** de RasGAP,
- ce domaine **SH3** est une cible pertinente dans le domaine de la conception de molécules anti-tumorales,
- l'utilisation de ces aptamères est une approche valable dans le but de concevoir des molécules ciblant ce domaine **SH3**.

Les résultats présentés dans le chapitre 5 nous permettent d'affirmer que les différents aptamères obtenus possèdent, tout du moins en double-hybride, de bonnes qualités de liaison au domaine **SH3** de RasGAP, contre lequel ils ont été sélectionnés : spécificité, diversité.

La traduction sous forme expérimentale des validations des hypothèses exposées ci-dessus est la suivante :

- reproduire *in vitro* les interactions entre RasGAP-**SH3** et les aptamères démontrées par double-hybride dans le chapitre 5,
- étudier le phénotype lié à l'expression d'aptamères dans des cellules tumorales et non tumorales.

|| Une grande partie de ces travaux a été réalisée par les équipes « biochimie » et « biocell » d'Aptanomics.

6.1 Validation *in vitro* des interactions **RasGAP-SH3**/aptamères

Afin de confirmer les interactions identifiées par double-hybride, nous avons procédé à deux types d'expériences :

- *pull-down*¹ sur protéines purifiées,
- *pull-down* de RasGAP endogène.

1. Les expériences de *pull-down* permettent d'observer la formation d'un complexe A/B par la co-précipitation d'une protéine B avec une protéine A retenue sur un support solide. La rétention de la protéine A sur colonne

6.1.1 Expression et purification

La première étape consiste à exprimer et purifier les aptamères obtenus par double-hybride. Ces aptamères sont uniquement composés de leur plate-forme de présentation TrxA ou TrxC, contenant les régions variables. Tous les autres éléments constituant les protéines utilisées en proie dans le système double-hybride (domaine d'activation de la transcription B42, NLS...) sont exclus de ces constructions.

Les différents aptamères ont été sous-clonés dans le vecteur pGEX 4T-1 (Amersham Pharmacia) pour une expression sous forme de protéine de fusion GST, ou dans le vecteur pET-15b pour une expression sous forme de protéine taggée $[His]_6$. Ces deux vecteurs sont présentés sur la figure 6.1.

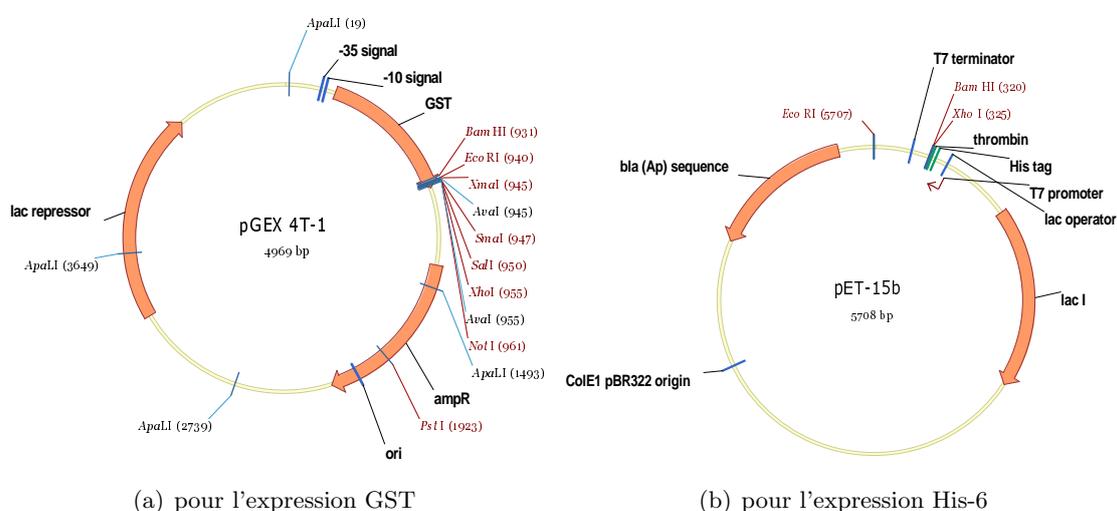


FIG. 6.1 – Vecteurs d'expression bactérienne

Nous avons tout d'abord exprimé les différents aptamères en fusion GST (figure 6.2). Nous les avons ensuite purifiés par chromatographie d'affinité sur billes de sépharose couplées au glutathion.

Parmi ces aptamères, nous avons pu identifier des différences de rendement de purification et de solubilité. Ainsi, les aptamères RG 09, 26 et 27 sont plus difficilement solubles. Cependant, l'étape de purification sur colonne sépharose-Ni-NTA a permis d'obtenir pour chacun des aptamères une quantité suffisante de protéine pure pour les différentes expériences réalisées ultérieurement.

peut être réalisée de différentes manières : à l'aide d'un anticorps dirigé contre [une partie de] cette protéine (co-immunoprécipitation), à l'aide de la formation d'un complexe entre un domaine de la protéine A et un ligand de ce domaine greffé sur support solide (par exemple : interaction GST / glutathion-Sépharose, il s'agit alors d'une expérience de GST-pull-down).

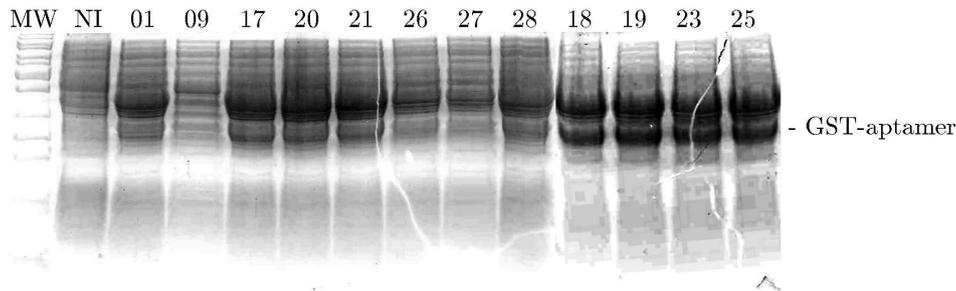


FIG. 6.2 – Production d'aptamères en fusion avec la GST, dans *E. coli* BL21 (DE3), après induction IPTG. NI : bactéries non induites par l'IPTG.

6.1.2 Expériences de pull-down

Pull-down sur protéines purifiées

Cette expérience consiste à vérifier l'interaction entre le domaine **SH3** de RasGAP exprimé en bactéries et purifié, et les aptamères (également purifiés). Les aptamères-GST sont immobilisés sur colonne glutathion-sépharose. Le domaine RasGAP-**SH3** purifié est incubé sur cette colonne, qui est ensuite lavée intensivement. Les protéines retenues sur la colonne sont analysées par SDS-PAGE, transférées sur membrane et révélées par immuno-chimie, en utilisant l'anticorps mAb200 dirigé contre le domaine **SH3** de RasGAP.

Les principaux résultats de cette expérience sont portés sur la figure 6.3. Les aptamères qui interagissent le plus fortement avec RasGAP-**SH3** purifié sont : RG 09, 20, 21, 27 et 30.

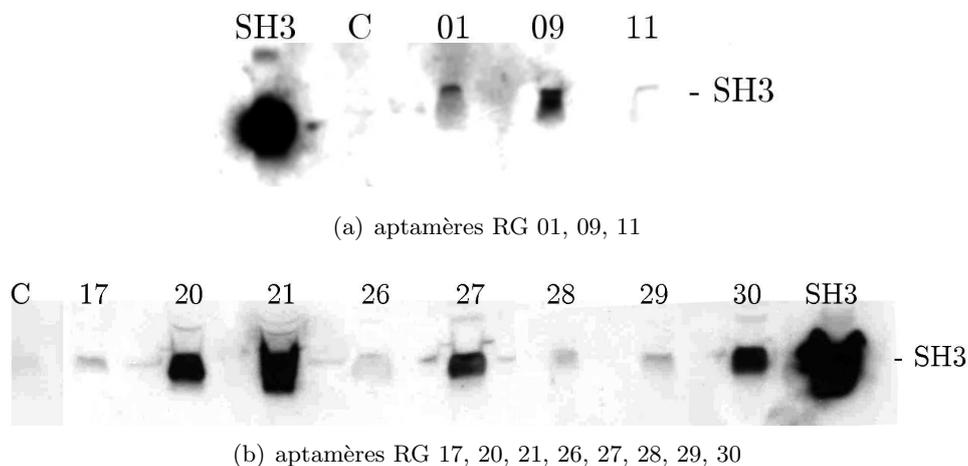


FIG. 6.3 – Pull-down de **SH3** purifié par des aptamères fusionnés à GST, immobilisés sur colonne glutathion-sépharose. Le domaine **SH3** est révélé par Western blot en utilisant l'anticorps mAb200. C : utilisation de l'aptamère pep11-GST (non dirigé contre RasGAP), SH3 : dépôt de quelques μg de RasGAP-**SH3** purifié.

Pull-down sur lysat cellulaire (cellules HeLa)

L'objectif de cette expérience est de compléter l'expérience précédente, en utilisant les protéines d'un lysat de cellules HeLa en lieu et place du domaine RasGAP-**SH3** purifié.

500 μ g de protéines de la fraction soluble (contenant RasGAP) d'un lysat de cellules HeLa sont incubées sur des billes glutathion-sépharose, préalablement chargées avec les différents aptamères purifiés. Après incubation et lavage, les protéines retenues sont analysées par SDS-PAGE et Western-blot en utilisant l'anticorps mAb200 dirigé contre RasGAP-**SH3**.

La figure 6.4 présente les résultats de quelques unes des expériences réalisées. Les aptamères RG 09 et 21 semblent donc interagir avec la protéine RasGAP exprimée de façon endogène dans les cellules HeLa. Cette expérience a été reproduite avec d'autres aptamères, et le même résultat a notamment été obtenu avec les aptamères RG 20, 27 et 30².

Ce résultat peut sembler en contradiction avec les expériences d'interaction en double-hybride (cf p. 126), qui n'avaient pas permis la mise en évidence d'interactions aptamères / protéine entière RasGAP. Cependant, l'état d'activation de RasGAP endogène au sein des cellules HeLa est certainement très différent de celui de la protéine appât constituée de la fusion RasGAP/LexA, exprimée en levure, ce qui peut certainement expliquer cette contradiction.



FIG. 6.4 – Pull-down de RasGAP issu d'un lysat de cellules HeLa par précipitation à l'aide de colonnes glutathion-sépharose préchargées avec différents aptamères fusionnés à GST. La protéine RasGAP est détectée par l'anticorps mAb200. LT : dépôt de 50 μ g de protéines de lysat total de cellules HeLa, C : utilisation de l'aptamère pep11-GST (non dirigé contre RasGAP).

III

En revanche, certains aptamères (notamment RG 01) ne semblent pas interagir avec une suffisamment grande affinité avec RasGAP pour permettre l'obtention d'un signal positif dans ce test.

Conclusion

Nous avons donc montré que certains des aptamères que nous avons identifiés par double-hybride possèdent bien la capacité d'interagir avec le domaine **SH3** de RasGAP dans d'autres systèmes de visualisation d'interactions.

6.2 Validation sur cultures cellulaires

L'objectif de ces expériences est de démontrer que certains des aptamères que nous avons obtenus, dirigés contre le domaine **SH3** de RasGAP, possèdent la capacité à induire des phénotypes anti-prolifératifs et anti-tumoraux dans différents modèles cellulaires, semblables à ceux obtenus par la micro-injection de l'anticorps mAb200, également dirigé contre RasGAP-**SH3**.

6.2.1 Test de viabilité cellulaire

La première étape de la validation de l'activité des aptamères dirigés contre le domaine **SH3** de RasGAP passe par une évaluation de leur capacité à induire une cytotoxicité dans des lignées cellulaires tumorales.

Les différents kits de mesure de la viabilité cellulaire sur le marché permettent de mesurer très facilement un paramètre proportionnel au nombre de cellules vivantes dans un puits de

2. Résultat non présenté ici.

plaque de culture cellulaire. L'équipe de biologie cellulaire d'Aptanomics a utilisé en parallèle deux kits : CellTiter Blue™³ et ViaLight™⁴.

Le test CellTiter Blue repose sur le principe relativement différent de réduction par différentes enzymes cellulaires de la resazurin en resorufin (figure 6.5), ce qui induit une modification de la fluorescence des noyaux aromatiques et du spectre d'absorption. La resazurin (également appelée *Alamar Blue*) est une petite molécule capable d'entrer dans les cellules vivantes. De ce fait ce test peut être réalisé sans lyser les cellules. La capacité à réduire la resazurin est, d'après [O'Brien et al. \(2000\)](#), une caractéristique des cellules vivantes, et constitue donc le fondement de ce test. Expérimentalement, le test consiste à ajouter aux cultures cellulaires en microplaques une solution de resazurin, à laisser agir quelques dizaines de minutes et enfin à mesurer l'absorbance ou la fluorescence aux longueurs d'onde spécifiques des deux formes oxydées et réduites.

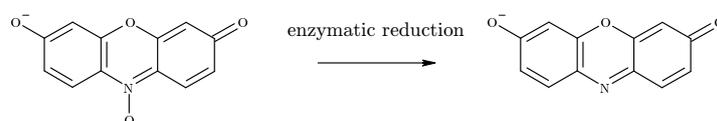


FIG. 6.5 – Réduction de la resazurin en resorufin, principe du test CellTiter Blue.

Le test ViaLight consiste en deux étapes : lyse des cellules, et suivie immédiatement de la quantification de l'ATP présent dans le lysat cellulaire. L'ATP étant un nucléotide indispensable à la survie cellulaire, et impliqué dans de nombreuses voies métaboliques, sa concentration dans le lysat cellulaire est un bon estimateur du nombre de cellules vivantes et de la viabilité de ces cellules. La mesure de cette concentration d'ATP se fait en utilisant une solution contenant une enzyme recombinante purifiée, la Luciferase, dont l'activité en présence d'ATP consiste en la production d'un rayonnement lumineux. La mesure de l'intensité lumineuse à l'aide d'un lecteur de plaque équipé d'un photomultiplicateur permet donc d'avoir accès à une évaluation de la viabilité cellulaire ([Dexter et al., 2003](#), [Crouch et al., 1993](#)).

[Squatrito et al. \(1995\)](#) ont démontré que ces deux tests donnaient des résultats très souvent concordants, même si les tests basés sur la mesure bioluminescente de l'ATP devaient être préférés.

Ces deux tests, utilisés en parallèle, ont donné des résultats tout à fait comparables, montrant la diminution du nombre de cellules après expression de plusieurs aptamères sélectionnés pour leur interaction avec **RasGAP-SH3**. Les résultats d'une partie des expériences réalisées sont présentés sur la figure 6.6, qui montre bien une diminution importante de la viabilité de cellules HeLa exprimant certains aptamères dirigés contre **RasGAP-SH3**, par rapport à des cellules HeLa exprimant un aptamère contrôle.

3. Promega Corp., Madison, WI, USA

4. Cambrex Corp., Rockland, ME, USA

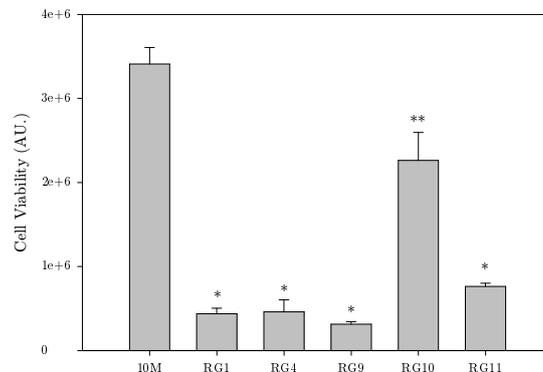


FIG. 6.6 – Résultats du test de viabilité cellulaire. Les résultats présentés sur cette figure ont été obtenus à l'aide du test ViaLight, 24h après transfection, sur des cellules HeLa transfectées par différents aptamères (expériences réalisées en plaque de culture cellulaire 96 puits; au moment de la transfection, les cellules HeLa étaient à 50-70% de la confluence). L'aptamère 10M n'est pas dirigé contre RasGAP-SH3 et est utilisé comme contrôle. Les viabilités mesurées pour cellules transfectées par les aptamères RG 01, RG 04, RG 09, RG 10 et RG 11 sont significativement différentes du contrôle 10M (* : $p < 0.001$, ** : $p < 0.05$, *Student's test*).

III

Ce premier résultat montrant la capacité des aptamères lorsqu'ils sont exprimés dans des cellules tumorales, à induire une diminution de la prolifération et de la viabilité cellulaire nous a naturellement encouragés à conduire des tests plus adaptés pour la démonstration de leur activité anti-tumorale.

6.2.2 Evaluation de la capacité à former des colonies

La capacité de cellules à former des colonies au sein d'un substrat solide est une caractéristique des cellules tumorales que ne possèdent pas les cellules normales. Différents tests sont utilisés pour évaluer l'activité de composés anti-tumoraux sur cette propriété, l'un des plus répandus et fiables étant certainement le test de clonage en agar mou (Agre & Williams, 1983).

Cependant, pour des raisons évidentes de simplicité, nous avons choisi un autre test sensiblement équivalent. Ce test⁵ consiste à observer, après une quinzaine de jours de croissance cellulaire et d'expression continue des différents transgènes, le nombre de colonies formées au fond d'une boîte de culture standard à 6 puits. Les cellules sontensemencées à J_{-1} en très faible nombre, et transfectées le lendemain (J_0) par un vecteur exprimant l'aptamère peptidique à tester. Une sélection à l'aide de l'antibiotique Hygromycine B permet le maintien du plasmide (portant le gène de résistance *hph*⁶) dans les cellules et donc l'expression de l'aptamère.

Nous avons réalisé ces expériences en utilisant plusieurs lignées cellulaires tumorales : HeLa (figure 6.7(a)), HCT116⁷, MDA-MB-231⁸ (figure 6.7(b)). Les lignées HCT116 et MDA-MB-231, bien caractérisées, surexpriment respectivement les protéines EGF et Ras^{G13C}, et leur voie

5. Ce test, appelé *Colony-Forming Chemosensitivity Assay* ou test de capacité à former des colonies (Bradley et al., 1984, Salmon et al., 1978), a été décrit comme permettant d'obtenir *in vitro* une évaluation relativement fiable de l'activité anti-tumorale d'un composé avec une bonne corrélation aux réponses obtenues sur patients atteints de tumeurs similaires.

6. HPT, le produit du gène *hph* d'*E. coli* est une kinase inactivant l'Hygromycine B par phosphorylation.

7. Résultats non présentés ici.

8. Voir p. 17 pour des informations sur ces lignées cellulaires.

de signalisation Ras sont donc suractivées, ce qui rend leur utilisation pertinente dans le cadre de notre projet : la conception d'inhibiteurs de cette voie de signalisation.

Nous avons également réalisé ces tests sur plusieurs types cellulaires non tumoraux, et obtenu des résultats comparables à ceux obtenus par [Leblanc et al. \(1999\)](#) sur des lignées similaires, en micro-injectant l'anticorps mAb200 dirigé contre RasGAP-**SH3** : les différents aptamères testés n'entraînent pas de diminution de la capacité de ces cellules à former des colonies⁹.

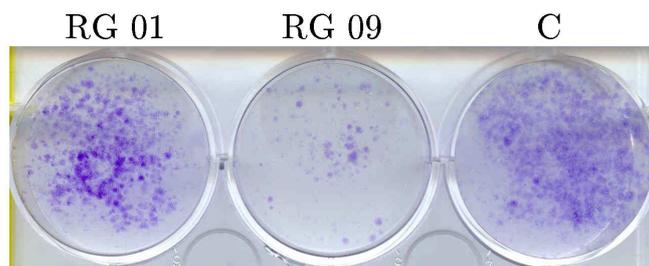
La figure 6.7 présente les résultats de ces expériences, et démontre que les aptamères RG 01, 09 et 11, lorsqu'ils sont exprimés dans les cellules MDA-MB-231¹⁰, provoquent une diminution de leur capacité à former des colonies. Sur cellules HeLa, ce même résultat a pu être obtenu avec ces mêmes aptamères RG 01 et 09, et également pour l'aptamère RG 11¹¹.

Nous avons exprimé dans ces cellules le domaine **SH3** de RasGAP (figure 6.7(b), puits noté « SH3 ») et obtenu une importante diminution de la capacité à former des colonies, ce qui est tout à fait en accord avec des résultats déjà décrits ([Clark et al., 1993](#)).

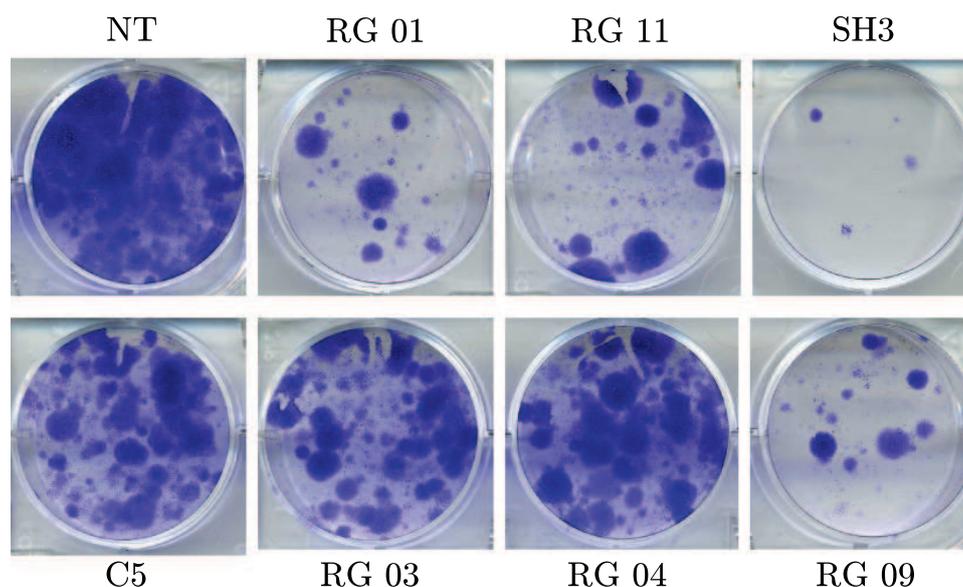
9. Résultats non présentés ici.

10. MDA-MB-231 : cellules de cancer du sein ([Cailleau et al., 1974](#)).

11. Résultat non présenté ici.



(a) Cellules HeLa



(b) Cellules MDA-MB-231. NT : non transfecté, C5 : aptamère non dirigé contre RasGAP-SH3, SH3 : expression du domaine SH3 seul.

FIG. 6.7 – Évaluation de la capacité à former des colonies de cellules transfectées par des vecteurs exprimant différents aptamères (cellules HeLa et MDA-MB-231).

Nous avons également obtenu une réduction de la capacité de cellules tumorales à former des colonies avec la transfection de vecteurs exprimant les aptamères RG 21, 27 et 30¹².

A titre de contrôle, nous avons exprimé ces aptamères dans des cellules non tumorales et n'avons pas pu mettre en évidence de diminution de la capacité de ces cellules à former des colonies.

6.2.3 Test double-hybride en cellules de mammifères

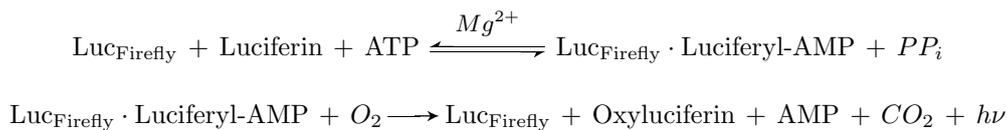
Les expériences présentées ci-dessus démontrent que l'expression de certains aptamères peptidiques dirigés contre le domaine SH3 de RasGAP dans des lignées tumorales induit une réponse semblable à celle de molécules anti-cancéreuses. En revanche, nous n'avons pas formellement démontré que cette réponse est bien due à l'interaction dans ces cellules entre ces aptamères et la protéine RasGAP. Sans entrer dans une démonstration parfaite et une étude complète des mécanismes moléculaires mis en jeu dans cette réponse, nous avons utilisé la technique du double-

12. Résultat non présenté ici.

hybride adaptée aux cellules humaines pour démontrer que l'interaction entre ces aptamères et le domaine **SH3** de RasGAP était possible dans un contexte cellulaire différent des levures et des expériences *in vitro* présentées au début de ce chapitre.

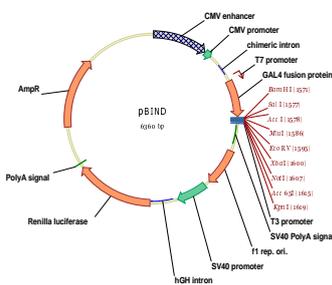
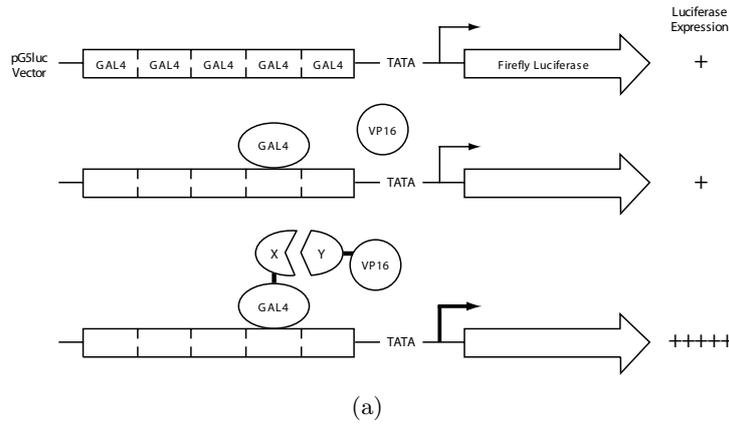
Le système CheckMate¹³ (test de type double-hybride en cellules de mammifère) a été utilisé pour tester l'interaction entre les différents aptamères identifiés. Ce test consiste à transférer une lignée cellulaire avec trois plasmides : pBIND, pACT et pG5*luc* (cf. figure 6.8 Promega, 2000). Au sein du plasmide pBIND, les différents appâts à tester sont sous-clonés en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de GAL4. Le vecteur pACT sert à l'expression des différentes proies, en fusion avec le domaine d'activation de la transcription de VP16 (protéine de *Herpes simplex virus-1*, Cress & Triezenberg, 1991). Enfin, le vecteur pG5*luc* contient le gène codant pour la Luciferase de la luciole *Photinus pyralis* (notée ici Luc_{Firefly}, de Wet et al., 1987), sous contrôle de cinq séquences de liaison de la protéine GAL4 (motif GAGTACTGTCCTCC, Liang et al., 1996b). Le schéma 6.8(a) présente le principe de fonctionnement de ce système, finalement très proche du double-hybride en levure décrit au chapitre 5.

Trois jours après transfection des vecteurs dans une lignée cellulaire, les cellules sont lysées, et la présence de Luc_{Firefly} est mesurée en ajoutant la Luciferin, substrat oxydé par cette protéine. Les réactions suivantes ont alors lieu (de Wet et al., 1987), et permettent la mesure d'une luminescence dépendant de l'interaction appât/proie testée :

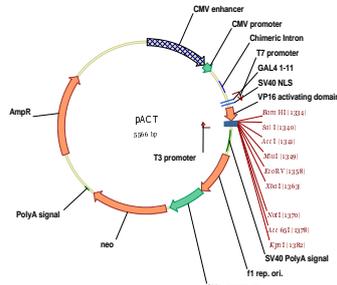


Afin de normaliser les résultats obtenus (qui dépendent des niveaux de transfection, du nombre de cellules, de l'éventuelle toxicité des protéines exprimées...), le vecteur pBIND porte le gène codant pour la Luciferase de *Renilla reniformis* (Luc_{Ren}), qui permet de mesurer la luminescence indépendamment de la mesure de la Luc_{Firefly} de luciole (Lorenz et al., 1991). Cette seconde mesure indépendante est possible grâce à la différence de spécificité des deux protéines Luc_{Firefly} et Luc_{Ren}. Le substrat de cette seconde enzyme est la coelenterazine, molécule très différente du substrat de Luc_{Firefly}. Sur le plan pratique, il s'agit donc de mesurer séquentiellement les luminescences des deux enzymes en ajoutant successivement les deux substrats. Cette double mesure permet donc de réaliser une normalisation, en utilisant un vecteur d'expression constitutive de Luc_{Ren}.

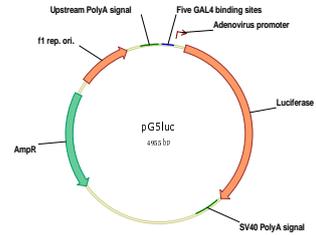
13. CheckMate™, Promega, Madison, WI, USA



(b) pBIND, vecteur d'expression de l'appât, fusionné avec GAL4. Ce vecteur exprime également Luc_{Ren}, pour contrôle du niveau de transfection et normalisation des mesures.



(c) pACT, vecteur d'expression de la proie, fusionnée au domaine d'activation de la transcription de VP16.



(d) pG5Luc, vecteur d'expression de Luc_{Firefly}, sous contrôle de cinq sites de fixation de GAL4.

FIG. 6.8 – Principe du système et vecteurs pour le double hybride en cellules de mammifère

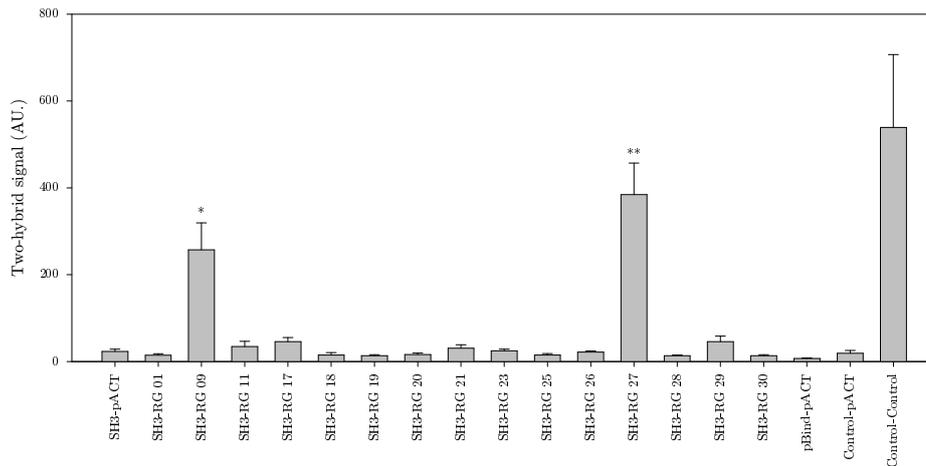


FIG. 6.9 – Résultats du test d'interaction double-hybride en cellules de mammifères. Le signal obtenu lors de l'interaction SH3/RG 09 et SH3/RG 27 est statistiquement différent du signal obtenu avec le plasmide pACT vide ($p < 0,001$ dans les deux cas, en utilisant le test de Student).

La figure 6.9 présente les résultats obtenus par ce test double-hybride en cellules humaines. Il a ainsi été démontré que dans un milieu intracellulaire « humain » l'interaction entre les aptamères RG 09 et RG 27 et le domaine **SH3** de RasGAP est maintenue. Concernant les autres aptamères, on peut supposer que des problèmes d'expression ou de repliement post-traductionnel les empêchent d'avoir une interaction suffisamment forte avec RasGAP-**SH3** pour que leur interaction soit visible dans ce système. Cependant, certains aptamères ne donnant pas un signal positif dans ce test possèdent tout de même une activité anti-proliférative et/ou anti-tumorale. Ceci peut être expliqué très probablement par la sensibilité relativement faible de ce système double-hybride en cellules humaines.

6.3 Sélection des aptamères pour étude ultérieure

Le tableau 6.1 récapitule les résultats de toutes les expériences de validation des aptamères que nous avons obtenus. Ces différentes expériences s'apparentent donc à un filtre, permettant de sélectionner, parmi les aptamères identifiés sur de simples informations de double-hybride, ceux possédant les meilleures affinités et activités cellulaires. Les étapes suivantes (synthèse peptidique, étude structurale, modélisation moléculaire, *drug design*, criblage à haut débit, cf. p. 95) ne pouvant être réalisées que sur un faible nombre d'aptamères différents, la mise au point et l'utilisation d'un tel ensemble d'outils de validation des aptamères revêt une importance toute particulière.

Bq.	#	2-H l.		Pull-down		CFCA	Viabilité	2-H m.	Score final
		TrxA/R	TrxH	SH3 pur.	HeLa				
1 ^{re} génération (TrxA, 16 mers)	RG 01	✓		✓		✓	✓		★★★☆☆
	RG 02	✓							☆☆☆☆☆
	RG 03	✓							☆☆☆☆☆
	RG 04	✓					✓		★☆☆☆☆
	RG 05	✓							☆☆☆☆☆
	RG 06	✓							☆☆☆☆☆
	RG 07	✓							☆☆☆☆☆
	RG 08	✓							☆☆☆☆☆
	RG 09 ¹⁴	✓			✓	✓	✓	✓	★★★★☆
	RG 10	✓							☆☆☆☆☆
	RG 11	✓			✓		✓	✓	☆☆☆☆☆
2 ^e génération (TrxR, 13 mers)	RG 17	✓							☆☆☆☆☆
	RG 18	✓							☆☆☆☆☆
	RG 19	✓							☆☆☆☆☆
	RG 20	✓		✓					★☆☆☆☆
	RG 21	✓		✓	✓				★★☆☆☆
	RG 23	✓							☆☆☆☆☆
	RG 25	✓							☆☆☆☆☆
	RG 26	✓							☆☆☆☆☆
	RG 27	✓	✓		✓	✓	✓	✓	★★★★★
	RG 28	✓							☆☆☆☆☆
	RG 29	✓							☆☆☆☆☆
	RG 30	✓			✓				★☆☆☆☆

TAB. 6.1 – Résultats des validations¹⁶. Le score final tient compte de l'ensemble des tests effectués sur les différents aptamères.

De façon très logique, les phases ultérieures de nos travaux se sont tout d'abord concentrés sur l'aptamère RG 01, que nous avons identifié en premier lieu et dont les caractéristiques perçues lors des phases de validation présentées dans ce chapitre sont raisonnablement intéressantes. L'aptamère RG 09 aurait également mérité un intérêt particulier s'il n'avait eu une longueur rédhibitoire (sa région variable compte 54 acides aminés, voir figure 5.1, p. 120) pour la synthèse peptidique et *a fortiori* l'analyse structurale ultérieure. Nous nous sommes alors très logiquement

15. L'aptamère RG 09 comporte une région variable de 52 acides aminés. De ce fait, et en dépit de ses qualités d'interaction avec RasGAP-SH3, il ne présente qu'un faible intérêt pour l'étude structurale ultérieure, et possède donc un score global inférieur à celui de RG 27.

16. Signification des en-têtes de colonne :

- 2-H l. : double-hybride en levure (TrxH : transfert de l'aptamère dans la thiorédoxine humaine, cf. p. 128),
- Pull-down : pull-down de RasGAP-SH3 (cf. pp. 137-137),
- CFCA : Colony-Forming Chemosensitivity Assay (cf. p. 140),
- Viabilité : tests colorimétriques de viabilité cellulaire après expression des aptamères (cf. p. 138)
- 2-H m. : double-hybride en cellules de mammifère (cf. p. 142).

concentrés sur les meilleurs aptamères issus du crible de la banque de seconde génération, RG 20, 21, 30, et surtout RG 27, ainsi que sur l'aptamère RG 01 de première génération.

En plus de la démonstration de la validité de notre approche et de notre cible, ces étapes de validation sur cultures cellulaires sont particulièrement cruciales dans le cadre de notre démarche. En effet, le caractère combinatoire de la technique des aptamères peptidiques permet l'interrogation des surfaces protéiques¹⁷, et sont capables de reconnaître différents sites de fixation dont la pertinence dans un but thérapeutique n'est probablement pas équivalente. Cette étape nous permet de ne pas poursuivre inutilement des études complexes sur des aptamères ne reconnaissant pas le « bon » site.

17. Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, en montrant que les différents aptamères que nous avons obtenus n'interagissent pas tous sur le même site à la surface de RasGAP-SH3.

Chapitre 7

Synthèse peptidique de régions variables

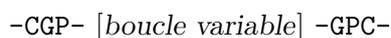
L'objectif de ce chapitre est de décrire les expériences qui nous ont permis, à partir des séquences des régions variables des aptamères, d'obtenir des molécules de plus petite taille, se prêtant plus facilement aux études biophysiques et structurales, et représentant une nette avancée vers la conception de « petites molécules », soit par modification progressive de ces premières molécules, soit par criblage de chimiothèques.

III

7.1 Peptides linéaires et cycliques : hypothèses de travail

La Thioredoxin d'*Escherichia coli*, utilisée comme plate-forme de présentation des régions variables des aptamères dans le système que nous avons mis en œuvre, est une protéine globulaire dont le site actif est constitué par deux Cystéines. L'activité catalytique de cette protéine consiste en la régulation du potentiel oxydo-réducteur intra-cellulaire (Holmgren, 1989). Cette activité est obtenue par réduction/oxydation d'un pont disulfure entre ces deux Cystéines. La protéine native Thioredoxin possède une très courte boucle entre ces deux Cystéines, constituée par la séquence -CGPC-. La structure de la Thioredoxin native a été résolue par RMN dans ses deux états oxydé (pont disulfure entre les deux Cystéines) et réduit (thiols) : même en l'absence du pont disulfure, les deux Cystéines du site actif sont très proches (PDB : Thioredoxin oxydée, 1X0A et réduite, 1X0B, Jeng et al., 1994).

La région variable des aptamères que nous avons sélectionnés est une boucle de 13 à 16 acides aminés insérés précisément au sein de cette boucle, entre les deux Cystéines :



Dans le cas de la banque à 13 acides aminés que nous avons utilisée dans la seconde série d'expériences, les deux Cystéines sont remplacées par des Sérines.

1^{re} hypothèse : L'insertion de la boucle variable ne modifie pas la structure générale de la plate-forme

Nous faisons l'hypothèse que la structure des deux extrémités de la région variable n'est pas trop modifiée. Les distances de ces extrémités sont donc encore suffisamment proches pour que la

contrainte structurale imposée par la Thioredoxin puisse être mimée par une liaison quelconque des deux extrémités de la région variable (par exemple un pont disulfure).

L'insertion de cette région variable ne provoque généralement pas de modification structurale importante de la plate-forme Thioredoxin (Kochoyan & Yang, 2004, résultats non publiés), d'après l'allure des spectres RMN obtenus.

2^e hypothèse : Reconnaissance par la région variable

Nous formulons une seconde hypothèse : la plate-forme de présentation ne joue qu'un faible rôle dans la reconnaissance de RasGAP-**SH3** par les aptamères. Cette hypothèse peut être justifiée par le mode de sélection utilisé, qui compare l'interaction d'aptamères ne différant que par leurs régions variables. Cette hypothèse a été partiellement vérifiée expérimentalement : l'équipe de biologie moléculaire d'*Aptanomics* a pu montrer que le remplacement de la Thioredoxine bactérienne par son paralogue humain (dont la similarité est relativement faible) n'altère pas la reconnaissance du domaine **SH3** par la boucle variable de l'aptamère RG 27 (cf. p. 128). De cette hypothèse découle qu'un peptide synthétique composé uniquement de la région variable de l'aptamère devrait interagir de façon similaire à l'aptamère entier avec RasGAP-**SH3**.

3^e hypothèse : Cyclisation / peptide linéaire

La contrainte conformationnelle imposée par la Thioredoxin sur la structure de la boucle variable des aptamères joue obligatoirement un rôle important dans la reconnaissance du domaine **SH3** par l'aptamère. Notre objectif étant dans un premier temps de nous séparer de la Thioredoxin pour obtenir des peptides de faible taille, nous formulons l'hypothèse qu'une cyclisation des extrémités d'un peptide de même séquence que la région variable d'un aptamère, permettra d'obtenir une molécule ayant des propriétés similaires à l'aptamère entier.

La cyclisation de peptides est une technique fréquemment utilisée pour obtenir des mimes de fragments protéiques, car elle permet de contraindre ces fragments à adopter une conformation préférentielle. Notamment, cette méthode permet de créer des conditions propices à l'établissement de liaisons hydrogène semblables à celles qui structurent les feuillettes β . De plus, la protection des extrémités N- et C-terminales par une cyclisation de type *head-to-tail* (tête à queue) procure une relative protection de ces peptides vis à vis des protéases extra et intra-cellulaires (Shibata et al., 2003).

Les différentes méthodes de cyclisation de peptides ont fait l'objet de nombreuses publications et de plusieurs revues, notamment celles de Lambert et al. (2001) ou de Li & Roller (2002). La cyclisation peut notamment être perçue comme une voie importante de modifications de peptides afin d'en faire des molécules susceptibles d'être utilisées en thérapeutique (voir par exemple Adessi & Soto, 2002).

Concernant notre problème précis et la présence des deux Cystéines mentionnées, nous avons tenté dans un premier temps une cyclisation en créant un pont disulfure entre leurs chaînes latérales. Dans un second temps, et pour obtenir une meilleure stabilité de la cyclisation, nous avons cherché à mimer ce pont disulfure par d'autres types de cyclisations.

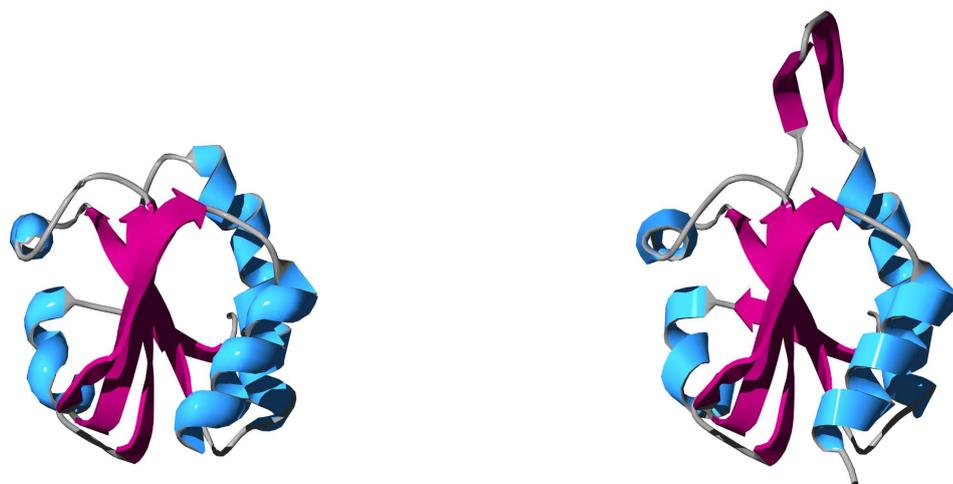


FIG. 7.1 – Thioredoxin native et avec une boucle de 16 acides aminés insérée dans le site actif. A gauche : Structure PDB 1X0A. A droite : figure obtenue par modélisation moléculaire, en remplaçant la boucle -CGPC- par la séquence de la région variable de l'aptamère RG 01.

Nous avons donc proposé différentes cyclisations :

- Pont disulfure : la Thioredoxin native possédant déjà deux Cystéines (susceptibles de former un pont disulfure), nous avons utilisé cette propriété pour construire des peptides cycliques,
- *Head to tail* en utilisant les chaînes principales ou latérales d'acides aminés (Lysine ou Acide Glutamique notamment) pour construire une liaison peptidique supplémentaire cyclisant le peptide,
- Pont thioéther : construction d'une liaison thioéther en utilisant le thiol d'une cystéine et la chaîne latérale d'un autre acide aminé du peptide (Roberts et al., 1998).

III

7.2 Peptides issus de l'aptamère RG01

L'aptamère RG 01 étant le premier que nous avons identifié et possédant une séquence courte (région variable de 11 acides aminés), nous avons synthétisé des peptides correspondant à sa région variable avant d'obtenir d'autres aptamères. Par la suite, après étude des phénotypes d'expression d'une première série d'aptamères, il s'est avéré que RG01 possédait de très bonnes qualités dans ces tests (*cf.* p. 146).

C-LWGISSCELVL-GPC

La région variable (ci-dessus) de cet aptamère (issu de la première banque comprenant normalement des régions variables de 16 acides aminés) est anormalement courte. Cette anomalie provient très certainement de la phase de construction de la banque. De plus, la présence d'une Cystéine au sein de la région variable complique un peu l'étude de cet aptamère. Pour éviter d'éventuels problèmes de formation de dimères de peptides par création de ponts disulfures, nous avons choisi dans un premier temps de remplacer cette Cystéine par une Sérine.

7.2.1 Peptides linéaires

Nous avons synthétisé plusieurs peptides analogues à la région variable de RG01, présentées dans le tableau 7.1. Notamment, nous avons cherché à remplacer la Cystéine interne à la région

variable de cette aptamère, en raison de la faible stabilité de cet acide aminé, aussi bien au cours des étapes de synthèse et purification, qu'au cours des étapes prévues ultérieurement de validation de son affinité et d'étude structurale.

Peptide	Description	Séquence
JS 08	Région variable seule	LWGISS <u>C</u> ELVL
JS 09	Région variable vectorisée (Cystéine mutée en Sérine)	LWGISS <u>S</u> ELVL-Ahx-Penetratin ^a
JS 11	Région variable (Cystéine mutée en Sérine)	LWGISS <u>S</u> ELVL

a. Penetratin est un court peptide de 16 acides aminés, issu de la protéine *Antennapedia* de *Drosophila melanogaster*, qui possède la propriété de faciliter le transport au travers de la membrane plasmique d'une protéine ou d'un peptide qui lui serait lié de façon covalente (Derossi et al., 1994, Chassaing & Prochiantz, 1996, Persson et al., 2004). D'autres peptides permettant la translocation active de molécules à travers la paroi cellulaire ont été décrits (voir par exemple Morris et al., 2001).

TAB. 7.1 – Peptides linéaires issus de RG01

Nous avons utilisé pour obtenir ces produits la synthèse peptidique en phase solide, telle que décrite tout d'abord par Merrifield (1963), et présentée pour notre peptide par la figure 7.2.

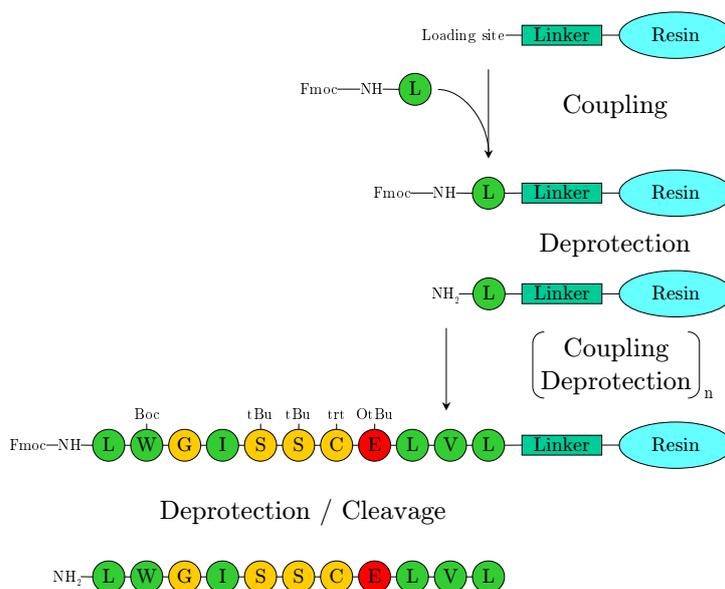


FIG. 7.2 – Synthèse peptidique en phase solide du peptide JS08. Le couplage s'effectue avec HBTU/HOBt (chimie FastMoc™) ou DCC/HOBt (chimie Fmoc classique). La déprotection du groupement Fmoc se fait en utilisant la Pipéridine. La résine que nous avons utilisée est de la résine HMP (résine de Wang). Le suivi de l'avancement de la synthèse est réalisé en utilisant un monitoring UV de la déprotection, par mesure de l'absorbance du solvant contenant le sel de Fmoc (Otterson et al., 1993). L'étape finale de déprotection/clivage est réalisée par action d'un acide fort (détails expérimentaux en annexe, p. 227).

7.2.2 Tentatives de cyclisation

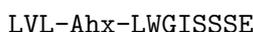
Nous avons tenté deux types de cyclisation « *head-to-tail* » sur résine de peptides issus de RG01. Cette approche a été très largement décrite dans la littérature, avec différentes conditions de cyclisation (voir notamment Bourne et al., 2000, Cudic et al., 2000).

Première tentative : utilisation de l'acide glutamique interne

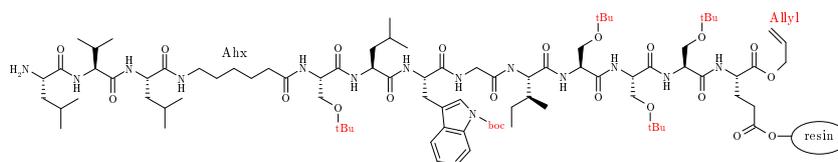
La première tentative a consisté en l'utilisation de la fonction acide de la chaîne latérale de cet acide glutamique interne à la région variable de RG01 pour le greffage sur résine HMP au début de la synthèse peptidique en phase solide.

Pour cette cyclisation, il est nécessaire d'utiliser un troisième type de protection pour la fonction acide de la chaîne principale de cette acide glutamique, orthogonale¹ par rapport aux deux autres types de protection déjà utilisées pour la synthèse peptidique. Nous avons choisi de protéger par un groupement *allyle* la fonction *acide*, sous forme d'*ester d'allyle* (Brase et al., 2003, Guibé, 1998, Seitz & Kunz, 1995, Kates et al., 1993). Cette protection, insensible à l'action de la pipéridine utilisée en chimie *Fmoc*, peut être très simplement retirée sélectivement sous l'action catalytique de Pd(PPh₃)₄, en utilisant le protocole suivant (White et al., 2002) :

- sous argon, ajouter à la résine couplée au peptide protégé allyle, 3 éq. Pd(PPh₃)₄ dissout dans CHCl₃:AcOH:NMP (37:2:1, 15 mg/ml résine),
 - laisser la déprotection se poursuivre pendant au moins 2 heures.
 - laver la résine avec tout d'abord 0,5% DIPEA en DMF, puis avec du sodium diethyldithiocarbamate (0,5 % masse/vol) en DMF,
 - laver la résine avec HOBt en DMF (avant de poursuivre par une cyclisation par exemple).
- Nous avons donc synthétisé le peptide suivant :



avec une protection *allyle* sur la fonction acide de la chaîne principale de l'Acide glutamique en C-ter, et un greffage sur résine par la fonction acide de sa chaîne latérale. En fin de synthèse, après déprotection du groupement *Fmoc* de la Leucine en N-ter, ce peptide a donc l'allure suivante (toujours greffé en C-ter sur la résine), avec de nombreux groupements protecteurs :



Après cette déprotection de la fonction *allyle*, nous avons utilisé différents agents de couplage pour tenter de former une liaison peptidique entre l'amine libre de la Leucine N-terminale et la fonction acide de la chaîne principale. Nous avons réalisé le suivi de ce couplage en utilisant le test de Kaiser et al. (1970). Cependant, malgré l'utilisation d'agents de couplage différents

1. En synthèse chimique, des protections « *orthogonales* » sont des protections que l'on peut cliver indépendamment. Dans le système de synthèse peptidique en phase solide que nous avons utilisé, le couple *Fmoc* / Pipéridine (groupe protecteur / agent de déprotection) est le principal système de protection utilisé. Les autres protections que nous avons utilisées pour les fonctions réactives des chaînes latérales sont principalement les groupements *boc* (lysine, tryptophane), *ter-butyle* (acides aspartique et glutamique, sérine, thréonine), *trityle* (histidine, cystéine, asparagine, glutamine) et *Mtr* (arginine), qui sont acido-labiles. Nous avons placé en annexe B.5.1 une figure présentant ces protections (p. 228).

(BOP/HOBt, HATU/HOBt...), nous ne sommes pas parvenus à réaliser cette cyclisation. L'encombrement stérique des protections restant sur les autres acides aminés du peptide, en plus des contraintes imposées par la porosité du substrat solide (résine) empêchent certainement le repliement du peptide nécessaire à la formation de la cyclisation.

Seconde tentative : ajout d'un acide glutamique

Pour tenter de remédier à cette impossibilité de cyclisation, nous avons proposé d'autres sites de cyclisation, en se basant toujours sur la création sur résine d'une liaison peptidique. Au sein de la Thiorédoxine, la contrainte structurale s'apparente très probablement à un pont disulfure entre deux Cystéines aux extrémités de la boucle variable. Nous avons donc imaginé de mimer ce pont disulfure (figure 7.3) par la formation d'une liaison peptidique entre l'amine de la chaîne principale ou de la chaîne latérale d'une Lysine (remplaçant l'une des deux Cystéines) et la fonction acide d'un acide glutamique (de façon similaire à ce qui a été fait ci-dessus).

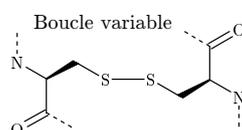


FIG. 7.3 – Pont disulfure entre deux cystéines

Nous avons donc synthétisé le peptide suivant :

KLWGISSSELVLGPE

dérivé de la séquence initiale de la région variable de l'aptamère RG 01 :

CLWGISSCELVLGPC

dans l'objectif de mimer le pont disulfure par une liaison entre deux acides aminés.

Nous avons utilisé des protections différentes pour la lysine N-terminale : Fmoc-Lys(Boc)-OH et Boc-Lys(Fmoc)-OH pour synthétiser deux peptides cycliques de longueurs légèrement différentes.

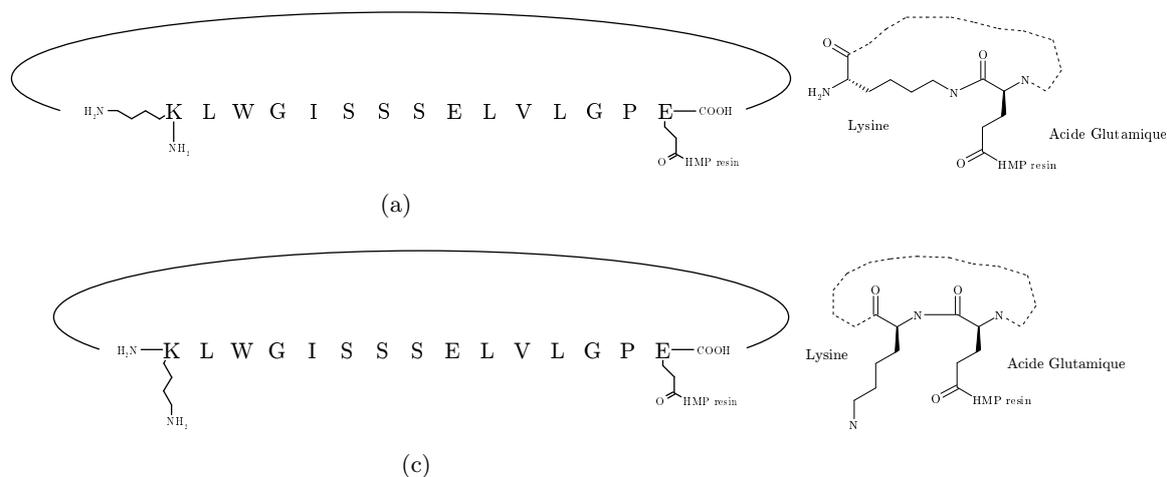


FIG. 7.4 – Deux types de cyclisations du peptide RG 01. Les longueurs de ces deux peptides cycliques sont à comparer avec la cyclisation par pont disulfure.

Cependant, lors de la cyclisation de ces peptides, nous avons à nouveau échoué à obtenir la fermeture du cycle, quels que soient les agents de couplage et les conditions utilisées. Les contraintes structurales sur ce peptide doivent probablement être importantes et empêcher les deux extrémités de se placer à proximité l'une de l'autre pour que la réaction puisse avoir lieu.

7.3 Peptides issus de l'aptamère RG 27

L'aptamère RG 27 possédant les meilleurs qualités d'interaction avec RasGAP-**SH3** (cf. p. 146), nous nous sommes naturellement concentrés par la suite sur la synthèse de peptides issus de sa région variable.

Nous avons d'abord synthétisé des peptides linéaires issus de cet aptamère que nous avons marqués à la fluorescéine (pour permettre la mesure du K_d de son interaction avec RasGAP-**SH3** par anisotropie de fluorescence, voir chapitre 8), avant de chercher à concevoir et à synthétiser des peptides cycliques.

7.3.1 Peptides linéaires

Nous avons synthétisé plusieurs peptides linéaires issus de l'aptamère RG 27, sans grande difficulté. Cependant, les rendements obtenus ont toujours été relativement faibles, en raison très probablement d'une conformation du peptide en cours de synthèse rendant difficilement accessibles les acides aminés à partir de la première Valine (en partant de l'extrémité C-terminale).

Nous avons également retrouvé cette difficulté lors de la synthèse de peptides linéaires destinés à la cyclisation.

La figure 7.5 présente le suivi UV de la synthèse du peptide JS 37, qui dérive directement de la région variable de RG 27. La séquence de ce peptide est :

KGPKWVVS~~H~~ARLMWSFGPE

L'objectif initial de la synthèse de ce peptide est la réalisation d'un peptide cyclique par formation sur résine d'une liaison peptidique entre les chaînes latérales et principales des Lysines et Acides glutamiques des deux extrémités, comme nous l'avons proposé précédemment pour des peptides issus de RG 01.

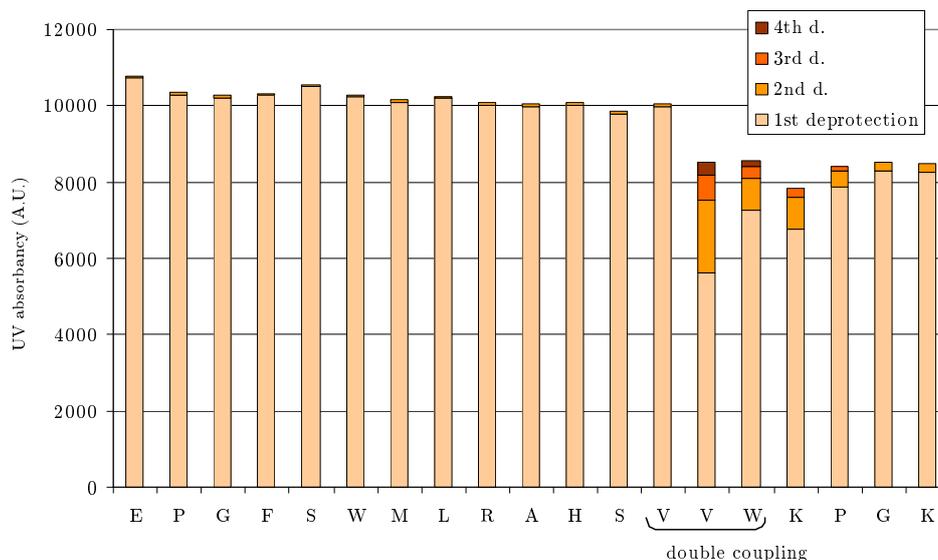


FIG. 7.5 – Suivi UV de la synthèse du peptide JS 37. Les valeurs de l'absorbance UV mesurées au cours des déprotections successives sont portées sur ce graphique. On remarque sur cette figure la forte diminution de l'efficacité de la première déprotection, à partir du 14^e acide aminé couplé sur le peptide.

III

Au cours de la synthèse peptidique (qui est réalisée en commençant par les acides aminés C-terminaux) de différents dérivés de l'aptamère RG 27, nous avons fréquemment remarqué la difficulté de l'avancement de la synthèse au niveau des Valines. Pour la synthèse du peptide JS 37 dont le suivi UV est présenté ici, nous avons tenté d'améliorer cette synthèse en utilisant les conditions suivantes :

- protocole de couplage en chimie DCC/HOBt,
- suivi UV de la déprotection des groupements Fmoc avec *feedback* : en cas de difficulté de déprotection, renouvellement du cycle de déprotection,
- temps de couplages prolongés dans la zone difficile ($\times 3$),
- double couplage des acides aminés incriminés (V, V, W, voir figure 7.5) : c'est à dire que le couplage est réalisé successivement avec deux cartouches contenant chacune 10 équivalents de l'acide aminé,
- *capping* systématique après le couplage de chaque acide aminé, avant déprotection : cette opération consiste à coupler après chaque acide aminé (dont l'amine est protégée par le groupement Fmoc) sur les amines restées libres (couplage non complet) un groupement acétyle par action de l'anhydride acétique (figure 7.6). Cette protection évite que les acides aminés couplés ultérieurement puissent venir se placer sur des fragments non complets.

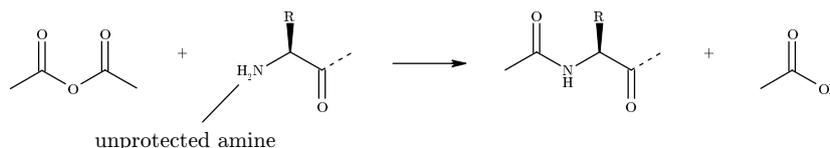


FIG. 7.6 – *Capping* des amines non protégées par l'anhydride acétique

Comme on le voit sur la figure 7.5, les difficultés de synthèse n'ont pas entièrement disparu malgré ces différentes précautions. Cependant grâce au capping systématique, la purification du peptide espéré ne s'est pas révélée trop difficile.

7.3.2 Peptides cycliques

L'aptamère RG 27 ayant montré de très bonnes qualités d'interaction avec RasGAP-SH3, nous nous sommes intéressés à la synthèse de peptides cycliques issus de sa région variable. Nous avons tenté trois types de cyclisation :

- *head-to-tail* par formation d'une liaison peptidique : cette cyclisation sur résine n'ayant pas encore donné de résultat positif et étant en tous points semblable à celle décrite plus haut (p. 154), nous ne la décrivons pas ici,
- cyclisation par pont disulfure,
- cyclisation par pont thioéther.

Cyclisation par formation d'un pont disulfure

Nous avons synthétisé comme exposé précédemment le peptide suivant, dans l'objectif de créer un pont disulfure entre les thiols des chaînes latérales des cystéines :

CGPKWVSHARLMYSFGPC

De nombreuses méthodes sont décrites dans la littérature pour la cyclisation de peptides par création d'un pont disulfure. Certaines des approches décrites font appel à une cyclisation sur résine (Berezhkovskiy et al., 1999, Albericio et al., 1991, García-Echeverría et al., 1989) ou en solution (Berezhkovskiy & Deshpande, 2000, Garay et al., 2000, Tam et al., 1991).

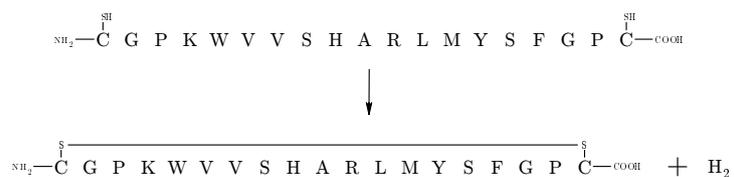
Nous avons choisi pour la simplicité de sa mise en œuvre une technique de cyclisation en solution, par action oxydante de l'oxygène présent dans l'air, en conditions basiques et à très faible concentration de peptide.

Après déprotection, clivage et purification sur HPLC, nous avons alors réalisé la cyclisation proprement dite, en phase liquide à très faible concentration, pour éviter au maximum la formation de complexes intermoléculaires, et favoriser la formation du pont disulfure intramoléculaire.

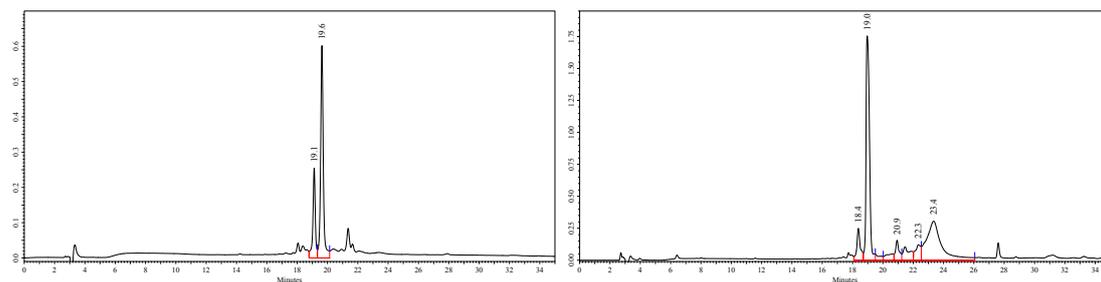
Très simplement, nous avons placé le peptide linéaire, préalablement solubilisé dans du méthanol (environ 5 mg dans 200 mL), en conditions basiques (à l'aide de faibles quantités de tampon hydrogénocarbonate d'ammonium $\text{NH}_4^+/\text{HCO}_3^-$ 0,1 M) et en présence d'oxygène apporté par l'air ambiant bulle à bulle dans la solution. Nous avons alors réalisé un suivi par HPLC de la cyclisation, en fin de réaction (environ 5 heures après ajout du tampon basique). Après évaporation du méthanol et lyophilisation, nous avons pu obtenir seulement environ 1 mg de peptide cyclique pur (à partir de 5 mg de peptide linéaire).

La figure 7.7 présente les résultats de l'analyse par HPLC des produits de cette cyclisation. Sur la figure 7.7(d), on voit nettement que le peptide cyclique pur a une rétention sur colonne C_{18} différente du peptide linéaire.

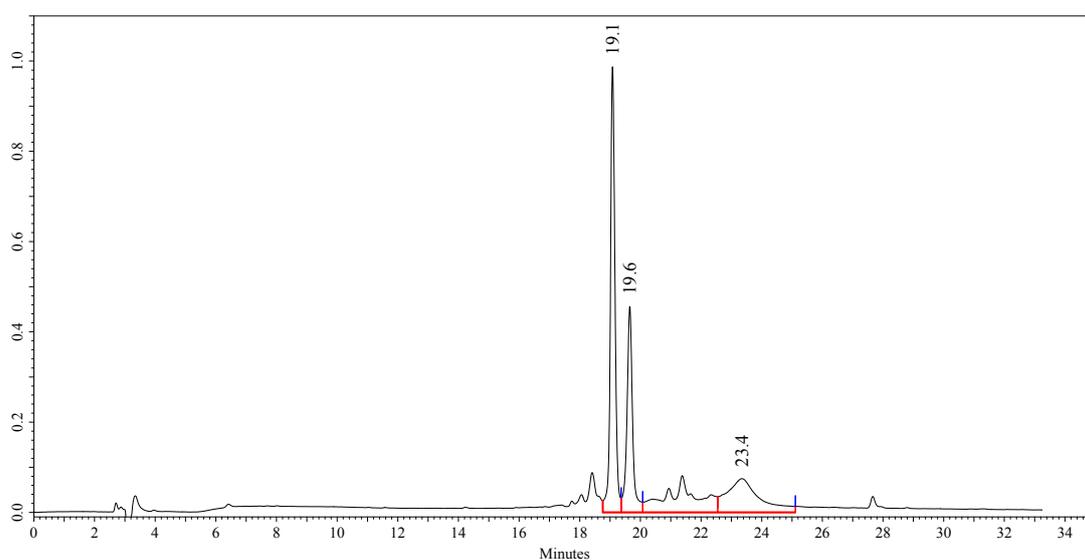
Nous avons également vérifié par spectrométrie de masse l'identité des produits obtenus, et montré que les peptides cycliques et linéaires avaient bien une différence de m/z de 2, correspondant aux deux protons dont le départ permet la formation du pont disulfure, selon l'équation réactionnelle suivante :



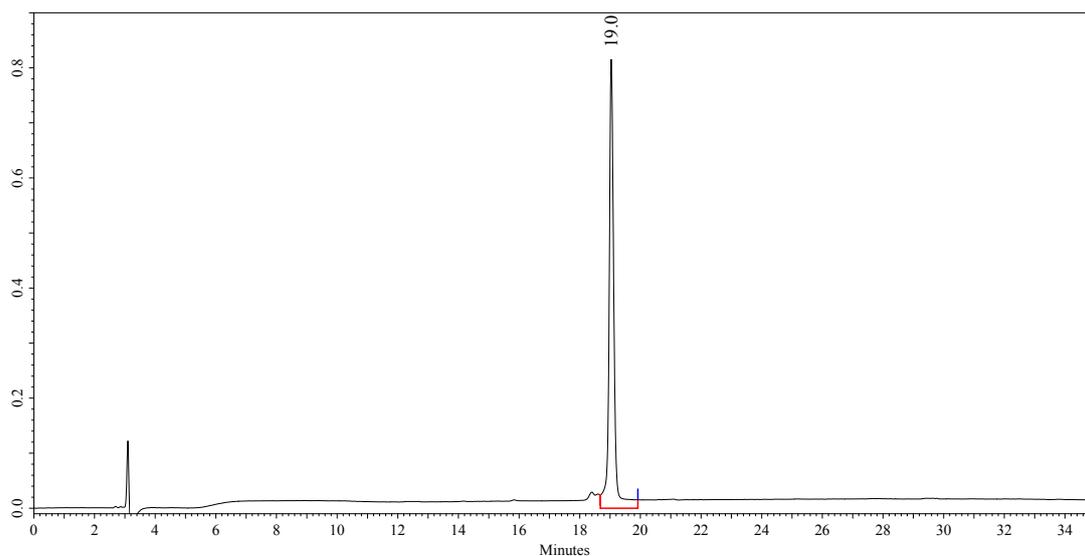
Le rendement de cette cyclisation est donc très faible, et la relative fragilité de la liaison disulfure nous a conduit à rechercher d'autres méthodes de cyclisation. Cependant, on peut toutefois noter que cette expérience est relativement facile à mettre en œuvre (très peu d'étapes après la synthèse peptidique).



(a) **Peptide linéaire** après purification (le second produit minoritaire, apparu au bout de quelques heures en solution est probablement le peptide cyclique) (b) **Peptide après cyclisation**, avant purification



(c) **Co-injection** de 7.7(a) et 7.7(b)



(d) **Peptide cyclique** après purification

FIG. 7.7 – Cyclisation du peptide issu de la région variable de RG27. Le peptide linéaire est élué à 63,0% **B**, le peptide cyclique à 61,4% **B**. Chromatogrammes HPLC (colonne C18), gradient $[10 \xrightarrow{5 \text{ min}} 25 \xrightarrow{30 \text{ min}} 90\% \text{ B}]$ (A : 100% H₂O, 0,1% TFA ; B : 30% H₂O, 70% CH₃CN, 0,1% TFA)

Chapitre 8

Évaluation des affinités des peptides synthétisés

L'objectif de ce chapitre est de présenter les résultats des mesures d'affinité (obtenus principalement par mesure d'anisotropie de fluorescence) entre le domaine **SH3** de RasGAP et les peptides synthétiques présentés au chapitre précédent.

Ce chapitre va donc logiquement commencer par une présentation rapide de la technique de production du domaine **SH3** par expression bactérienne et purification, avant de présenter les résultats de ces mesures d'affinités. Enfin, nous présentons brièvement les résultats que nous avons également obtenus par spectroscopie par corrélation de fluorescence, qui complètent l'étude par anisotropie de fluorescence.

III

8.1 Expression et purification du domaine **SH3** de RasGAP

Les études structurales et biophysiques nécessitent de pouvoir produire en grandes quantités le domaine **SH3** de RasGAP recombinant, avec le moins possible de différences entre le domaine **SH3** tel qu'il se présente au sein de la protéine endogène et la protéine recombinante obtenue. Notamment, il était impératif que le domaine purifié soit de la taille la plus faible possible pour faciliter l'interprétation des spectres RMN.

8.1.1 Le vecteur d'expression

Nous avons retenu le système d'expression constitué par le vecteur pT7-7, qui permet une forte expression du transgène inséré dans son site de clonage, fusionné avec six Histidines en C-terminal. Après clonage dans ce vecteur, le domaine **SH3** est donc allongé de neuf acides aminés (une Méthionine en N-ter, deux acides aminés : Leucine et Glutamine, qui constituent le site de clonage en C-ter, et enfin les six Histidines). La séquence de ce domaine SH3 exprimé a déjà été présentée (figure 4.6, p. 85)¹.

Nous avons également sous-cloné dans ce vecteur le mutant **SH3**^{W317K}, qui nous a servi ultérieurement d'outil de comparaison pour les expériences de biophysique.

1. MEDRR RVRAI LPYTK VPDTD EISFL KGDMF IVHNE LEDGW MWVTN LRTDE QGLIV EDLVE EVGRE EDPHE GKILQ
HHHHH H

8.1.2 Expression et purification

Le sous-clonage du domaine **SH3** a été réalisé dans des bactéries *E. coli* DH5 α . Pour la production de la protéine recombinante, le vecteur est transféré dans des bactéries *E. coli* BL21(DE3)-T1^R².

L'expression a été réalisée en milieu LB classique, avec induction IPTG (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pendant 4h. Après centrifugation et lyse, nous avons procédé à une première vérification de la présence des protéines (figure 8.1).

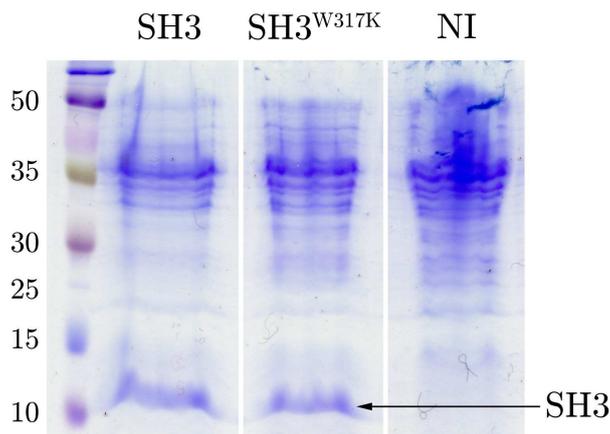


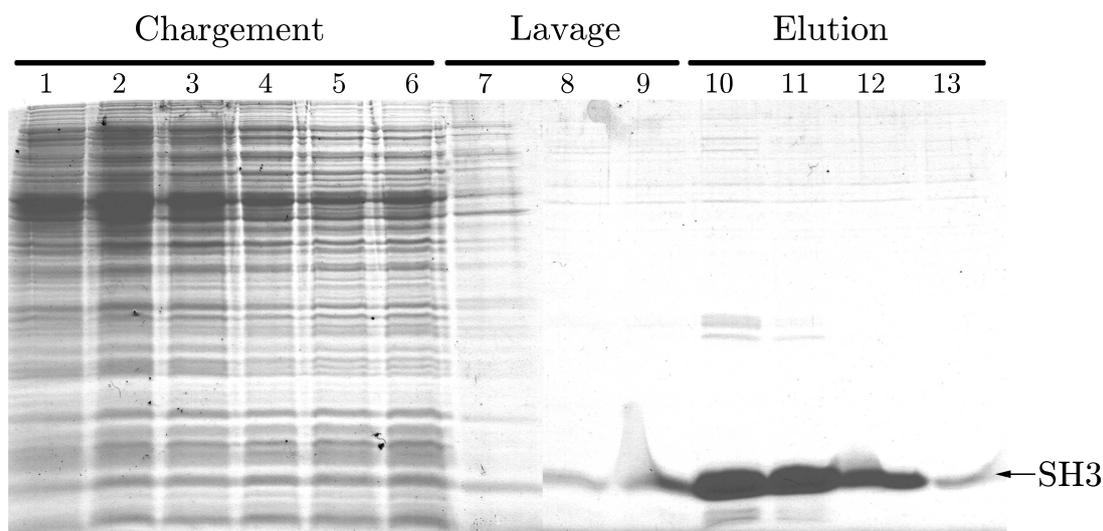
FIG. 8.1 – Vérification de l'expression de RasGAP-**SH3**

Le domaine **SH3** de RasGAP semble migrer à environ 12 kDa , ce qui est légèrement supérieur à la masse attendue (9676,8 Da).

Nous avons ensuite purifié le lysat cellulaire en utilisant une colonne nickel-agarose³, en utilisant pour l'élution un gradient de 10 à 300 mM d'imidazole (figure 8.2). L'élution de RasGAP-**SH3** intervient à environ 120 mM d'imidazole.

2. BL21(DE3)-T1^R (Sigma, St. Louis, MO, USA) est une souche bactérienne déficiente pour deux protéases *lon* et *ompT*. Cette souche exprime également l'ARN polymérase T7, sous contrôle du promoteur *lacUV5*. L'induction de ce promoteur issu de *Lactococcus lactis* peut être réalisée par l'ajout d'IPTG dans le milieu de culture.

3. HIS-Select™ 1.25ml Cartridge, Sigma H8286

FIG. 8.2 – Purification de RasGAP-**SH3**

Les fractions 10, 11 et 12 contiennent le domaine **SH3** relativement pur (> 90%, d'après analyse SDS-PAGE d'un nouveau dépôt).

Après dosage Bradford et spectrophotométrique (extinction molaire⁴ : $\epsilon_{280} = 12660 M^{-1} \cdot cm^{-1}$), nous avons pu évaluer le rendement à 1 – 2 mg pour 500 mL de LB.

III

8.2 Principe de la mesure d'affinité par polarisation de fluorescence

8.2.1 La polarisation de fluorescence

Le principe de cette expérience repose sur des travaux anciens (notamment ceux de Perrin, 1926) portant sur la durée de vie de l'état excité des molécules fluorescentes, et sur la polarisation de l'onde excitatrice et émise par des molécules fluorescentes. Ce principe est illustré par la figure 8.3.

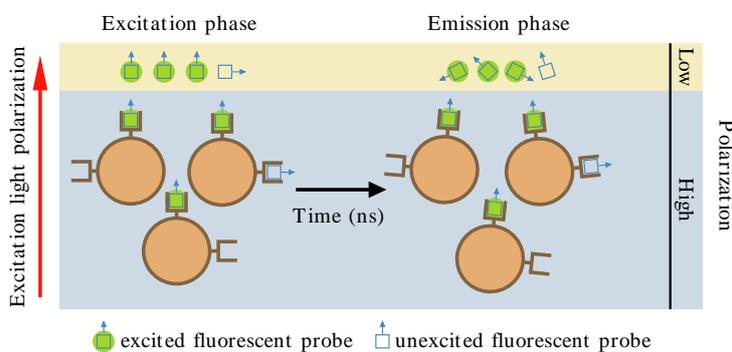


FIG. 8.3 – Principe l'expérience de polarisation de fluorescence (d'après Molecular Probes (2004a))

4. Calculée à l'aide du logiciel ProtParam www.expasy.org/tools/protparam.html

Schématiquement, on peut considérer que seuls les fluorophores orientés « parallèlement » au plan de polarisation de l'onde excitatrice sont excités, et restent excités pendant un temps τ (durée de vie moyenne de l'état excité, caractéristique du fluorophore considéré). Pendant cet intervalle de temps, le fluorophore peut se déplacer et changer d'orientation, en raison de l'agitation thermique, qui elle-même dépend directement du volume moléculaire V de la molécule marquée par ce fluorophore. Plus ce volume moléculaire est important, plus la rotation qui peut avoir lieu pendant cet intervalle de temps τ , est faible. L'onde émise lors du retour à l'état normal du fluorophore est polarisée suivant un plan lié à son orientation. L'état de polarisation suivant la direction parallèle à l'onde excitatrice de la fluorescence émise représente donc une moyenne des orientations *après le mouvement* pendant le temps τ des fluorophores qui étaient convenablement orientés *avant leur mouvement*.

8.2.2 Aspects expérimentaux et méthodologiques

Plus pratiquement, l'expérience consiste à exciter un fluorophore porté par une petite molécule (typiquement le ligand dont on cherche à mesurer l'affinité) avec un rayonnement λ_{exc} polarisé. On mesure ensuite les intensités du rayonnement de fluorescence λ_{em} à travers deux filtres polarisants dont les plans de polarisation sont placés parallèlement et perpendiculairement au plan de polarisation du rayonnement d'excitation. Les intensités suivant ces deux plans de polarisation sont notées respectivement F_{\parallel} et F_{\perp} .

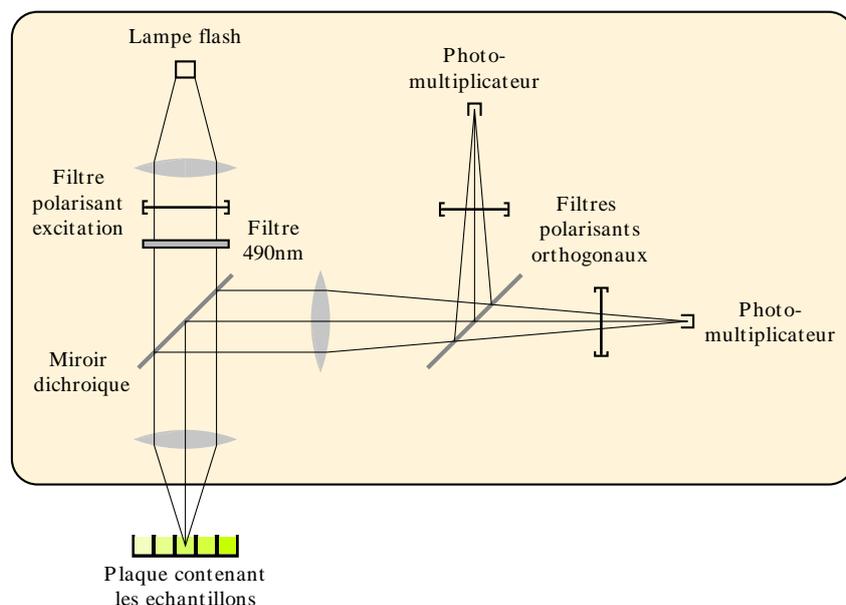


FIG. 8.4 – Dispositif de mesure de la polarisation de fluorescence, semblable à celui que nous avons utilisé. L'appareil Perkin Elmer Envision™ utilisé ne dispose que d'un photomultiplicateur, qui sert donc aux deux mesures suivant les plans de polarisation parallèle et perpendiculaire, avec un échange motorisé des filtres polarisants à chaque mesure. Ce schéma est largement simplifié et ne présente pas les différents systèmes de contrôle qui sont présents dans l'appareil.

On peut dès lors calculer deux grandeurs adimensionnelles quasiment équivalentes P (polarisation) et A (anisotropie). Ces grandeurs représentent toutes deux l'état de polarisation du rayonnement émis par le fluorophore.

$$P = \frac{F_{\parallel} - F_{\perp}}{F_{\parallel} + F_{\perp}}$$

$$A = \frac{F_{\parallel} - F_{\perp}}{F_{\parallel} + 2 \cdot F_{\perp}}$$

La théorie du mouvement brownien permet de relier cette polarisation P à la viscosité du solvant η , à la température T , et au volume moléculaire V suivant les relations :

$$\left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3}\right) = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3}\right) \left(1 + \frac{\tau}{\phi}\right)$$

τ étant la durée de vie de l'état excité du fluorophore, et ϕ :

$$\phi = \frac{\eta V}{RT}.$$

La constante P_0 est appelée polarisation fondamentale du fluorophore et est proche du maximum théorique de 0,5 pour la plupart des molécules utilisées en biologie (fluorescéine, rhodamine...).

P est physiquement compris entre $-0,33$ et $0,5$, et on utilise le sous-multiple au $1/1000^e$ noté mP .

||| *Nous avons placé en annexe B.6.1 (p. 229) quelques détails concernant les méthodes permettant d'utiliser cette mesure d'anisotropie de fluorescence pour obtenir des mesures d'affinité.*

III

8.3 Résultats obtenus

8.3.1 Molécules utilisées dans les interactions

Domaine SH3 recombinant

Pour ces études par anisotropie de fluorescence, nous avons utilisé le système d'expression décrit dans la section 8.1. Le domaine **SH3** produit comporte donc un tag *His*₆. Nous avons également produit un mutant du domaine, le tryptophane *W*₄₃ muté en lysine. La séquence de ce domaine est présentée dans l'introduction (section 4.6, p. 85).

Peptides fluorescents

Nous avons synthétisé en phase solide des peptides fluorescents, en couplant à leur extrémité N-terminale⁵ un dérivé de la fluorescéine (le dérivé éthyl ester activé pour son utilisation en couplage sur peptide, présenté sur la figure 8.5(b), voir [Lohse et al., 1997](#)) couplé à un acide amino-hexanoïque (qui apporte de nombreux degrés de liberté supplémentaires et qui joue donc un rôle d'espaceur).

5. Ce couplage du fluorophore et de son espaceur, réalisé sur résine, avant clivage et purification, garantit un taux de marquage du peptide de 100% parfaitement maîtrisé. Cette technique est donc nettement plus fiable que le marquage habituellement réalisé sur protéines purifiées, réalisé par activation du fluorophore et couplage sur différents sites réactifs à la surface de la protéine, où les sites et taux de couplage ne sont donc pas maîtrisables, ce qui peut induire une relative incertitude sur les mesures réalisées ensuite et sur leur reproductibilité.

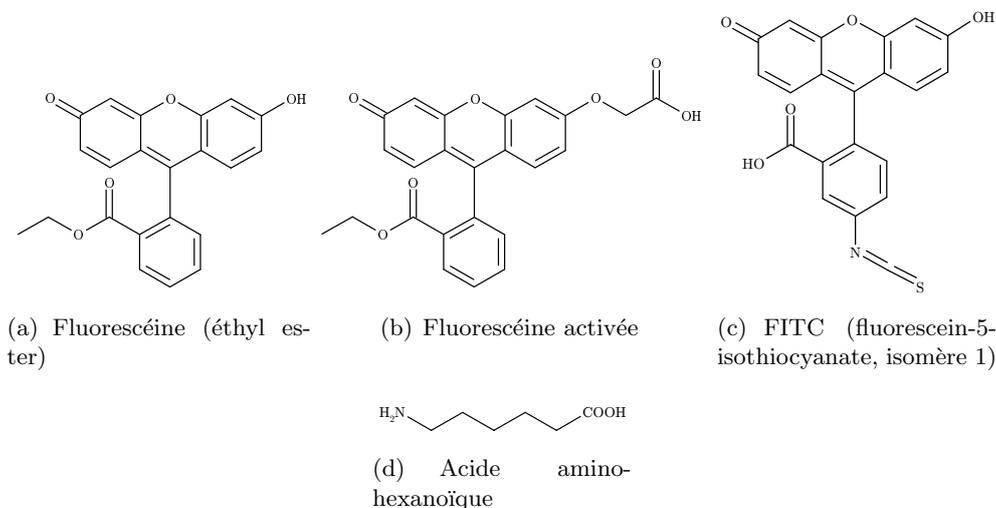


FIG. 8.5 – Différents analogues de la fluorescéine, ainsi que l'acide amino-hexanoïque (que nous avons utilisé comme espaceur, pour séparer le fluorophore de la région « active » du peptide).

Les caractéristiques de fluorescence de la fluorescéine FITC sont présentées dans le tableau 8.1. L'analogue de la fluorescéine que nous avons utilisé (fluorescéine éthyl ester activée, figure 8.5(b)) a des caractéristiques proches (Lohse et al., 1997).

λ_{exc}	490 nm
ϵ_{max}	$10^5 L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$
λ_{em}	517 nm
η	0,8
τ	3,5 ns

TAB. 8.1 – Caractéristiques de fluorescence de la fluorescéine FITC

Peptides non fluorescents

Différents peptides non fluorescents, synthétisés d'après des régions variables d'aptamères sont également testés par compétition de l'interaction d'un peptide fluorescent de référence.

Protéines compétitrices

Nous avons également étudié l'interaction de **RasGAP-SH3** avec différentes protéines purifiées, également par compétition d'interaction. Notamment, nous avons tenté de mesurer par compétition les affinités des aptamères RG 01 et RG 27, mais également de la protéine Aurora-B⁶ recombinante pour le domaine **SH3** de RasGAP.

8.3.2 Mesures de K_d

Nous avons tout d'abord effectué une première série de mesures d'anisotropie de fluorescence sur un polarimètre à haute sensibilité Panvera/Invitrogen Beacon 2000, au Centre de Biochimie

6. Upstate, Lake Placid, NY, USA

Structurale de Montpellier, qui ont permis de définir les ordres de grandeur des affinités des premiers peptides synthétisés issus de régions variables d'aptamères. Ce polarimètre ne permettant qu'une lecture à la fois, dans un tube en verre optique et dans un volume d'échantillon relativement important (200 μL), dans un second temps, nous avons utilisé un lecteur de plaques Envision (Perkin Elmer) permettant une mesure de polarisation de fluorescence dans des plaques « standard » de 96 ou 384 puits (avec possibilité d'évolution jusqu'à 1536 puits), dans un volume de moins de 15 μL .

D'autres précisions expérimentales sont présentées en annexe (p. 229).

Exemple de mesure de K_d par interaction simple

La figure 8.6 présente les résultats d'expériences de détermination de K_d réalisées avec les peptides SP 02 et SP 08, qui sont tous les deux des peptides fluorescents, dérivés de l'aptamère RG 27. Le peptide SP 08 a en fait la même séquence peptidique que le peptide SP 02 : Fluorescéine-Ahx-CGPKWVVSARLYSFGPC, mais le peptide SP 08 a été cyclisé par formation d'un pont disulfure entre les chaînes latérales de ses cystéines.

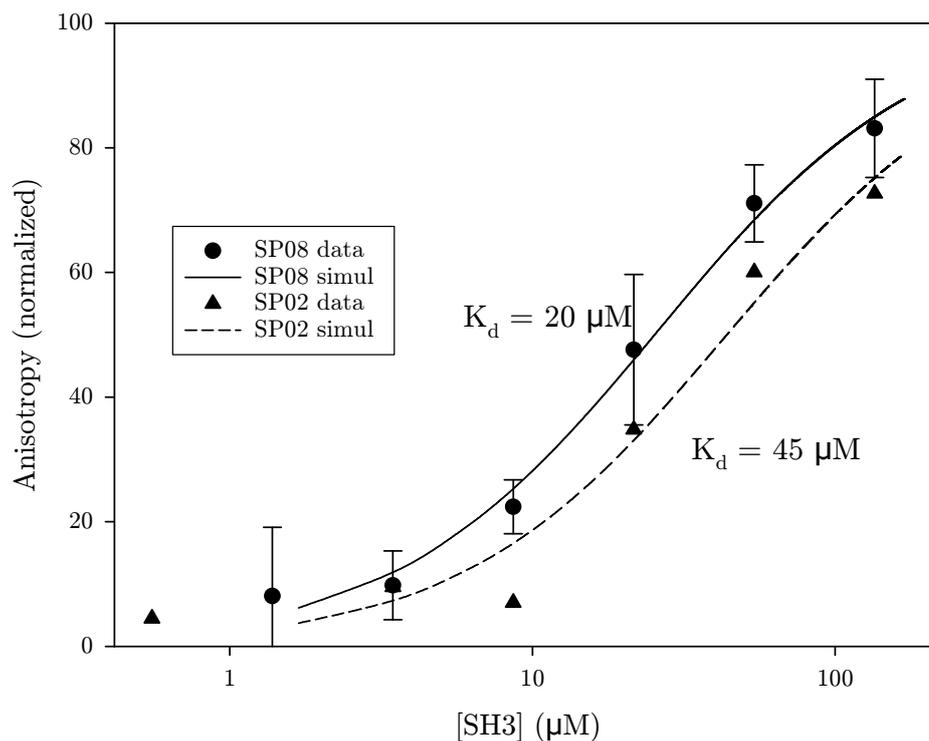


FIG. 8.6 – Interaction **SH3** / peptides issus de RG27

Cette expérience nous a permis de calculer les affinités respectives des deux peptides pour le domaine **SH3** de RasGAP :

- Complexe **SH3** / SP 02 : $K_d \approx 45 \mu\text{M}$,
- Complexe **SH3** / SP 08 : $K_d \approx 20 \mu\text{M}$.

Oxydation du pont disulfure Cette différence de K_d nous semble significative, d'autant plus que nous avons renouvelé plusieurs fois cette expérience. De plus, nous pensons que la cyclisation par pont disulfure est rapidement dégradée lors de l'ajout du domaine **SH3** purifié, très probablement par certaines protéines présentes à l'état d'impuretés et provenant du lysat bactérien d'expression du domaine **SH3**. Ainsi, nous ne mesurons probablement pas l'affinité du peptide cyclique SP 08 mais d'un mélange de ce peptide cyclique (qui a donc une bien meilleure affinité pour ce **SH3**) et du peptide linéaire (voir p. 183 la suite de cette discussion suite à des expériences RMN).

Exemple de mesure de K_d par compétition

La figure 8.7 présente les résultats d'une expérience de mesure d'affinité par compétition d'interaction. Le peptide JS 21 fluorescent est utilisé ici comme ligand de référence, dont l'interaction avec le domaine **SH3** est déplacée par un second peptide, JS 15 dont on cherche à estimer l'affinité.

Nous avons préalablement estimé le K_d du complexe **SH3**·JS 21 à environ $145 \mu M$.

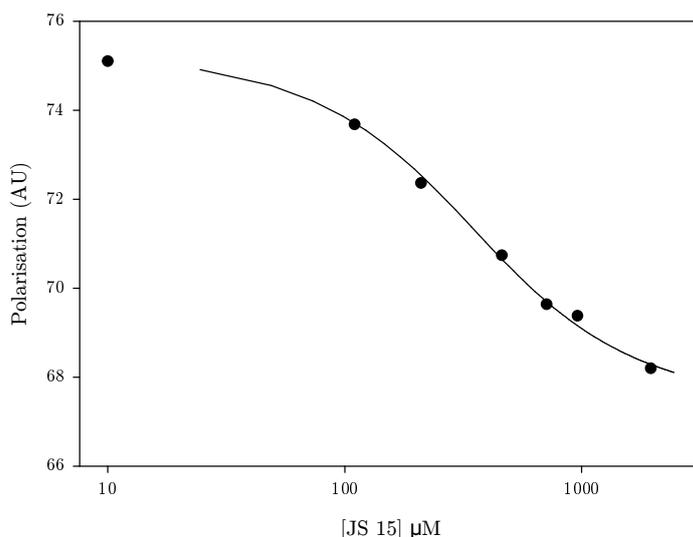


FIG. 8.7 – Compétition de l'interaction du peptide JS 21 (fluorescent) avec le domaine **SH3** de RasGAP, par le peptide JS 15 (non fluorescent). La concentration du peptide JS 21 est constante à $30 nM$, celle de RasGAP-SH3 est également constante à $100 \mu M$

Tableau récapitulatif des mesures d'affinité obtenues

Le tableau 8.2 présente les résultats obtenus sur l'ensemble des peptides synthétisés à partir de régions variables d'aptamères. Les valeurs indiquées sur ce tableau résultent de plusieurs expériences, et présentent les ordres de grandeurs des affinités.

<i>Apt.</i>	<i>Modif.</i>	<i>Peptide</i>	K_d (μM)
RG 01		JS 09 Antennapedia-Ahx-LWGISSSELV	> 1000
RG 20	-----	JS 18 QHLTRGSPEFYHV	> 1000
		JS 17 GSPEFYHV	
RG 28	C4S	JS 19 EGACPWEVRRLLRF	> 1000
		JS 20 EGASPWEVRRLLRF	
RG 26	-----	JS 16 ASTFPKPPRFYHV	\approx 200
		JS 21 ⁷ Fluo-Ahx-ASTFPKPPRFYHV	
		JS 15 KPPRFYHV	
RG 30	C10S	JS 31 GVAPWGTTTSRRF	\approx 100
		JS 32 Fluo-Ahx-GVAPWGTTTSRRF	
RG 27	linéaire	JS 35 KWVVS HARLMYSF	\approx 70
		SP 02 Fluo-Ahx-CGPKWVVS HARLMYSFGPC	
	cyclique	SP 10 CGPKWVVS HARLMYSFGPC	\approx 8 ⁸
		SP 08 Fluo-Ahx-CGPKWVVS HARLMYSFGPC	\approx 1

TAB. 8.2 – Résultats des mesures d’affinité par anisotropie de fluorescence obtenues avec des peptides synthétiques. La plupart des mesures de K_d de peptides non fluorescents a été réalisée par compétition d’interaction en utilisant le peptide fluorescent JS 21 comme compétiteur de référence.

Nous n’avons pas noté de différences significatives entre peptides fluorescents et non fluorescents dérivant du même aptamère, ce qui semblerait indiquer que le couplage de la fluorescéine n’introduirait pas trop de gêne stérique.

De façon similaire, nous avons synthétisé des fragments correspondant à une partie du motif conservé présenté p. 125 : P-x-x-Y. Ainsi, les peptides de 8 acides aminés JS 15 (KPPRFYHV) et JS 17 (GSPEFYHV), issus respectivement de RG 26 et RG 20, possèdent la même affinité que les peptides plus longs JS 16 et JS 18, correspondant à l’intégralité de la région variable. Ceci peut certainement s’expliquer par le fait que seules ces sous-parties de la région variable sont réellement impliquées dans l’interaction avec RasGAP-**SH3**.

Concernant les différentes protéines dont nous avons mesuré l’affinité par compétition de l’interaction **SH3**-JS 21, les résultats sont les suivants :

- aptamère RG 01 : $K_d \approx 100 \mu M$
- aptamère RG 27 : K_d non mesurable
- Aurora-B : K_d non mesurable

Les mesures que nous avons réalisées sur l’aptamère RG 27 et sur Aurora-B ne nous ont pas permis d’évaluer précisément leur affinité pour le domaine **SH3** de RasGAP. En effet, lors de l’ajout de ces protéine au complexe **SH3**-JS 21, nous n’avons pas observé une décroissance de la polarisation de fluorescence (qui accompagne normalement la dissociation du complexe par un compétiteur, cf. figure 8.7). La fixation de l’aptamère RG 27 et de Aurora-B sur RasGAP peut donc se faire sans dissociation du complexe

7. Nous avons également évalué l’affinité de ce peptide JS 21 pour le mutant **SH3**^{W43K}, qui semble être de l’ordre du millimolaire, ce qui confirme les résultats des expériences de mutagenèse.

8. Bien que la figure 8.6 indique un K_d de $20 \mu M$ pour l’interaction SP 08/**SH3**, nous estimons qu’une large part du peptide SP 08 n’est plus cyclisé lorsque nous réalisons la mesure, et donc que cette expérience sous-estime largement l’affinité de ce peptide. Ceci est également confirmé dans le chapitre suivant, p. 183.

8.4 Spectroscopie par corrélation de fluorescence

8.4.1 Objectifs

Les expériences de mesures d'affinité par anisotropie de fluorescence du premier peptide fluorescent que nous avons synthétisé (JS 21) ayant donné des résultats montrant une faible affinité (de l'ordre de quelques centaines de μM), nous avons recherché une démonstration plus « directe » de l'interaction **SH3**-peptide JS 21.

Pour cela, nous avons pu utiliser les installations du Centre de Biochimie Structurale de Montpellier, qui dispose d'une chaîne optique permettant de réaliser une expérience de spectroscopie par corrélation de fluorescence (FCS *Fluorescence Correlation Spectroscopy*, Elson & Magde, 1974, Magde et al., 1974, Ponder & Elson, 2004).

Le dispositif expérimental que nous avons utilisé est donc tout à fait semblable à celui décrit par Margeat et al. (2001) :

- Excitation biphotonique : laser Titane-Saphire bloqué en mode femto-seconde à 780 nm, pompé par un laser Nd:YVO₄ doublé intracavité,
- Microscope : Zeiss Axiovert 200, objectif Plan Achromat $\times 63$ à huile,
- Détection : APD (*avalanche photodiode*) couplé à une carte d'acquisition sur PC.

8.4.2 Principe expérimental

Cette expérience consiste à réaliser une excitation du fluorophore dans un très faible volume, de l'ordre du femtolitre ($\sim 10^{-15} L$, tel qu'avec une forte probabilité, il n'y ait au maximum qu'une molécule fluorescente éclairée) à l'aide d'un laser bi-photonique⁹, au travers de l'optique d'un microscope (Edman, 2000, Schwille et al., 1999, Craenenbroeck & Engelborghs, 1999, Berland et al., 1995). Les photons émis par le fluorophore lors de sa désexcitation sont comptés toujours au travers de ce microscope. Durant la durée de vie de l'état excité du fluorophore, le peptide greffé diffuse dans le milieu et a donc une certaine probabilité de sortir du volume focal du microscope, cette probabilité dépendant directement du coefficient de diffusion du peptide (figure 8.8).

9. L'excitation bi-photonique consiste à utiliser un laser émettant à des photons de longueur d'onde double de celle nécessaire à exciter le fluorophore choisi. Dans le volume focal du microscope, ces photons peuvent se combiner pour former un photon de longueur d'onde moitié, qui peut exciter le fluorophore. Cette technique a l'avantage de ne pas exciter le fluorophore en dehors du volume focal, et donc de ne pas générer de fluorescence parasite d'arrière plan.

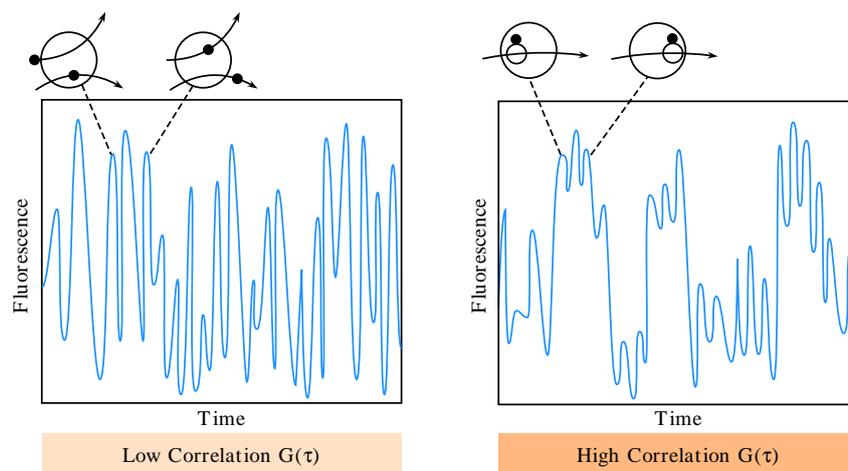


FIG. 8.8 – Principe de la spectroscopie par corrélation de fluorescence (d'après [Molecular Probes, 2004b](#)).

|| En annexe B.6.2 (p. 232), nous avons détaillé les calculs permettant de relier corrélation de fluorescence et coefficient de diffusion.

8.4.3 Résultats

La figure 8.9 présente les résultats des mesures de corrélation de fluorescence.

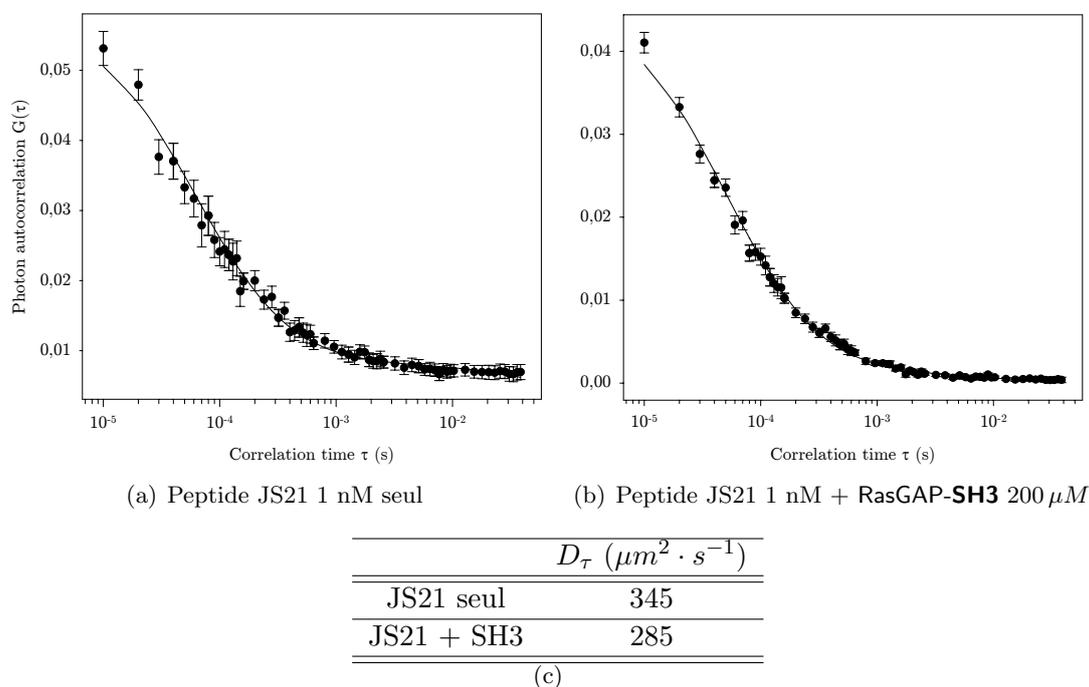


FIG. 8.9 – Autocorrélations mesurées pour l'étude de la fixation du peptide JS 21 sur le domaine SH3 de RasGAP, et coefficients de diffusion D_{τ} .

Nous avons d'abord mesuré par FCS la corrélation de fluorescence du peptide JS 21 seul

(figure 8.9(a)).

Après ajout du domaine **SH3** de RasGAP dans l'échantillon, nous avons pu constater, après une nouvelle mesure de la corrélation de fluorescence (figure 8.9(b)), une augmentation du coefficient de diffusion du peptide JS 21. Cette expérience nous a donc permis de renforcer, par une technique sensiblement différente de la mesure d'anisotropie de fluorescence, la démonstration de la fixation du peptide JS 21 (tableau 8.9(c)).

Conclusion du chapitre 8

Ce chapitre nous a donc permis d'obtenir un ordre de grandeur des affinités pour le domaine **SH3** de RasGAP des peptides linéaires et cycliques, synthétisés à partir des aptamères, et donc de confirmer les différentes hypothèses formulées.

Ainsi, nous avons notamment apporté la preuve que la cyclisation de peptides issus de régions variables est une approche pertinente pour mimer les interactions des aptamères peptidiques. De plus, la simplicité de la mise en œuvre de l'expérience de mesure d'affinité par anisotropie de fluorescence en fait une étape très importante dans la validation des molécules que l'étude structurale présentée dans le chapitre suivant nous permettra de concevoir.

Chapitre 9

Analyse structurale des complexes **SH3**-peptides issus d'aptamères

*Ce chapitre décrit la dernière phase des travaux réalisés, qui tente de tisser des liens sur des bases structurales entre les différents résultats obtenus. Son objectif est de proposer une explication rationnelle aux différences d'affinités en étudiant les sites de fixation des différents peptides que nous avons pu tester. Dans un premier temps, nous avons cherché à compléter et confirmer les informations obtenues par mutagenèse dirigée, pour définir précisément le (ou les) site(s) d'interaction des aptamères à la surface du domaine **SH3** de RasGAP. Ensuite, nous avons envisagé par modélisation moléculaire les différentes conformations que pouvaient prendre les peptides synthétisés à la surface de RasGAP-**SH3**, pour tenter de proposer des modifications de ces peptides afin de les rendre plus solubles et plus affins.*

Nous avons choisi délibérément la Résonance Magnétique Nucléaire comme technique d'étude structurale des complexes RasGAP-**SH3**/peptides synthétiques issus de régions variables d'aptamères. Ceci s'est imposé étant donné que la structure de ce domaine **SH3** a été résolue en utilisant cette technique. De plus, l'enrichissement isotopique ^{15}N , peu coûteux et relativement facile à obtenir, nous promettait de pouvoir utiliser rapidement (d'autant plus que sa faible taille permet des temps d'acquisition courts) la RMN pour étudier la formation de complexes entre ce domaine **SH3** et ses nouveaux ligands. La RMN permet par exemple de faire une première évaluation de la qualité de la reconnaissance de ces ligands. Enfin, nous avons également choisi cette technique en raison de la difficulté qu'ont éprouvée différentes équipes à obtenir la cristallisation de ce domaine, ce qui n'a toujours pas permis, à l'heure actuelle, la résolution de sa structure à haute résolution par diffraction de rayons X.

9.1 Obtention d'informations structurales par RMN

L'utilisation de la résonance magnétique nucléaire (RMN) en pharmacochimie a fait l'objet de nombreux articles et revues. On peut notamment citer les très brillantes revues de [Pellecchia et al. \(2002\)](#) et de [Heller & Kessler \(2001\)](#).

9.1.1 Expérience RMN 2D hétéronucléaire HSQC $^{15}\text{N}/^1\text{H}$

Principe

Seule l'expérience HSQC $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*, [Bodenhausen & Ruben, 1980](#)), essentielle à notre étude, est décrite. Elle permet de mesurer les déplacements chimiques des atomes d'azote ^{15}N couplés à des protons ^1H , par corrélation du spin de l'azote avec le spin de l'hydrogène proche. Les données provenant de cette expérience sont présentées sur un graphique à deux dimensions, ne possédant pas de symétrie suivant une diagonale, étant donné que les deux axes ne correspondent pas aux mêmes types d'atomes. La séquence d'impulsion caractéristique de cette expérience est présentée sur la figure 9.1.

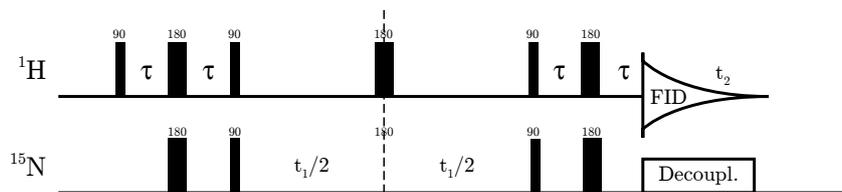


FIG. 9.1 – Séquence HSQC $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ classique

Apparaissent donc sur les spectres à deux dimensions des pics correspondant chacun à un couple d'atomes $^{15}\text{N}/^1\text{H}$. Lorsque l'on étudie des chaînes polypeptidiques par cette expérience, on obtient naturellement un pic par acide aminé correspondant au couple N-H de la chaîne principale (sauf pour les Prolines), et suivant les conditions, un pic pour les N-H de la chaîne latérale des Tryptophanes, et deux pour chacun des deux protons NH_2 de la chaîne latérale des Asparagines et Glutamines.

L'intérêt de cette expérience est notamment de permettre l'étude d'une protéine enrichie en azote 15 en présence de différents ligands non enrichis. Sur les différents spectres obtenus, seuls les signaux de la protéine enrichie en ^{15}N sont présents. La comparaison des spectres obtenus avec ou sans ligand permet d'identifier les acides aminés impliqués dans l'interaction si celle-ci a lieu. En effet, la liaison d'un ligand sur cet acide aminé va modifier les environnements électroniques du couple H/N et donc déplacer son pic sur le spectre HSQC $^{15}\text{N}/^1\text{H}$.

L'ensemble des modifications des pics du spectre HSQC va donc définir une empreinte des différents ligands étudiés sans avoir à attribuer totalement les spectres RMN (en particulier, il n'est pas nécessaire d'attribuer les signaux dus au ligand, qui ne sont pas visibles sur les spectres HSQC s'il n'est pas marqué au ^{15}N). Cette technique peut même être utilisée pour cribler de petites chimiothèques, en enregistrant pour chaque composé le spectre HSQC en présence de la protéine enrichie ciblée ([Meyer & Peters, 2003](#), [Tisné & Dardel, 2002](#)).

Application à nos travaux

En préalable à l'utilisation de cette technique pour l'obtention d'informations structurales concernant les complexes **SH3**/peptides issus d'aptamères, il était nécessaire d'obtenir une attribution complète du spectre HSQC $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ de ce domaine. Pour cela, nous avons utilisé l'expérience 3D hétéronucléaire HSQC-NOESY, qui consiste à ajouter au spectre HSQC 2D une troisième dimension correspondant aux corrélations à longue distance entre protons (NOE, *Nuclear Overhauser Effect*, [Carver & Slichter, 1953](#)). Nous avons ainsi pu attribuer intégralement

les résonances des noyaux d'azote du domaine **SH3** de RasGAP, en nous appuyant sur les attributions des protons qui avaient déjà été réalisées (Yang et al., 1994, cf. annexe D, p. 241).

9.1.2 Résultats

Les figures suivantes présentent les spectres HSQC que nous avons réalisés en collaboration avec MM. Yinshan Yang et Michel Kochoyan, au Centre de Biochimie Structurales de Montpellier. Ces spectres ont été enregistrés sur le spectromètre RMN Bruker Avance™ 600 MHz, en utilisant une cryo-sonde.

Peptides JS 09, JS 15, JS 17 et JS 21

Les premiers peptides que nous avons synthétisés, principalement sur la base d'alignements de séquence et de premiers résultats de mesures d'affinité par anisotropie de fluorescence sont les suivants :

Aptamère	Peptide	Séquence	Notes
RG 01	JS 09	Antennapedia- <i>Ahx</i> -LWGISSSELVL	Seul peptide soluble obtenu à partir de RG01
RG 26	JS 21	Fluo- <i>Ahx</i> -ASTFPKPPRFYHV	
	JS 15	KPPRFYHV	8 derniers acides aminés de RG 26
RG 20	JS 17	GSPEFYHV	8 derniers acides aminés de RG 20

La figure 9.2 présente la superposition des spectres HSQC $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ du domaine **SH3** complexé avec ces peptides¹. La plupart de ces peptides dont les affinités mesurées sont relativement faibles, de l'ordre de la centaine de micromolaire) lors de leur fixation sur le domaine SH3, provoquent un déplacement des pics des N-H de certains acides aminés, mais l'intensité de ces modifications reste très modeste. Étant donné les K_d de ces peptides pour le domaine **SH3**, on s'attendait tout à fait à ne pas voir de signaux très intenses sur cette figure. Cependant, ces déplacements semblent toutefois significatifs, et la figure 9.3 montre les détails de ces spectres, au niveau des acides aminés probablement les plus impliqués dans les interactions : H₃₆, N₃₇, E₃₈, E₄₀, V₄₁, V₅₈ et D₆₀.

La figure 9.4 présente les résultats « quantifiés » des modifications des positions des pics des spectres présentés sur la figure 9.2. On voit nettement sur cette figure que les modifications des positions de pics interviennent pour la plupart des peptides testés sur les mêmes acides aminés, ce qui permet de penser qu'ils partagent le même site d'interaction. Ces peptides étant dérivés des aptamères RG 01, 20 et 26, ce résultat semble tout à fait en accord avec celui obtenu par mutagenèse du domaine **SH3** et double-hybride (cf. p. 132).

1. Après acquisition et traitement à l'aide du logiciel XWinNMR (Bruker), les spectres ont été retravaillés à l'aide du logiciel Sparky (Goddard & Kneller, 2004).

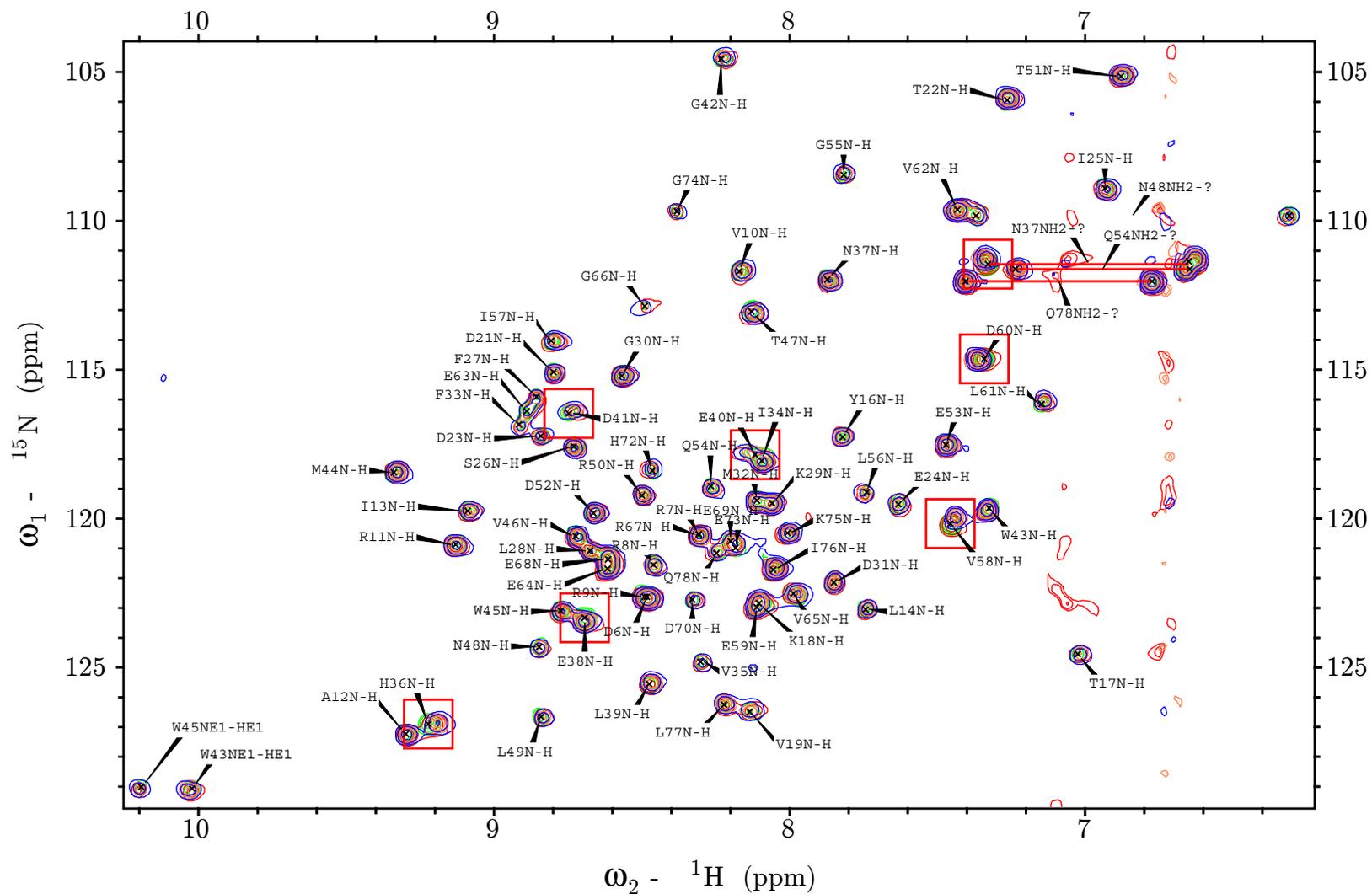


FIG. 9.2 – Spectres HSQC $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ du domaine SH3 de RasGAP, en présence ou non de peptides issus de régions variables d'aptamères. Conditions communes aux différentes expériences : 305 °K, $pH = 6, 8$, $[SH3] = 0, 1 \text{ mM}$. Vert : sans peptide ; Orange : JS 21 2 mM ; Bleu : JS 18 2 mM ; Rouge : JS 17 2 mM

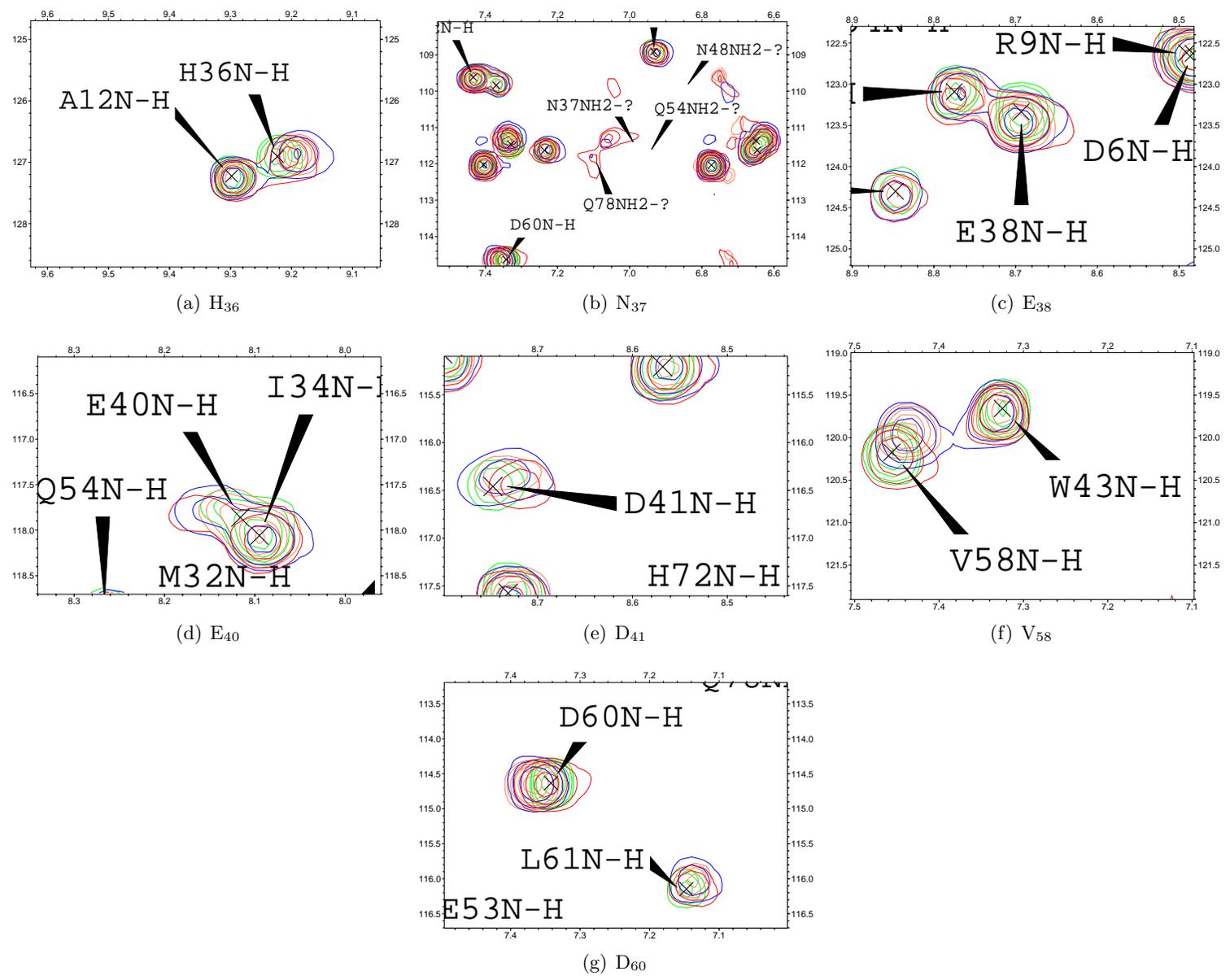


FIG. 9.3 – Détails de la figure 9.2

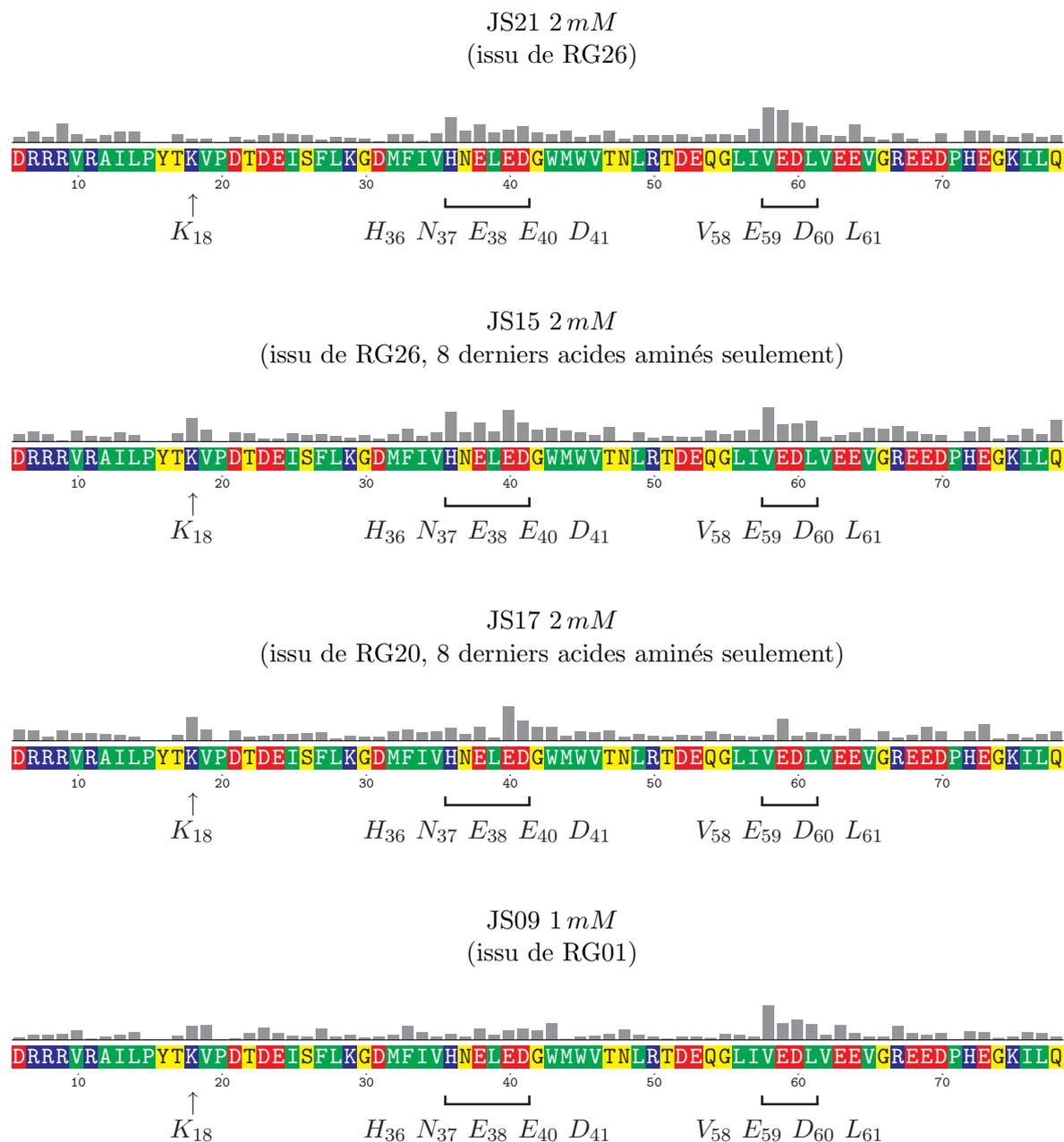
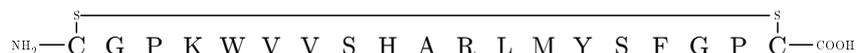


FIG. 9.4 – Déplacement des pics des spectres ^{15}N - ^1H -HSQC du domaine **SH3** de RasGAP en présence de différents peptides. Les histogrammes ont été obtenus en calculant une valeur représentant les déplacements chimiques à la fois suivant les directions N et H : $(\Delta\delta_N^2/25 + \Delta\delta_H^2)^{1/2}$. De haut en bas : JS21 2 *mM* (spectre n°10); JS15 2 *mM* (spectre n°11); JS17 2 *mM* (spectre n°13); JS09 1 *mM* (spectre n°14). Spectre de référence : SH3 100 μM dans tampon sodium phosphate 50 *mM* pH 6.8, NaCl 100 *mM*, 305°K (spectre n°12). Les principales régions subissant des modifications sont notées sur cette figure.

Peptide SP 10, issu de RG 27

Le peptide SP 10, dont la séquence est issue de l'aptamère RG 27 (cf. p. 146) est un peptide cyclisé par la construction d'un pont disulfure entre les chaînes latérales des deux cystéines qu'il possède.

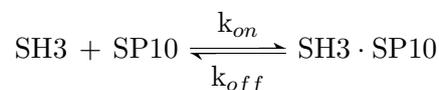


Cette cyclisation est particulièrement sensible, puisqu'elle peut être ouverte par l'action de nombreux agents réducteurs. Nous avons ainsi dû écarter le **DTT** des compositions de nos tampons de purification de protéines recombinantes.

La figure 9.6 présente les spectres HSQC $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ comparant l'état du domaine **SH3** de RasGAP seul et en présence de ce peptide cyclique SP 10. De nombreux pics sont déplacés par la fixation de ce peptide sur le domaine **SH3**. Les acides aminés probablement les plus impliqués dans cette interaction sont V₁₉, E₄₀, W₄₃ et V₅₈. En effet, les pics correspondant aux N-H de ces acides aminés sont bien visibles sur le spectre du domaine **SH3** seul, lors de l'ajout du peptide SP 10, leurs pics sont fortement déplacés (V₅₈) ou disparaissent (V₁₉, E₄₀, W₄₃).

Ces déplacements et disparition de pics s'expliquent par une modification importante de l'environnement électronique des noyaux des N-H de ces acides aminés, par échange entre les deux états du domaine **SH3** : libre et lié au peptide SP 10.

A l'équilibre thermodynamique (qui est l'état dans lequel se déroulent les expériences de RMN que nous avons réalisées), la coexistence de ces deux espèces SH3 et SH3·SP10 est régie par l'équation bilan suivante :



où k_{on} et k_{off} désignent les constantes cinétiques de formation et de séparation du complexe, qui dépendent de la température. Aux relativement faibles concentrations auxquelles nous travaillons, la formation du complexe étant probablement principalement limitée par la diffusion, k_{on} peut être considérée comme relativement proche de la valeur limite de diffusion, typiquement de 10^7 à $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Prestegard, 2004).

Les K_d que nous avons estimés pour l'interaction du peptide SP 10 avec le domaine **SH3** sont de l'ordre de $1 \mu\text{M}^2$. La relation

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

nous permet donc d'estimer la valeur de k_{off} entre 10 et 100 s^{-1} . Cette vitesse de dissociation du complexe SH3·SP10 la place dans la gamme des échanges intermédiaires, entre échanges lents et échanges rapides³. L'ordre de grandeur des vitesses d'échanges entre les deux états (libre et lié à SP 10) a une influence directe sur les positions et largeur des raies des couples N-H des acides aminés impliqués dans cette interaction. Dans le cas de l'échange à vitesse « intermédiaire »,

2. La réaction de dissociation $\text{SH3} \cdot \text{SP10} \xrightarrow{k_{on}} \text{SH3} + \text{SP10}$ est donc d'ordre 1 et a une vitesse $v = \frac{d(\text{SH3} \cdot \text{SP10})}{dt} = k_{on}$. La demie-vie du complexe est naturellement de l'ordre de : $t_{1/2} = \log(2)/k_{on}$; et donc dans notre cas : $t_{1/2}$ est compris entre 3 et 30 ms.

un élargissement des raies a fréquemment lieu, qui peut se traduire par une disparition dans le bruit de fond des pics les plus impliqués dans l'interaction. Cependant, de telles disparitions de pics peuvent également résulter d'une modification de la mobilité des atomes considérés, due à la fixation du ligand.

Ainsi, les pics correspondant aux N-H des acides aminés V₁₉, E₄₀ et W₄₃ disparaissent lors de l'ajout de SP 10 sur la figure 9.6, très probablement en raison de leur relativement forte implication dans l'interaction **SH3**/SP 10. La figure 9.5 présente un détail de la figure 9.6, montrant la disparition du pic de la valine 19.

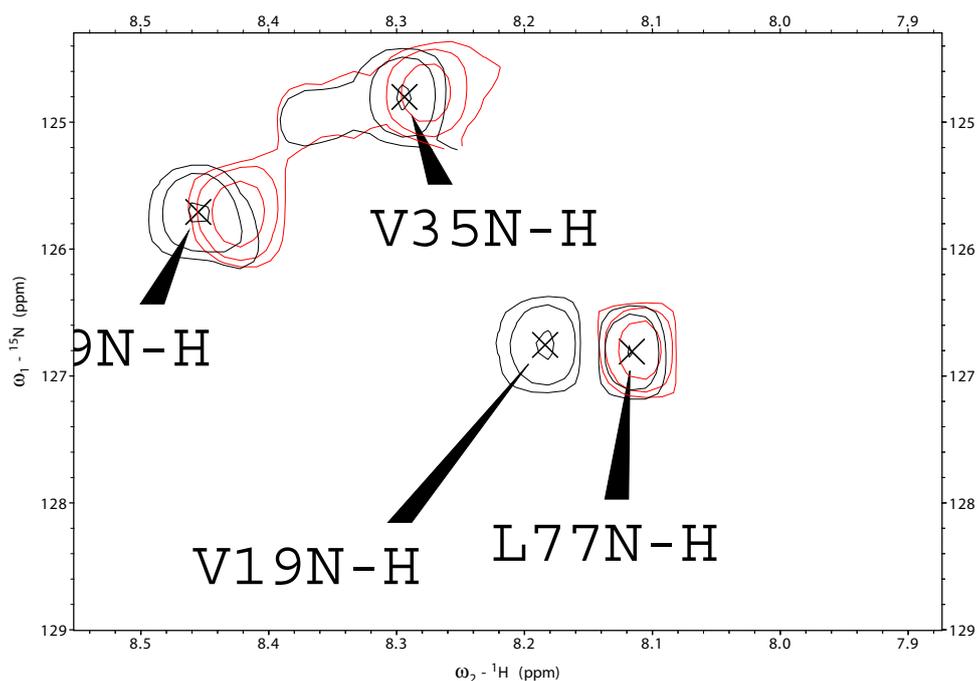


FIG. 9.5 – Détail de la figure 9.6, montrant la nette disparition du pic correspondant au couple N-H de V₁₉.

3. Plus généralement, la seule indication du K_d d'un complexe permet de considérer que l'on se place dans les conditions d'échange suivantes (Bertho, 1998) :

- | | | | |
|---------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------|
| - K_d entre | 10^{-3} et 10^{-6} M | : échange rapide | (1 mM-1 μ M) |
| - K_d entre | 10^{-6} et 10^{-7} M | : échange intermédiaire | (1 μ M-100 nM) |
| - K_d inférieur à | 10^{-7} M | : échange lent | (<100 nM) |

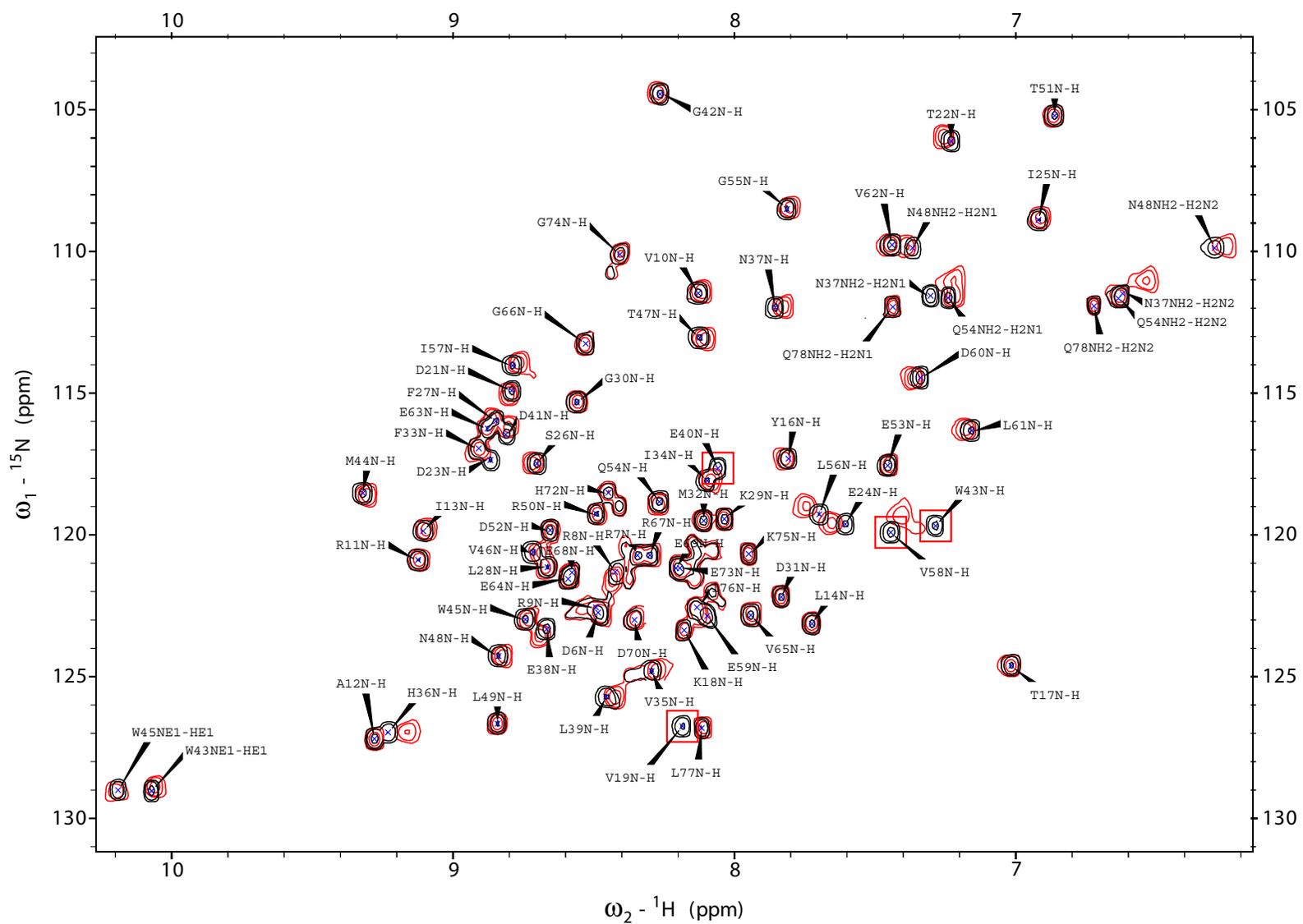
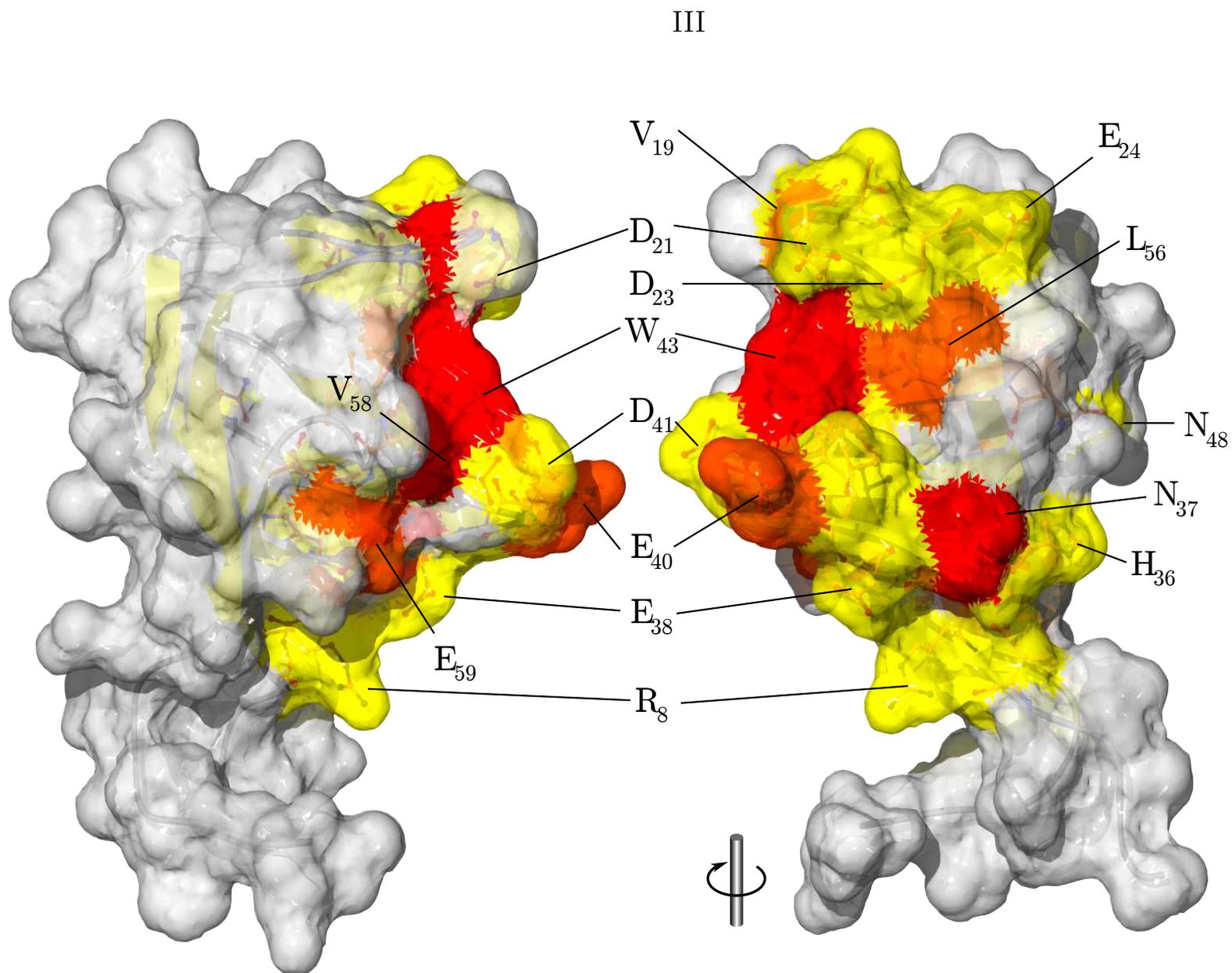


FIG. 9.6 – Spectres HSQC du domaine **SH3** seul (noir) et en présence du peptide SP10 (rouge).

FIG. 9.7 – Empreinte du peptide SP10 sur le domaine **SH3** de RasGAP

Oxydation du pont disulfure Les expériences de mesures d'affinité par anisotropie de fluorescence (cf. p. 168) nous ont déjà laissé imaginer que la cyclisation par pont disulfure pouvait facilement être dégradée par des molécules présentes dans le lysat bactérien et non suffisamment éliminées par la purification du domaine **SH3**. Effectivement, lors d'une tentative d'obtention d'informations structurales complémentaires par acquisition longue d'un spectre **NOESY** (8h), nous avons assisté à la dégradation du peptide cyclique. En effet, avant cette acquisition, un spectre HSQC $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ avait été enregistré, et était tout à fait semblable à celui présenté sur la figure 9.6. En revanche, après la longue acquisition **NOESY**, un nouveau spectre HSQC $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ a été enregistré, ne présentant plus que de très faibles différences avec le spectre du domaine **SH3** seul et tout à fait semblable au spectre du mélange **SH3** / peptide linéaire issu de RG 27. Cette dégradation au cours de l'acquisition du spectre **NOESY** n'a pas permis d'obtenir d'informations de très grande qualité, mis à part une nouvelle confirmation de l'interaction par l'apparition de pics **NOE** correspondant à l'interaction du peptide avec le W_{43} du domaine **SH3**⁴.

Aptamère RG 27 entier

Nous avons également réalisé des expériences HSQC $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ pour essayer de confirmer que le site d'interaction du peptide SP 10 sur le domaine **SH3** de RasGAP était le même que celui de l'aptamère entier RG 27. Pour cela, nous avons exprimé l'aptamère RG 27 enrichi en ^{15}N (par expression de la protéine dans *E. coli* et purification) et enregistré les spectres RMN dans les mêmes conditions que précédemment.

Le spectre HSQC de RG 27 seul montre que la boucle variable est très peu structurée (raies très larges). En revanche, lors de la formation du complexe avec le domaine **SH3**, la structure de cette boucle variable se stabilise. Il s'agit très probablement d'un phénomène de « stabilisation induite » par le domaine **SH3** (*induced folding*) qui a déjà été observé dans de nombreux exemples, notamment lors de l'étude de la conformation adoptée par des aptamères ARN (Dieckmann et al., 1996).

9.2 Modélisation moléculaire du complexe RasGAP-SH3/peptide SP 10

Cette section présente les tentatives d'obtention de structures du complexe **SH3**/SP 10 par modélisation moléculaire à partir des données obtenues par mutagénèse (cf. p. 131) et par RMN.

9.2.1 Introduction à la modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire est l'utilisation de l'outil informatique pour analyser, simuler et prédire le comportement de molécules, en se plaçant à l'échelle atomique. La première étape de cette démarche consiste à utiliser des données expérimentales (principalement obtenues par RMN et par cristallographie aux rayons X) pour concevoir un modèle tridimensionnel de la géométrie des molécules étudiées. La modélisation moléculaire permet ensuite de simuler différents événements, par exemple l'activité enzymatique d'une protéine ou l'interaction entre un ligand et son récepteur.

4. Il s'agit des seuls signaux ayant pu être attribués avec certitude, étant donné la position particulière des résonances du proton H^ϵ des Tryptophanes.

La difficulté de l'utilisation de la modélisation moléculaire pour étudier les macromolécules que sont les protéines tient à leur taille souvent très importante. En effet, la simulation de ces molécules de grande taille requiert la description de la position et des interactions de tous les atomes les composant. Le nombre de paramètres atteint donc très vite plusieurs dizaines de milliers.

Deux types « d'expériences » sont couramment utilisées : la dynamique et la minimisation moléculaire. Ces deux expériences nécessitent le calcul de la fonction d'énergie du système étudié. Ce calcul, réalisé le plus souvent de façon empirique en utilisant des champs de force moléculaires^{5 6} est l'étape cruciale de la modélisation moléculaire : son calcul est long, et de la précision de la technique utilisée dépend la qualité de la simulation.

La minimisation moléculaire consiste à rechercher, à partir d'une conformation quelconque du système, une conformation meilleure, c'est à dire possédant une énergie minimale. L'espace conformationnel à explorer pour la recherche de ce minima possédant au moins $3 \cdot N$ -dimensions (où N est nombre d'atomes du système et donc $3 \cdot N$ est le nombre de coordonnées définissant une conformation), la minimisation ne peut conduire qu'à un minima local⁷.

La dynamique moléculaire⁸ est une méthode de simulation de trajectoires moléculaires par intégration numérique des équations du mouvement de chaque atome du système étudié, qui s'écrivent, pour chaque particule i :

$$\begin{cases} m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \mathbf{f}_i(t) \\ \mathbf{f}_i(t) = -\frac{\partial V(\mathbf{r}^N)}{\partial \mathbf{r}_i(t)} \end{cases}$$

Dans cette expression, V désigne le potentiel dérivant du champ de force empirique, et qui comprend différents termes, correspondant principalement aux liaisons intramoléculaires, ainsi qu'aux forces de Van der Waals et électrostatiques.

9.2.2 Données de départ pour la modélisation

La figure 9.8 propose une comparaison des données concernant le site de fixation du peptide SP 10 obtenues par RMN et des données obtenues par mutagenèse sur l'interaction **SH3**/aptamère RG 27, dont SP 10 est dérivé.

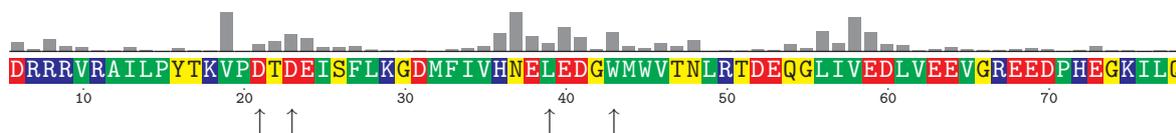


FIG. 9.8 – Déplacements des raies du spectre HSQC de RasGAP-**SH3** suite à la fixation de SP10. Les flèches (↑) indiquent les acides aminés mutés et ayant fait l'objet d'une étude par double-hybride (cf. p. 131).

5. L'énergie du système peut également être calculée *ab initio*, en revenant aux principes quantiques de la chimie.

6. Les champs de force les plus souvent utilisés sont AMBER (Pearlman et al., 1995), OPLS (Damm et al., 1997), CVFF et CFF91 (Asensio et al., 1995).

7. Plusieurs algorithmes sont utilisés pour la recherche efficace d'un bon minima local : notamment les algorithmes de *steepest descent* (Curry, 1944) et du gradient conjugué (Stich et al., 1989).

8. Voir par exemple Chipot (2000-2003).

Les données obtenues par RMN avec le peptide issu de RG 27 et par mutagénèse sur l'aptamère entier sont donc en accord. Cette étude nous a permis d'identifier les principaux acides aminés impliqués dans la liaison entre le domaine **SH3** et le peptide SP 10.

Les figures 9.7 et 9.9 présentent le site de fixation du peptide SP 10.

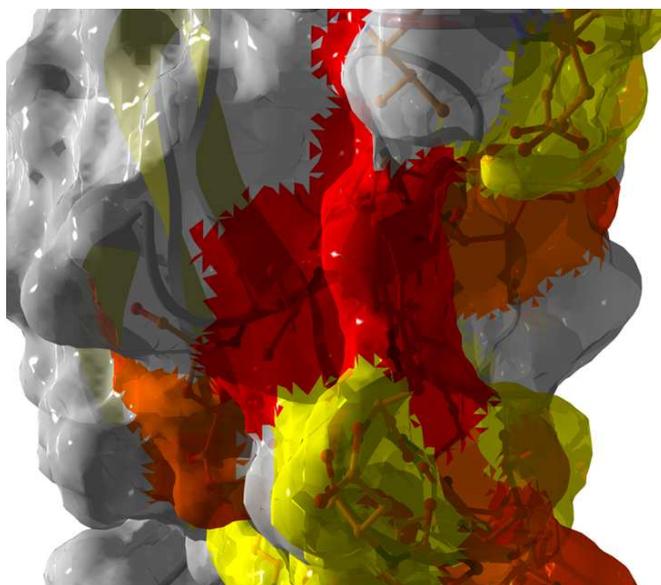


FIG. 9.9 – Détail du site de fixation du peptide SP10 sur le domaine **SH3** de RasGAP.

Ces informations nous ont permis de mener une étude par modélisation moléculaire du complexe **SH3**/peptide SP10, présentée ci-dessous.

9.2.3 Modélisation moléculaire

A l'aide du logiciel Discover, nous avons simulé différentes conformations probables du peptide SP10 (peptide cyclique issu de l'aptamère RG27) docké sur le domaine **SH3** de RasGAP. Le protocole que nous avons utilisé, qui s'apparente à un algorithme de recuit simulé (*simulated annealing*, proposé par Kirkpatrick et al., 1983, Cerny, 1985), est présenté en annexe E (p. 247).

La figure⁹ 9.10 représente différentes conformations obtenues après évolution libre du peptide docké initialement à proximité du W₄₃ de RasGAP-**SH3**.

Les figures 9.10(a) et 9.10(b) présentent chacune une conformation issue d'une série de deux expériences de dynamique moléculaire. Chacune d'elle porte deux numéros (ex : [015 027]). Le premier numéro se réfère à une première conformation que nous avons sélectionnée et resoumise à évolution dynamique. A l'issue de cette seconde simulation, nous avons sélectionné plusieurs conformations représentatives (identifiées par un second numéro), d'énergies totales similaires.

9. Tracés réalisés à l'aide du logiciel LigPlot (Wallace et al., 1995). Ce logiciel permet de projeter sur une surface plane les fragments pertinents d'une représentation tridimensionnelle d'une interaction de type ligand/récepteur.

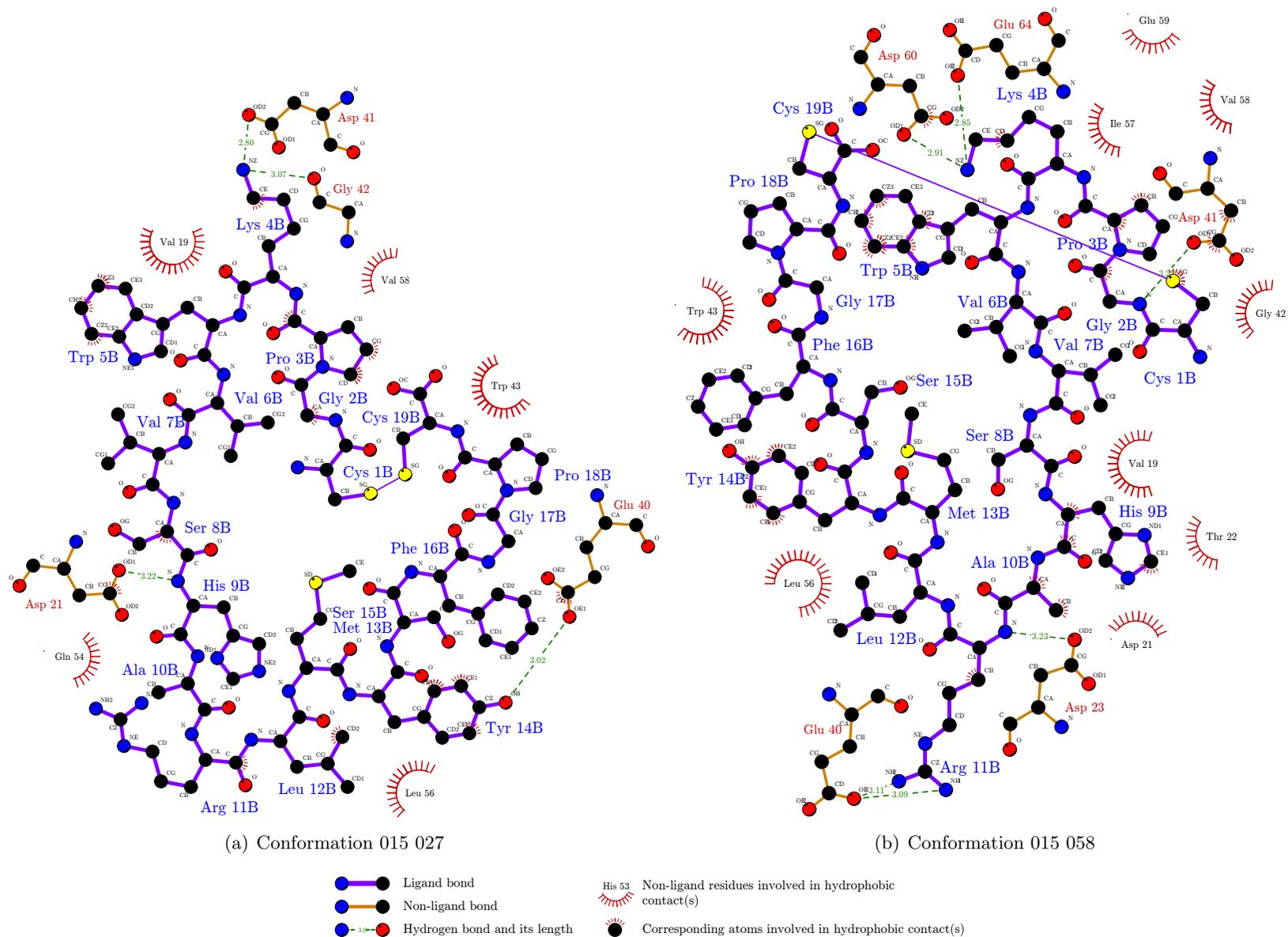


FIG. 9.10 – Exemples de conformations obtenues par modélisation moléculaire

La figure 9.11 présente l'une de ces conformations (la conformation [015 027]). On voit nettement que le peptide SP10 se place au sein de la poche hydrophobe présentée p. 86.

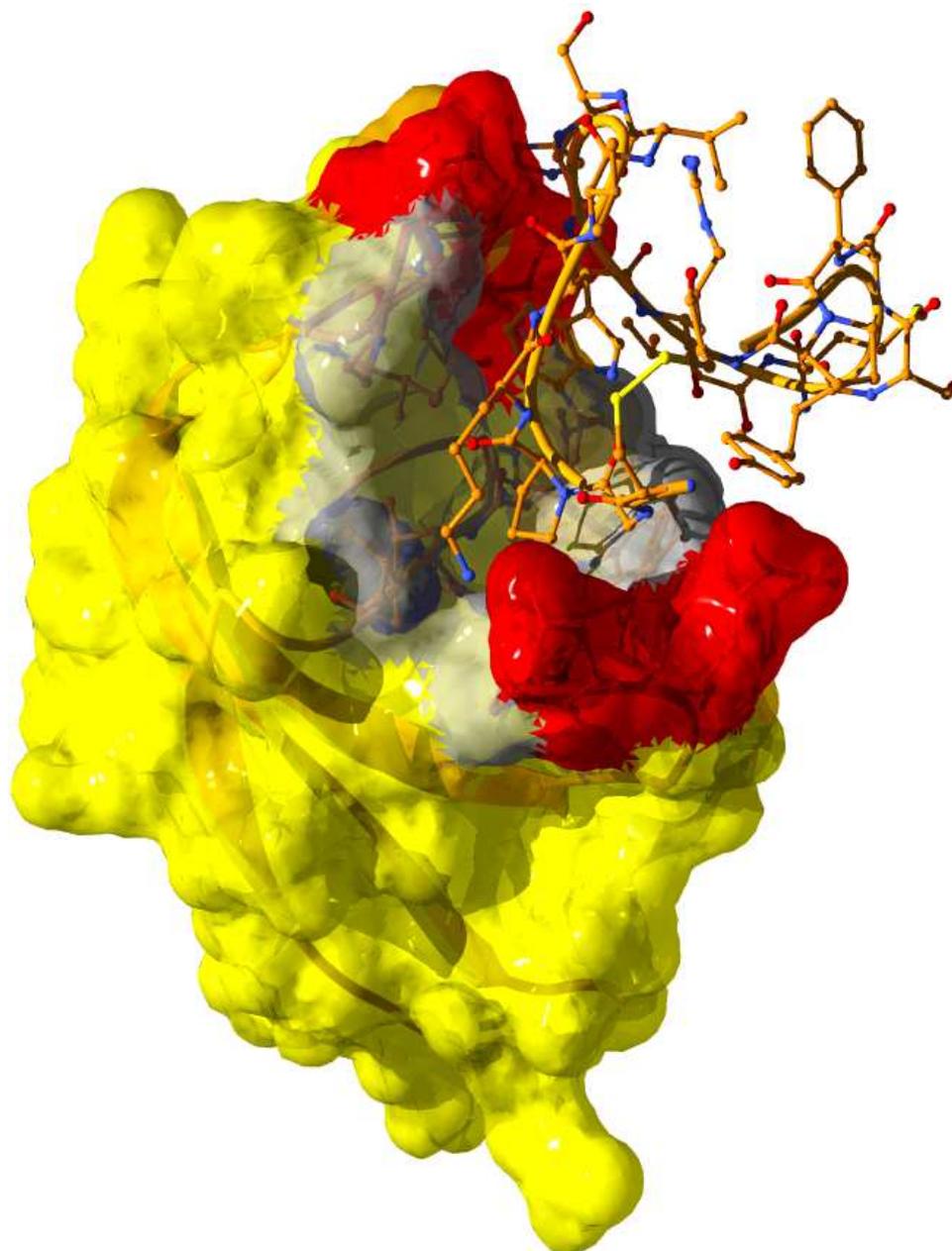
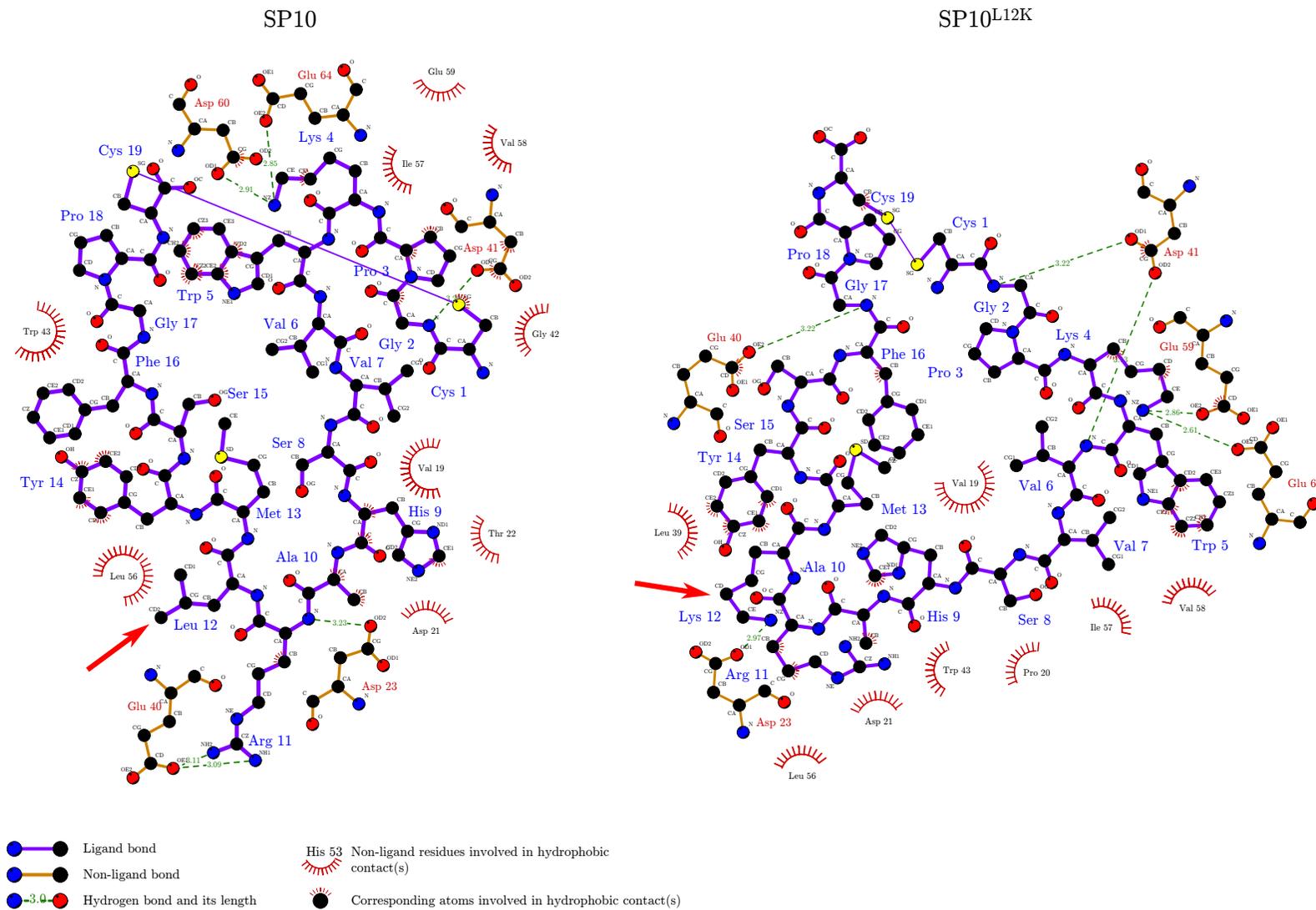


FIG. 9.11 – Structure du peptide SP10 (cyclisé par un pont disulfure) docké sur le domaine **SH3** de RasGAP. Cette conformation obtenue par modélisation moléculaire correspond à la conformation [015 027].

Nous avons par la suite sélectionné la conformation [015 058], qui nous paraît correspondre le mieux à la fois aux informations issue de ces premières expériences de RMN, et également aux informations obtenues en double-hybride à l'aide de la mutagenèse du domaine **SH3** de RasGAP.

Une observation attentive de la conformation [015 058] montre que plusieurs acides aminés du peptide SP10 semblent ne jouer aucun rôle dans l'interaction avec le domaine **SH3** de RasGAP. Notamment, la Leucine¹² ne semble participer à aucune interaction. Nous avons donc proposé une modification de cet acide aminé en Lysine, et soumis ce nouveau peptide muté SP10^{L12K} à une nouvelle évolution par dynamique moléculaire, en partant d'une configuration proche de celle de [015 058]. Les résultats de cette expérience sont présentés sur la figure 9.12. Cette expérience de mutation permet donc, comme souligné sur cette figure par les deux flèches rouges, de remplacer un résidu hydrophobe ne réalisant probablement pas beaucoup d'interactions avec le domaine **SH3** par un résidu participant à la solubilité du peptide et capable de rechercher des interactions supplémentaires. Ainsi, la Lysine K₁₂ qui remplace la Leucine L₁₂ est susceptible d'interagir notamment avec l'acide aspartique D₂₃ du domaine **SH3**.

Ce type de mutagénèse *in silico* s'avère donc être une étape indispensable avant la synthèse de peptides modifiés pour la recherche d'une amélioration de la solubilité et de l'affinité d'inhibiteurs du domaine **SH3** de RasGAP.

FIG. 9.12 – Comparaison entre les structures modélisées des peptides SP10 et SP10^{L12K}

Conclusion du chapitre 9

Site d'interaction

Cette étude structurale, à la fois par l'obtention de données expérimentales par RMN, et par modélisation moléculaire, nous a permis de déterminer assez précisément le site d'interaction du peptide cyclique SP 10. D'après les expériences de mutagenèse réalisées (p. 132), ce peptide possède approximativement le même site d'interaction que l'aptamère RG 27 dont il est dérivé. Nous n'avons pas encore à ce jour testé l'activité cellulaire du peptide, mais étant donné les excellentes propriétés de l'aptamère RG 27, nous pensons que ce peptide, une fois vectorisé, possèdera cette même activité sur cellules tumorales.

Ces résultats méritent d'être comparés à ceux obtenus dans le laboratoire du Pr. WIDMANN. Cette équipe a montré récemment que le peptide issu du domaine **SH3** de RasGAP₃₁₇WMWVTNLRD₃₂₆¹⁰ permet une significative sensibilisation de cellules tumorales à l'action d'agents cytotoxiques pro-apoptotiques (cf. p. 82, Michod et al., 2004).

L'effet que nous avons observé avec l'expression des aptamères peptidiques dirigés contre le domaine **SH3** de RasGAP est plus important que celui décrit par Michod et al. (2004). Ceci peut s'expliquer par le fait que le peptide utilisé par cette équipe n'est pas optimal, en ce sens qu'il ne mime certainement qu'une partie du site de fixation des ligands de RasGAP-**SH3**, et de ce fait ne se fixe sur ces ligands qu'imparfaitement. La transduction des signaux mitogènes et anti-apoptotiques ne peut donc qu'être seulement altérée. L'approche inverse que nous avons choisie est certainement plus puissante. En effet, nous avons pris pour cible le domaine **SH3** lui-même, dans le projet d'inhiber ses interactions avec tous ses partenaires, en essayant d'imiter l'action de l'anticorps mAb200.

Cette approche nous semble donc porteuse de nombreux succès à venir, et les données obtenues ici concernant le site d'interaction seront très bientôt complétées, nous l'espérons, par une structure complète du complexe **SH3**/peptide SP 10.

Target drugability

L'inhibition d'interactions protéine-protéine est un projet assez sensiblement différent de celui de l'inhibition de l'activité enzymatique d'une protéine. La mise au point de la molécule imatinib (déjà citée p. 1.3.3) est l'un des exemples les plus célèbres de la conception d'inhibiteurs de tyrosine kinase. La comparaison de la figure 1.4, qui représente cette petite molécule au sein du site actif de la kinase Abl, et de la figure 9.11 (p. 187), qui présente le peptide SP 10 à la surface de RasGAP-**SH3** permet d'avoir une idée précise des différences entre ces deux approches :

- dans le cas d'imatinib, il s'agit d'obtenir une molécule de petite taille, s'inscrivant le mieux possible dans une cavité, en mimant une molécule universelle, l'ATP, mais en exploitant certaines particularités de ses cibles pour ne pas interférer avec d'autres processus cellulaires et éviter les effets indésirables ;
- dans notre problématique, il s'agit en revanche d'une large plate-forme dont les sites susceptibles de fournir des interactions sont relativement distants. Les inhibiteurs que nous cherchons à concevoir sont donc nécessairement plus grands et plus flexibles que des molécules telles qu'imatinib.

Cependant, l'atypie du domaine **SH3** de RasGAP permettra certainement d'obtenir des molécules très spécifiques de ce domaine, et donc n'entraînant pas d'effets non maîtrisés. Ceci est un

10. Dans la numérotation que nous avons adoptée, il s'agit des acides aminés 43 à 52 du domaine **SH3**.

avantage important de cette stratégie, notamment comparée aux approches ciblant des domaines **SH3** conventionnels en utilisant comme molécule de départ pour la conception d'inhibiteurs un peptide riche en proline.

Enfin, la protéine RasGAP ne faisant pas partie des protéines fréquemment mutées dans les cancers humains, il est très peu probable que la cible **SH3** puisse être altérée au point de voir des résistances apparaître par un tel mécanisme¹¹. Ceci représente très certainement un avantage notable dans le cadre de la conception de molécules ciblées anti-tumorales, et donc un avantage à prendre en compte dans l'étude de la *drugability* de RasGAP-**SH3** en tant que cible.

11. Ces mécanismes d'apparition de résistance ont déjà été cités à propos d'imatinib, cf. p. 30.

Chapitre 10

Publications

Brevet Aurora

Les pages suivantes présentent le brevet « Methods to identify anti-tumoral agents inhibiting RasGAP / Aurora kinase interactions ».

Autres publications en préparation

Pour des raisons de confidentialité, nous ne souhaitons pas pour le moment publier les résultats présentés dans ce manuscrit. En revanche, d'ici quelques mois, après obtention de résultats supplémentaires et probablement après l'obtention de peptides d'affinité meilleure, dont les structures seront brevetées, ces travaux feront l'objet d'une publication présentant l'ensemble de ce travail.

III

Methods to identify anti-tumoral agents inhibiting RasGAP / Aurora kinase interactions

Christiane Garbay, Véronique Gigoux, Jacques Camonis,
Sébastien L'Hoste and Jérôme Samson

PCT Patent Application

International publication number: WO 03/087395 A2

Priority date: April 15, 2002

Abstract

The present invention concerns new methods for identifying a biologically active compound with anti-tumoral properties wherein said compound is studied for its capacity to inhibit the interaction:

- between RasGAP and the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP,
- or between RasGAP, an Aurora-binding protein and the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP.

1 Description

The present invention concerns new methods for screening anti-tumoral agents and more particularly, said agents are identified thanks to their capacity to inhibit the interaction between RasGAP and the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, or an ortholog of said kinase, or between RasGAP, the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, or an ortholog of said kinase, and an aurora-binding protein.

Ras proteins play a key role in the control of proliferation and differentiation (Hall, 1990). Their signaling pathway is often critical in tumorigenesis. Certain specific modifications of Ras proteins cause them to lose their control and lead them to be oncogenic. A large part of human tumours are associated with the presence of modified ras genes. In the same way, overexpression of these Ras proteins can lead to deregulation of cell proliferation. Taken overall, Ras proteins are constitutively activated in 30% human tumours or transduce essential signals from upstream oncogenic proteins, such as growth factor receptors (HER2) or

cytosolic tyrosine kinase proteins (bcr-abl). An understanding of the mechanisms involved in Ras-dependent-cell transformation constitutes one of the main objectives of research in oncology.

The function of Ras in mammalian cells depends upon the activities of guanine exchange factors (GEF), which catalyze the exchange of GDP/GTP (Shou et al., 1992), and the activities of GTPase-activating proteins (GAP), such as RasGAP and neurofibromin (Xu et al., 1990). RasGAP was first identified as a cytosolic protein which is present in all eucaryotic organisms and which is able to stimulate the GTP hydrolysis of GTP bound to p21Ras (Gibbs et al., 1988) and is thus essentially described as a negative regulator of Ras. The association of p21Ras-GTP with RasGAP simultaneously triggers hydrolysis of the GTP and return of the p21Ras to its inactive GDP form.

In the case of cells expressing oncogenic forms of Ras, the mutation which they carry prevents return to the inactive state and the equilibrium is displayed towards the active form of p21Ras. Moreover, RasGAP is no longer able to deactivate Ras. However, in these cells, RasGAP acts as a Ras effector, displaying functions associated with proliferation, differentiation and apoptosis, independently of its GAP activity (Tocque et al., 1997). These effects may be transduced by unknown RasGAP partners.

RasGAP possesses two regions which are responsible for separate functions. RasGAP displays its GAP activity via its COOH-terminus domain (Marshall et al., 1989). Its NH₂-terminus region appears to be essential to trigger downstream signals (Clark et al., 1993, Martin et al., 1992). Interestingly, the NH₂-terminus region contains several domains involved in interactions with different proteins in vitro, notably an SH3 domain flanked by two SH2 domains. The SH2 domains can associate with phosphorylated tyrosine kinase receptors (PDGF, EGF), v-Src and two phosphotyrosine-

containing proteins, p62 and p190RhoGAP (Ellis et al., 1990, Gibbs et al., 1990, Molloy et al., 1989).

SH3 domains are about 60 amino acids long and generally mediate interactions with proline-containing motifs within their partners (Musacchio et al., 1992). The RasGAP SH3 domain is unusual, as no proline-rich sequences able to bind this SH3 have been found. SH3 domains are frequently found in signaling proteins such as small adaptors (Grb2) and in enzymes such as kinases (p85 of 3-phosphatidylinositol kinase), lipases (C.gamma phospholipases) and phosphatases, all of which are implicated in transduction of the Ras proteins signal. These data suggests that this domain is of particular importance for directing protein/protein interactions and therefore essential to the function of the corresponding protein. So, inhibitors of interactions with SH3 domains are considered to be potential antitumor agents (Vidal et al., 2001).

In the particular case of the RasGAP protein, its SH3 domain is important in oncogenic Ras signaling pathways (Leblanc et al., 1999, 1998, Medema et al., 1992, Schweighoffer et al., 1992). In fact, the micro-injection of a monoclonal antibody directed against the RasGAP SH3 domain specifically induces cell death by apoptosis in tumour cells but not in normal cells (Leblanc et al., 1999). The RasGAP SH3 domain is also involved in cytoskeletal reorganization, cell adhesion and the induction of gene expression in a Ras-dependent manner (Leblanc et al., 1998, Medema et al., 1992, Schweighoffer et al., 1992). RasGAP associates with the G3BP protein (GAP SH3-binding protein) and an unknown 14 kDa protein through its SH3 domain (Hu & Settleman, 1997, Parker et al., 1996). However, the RNase G3BP was not related to the known roles of RasGAP in the previous effects (Gallouzi et al., 1998, Guitard et al., 2001).

The inventors have identified that the mitotic "Aurora/Ipl1-related" kinases is a specific *in vivo* partner of RasGAP. This interaction was confirmed by two-hybrid system, co-immunoprecipitation in COS-7 cells and pull-down assays in HeLa cells. RasGAP binds to the kinase domain of Aurora proteins and this interaction inhibits the kinase activity of Aurora proteins.

The members of the Aurora kinase family are required for the completion of mitotic events (centrosome separation, bipolar spindle assembly, chromosome separation, and cytokinesis) and are often overexpressed in tumor cells (Bischoff et al., 1998). The interaction between RasGAP and Aurora kinase may be involved in the regulation of cell division and therefore in tumor cell proliferation. As a consequence, this interaction is of particular interest for screening anti-tumoral agents.

The expression and activity of HsAIRK are cell cycle-dependent (Giet & Prigent, 1999). In fact,

Aurora family proteins are produced during G2/M transition and mitosis. Their activation, deactivation, and degradation by the proteasome are regulated by phosphorylation (cAMP-dependent protein kinase) and dephosphorylation (protein phosphatase 1) processes (Walter et al., 2000). RasGAP may regulate HsAIRKs by recruiting them together with kinases and phosphatases, which are necessary for their activation or their inactivation and further degradation.

Moreover, in G2/M synchronized cells, the inventors have identified the formation of a ternary complex between RasGAP, the Aurora/HsAIRK and survivin. This interaction between these three proteins can be used for screening anti-tumoral agents, said anti-tumoral agents being able to inhibit the formation of the ternary complex.

As a consequence, the present invention concerns a method for identifying a biologically active compound with anti-tumoral properties wherein said compound is studied for its capacity to inhibit the interaction:

- between RasGAP and the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP,
- or between RasGAP, an Aurora-binding protein and the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP.

In the present invention, the method for identifying a biologically active compound with anti-tumoral properties consists in detecting the inhibition of at least one of these interactions in presence of said compound.

By biologically active compound, the present invention gives particular consideration to natural or synthetic compounds such as, for example, but not restricted to proteins, polypeptides, peptides, peptide aptamers, lipoproteins, polysaccharides, small molecule compounds, non-peptidic molecules, etc. After the identification of a biologically active compound likely to present an anti-tumoral activity by using any methods of the present invention, the validation of its anti-tumoral activity can be done thanks to any method known by the one skilled in the art. Such a method can be, for example, measurement of the inhibition of cellular cloning efficiency on transformed cells transfected with oncogenic p21RAS or HER2 (oncogenic form of EGF receptor) (Cussac et al., 1999), measurement of *in vivo* antitumoral activity on nude mice xenografted with tumor expressing oncogenic p21Ras or HER2 (Arvelo et al., 1994, Bras-Goncalves et al., 2000).

The method of the present invention in which the interaction between RasGAP and the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP is studied comprises advantageously:

(a) contacting the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP, with RasGAP or a fragment thereof containing at least the SH3 domain, and the compound to be tested,

(b) precipitating either RasGAP (or the fragment thereof containing at least the SH3 domain) or the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase (or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP),

(c) if at step (b) RasGAP or the fragment thereof containing at least the SH3 domain is precipitated, detecting the presence of the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, an ortholog of said kinase or a fragment thereof in the precipitate obtained at step (b),

(d) if at step (b) the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, an ortholog of said kinase or a fragment thereof is precipitated, detecting the presence of RasGAP or the fragment thereof containing at least the SH3 domain in the precipitate obtained at step (b),

wherein if said *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, an ortholog of said kinase or a fragment of said kinase is present at step (c), or if said RasGAP or the fragment thereof containing at least the SH3 domain is present at step (d), said compound is not an antitumoral agent inhibiting said interaction.

The *Drosophila melanogaster* Aurora kinase which can be used in the methods object of the present invention is advantageously the protein whose amino acid sequence is the sequence SEQ ID No. 4 in the sequence listing in the appendix. Moreover, the ortholog of *Drosophila melanogaster* Aurora kinase which can be used in the methods object of the present invention can be any ortholog known by the one skilled in the art. Said ortholog is preferably chosen in the group comprising the human ortholog HsAIRK-1 (also called Aurora B), the human ortholog HsAIRK-2 (Aurora A) and the human ortholog HsAIRK-3 (Aurora C). The amino acid sequence of the human ortholog HsAIRK-1, the human ortholog HsAIRK-2 and the human ortholog HsAIRK-3 corresponds respectively to the sequence SEQ ID No. 6, the sequence SEQ ID No. 8 and the sequence SEQ ID No. 10 in the sequence listing in the appendix.

Nevertheless, a protein whose amino acid sequence presents one or more modification(s) compared to said sequences SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 8 and SEQ ID No. 10 can also be used in the scope of the present invention. Such modifications can be

the addition, the deletion or the substitution of one or more amino acid(s), in as much as said modifications do not inhibit the interaction of said proteins with the RasGAP SH3 domain.

The fragment of the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase which can be used in the method of the present invention is any fragment which can normally interact with RasGAP and, more particularly, with RasGAP SH3 domain. Advantageously, said fragment contains at least the C-terminal region of said kinases.

As the interaction between the Aurora kinases and RasGAP is done thanks to the RasGAP SH3 domain, the one skilled in the art can easily understand that a fragment of RasGAP which can be used in the present invention is a fragment which contains at least said SH3 domain. Any RasGAP can be used in the scope of the present invention. The sequence listing in appendix disclose the amino acid sequence of the human RasGAP protein, said sequence corresponds to the sequence SEQ ID No. 2 in the sequence listing. In the SEQ ID No. 2 in the sequence listing in appendix, the SH3 domain corresponds to the sequence comprised between amino acid 275 and amino acid 350. As disclosed above for the Aurora kinases, a protein which presents modification(s) when compared to the known RasGAP sequences and to fragments thereof containing the SH3 domain can be used in the scope of the present invention, in as much as such modifications do not inhibit the interaction with the Aurora kinases.

At step (b), any method of precipitation known by the one skilled in the art can be used in the present invention. This method of precipitation is advantageously chosen among a method of immunoprecipitation and a method of precipitation using a pull-down assay. Any method of immunoprecipitation or any method of precipitation using a pull-down assay known by the one skilled in the art can be used at the step (b) of the method of the present invention. The one skilled in the art will know which antibody or peptide must be used at step (b) according to the kind of RasGAP or of Aurora kinase used at step (a), respectively.

The detection of the presence of the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, an ortholog of said kinase or a fragment thereof in the precipitate (immunoprecipitate if step (b) is an immunoprecipitation of RasGAP or the precipitate if step (b) is a precipitation using RasGAP pull-down assay) obtained at step (b) can be done at step (c) by any appropriate method known by the one skilled in the art. For example, said immunoprecipitate or precipitate can be used for a Western blot and the presence of the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, an ortholog of said kinase or a fragment thereof in the immunoprecipitate

can be achieved by using an antibody specific of the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, an ortholog of said kinase or a fragment thereof. Kinase activity tests using substrates specific of Aurora kinases can also be used to detect the presence of an Aurora kinase in the immunoprecipitate or the precipitate. The same implementations can be achieved *mutatis mutandis* for RasGAP or a fragment thereof at step (d).

In addition, a method for identifying a biologically active compound with anti-tumoral activity using the interaction between RasGAP and the Aurora kinases can comprise:

(i) eventually, transfection of host cells with a molecule of a nucleic acid encoding the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP,

(ii) lysis of said cells,

(iii) addition of the compound to be tested before or after (ii),

(iv) precipitation either of endogenous RasGAP or of the endogenous Aurora kinase or of the amino acid sequence coded by the nucleic acid used in step (i),

(v) if at step (iv) the endogenous RasGAP is precipitated, detection of the endogenous Aurora kinase or of the amino acid sequence coded by the nucleic acid used in step (i) in the co-precipitated proteins,

(vi) if at step (iv) the endogenous Aurora kinase or the amino acid sequence coded by the nucleic acid used in step (i) is precipitated, detection of the endogenous RasGAP in the co-precipitated proteins,

wherein if the endogenous Aurora kinase or if the amino acid sequence coded by the nucleic acid used in step (i) is present at step (v) or if the endogenous RasGAP is present at step (vi), said compound is not an anti-tumoral agent inhibiting said interaction.

The step (i) and (ii) can be realised by using any kind of cells. Advantageously, the cells which can be used at step (i) and (ii) can be either eucaryotic or procaryotic hosts. Suitable eucaryotic hosts which may be mentioned are animal cells, yeasts or fungi. In particular, yeasts which may be cited are the yeasts of the genera *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces* or *Hansenula*. Animal cells which may be cited are COS, CHO, C127, HeLa, NIH 3T3, HEK293, etc. cells. Fungi which may more particularly be cited are *Aspergillus* spp. or *Trichoderma* spp. The following bacteria are preferably used as procaryotic hosts: *E. coli*, *Bacillus* or *Streptomyces*.

If the cells used at step (ii) do not present a sufficient amount of Aurora kinase, a transfection by the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP can be necessary (step (i)).

The molecule of a nucleic acid encoding the

Drosophila melanogaster Aurora kinase, an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP which can be used at step (i) of the method of the present invention may or may not be of artificial origin. They can be genomic, cDNA or RNA sequences, hybrid sequences or synthetic or semi-synthetic sequences. These sequences can be obtained, for example, by screening DNA libraries (cDNA library or genomic DNA library) using probes specific to the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP. Such libraries can be prepared from cells of different origins using conventional molecular biological techniques known to the one skilled in the art. The nucleotide sequences of the invention can also be prepared by chemical synthesis, in particular in accordance with the phosphoramidite method, or else by mixed methods including chemical or enzymatic modification of sequences obtained by screening libraries.

Advantageously, the nucleic acid encoding for the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase corresponds to the sequence SEQ ID No. 3 in the sequence listing in appendix. When the human orthologs of the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase are used at step (i), the nucleic acid used are the sequences SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7 and SEQ ID No. 9 for the human ortholog HsAIRK-1 (Aurora B), the human ortholog HsAIRK-2 (Aurora A) and the human ortholog HsAIRK-3 (Aurora C), respectively. Due to the degeneracy of nucleotide coding sequences, other sequences which encode a protein close to the Aurora kinases and able to interact with RasGAP may be used in the practise of the present invention. These include but are not limited to nucleotide sequences comprising all or portions of the Aurora kinase genes (portions which encode a fragment able to interact with the RasGAP) which are altered by the substitution of different codons that encode a functionally equivalent amino acid which belongs to the same class as the wild amino acid. The one skilled in the art knows the different amino acid classes which are the nonpolar (hydrophobic) amino acids, the polar neutral amino acids, the positively charged (basic) amino acids and the negatively charged (acidic) amino acids.

In order to produce the polypeptides of the invention (i.e. the amino acid sequences coded by the nucleic acid used in step (i), i.e. the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, its orthologs and fragments thereof), the above-defined nucleic acid sequences are generally placed under the control of signals which enable them to be expressed in a host cell. The choice of these signals (promoters, terminators, secretory leader sequences, etc.) may vary depending on the host cell employed. Preferably, these nucleotide se-

quences of the invention form part of a vector which can be autonomously replicating or one which integrates. More especially, autonomously replicating vectors can be prepared using sequences which replicate autonomously in the chosen host. Integrating vectors can be prepared, for example, using sequences which are homologous to certain regions of the host genome and which enable the vector to integrate by means of homologous recombination.

The lysis of the cells at step (ii) can be done by any methods known by the one skilled in the art, depending of the host cells employed at step (i).

The step (iv), (v) and (vi) of the present method can be implemented according to the implementations above-mentioned for the steps (b), (c) and (d).

The compound to be tested can be added before or after the step (ii) of the method of the present invention. Advantageously, said compound is added before the step (ii) and, more particularly, it is present in the transfected cells before lysis. Any method known by the one skilled in the art to introduce the compound to be tested in the transfected cells before lysis can be used in the present invention. The compound can be cotransfected under cDNA in fusion with protein transducing domain (PTD) for example, or introduced after vectorization with targetting sequence (such as, for example, penetratin or amino acid sequences facilitating penetration of a substance of interest into cells and/or nuclei (Derossi et al., 1998), sequences from tat or Vpr, etc.) or embedding by chariot peptide (active motif). In the case of small molecules or non-peptidic molecules, the compound can be added to the treated cells.

In addition, a method for identifying a biologically active compound with anti-tumoral activity using the interaction between RasGAP and the Aurora kinases can be implemented using the two-hybrid screening method known by the one skilled in the art.

Advantageously, said method comprises:

(α) Transformation of yeast cells (for example, HF7, L40, EGY48, etc.) with a molecule of a nucleic acid encoding RasGAP or a fragment thereof containing at least the SH3 domain, *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP, these molecules being fused to molecules of nucleic acid encoding the transcriptional moieties used in the two-hybrid method known by the one skilled in the art,

(β) Incubation with the compound to be tested or transformation by molecules of nucleic acid encoding the compound to be tested,

(γ) Analysis of the inhibition of the two-hybrid signals

wherein a compound which inhibits specifically the

two-hybrid signals is an anti-tumoral agent inhibiting said interaction.

Every two-hybrid method known to the skilled man can be employed. The two-hybrid signals, said selecting and screening activities, depend on a particular two-hybrid approach. Reporter genes include but are not limited to auxotrophy markers allowing cell growth on selective media, gene encoding the β -galactosidase, genes encoding green fluorescent proteins and variants thereof, genes encoding luciferases. These reporter genes can also encode proteins which cause death of host cells on specific media (counter-selectable reporter genes). According to the two-hybrid method employed, these assays can be performed in liquid, sometimes in multi-well plates or on solid media.

The present invention also concerns a method for identifying a biologically active compound with anti-tumoral properties wherein said compound is studied for its capacity to inhibit the interaction between RasGAP, an Aurora-binding protein and the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP.

In said embodiment, the aurora-binding protein advantageously used is the survivin protein. The survivin obtained from human can be used in the methods object of the present invention is advantageously the protein whose amino acid sequence is the sequence SEQ ID No. 12 in the sequence listing in the appendix. Moreover, any ortholog of this protein known by the one skilled in the art can be used in the methods object of the present invention. Moreover, a protein whose amino acid sequence presents one or more modification(s) compared to said sequence SEQ ID No. 12 can also be used in the scope of the present invention. Such modifications can be the addition, the deletion or the substitution of one or more amino acid(s), in as much as said modifications do not inhibit the formation of the ternary complex between RasGAP, the Aurora kinase and the survivin.

The method of the present invention in which the the interaction between RasGAP, an Aurora-binding protein and the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP is studied comprises advantageously:

(a') contacting the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP, with RasGAP or a fragment thereof containing at least the SH3 domain, an aurora-binding protein and the compound to be tested,

(b') precipitating

either RasGAP or the fragment thereof containing

at least the SH3 domain,

either the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP

or the aurora-binding protein

(c') if at step (b') RasGAP or the fragment thereof containing at least the SH3 domain is precipitated, detecting the presence of the aurora-binding protein in the precipitate obtained at step (b'),

(d') if at step (b') the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP is precipitated, detecting the presence of RasGAP or the fragment thereof containing at least the SH3 domain and of the aurora-binding protein in the precipitate obtained at step (b'),

(e') if at step (b') the aurora-binding protein is precipitated, detecting the presence of RasGAP or the fragment thereof containing at least the SH3 domain and of the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP in the precipitate obtained at step (b'),

wherein if said aurora-binding protein is present at step (c') or if RasGAP or the fragment thereof containing at least the SH3 domain and the aurora-binding protein are present at step (d') or if RasGAP or the fragment thereof containing at least the SH3 domain and the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP are present at step (e'), said compound is not an anti-tumoral agent inhibiting said interaction.

Any implementation disclosed for the above-mentioned steps (a), (b), (c) and (d) can be used for the corresponding step (a'), (b'), (c'), (d') and (e').

In addition, a method for identifying a biologically active compound with anti-tumoral activity using the interaction between RasGAP, the Aurora kinases and an aurora-binding protein such as the survivin can comprise:

(i') synchronisation in G2/M cells eventually transfected with a molecule of a nucleic acid encoding the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, an ortholog of said kinase or a fragment thereof,

(ii') lysis of said synchronised transfected cells,

(iii') addition of the compound to be tested before or after (ii'),

(iv') precipitation

of endogenous RasGAP,

of endogenous Aurora kinase or the amino acid sequence coded by the nucleic acid used at step (i'),

of an aurora-binding protein,

(v') if at step (iv') the endogenous RasGAP is precipitated, detecting the presence of said aurora-binding protein in the precipitate obtained at step (iv'),

(vi') if at step (iv') endogenous Aurora kinase or the amino acid sequence coded by the nucleic acid used at step (i') is precipitated, detecting the presence of the endogenous RasGAP and of said aurora-binding protein in the precipitate obtained at step (iv'),

(vii') if at step (iv') said aurora-binding protein is precipitated, detecting the presence of the endogenous RasGAP and of endogenous Aurora kinase or of the amino acid sequence coded by the nucleic acid used at step (i') in the precipitate obtained at step (iv'),

wherein if said aurora-binding protein is present at step (v') or if the endogenous RasGAP and said aurora-binding protein in the precipitate obtained at step are present at step (vi') or if the endogenous RasGAP and endogenous Aurora kinase or the amino acid sequence coded by the nucleic acid used at step (i') are present at step (vii'), said compound is not an anti-tumoral agent inhibiting said interaction.

The different cells, the different molecules of nucleic acid which can be used to transfect said cells at step (i') are the same as the one disclosed for the above-mentioned step (i).

Moreover, the one skilled in the art knows different chemical methods to synchronised cells at G2/M phase. Said method can be for example submitting said cells to double-block thymidine, releasing them for 6-8 h with DMEM-10% FCS and finally incubating them in the presence of 400 ng/ml nocodazole for 16-18h.

The lysis step of the transfected synchronised cells at step (ii') can be done by any methods known by the one skilled in the art, depending of the host cells employed at step (i').

The step (iv'), (v'), (vi') and (vii') of the present method can be implemented according to the implementations above-mentioned for the steps (b), (c) and (d). The presence of the aurora-binding protein can be detected by using antibodies specific to said aurora-binding protein.

In addition, a method for identifying a biologically active compound with anti-tumoral activity using the interaction between RasGAP, the Aurora kinases and an aurora-binding protein such as the survivin can be implemented using the two hybrid screening method.

Advantageously, said method comprises:

(α') Transformation of yeast cells with a molecule of a nucleic acid encoding RasGAP or a fragment thereof containing at least the SH3 domain, an Aurora binding protein such as the survivin, these molecules being fused to molecules of nucleic acid encoding the transcriptional moieties used in the two-hybrid method,

(β') Transformation of yeast cells with a molecule of

a nucleic acid encoding *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP

(γ') Incubation with the compound to be tested or transformation by a molecule of a nucleic acid encoding the compound to be tested,

(δ') Analysis of the inhibition of the two-hybrid signals,

wherein a compound which inhibits specifically the two-hybrid signals is an anti-tumoral agent inhibiting said interaction.

In this experimental setting, The Aurora kinase acts as a molecular bridge between RasGAP and an Aurora-binding protein and a two-hybrid signal is obtained.

The present invention also concerns an anti-tumoral composition containing as active agent a compound capable of inhibiting the interaction between RasGAP or a fragment thereof containing at least the SH3 domain and the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP.

Finally, the present invention also concerns an anti-tumoral composition containing as active agent a compound capable of inhibiting the interaction between RasGAP or a fragment thereof containing at least the SH3 domain, an aurora-binding protein and the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP.

1.1 Figures

Other advantages and characteristics of the invention will become apparent by reading the following examples concerning the identification of the interaction between RasGAP and an Aurora kinase and between RasGAP, an Aurora kinase and an aurora-binding protein and in which:

1.1.1 Figure 1

The figure 1 represents the specific interaction of Aurora/HsAIRK with RasGAP SH3.

A, *Drosophila melanogaster* RasGAP SH3 domain bait interacted with Dm Aurora and the human orthologs HsAIRK-1 and HsAIRK-2 orthologs in the yeast two-hybrid system. An HF7 yeast strain expressing Dm GAP SH3 domain was mated with Y187 strains expressing Dm Aurora or HsAIRK-1 or HsAIRK-2. Diploids were tested for growth on a selective medium (Leu-, Trp-, His-) and for β -galactosidase (lacZ) activity by the filter assay.

B, Aurora interacts specifically with the RasGAP SH3 domain. The specificity of interaction of Dm Au-

rorra prey was analyzed with different baits containing SH3 domains. An Y187 yeast strain expressing Dm Aurora mated with HF7 strains expressing Hs GAP SH3, Dm GAP SH3, Hs GAP SH2-3-2 encoding the fragment containing SH2-SH3-SH2 domains, Hs GAP SH3 W317K, Grb2 and Nck.

1.1.2 Figure 2

The figure 2 represents the co-immunoprecipitation of HsAIRK-1 and HsAIRK-2 with RasGAP, in COS cells.

A, The immunoblot was probed with anti-FLAG antibody. COS cells were transfected with the p3XFLAG vector alone (lanes -) or fused to HsAIRK-1 or HsAIRK-2 (lanes +). Immunoprecipitations were done using either a pAb directed against the C-terminal SH2 domain of RasGAP or anti-FLAG antibody. The lanes in C contain total cell extracts as a control for HsAIRK-1 and HsAIRK-2 protein expression.

B, The immunoblot was probed with a mAb directed against RasGAP as a control for the expression and immunoprecipitation of RasGAP in untransfected and transfected COS cells.

1.1.3 Figure 3

The figure 3 represents that RasGAP interacts with the Ser/Thr kinase domain of Aurora and inhibited its kinase activity.

A, **Schematic diagram showing the structure of RasGAP, Aurora and its human HsAIRK-1 and HsAIRK-2 orthologs.** The RasGAP protein consists of two regions. The C-terminal region contains the catalytic domain which increases GTPase activity of Ras. The N-terminal region consists of a proline-rich domain, two SH2 domains, one SH3 domain, a pleckstrin homology (PH) domain and a calcium-dependent phospholipid-binding domain (CalB). The Aurora/HsAIRK proteins consist of two regions: a divergent NH2-terminal region and a conserved COOH-terminal domain with Ser/Thr kinase activity.

B, **Y187 yeast strains expressing truncated preys encoding the NH2-terminal or the COOH-terminal domain of Aurora were mated with the HF7 strain expressing the Dm GAP SH3 domain.**

C, **RasGAP inhibits the kinase activity of Aurora.** COS cells transfected with the p3XFLAG vector alone (lanes -) or fused to HsAIRK-1/HsAIRK-2 (lanes +) were submitted to immunoprecipitation using anti-RasGAP or anti-FLAG antibodies, followed by kinase assays. The C+ Lane is used as a positive control, corresponding to total cellular extracts submitted to kinase assay. Results are the means of 3 to 5 indepen-

dent transfection experiments and normalized with optic density of immunoprecipitated proteins from Western Blot. FLAG-immunoprecipitated HsAIRK-1 and HsAIRK-2 contained significant kinase activity, with exception of those that immunoprecipitated with the anti-RasGAP antibody.

1.1.4 Figure 4

The figure 4 represents the co-precipitation of RasGAP, HsAIRK-1/HsAIRK-2 and survivin.

A, HsAIRK-1 co-precipitates with RasGAP. HeLa cells were synchronized in G1/S or G2/M. 500 micrograms of each cell extracts were submitted to RasGAP pull-down assays as described in experimental procedures, followed by anti-HsAIRK-1 or anti-RasGAP immunoblots (upper and lower parts, respectively). Total cell extracts were analyzed by anti-HsAIRK-1 or anti-RasGAP immunoblots (upper and lower parts, respectively). RasGAP and HsAIRK-1 were not observed in the negative control performed in the RasGAP pull-down assay with CNBr-activated sepharose beads alone (data not shown).

B, HsAIRK-1 and HsAIRK-2 co-immunoprecipitated with survivin protein. COS cells were transfected with the p3XFLAG vector alone (lanes -) or fused with HsAIRK-1 or HsAIRK-2 (lanes +). The immunoprecipitation experiments were done using anti-survivin or anti-FLAG antibodies. The immunoblot was probed with anti-FLAG antibody.

C, RasGAP and survivin proteins co-immunoprecipitated in G2/M synchronized HeLa cells. Immunoprecipitations were done using pAb directed against either the C-terminal SH2 domain of RasGAP or survivin. The C Lane corresponds to total cell extracts as a control of survivin protein expression. The immunoblot was probed with either a mAb directed against RasGAP (upper part) or with a pAb directed against survivin (lower part).

2 Experimental procedures

2.1 Abbreviations

dTT, dithiothreitol; EGF, epidermal growth factor; EGTA, ethylene glycol-bis(?-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; GAL4BD, GAL4-Binding Domain; GAP, GTPase-Activating Protein; GST, Glutathione S-Transferase; HEPES, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; HsAIRK, Human Aurora/Ipl1 Related Kinase; MBP, Myelin Basic Protein; PCR, Polymerase Chain Reaction; PDGF, Platelet-Derived Growth Factor; PMSF, Phenylmethylsulfonyl fluoride; SH3, Src Homology 3.

2.2 Antibodies

A rabbit polyclonal antibody (pAb) and a mouse monoclonal antibody (mAb) directed against RasGAP C-terminal SH2 domain (G12930 and G12920, respectively) were purchased from Transduction Laboratories. The mouse mAb directed against FLAG (M2) and the pAb directed against survivin (FL-142) were purchased from Sigma and Santa-Cruz Biotechnology, respectively. The rabbit immune serum directed against HsAIRK-1 was a gift from Aventis Pharma.

2.3 DNA Constructs

DNA sequences corresponding to the SH3 domain of human RasGAP (Hs GAP SH3, residues 275 to 342), the SH3 domain of *Drosophila melanogaster* RasGAP (Dm GAP SH3, residues 176 to 252) and the SH2-SH3-SH2 region of human RasGAP (GAP SH2-3-2, residues 170 to 440) were amplified by PCR and cloned in frame with the GAL4 DNA-binding domain (GAL4BD) in pGBT10. Human RasGAP cDNA was a gift from Aventis Pharma company. For expression in mammalian cells, the cDNAs encoding HsAIRK-1 and HsAIRK-2 were amplified by PCR and the products were inserted in frame with the N-terminal FLAG and C-terminal Myc tags in p3X-FLAG-Myc-CMV-24 (referred to as p3XFLAG vector hereafter, Sigma).

2.4 Site-Directed Mutagenesis

Site-directed mutagenesis was carried out using the Quick Change™ site-directed mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. A mutation (W317K) was introduced into the pGAL4BD-Hs GAP SH3 vector using oligonucleotides based on the published human RasGAP cDNA sequence. The mutation was confirmed by sequencing on an automated sequencer (Applied Biosystems).

2.5 Yeast Two-Hybrid Screening

Yeast two-hybrid procedures were carried out using a mating approach with HF7 and Y187 yeast strains (Fromont-Racine et al., 2002). The SH3 domain of the *Drosophila melanogaster* RasGAP was fused in frame with the GAL4 DNA-binding domain (pGAL4BD-Dm GAP SH3) in pGBT10 vector, and used as the bait to screen of an oligo-dT primed *Drosophila melanogaster* 0-24 h embryo cDNA library cloned in pACTII (a gift from S. Elledge). Plasmids from positive clones were rescued and their specificity was tested with Dm GAP SH3, Human (Hs) GAP SH3, GAP SH2-3-2, Hs GAP SH3 mutant (W317K), human Grb2 and human Nck baits containing irrelevant SH3 domains.

2.6 Cell Culture and Transient Expression in COS Cells

COS cells (1.5×10^6) were plated onto culture dishes (100-mm diameter) and grown overnight in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 100 U/ml penicillin/streptomycin, in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. The DEAE-dextran method was then used to transfect cells with 1 μ g of p3X-FLAG vector containing or not the cDNA encoding HsAIRK-1 (GI:4507278) or HsAIRK-2 (GI:4759177). After transfection, cells were grown for 48 h, before being lysed with the appropriate buffer for further analysis.

2.7 Cell Culture and Cell Cycle Synchronization of HeLa Cells

Exponential phase HeLa cells were cultured in DMEM with 10% FCS. For G1/S synchronization, cells were treated with 2.5 mM thymidine for 18-24 h, released for 8-10 h, then treated with thymidine for 16-18h. For G2/M synchronization, cells were submit to double-block thymidine, released for 6-8 h with DMEM-10% FCS and finally incubated in the presence of 400 ng/ml nocodazole (Sigma) for 16-18h.

2.8 Immunoprecipitations and Immunoblotting

Cells were washed four times with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). Cells were lysed in 250 μ l of lysis buffer consisting of 50 mM HEPES pH7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, phosphatase inhibitor (1 mM Na₃VO₄), kinase inhibitor (10 mM NaF) and protease inhibitors (1 mM PMSF, CompleteTM protease inhibitors cocktail, Roche). After a 15-min incubation at 4°C, the lysate was collected, solubilized for 30 min at 4°C with gentle rocking and centrifuged at 13,000 x g for 10 min at 4°C to remove insoluble material. The protein concentration was determined by Bradford method (Sigma). Proteins of interest were immunoprecipitated with the corresponding antibodies coupled to either protein-G or protein-A Sepharose for 2 h at 4°C with gentle rocking. The immune complexes were collected by centrifugation, washed four times with a HNT buffer containing 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, pH 7.5, and solubilized in 25 μ l of sample buffer. Proteins were then separated by SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes. The membranes were incubated overnight at 4°C in Superblock buffer (Pierce) and blotted for 1 h at room

temperature with the corresponding primary antibodies: mAb GAP SH2 (1:1000), anti-FLAG (1 μ g/ml) or anti-survivin (1:500) antibodies. After the secondary antibodies (peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG, Amersham) incubation for 30 min at room temperature, immunoreactive bands were detected by use of the ECL immunodetection system (Amersham).

2.9 Pull-Down Assay

2.9.1 RasGAP pull-down assay

Cell lysates were prepared as previously described in immunoprecipitation experiments. RasGAP was precipitated using the PALpYAEPLDSL peptide (SEQ ID No. 13 in the sequence listing in appendix) coupled to CNBr-activated Sepharose beads. This peptide was issued from p62dok protein and binds to the RasGAP N-terminal SH2 domain. Proteins were separated by SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membrane. Immunoblots were performed as previously described, with the respective primary antibodies mAbGAP SH2 (1:1000) and anti-HsAIRK-1 serum (1:10,000).

2.9.2 Aurora pull-down assay

Cell lysates were prepared as previously described in immunoprecipitation experiments. Aurora was precipitated using the RGSRLDTRPILDSRSSC peptide (SEQ ID No. 14 in the sequence listing in appendix) and issued from CPEB protein, identified as an Aurora target protein by (Hodgman et al., 2001) or another peptide able to interact with Aurora kinase coupled to CNBr-activated Sepharose beads. Proteins were separated by SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membrane.

2.10 Protein Kinase Assay

Assays were performed in 100 μ l of 50 mM HEPES pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 10 μ M ATP containing 10 μ Ci [³²P]ATP at 5,000 Ci/mole (Amersham) and 10 μ g of MBP (myelin basic protein, Sigma). After 10 min at 30°C with shaking, 25 μ l of the product reaction was withdrawn and placed down on a piece of p81 Whatman (0.5 x 1.5 cm). The paper was washed three times with 5% orthophosphoric acid (2 ml/sample), and the radioactivity was counted. The results are expressed as the means of three to five independent transfection experiments and normalized according to the optic density of the immunoprecipitated proteins from the western blotting experiments.

3 Results

3.1 Yeast Two-Hybrid Screening for RasGAP SH3 Domain Partners

The yeast two-hybrid system was used to identify proteins that interact with the RasGAP SH3 domain. cDNA corresponding to amino acids 176 to 252 of the *Drosophila melanogaster* RasGAP (Dm GAP SH3) was fused to the GAL4 DNA-binding domain (GAL4BD) and used as the bait to screen of a two-hybrid *Drosophila melanogaster* embryonic cDNA library. We obtained 6×10^6 transformants including 150 His⁺/Lac⁺ double-positive clones. To analyze the specificity of their interactions, the 150 plasmids were isolated, retransformed into yeast Y187, and mated with the HF7 strain expressing either the GAL4BD alone or fused to human GAP SH3 (Hs GAP SH3), Dm GAP SH3, GAP SH2-3-2 (containing the Hs GAP SH3 domain flanked with the two SH2 domains), the Hs GAP SH3 mutant (W317K), human Grb2 and human Nck (Fig. 1). This led to the identification of two preys that 1) allowed robust growth on histidine-free plates and displayed strong β -galactosidase activity, when co-expressed with baits containing the wild-type GAP SH3 domain, 2) yielded no growth in the presence of Grb2 or Nck which contains two and three SH3 domains, respectively and 3) produced no growth in the presence of RasGAP SH3 W317K, which carries a mutation in a position known to disrupt SH3 domain interactions (Fig. 1). One of these two preys is a truncated Dm Aurora protein (GI:603534) that lacks the first 19 amino acids and is in frame with the GAL4 activation domain.

3.2 Cellular Interaction between the RasGAP Protein and the Human *Drosophila melanogaster* Aurora Orthologs

The human Aurora kinase orthologs, HsAIRK-1 and HsAIRK-2, are ubiquitously expressed proteins, whereas HsAIRK-3 is expressed only in the testis (Giet & Prigent, 1999). Our two-hybrid assay confirmed that HsAIRK-1 and HsAIRK-2 orthologs interact with the Dm GAP SH3 domain (Fig. 1A). The same results were obtained with the Hs GAP SH3 domain (data not shown). For in vivo studies, HsAIRK-1 and HsAIRK-2 were cloned into the p3XFLAG vector and expressed in COS cells. The in vivo interactions between RasGAP and HsAIRK-1 or HsAIRK-2 were studied by immunoprecipitation experiments performed on transfected COS cells lysates (Fig. 2). When endogenous RasGAP was immunoprecipitated in lysates from

p3XFLAG-HsAIRK-1 or p3XFLAG-HsAIRK-2 transfected COS cells, RasGAP and the kinases were co-precipitated.

3.3 RasGAP Interacts with the Aurora Kinase Domain and Inhibits HsAIRK kinase Activity

Two truncated versions of Aurora were generated in an attempt to locate the region involved in the binding of Aurora to the RasGAP SH3 domain (Fig. 3A). The N-terminal (residues 1-152) and the C-terminal (residues 153-411) domains were cloned independently into the pACTII vector and mating experiments were carried out to determine whether they interacted with the RasGAP SH3 domain. The RasGAP SH3 domain bound to the C-terminal domain of Aurora, but not to the N-terminal domain (Fig. 3B). These results are consistent with the conserved interaction between RasGAP and the Aurora/HsAIRKs proteins, and with the fact that the C-terminal kinase domain is highly preserved throughout evolution (identity/similarity 58/68% between Aurora and HsAIRK-1). Interestingly, this minimal interaction domain does not contain any proline-rich consensus sequences. This is in accordance with 1) the lack of a recognition platform required for the preferential binding to proline-rich consensus sequence in the RasGAP SH3 domain, and 2) the fact that no consensus proline-rich motif has been shown to bind to the RasGAP SH3 domain (Yang et al., 1994).

The inventors investigated whether RasGAP modulated the kinase activity of HsAIRK proteins. The p3XFLAG-HsAIRK-1 and p3XFLAG-HsAIRK-2 were expressed in COS cells and the kinase activity was measured after immunoprecipitation using anti-FLAG or anti-RasGAP antibodies (Fig. 3C). Results are normalized with optic density of immunoprecipitated proteins from Western Blot. When expressed in the p3XFLAG vector, HsAIRK-1 and HsAIRK-2 were highly expressed and active, whereas they were inactive when they were co-immunoprecipitated with the anti-RasGAP antibody. These results suggest that the kinase activity of HsAIRK proteins is inhibited by bound RasGAP.

3.4 RasGAP forms a complex with HsAIRK and Survivin in G2/M HeLa cells

HsAIRK proteins are mainly expressed at the G2/M transition and during mitosis (Giet & Prigent, 1999). In fact, we confirmed that HsAIRK-1 is highly expressed at G2/M transition compared to G1/S

transition, whereas RasGAP is similarly expressed in G1/S and G2/M transitions (Fig 4A). As the RasGAP/HsAIRK-1 interaction could not be observed by immunoprecipitation with the anti-Aurora immune serum, it was analyzed during cell cycle using RasGAP pull-down assay (Fig.4A). Under these conditions, RasGAP precipitation is observed and reproducible. The RasGAP/HsAIRK-1 interaction increases in G2/M transition compared to G1/S transition, and this increase correlates with the cell cycle dependent expression of HsAIRK-1 protein.

Otherwise, yeast two-hybrid and pull-down assays showed that survivin, a 16 kDa protein, interacts with HsAIRK-2 (Wheatley et al., 2001). To determine whether RasGAP forms a complex with these proteins, we studied the capacity of survivin to precipitate with RasGAP. As expected, survivin co-immunoprecipitated with HsAIRK-1 and HsAIRK-2 when they were expressed as FLAG fusion proteins in COS cells (Fig.4B). HsAIRK and survivin proteins are mainly expressed during the G2/M transition and during mitosis (Ambrosini et al., 1997, Giet & Prigent, 1999). Thus, we analyzed the co-immunoprecipitation of RasGAP and survivin in G2/M nocodazole-synchronized HeLa cells. In these conditions, survivin was co-immunoprecipitated with an antibody directed against RasGAP (Fig. 4C). Conversely, RasGAP co-immunoprecipitated with an antibody directed against survivin (Fig. 4C). These results show that the existence of a ternary complex between the RasGAP, HsAIRK-1/HsAIRK-2 and Survivin proteins.

4 Discussion

The inventors identified the mitotic "Aurora/Ipl1-related" kinases (referred to as Aurora hereafter) as specific *in vivo* partners of RasGAP, a protein involved both in the negative regulation of Ras and in Ras oncogenic activity (Tocque et al., 1997). This interaction involves the kinase domain of Aurora and the RasGAP SH3 domain. Aurora kinase is modulated *in vivo* by its interaction with RasGAP. This interaction is conserved between flies and humans. Moreover, the RasGAP/HsAIRK-1 interaction is related to the cell cycle dependant expression of HsAIRK protein.

The members of the Aurora kinase family are required for the completion of mitotic events (centrosome separation, bipolar spindle assembly, chromosome separation and cytokinesis) and are often overexpressed in tumour cells (Bischoff et al., 1998). The interaction between RasGAP and Aurora may be involved in the regulation of cell division, and therefore in tu-

mor cell proliferation. The expression and activity of HsAIRK are cell cycle-dependent (Giet & Prigent, 1999). In fact, Aurora family proteins are produced during G2/M transition and mitosis. Their activation, deactivation and degradation by the proteasome are regulated by phosphorylation (cAMP-dependent protein kinase) and dephosphorylation (phosphatase PP1) processes (Giet & Prigent, 1999, Walter et al., 2000). RasGAP may regulate HsAIRK kinases by recruiting them together with kinases and phosphatases, which are necessary for their activation, or their inactivation and further degradation.

These results also showed that RasGAP co-immunoprecipitated with Survivin in G2/M synchronized HeLa cells. Survivin is an Aurora-binding protein, from the inhibitory apoptotic protein (IAP) family (Wheatley et al., 2001). Survivin is a bifunctional protein that suppresses apoptosis, regulates cell division and is overexpressed in tumour cells (Ambrosini et al., 1997). Survivin, a 16 kDa protein, could be the unknown p14 protein that co-precipitates with RasGAP SH3 domain in GST pull-down assays (Hu & Settleman, 1997). RasGAP can generate anti-apoptotic signals through its N-terminal region, in particular by means of its SH3 domain (Leblanc et al., 1999, Yang & Widmann, 2001). Our results suggest that survivin may be the RasGAP SH3 domain target that transduces the anti-apoptotic effect of RasGAP in cancer cells. This effect may be transmitted or modulated via Aurora. The phosphorylation of survivin is crucial for its ability to direct cells towards division or death by apoptosis, particularly in association with caspase-9 (O'Connor et al., 2000). The question remains as to whether survivin directly binds and inhibits caspase-9. The inventors suggest that RasGAP and Aurora proteins are involved in the recruitment of survivin to p34cdc2, a kinase known to regulate survivin function (O'Connor et al., 2000). This hypothesis is in accordance with the finding that RasGAP is a caspase-3 and -9 substrate, and the finding that a N-terminal generated fragment, including the SH3 domain, is involved in an anti-apoptotic signaling (Yang & Widmann, 2001).

Finally, RasGAP was shown to be involved in the maturation of *Xenopus* oocytes at the G2/M transition. The micro-injection of an antibody directed against the RasGAP SH3 domain inhibits the maturation of *Xenopus* oocytes, by preventing the activation of the maturation-promoting factor complex (cyclinB-p34cdc2) by activated Ras (Pomerance et al., 1996). The anti-RasGAP SH3 antibody also induces an apoptotic response when injected into tumour cells (Leblanc et al., 1999). On the one hand, survivin is required for mitosis execution and is thought to be involved in the targeting of HsAIRK to its correct location on mi-

otic chromosomes and on the mitotic spindle apparatus. Survivin is also a mitotic substrate of p34cdc2-cyclin B1 and its subsequent phosphorylation is crucial for the survivin-mediated regulation of apoptosis during cell division (O'Connor et al., 2000). On the other hand, Prigent et al. suggested that p34cdc2 is involved in the regulation of Aurora kinases during the G2/M (Giet & Prigent, 1999). All of these data suggest the existence of a multi-protein complex involving RasGAP, Aurora, survivin, p34cdc2 and caspase-9 proteins. This complex is probably involved in the balance between cell progression and apoptosis at the cell cycle G2/M checkpoint.

This is the first study to propose a new RasGAP signaling pathway involving the formation of a ternary complex between RasGAP, Aurora/HsAIRK and survivin. The analysis of these protein interactions will further improve our understanding of their respective roles in signal transduction. The inventors' results open the way for studies on the RasGAP-dependent biological effects involved in Ras oncogenic transformation and tumor progression. Finally, these findings suggest that the interactions between these proteins may act as potential anti-tumor targets.

5 Claims

5.1 Method for identifying

A biologically active compound with anti-tumoral properties wherein said compound is studied for its capacity to inhibit the interaction:

- between RasGAP and the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP,
- or between RasGAP, an Aurora-binding protein and the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP.

5.2 Method according to claim 1, wherein said method comprises

(a) contacting the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP, with RasGAP or a fragment thereof containing at least the SH3 domain, and the compound to be tested,

(b) precipitating either RasGAP (or the fragment thereof containing at least the SH3 domain) or the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase (or an ortholog

of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP),

(c) if at step (b) RasGAP or the fragment thereof containing at least the SH3 domain is precipitated, detecting the presence of the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, an ortholog of said kinase or a fragment thereof in the precipitate obtained at step (b),

(d) if at step (b) the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, an ortholog of said kinase or a fragment thereof is precipitated, detecting the presence of RasGAP or the fragment thereof containing at least the SH3 domain in the precipitate obtained at step (b),

wherein if said *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, an ortholog of said kinase or a fragment of said kinase is present at step (c), or if said RasGAP or the fragment thereof containing at least the SH3 domain is present at step (d), said compound is not an anti-tumoral agent inhibiting said interaction.

5.3 Method according to claim 1, wherein said method comprises

(i) eventually, transfection of host cells with a molecule of a nucleic acid encoding the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP,

(ii) lysis of said cells,

(iii) addition of the compound to be tested before or after (ii),

(iv) precipitation either of endogenous RasGAP or of the endogenous Aurora kinase or of the amino acid sequence coded by the nucleic acid used in step (i),

(v) if at step (iv) the endogenous RasGAP is precipitated, detection of the endogenous Aurora kinase or of the amino acid sequence coded by the nucleic acid used in step (i) in the co-precipitated proteins,

(vi) if at step (iv) the endogenous Aurora kinase or the amino acid sequence coded by the nucleic acid used in step (i) is precipitated, detection of the endogenous RasGAP in the co-precipitated proteins,

wherein if the endogenous Aurora kinase or if the amino acid sequence coded by the nucleic acid used in step (i) is present at step (v) or if the endogenous RasGAP is present at step (vi), said compound is not an anti-tumoral agent inhibiting said interaction.

5.4 Method according to claim 3, wherein the compound to be tested is present in the transfected cell before lysis

5.5 Method according to claim 1, wherein said method uses the two hybrid screening method

5.6 Method according to claim 5, wherein said method comprises:

(a) Transformation of yeast cells with a molecule of a nucleic acid encoding RasGAP or a fragment thereof containing at least the SH3 domain, *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP, these molecules being fused to molecules of nucleic acid encoding the transcriptional moieties used in the two-hybrid method known by the one skilled in the art,

(b) Incubation with the compound to be tested or transformation by molecules of nucleic acid encoding the compound to be tested,

(c) Analysis of the inhibition of the two-hybrid signals,

wherein a compound which inhibits specifically the two-hybrid signals is an anti-tumoral agent inhibiting said interaction.

5.7 Method according to claim 1, wherein said aurora-binding protein is the survivin protein

5.8 Method according to any one of claims 1 or 7, wherein said method comprises:

(a') contacting the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP, with RasGAP or a fragment thereof containing at least the SH3 domain, an aurora-binding protein and the compound to be tested,

(b') precipitating

either RasGAP or the fragment thereof containing at least the SH3 domain,

either the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP

or the aurora-binding protein

(c') if at step (b') RasGAP or the fragment thereof containing at least the SH3 domain is precipitated, detecting the presence of the aurora-binding protein in the precipitate obtained at step (b'),

(d') if at step (b') the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP is precipitated, detecting the presence of RasGAP or the fragment thereof containing at least the SH3 domain and of the aurora-binding protein in the precipitate obtained at step (b'),

(e') if at step (b') the aurora-binding protein is precipitated, detecting the presence of RasGAP or the fragment thereof containing at least the SH3 domain and of the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP in the precipitate obtained at step (b'),

wherein if said aurora-binding protein is present at step (c') or if RasGAP or the fragment thereof containing at least the SH3 domain and the aurora-binding protein is present at step (d') or if RasGAP or the fragment thereof containing at least the SH3 domain and the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP is present at step (e'), said compound is not an anti-tumoral agent inhibiting said interaction.

5.9 Method according to any one of claims 1 or 7, wherein said method comprises

(i') synchronisation in G2/M cells eventually transfected with a molecule of a nucleic acid encoding the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, an ortholog of said kinase or a fragment thereof,

(ii') lysis of said synchronised transfected cells,

(iii') addition of the compound to be tested before or after (ii'),

(iv') precipitation of endogenous RasGAP,

of endogenous Aurora kinase or the amino acid sequence coded by the nucleic acid used at step (i'),

of an aurora-binding protein,

(v') if at step (iv') the endogenous RasGAP is precipitated, detecting the presence of said aurora-binding protein in the precipitate obtained at step (iv'),

(vi') if at step (iv') endogenous Aurora kinase or the amino acid sequence coded by the nucleic acid used at step (i') is precipitated, detecting the presence of the endogenous RasGAP and of said aurora-binding protein in the precipitate obtained at step (iv'),

(vii') if at step (iv') said aurora-binding protein is precipitated, detecting the presence of the endogenous RasGAP and of endogenous Aurora kinase or of the amino acid sequence coded by the nucleic acid used at step (i') in the precipitate obtained at step (iv'),

wherein if said aurora-binding protein is present at step (v') or if the endogenous RasGAP and said aurora-binding protein in the precipitate obtained at step are present at step (vi') or if the endogenous RasGAP and endogenous Aurora kinase or the amino acid sequence coded by the nucleic acid used at step (i') are present at step (vii'), said compound is not an anti-tumoral agent inhibiting said interaction.

5.10 Method according to any one of claims 1 or 7, wherein said method comprises:

(α') Transformation of yeast cells with a molecule of a nucleic acid encoding RasGAP or a fragment thereof containing at least the SH3 domain, an Aurora binding protein such as the survivin, these molecules being fused to molecules of nucleic acid encoding the transcriptional moieties used in the two-hybrid method,

(β') Transformation of yeast cells with a molecule of a nucleic acid encoding *Drosophila melanogaster* Aurora kinase, an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP

(γ') Incubation with the compound to be tested or transformation by a molecule of a nucleic acid encoding the compound to be tested,

(δ') Analysis of the inhibition of the two-hybrid signals.

5.11 Method according to any one of precedings claims, wherein

The ortholog of *Drosophila melanogaster* Aurora kinase is chosen in the group comprising the human ortholog HsAIRK-1 (Aurora B), the human ortholog HsAIRK-2 (Aurora A) and the human ortholog HsAIRK-3 (Aurora C).

5.12 Anti-tumoral composition containing

As active agent a compound capable of inhibiting the interaction between RasGAP or a fragment thereof containing at least the SH3 domain and the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP.

5.13 Anti-tumoral composition containing

As active agent a compound capable of inhibiting the interaction between RasGAP or a fragment thereof

containing at least the SH3 domain, an aurora-binding protein and the *Drosophila melanogaster* Aurora kinase or an ortholog of said kinase, or a fragment thereof able to interact with RasGAP

References

- Ambrosini G, Adida C, Altieri D (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* **3**: 917–21
- Arvelo F, Poupon M, Chevalier TL (1994) Establishment and characterization of five human small cell lung cancer cell lines from early tumor xenografts. *Anticancer Res* **14**: 1893–901
- Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD (1998) A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *Embo J* **17**: 3052–65 0261-4189 Journal Article
- Bras-Goncalves R, Rosty C, Laurent-Puig P, Soulié P, Dutrillaux B, Poupon M (2000) Sensitivity to CPT-11 of xenografted human colorectal cancers as a function of microsatellite instability and p53 status. *Br J Cancer* **82**: 913–23 doi:10.1054/bjoc.1999.1019
- Clark G, Quilliam L, Hisaka M, Der C (1993) Differential antagonism of Ras biological activity by catalytic and Src homology domains of Ras GTPase activation protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 4887–91
- Cussac D, Vidal M, Leprince C, Liu WQ, Cornille F, Tiraboschi G, Roques BP, Garbay C (1999) A Sos-derived peptidimer blocks the Ras signaling pathway by binding both Grb2 SH3 domains and displays antiproliferative activity. *Faseb J* **13**: 31–8.
- Derossi D, Chassaing G, Prochiantz A (1998) Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol* **8**: 84–7
- Ellis C, Moran M, McCormick F, Pawson T (1990) Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature* **343**: 377–81 doi:10.1038/343377a0
- Fromont-Racine M, Rain JC, Legrain P (2002) Building protein-protein networks by two-hybrid mating strategy. *Methods Enzymol* **350**: 513–24
- Gallouzi IE, Parker F, Chebli K, Maurier F, Labourier E, Barlat I, Capony JP, Tocque B, Tazi J (1998) A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability. *Mol Cell Biol* **18**: 3956–65.
- Gibbs J, Marshall M, Scolnick E, Dixon R, Vogel U (1990) Modulation of guanine nucleotides bound to Ras in NIH3T3 cells by oncogenes, growth factors, and the GTPase activating protein (GAP). *J Biol Chem* **265**: 20437–42
- Gibbs J, Schaber M, Allard W, Sigal I, Scolnick E (1988) Purification of ras GTPase activating protein from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 5026–30
- Giet R, Prigent C (1999) Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J Cell Sci* **112** (Pt 21): 3591–601 0021-9533 Journal Article Review Review, Tutorial
- Guitard E, Parker F, Millon R, Abecassis J, Tocque B (2001) G3BP is overexpressed in human tumors and promotes S phase entry. *Cancer Lett* **162**: 213–21.
- Hall A (1990) The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* **249**: 635–40
- Hodgman R, Tay J, Mendez R, Richter J (2001) CPEB phosphorylation and cytoplasmic polyadenylation are catalyzed by the kinase IAK1/Eg2 in maturing mouse oocytes. *Development* **128**: 2815–22
- Hu KQ, Settleman J (1997) Tandem SH2 binding sites mediate the RasGAP-RhoGAP interaction: a conformational mechanism for SH3 domain regulation. *Embo J* **16**: 473–83.
- Leblanc V, Delumeau I, Tocque B (1999) Ras-GTPase activating protein inhibition specifically induces apoptosis of tumour cells. *Oncogene* **18**: 4884–9.
- Leblanc V, Tocque B, Delumeau I (1998) Ras-GAP controls Rho-mediated cytoskeletal reorganization through its SH3 domain. *Mol Cell Biol* **18**: 5567–78 0270-7306 Journal Article
- Marshall M, Hill W, Ng A, Vogel U, Schaber M, Scolnick E, Dixon R, Sigal I, Gibbs J (1989) A C-terminal domain of GAP is sufficient to stimulate ras p21 GTPase activity. *EMBO J* **8**: 1105–10
- Martin G, Yatani A, Clark R, Conroy L, Polakis P, Brown A, McCormick F (1992) GAP domains responsible for ras p21-dependent inhibition of muscarinic atrial K⁺ channel currents. *Science* **255**: 192–4
- Medema R, de Laat W, Martin G, McCormick F, Bos J (1992) GTPase-activating protein SH2-SH3 domains induce gene expression in a Ras-dependent fashion. *Mol Cell Biol* **12**: 3425–30

- Molloy C, Bottaro D, Fleming T, Marshall M, Gibbs J, Aaronson S (1989) PDGF induction of tyrosine phosphorylation of GTPase activating protein. *Nature* **342**: 711–4 doi:10.1038/342711a0
- Musacchio A, Gibson T, Lehto V, Saraste M (1992) SH3—an abundant protein domain in search of a function. *FEBS Lett* **307**: 55–61
- O'Connor D, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio P, Altieri D (2000) Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13103–7 doi:10.1073/pnas.240390697
- Parker F, Maurier F, Delumeau I, Duchesne M, Faucher D, Debussche L, Dugue A, Schweighoffer F, Tocque B (1996) A Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein *Mol Cell Biol* **16**: 2561–9.
- Pomerance M, Thang MN, Tocque B, Pierre M (1996) The Ras-GTPase-activating protein SH3 domain is required for Cdc2 activation and mos induction by oncogenic Ras in *Xenopus* oocytes independently of mitogen-activated protein kinase activation *Mol Cell Biol* **16**: 3179–86.
- Schweighoffer F, Barlat I, Chevallier-Multon M, Tocque B (1992) Implication of GAP in Ras-dependent transactivation of a polyoma enhancer sequence. *Science* **256**: 825–7
- Shou C, Farnsworth C, Neel B, Feig L (1992) Molecular cloning of cDNAs encoding a guanine-nucleotide-releasing factor for Ras p21. *Nature* **358**: 351–4 doi:10.1038/358351a0
- Tocque B, Delumeau I, Parker F, Maurier F, Multon MC, Schweighoffer F (1997) Ras-GTPase activating protein (GAP): a putative effector for Ras *Cell Signal* **9**: 153–8.
- Vidal M, Gigoux V, Garbay C (2001) SH2 and SH3 domains as targets for anti-proliferative agents *Crit Rev Oncol Hematol* **40**: 175–86 1040-8428 Journal Article Review Review, Tutorial
- Walter A, Seghezzi W, Korver W, Sheung J, Lees E (2000) The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene* **19**: 4906–16 doi:10.1038/sj.onc.1203847
- Wheatley S, Carvalho A, Vagnarelli P, Earnshaw W (2001) INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr Biol* **11**: 886–90
- Xu G, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R (1990) The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* **62**: 599–608
- Yang JY, Widmann C (2001) Antiapoptotic signaling generated by caspase-induced cleavage of RasGAP *Mol Cell Biol* **21**: 5346–58.
- Yang YS, Garbay C, Duchesne M, Cornille F, Jullian N, Fromage N, Tocque B, Roques BP (1994) Solution structure of GAP SH3 domain by 1H NMR and spatial arrangement of essential Ras signaling-involved sequence *Embo J* **13**: 1270–9.

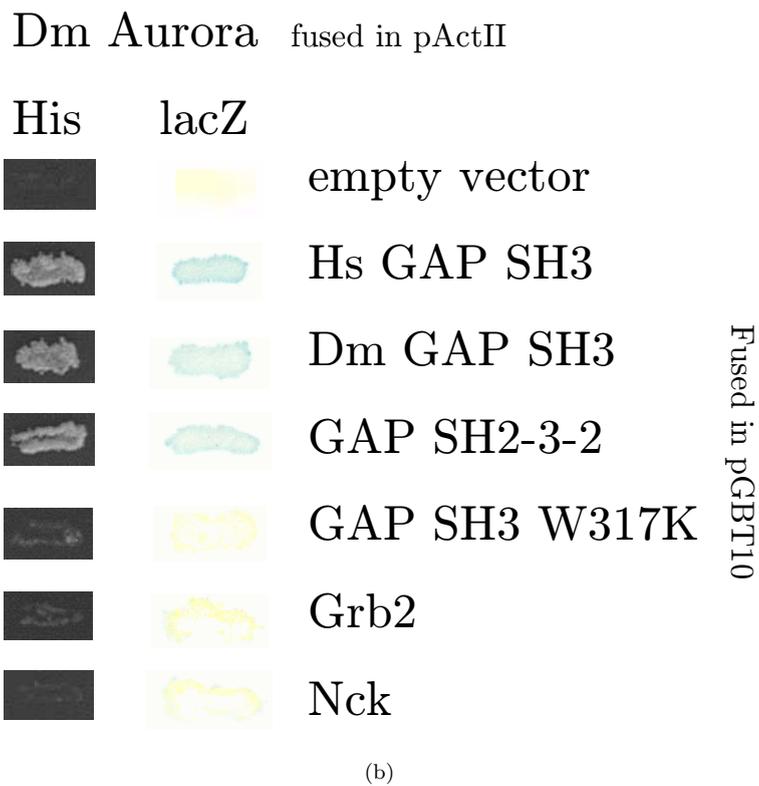
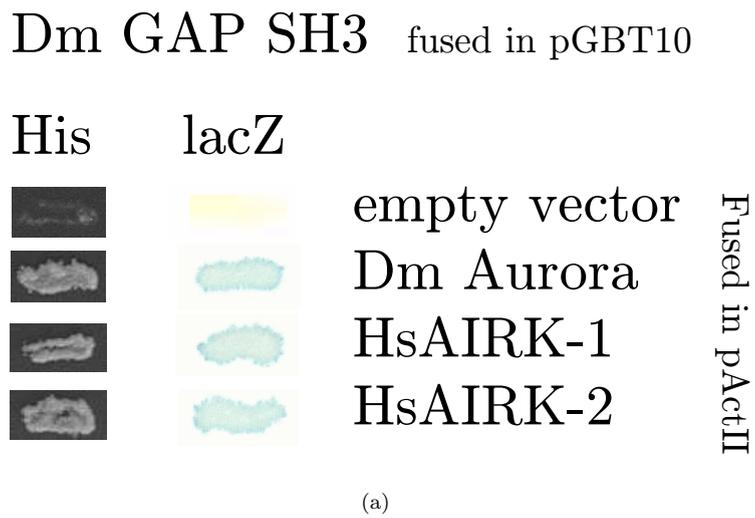
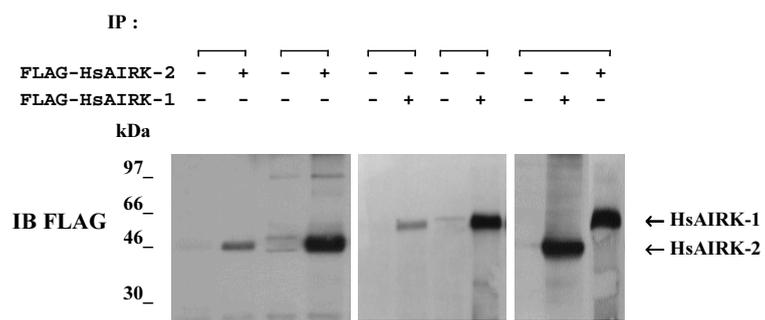
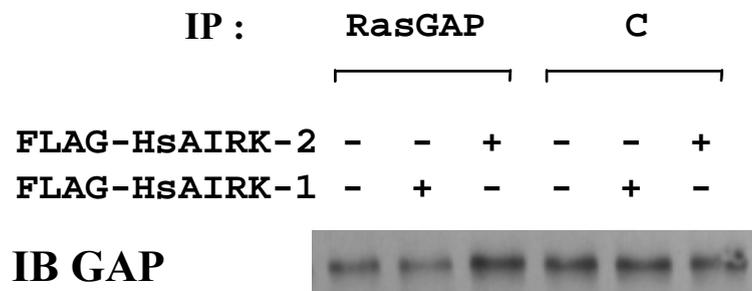


Figure 1: Specific interaction of Aurora/HsAIRK with RasGAP SH3

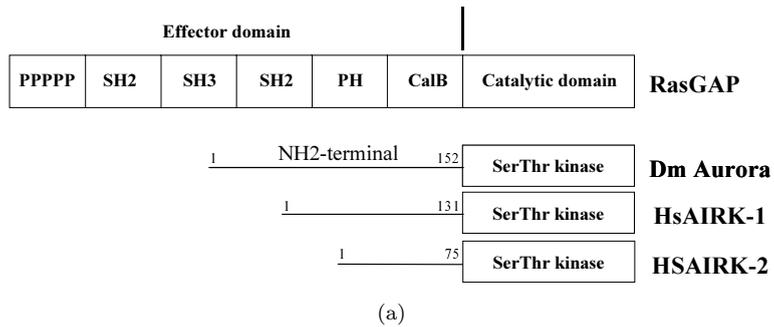


(a)

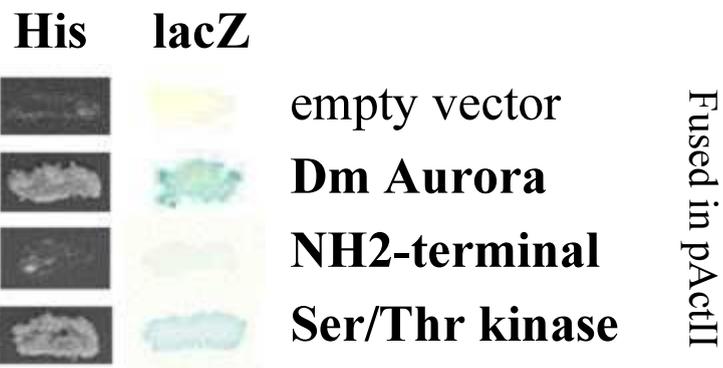


(b)

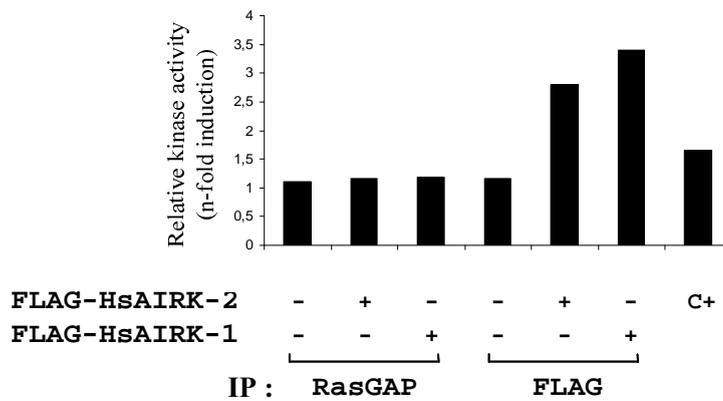
Figure 2: Co-immunoprecipitation of HsAIRK-1 and HsAIRK-2 with RasGAP, in COS cells



Dm GAP SH3 fused in pGBT10

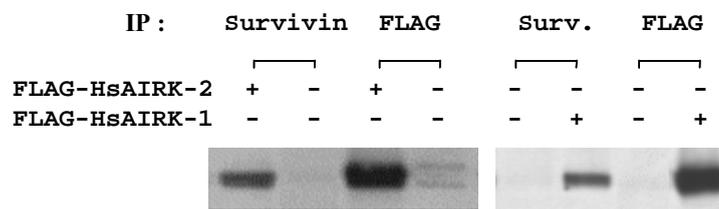


(b)

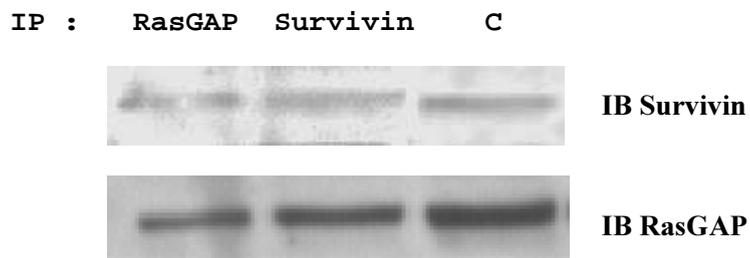


(c)

Figure 3: RasGAP interacts with the Ser/Thr kinase domain of Aurora and inhibited its kinase activity



(a)



(b)

Figure 4: Co-precipitation of RasGAP, HsAIRK-1/HsAIRK-2 and survivin

Conclusion générale

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de remplir en grande partie les objectifs que nous nous étions fixés lors du démarrage de ce projet :

1. validation de la cible constituée par le domaine **SH3** de RasGAP,
2. obtention d'une première série d'inhibiteurs de cette cible,
3. validation de l'approche « aptamères peptidiques »,
4. définition au niveau structural du site d'intérêt thérapeutique au sein du domaine **SH3**,
5. mise au point de techniques simples de test d'affinité de molécules pour ce domaine **SH3**, utilisable dans un crible à haut débit.

La réussite de ce projet marque avant tout la réussite de la coordination d'une équipe importante. En effet, de façon relativement ambitieuse, nous nous étions volontairement placés à l'interface entre de nombreuses disciplines :

- **biologie moléculaire** et génétique de la levure, pour tous les aspects concernant le crible de la banque d'aptamères peptidiques,
- **biochimie** et **biologie cellulaire**, pour mettre au point et utiliser de nombreux tests de validation de notre démarche et des aptamères obtenus,
- **biochimie préparative**, pour la production de nombreuses protéines recombinantes et leurs enrichissements isotopiques,
- **synthèse chimique**, pour l'obtention de peptides synthétiques et de leurs dérivés,
- **biophysique**, pour la mise en œuvre de techniques performantes et miniaturisables d'analyse de complexes moléculaires,
- **analyse structurale** par **résonance magnétique nucléaire** et **modélisation moléculaire**, pour l'obtention d'informations nécessaire à la conduite ultérieure d'une démarche de conception rationnelle d'inhibiteurs de petite taille.

Cette démarche nous a donc placés dans une situation tout à fait semblable à celle des acteurs majeurs de l'industrie pharmaceutique, lors des premières étapes de la conception de molécules thérapeutiques. Il s'agissait de l'un des aspects clés de ce projet, et nous espérons que cette collaboration multidisciplinaire s'étende le plus largement possible dans le cadre de partenariats entre laboratoires publics et privés.

Les résultats obtenus nous ont permis de démontrer la capacité de la technique des aptamères à valider une cible thérapeutique et à obtenir des informations structurales sur cette cible et ses interactions avec ses partenaires. De nombreuses équipes s'étaient

déjà intéressées à ce sujet sans parvenir à ce résultat. Les aptamères identifiés nous ont également permis de reproduire les effets observés avec la micro-injection de l'anticorps mAb200, ce qui valide l'approche choisie.

Sur le plan technologique, les travaux réalisés dans cette thèse ont permis la définition d'une nouvelle approche, en adaptant de nombreux outils existants. En effet, les différentes techniques utilisées font partie de l'arsenal des techniques relativement courantes de la biotechnologie – au sens large – moderne. Cependant, sur le plan méthodologique, notre projet de recherche présente, de par la grande variété des domaines couverts et leur enchaînement, une réelle originalité. Cette originalité tient en particulier à l'utilisation réussie de la technique des aptamères peptidiques pour obtenir des informations structurales. Jusqu'ici, les développements dans cette direction (de l'aptamère peptidique ou du *phage display* au peptide) n'avaient mené qu'à la définition de nouveaux motifs consensus, obtenus par alignements de séquences de régions variables. Les travaux présentés ici n'ont pas encore conduit à la résolution complète de la structure du complexe entre le domaine **SH3** et un peptide (en raison principalement de problèmes de stabilité du peptide qui devraient rapidement être résolus, comme nous l'avons vu). Nous avons toutefois obtenu la démonstration de l'existence d'un complexe stable, dont la structure, qui sera résolue prochainement par RMN ou par cristallographie aux rayons X, sera très certainement proche de celles proposées par modélisation moléculaire et présentées dans le dernier chapitre.

L'un des objectifs initiaux de ce projet concernait la définition précise du site d'intérêt thérapeutique au sein de la surface du domaine **SH3** de RasGAP. En effet, dans le cadre de la recherche d'inhibiteurs d'interactions protéine-protéine impliquant un domaine **SH3**, l'une des questions les plus délicates est probablement celle de la « *target drugability* », c'est à dire la question de la « faisabilité » de la conception de petites molécules inhibitrices.

La plupart des molécules ciblées de petite taille actuellement sur le marché sont des inhibiteurs de site actif enzymatique. Cependant, et comme nous l'avons vu au chapitre 2, de nombreuses études sont en cours pour l'émergence d'autres approches, telles que celle que nous avons choisie, par inhibition d'interactions protéine-protéine.

La principale difficulté de ces approches tient à la grande taille des sites de reconnaissance, et au nombre d'interactions mises en jeu, qui nécessitent la découverte de molécules parfaitement adaptées.

Le site d'intérêt que nous avons identifié comprend une poche hydrophobe encadrée de résidus acides. Malgré sa taille relativement importante en comparaison avec, par exemple, le site ATP ciblé par imatinib, et le fait qu'il ne s'agisse pas d'une cavité (ce qui permet avec une petite molécule de créer un nombre important d'interactions), ce site nous paraît promettre des résultats tout à fait satisfaisants. Les récents succès sur d'autres domaines **SH2** ou **SH3** de conception de molécules de petites tailles et d'affinités importantes témoignent en effet de la faisabilité de cette approche.

Enfin, il est clair que ce projet ne prend pas fin avec cette thèse. Il va se poursuivre au sein de notre laboratoire par l'optimisation par modélisation et synthèse chimique des molécules présentées ici. En parallèle, les structures obtenues vont servir de base à la

définition de tests de criblage *in vitro* de chimiothèques virtuelles. Cette étape permettra la sélection de molécules au sein de chimiothèques obtenues auprès d'instituts partenaires (notamment l'Institut Curie) et leur étude à haut débit en utilisant un test miniaturisé consistant à mesurer l'anisotropie de fluorescence d'un ligand de référence. Nous sommes donc tout à fait confiant dans l'obtention très prochaine de petites molécules inhibitrices du domaine **SH3** de RasGAP, dont l'activité anti-tumorale sera étudiée au laboratoire sur des modèles cellulaires et animaux.

Annexes

Annexe A

Mise au point d'outils de mise en évidence du complexe RasGAP-Aurora

A.1 Un besoin à remplir

Pour confirmer l'interaction RasGAP-**SH3**/Aurora mise en évidence par un crible double-hybride, nous avons besoin d'un système de précipitation de ce complexe efficace, étant donné les difficultés suivantes :

- RasGAP, protéine de 120 *KDa*, migre à une position très proche des chaînes lourdes des immunoglobulines utilisées en immunoprécipitation, et bien souvent révélées par les anticorps secondaires,
- les différentes protéines Aurora migrent à une position très proche des chaînes légères des immunoglobulines utilisées en immunoprécipitation,
- étant données les faibles quantités des protéines présentes dans les lysats que nous souhaitons visualiser, et la difficulté de visualiser des complexes multiprotéiques, nous avons besoin d'un système simple à mettre en œuvre, peu coûteux et efficace.

La figure A.1 présente une expérience de co-précipitation du complexe RasGAP/AuroraSurvivin. Cette expérience a été réalisée sur cellules COS-1¹ en surexprimant Aurora-A taggé FLAG² par transfection transitoire avant de disposer du peptide de précipitation de RasGAP. Après une première révélation par l'anticorps M5 α -FLAG, la membrane du Western-Blot a été hybridée une seconde fois avec l'anticorps mAb200 α -RasGAP-**SH3**. On voit nettement la précipitation de Aurora-A-FLAG lié à RasGAP sur les deux premières colonnes, mais en revanche, lors de la précipitation de Aurora-A-FLAG par l'anticorps M5 couplé aux billes sépharose-protéine A, sur cette membrane, la présence des chaînes lourdes de l'anticorps M5 empêche la visualisation de RasGAP. Nous avons rencontré le même type de problèmes lors de l'utilisation d'anticorps α -Aurora après immunoprécipitation par l'anticorps B4F8 α -RasGAP, Aurora migrant à peu près à la même position que les chaînes légères de cet anticorps.

1. COS-1 : Fibroblastes de singe vert *Cercopithecus aethiops* transformées par *SV40*, exprimant l'antigène T
2. Séquence du tag FLAG utilisé MDFKDDDDK.

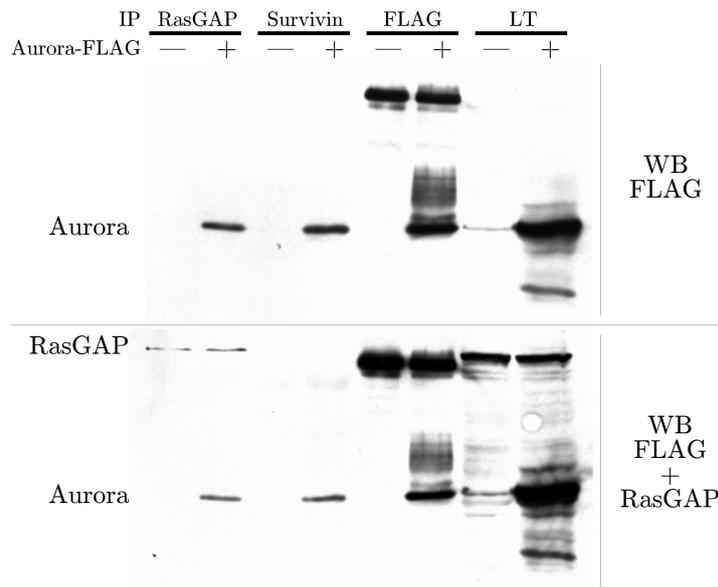


FIG. A.1 – Complexe Aurora/RasGAP dans cellules COS, par surexpression de Aurora-A taggé FLAG.

Nous avons alors étudié la possibilité d'utiliser, en complément des expériences classiques d'immunoprécipitation, la précipitation de RasGAP et des complexes formés par cette protéine avec d'autres protéines, par un peptide reconnu par l'un de ses domaines **SH2**, et fixé covalamment à des billes de sépharose.

La protéine p62-dok est un ligand endogène des domaines **SH2** de RasGAP, et la reconnaissance de cette protéine se fait par l'intermédiaire de plusieurs tyrosines phosphorylées, notamment celle se trouvant en position 296 (Carpino et al., 1997, Kashige et al., 2000). Nous avons donc retenu la séquence ${}_{293}\text{PALpYAEPLDS}_{302}$, issue de la séquence de p62-dok pour la synthèse de ce peptide.

VI

A.2 Synthèse d'un peptide se fixant spécifiquement sur le domaine **SH2** de RasGAP

La synthèse peptidique en phase solide a été réalisée à l'échelle 0,1 mmol sur de la résine HMP, en utilisant un synthétiseur de peptide A431 (Applied Biosystems), en chimie Fmoc. Tous les acides aminés ont été couplés en utilisant les agents de couplage DCC / HOBt, sauf la phospho-tyrosine, qui a été couplée en utilisant BOP / HOBt / DIEA (10:10:30 équivalents) en solution dans NMP.

Après déprotection, clivage, purification sur HPLC et lyophilisation, ce peptide est greffé sur des billes Sépharose-CNBr (Amersham). Ces billes peuvent alors servir à réaliser des colonnes d'affinité pour la purification de la protéine RasGAP par l'un de ses domaines SH2, ainsi que des protéines complexées à RasGAP.

La figure A.2 présente l'une de nos premières expériences de précipitation de RasGAP issu de lysat HeLa par son domaine **SH2**, sous forme d'un Western-blot révélé par l'anticorps B4F8. RasGAP ne se fixe pas sur les billes Sépharose-CNBr non couplées au peptide issu de p62-dok. Pour vérifier que RasGAP était la seule protéine précipitée, nous avons tenté de colorer au bleu

de Coomassie ou au nitrate d'argent des gels similaires, mais la faible quantité de protéines ainsi recueillies n'ont pas permis d'obtenir un résultat significatif.

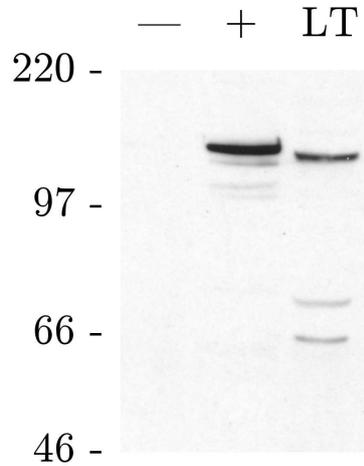


FIG. A.2 – Pull-down de RasGAP par son domaine **SH2**. -/+ : 500 μ g de protéines de lysat de cellules HeLa sont incubées avec des billes CNBr-Sépharose seules (-) ou couplées au peptide p62-dok^{293-302, pY 296} ; après incubation et lavage, les protéines sont décrochées des billes par 40 μ l de tampon de dépôt de Laemmli. LT : dépôt de 50 μ g de lysat total

Toutefois, la figure A.3 montre que l'interaction RasGAP-**SH2**/peptide p62-dok^{293-302, pY 296} est spécifique. L'expérience présentée ici consiste à réaliser une compétition de l'interaction entre RasGAP et ce peptide fixé sur billes CNBr-Sépharose, par ce même peptide, mais libre et placé en solution dans le lysat cellulaire 30 minutes avant l'incubation sur billes. Cette figure permet d'estimer une CI_{50} de l'ordre de 10^{-5} M.

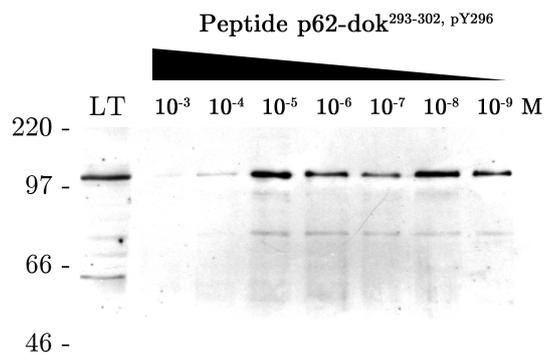


FIG. A.3 – Compétition de l'interaction de RasGAP avec les billes couplées au peptide issu de p62dok par ce peptide en solution. La colonne LT correspond au dépôt de 50 μ g de lysat total.

Annexe B

Matériels et Méthodes

B.1 Biologie Moléculaire

Les méthodes de biologie moléculaire que nous avons utilisé sont tout à fait classiques (construction de plasmides, séquençage...) et ne sont donc pas détaillées ici.

Construction des plasmides pEG202 RasGAP-SH3 et pEG202 RasGAP-SH3^{W317K}

Ces constructions ont été faites par sous-clonage entre les sites de restriction *EcoRI* et *BamHI* ou *SalI* de ce vecteur de fragments issus de plasmides contenant déjà ces domaines, amplifiés par PCR en utilisant les amorces suivantes :

- **SH3**
 - 5'-ATAT GAA TTC GGC GGT GAA GAT AGA TAG AAG GCG TGT ACG AGC (sens)
 - 5'-TAAT GGA TCC TTA TAT TTT TCC TTC ATG TGG ATC TTC (α -sens)
- **SH2-SH3-SH2** (noté parfois ici **SH232**)
 - 5'-ATAT GAA TTC GGT GGC GCC ATA CCG TTG ACC GCT CCT CC (sens)
 - 5'-TAAT GTC GAC CTA TTG TTC TTG ATC CTG CAT TGG TAC (α -sens)

B.2 Sélection d'aptamères peptidiques

Le chapitre 5 contient de nombreux détails concernant les expériences que nous avons réalisées à l'aide de levures. Les protocoles de mise en œuvre des aptamères peptidiques sont la propriété d'*Aptanomics* et ne sont donc pas détaillés ici.

B.3 Biologie cellulaire

B.3.1 Culture cellulaire

Les cellules HeLa utilisées ont été cultivées en milieu DMEM (Gibco, ref. 31966-021, contenant 4,5 g/L de glucose et du GlutaMAX™ I) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Gibco, ref. 10270-106), en présence des antibiotiques pénicilline (100 U/mL) et streptomycine (100 µg/mL). Tous les trois à quatre jours, les cellules sont lavées au PBS, décollées de leur substrat plastique par action de la Trypsine (Gibco) et réensemencées après dilution au 1/5^e. Les cellules sont maintenues dans un incubateur thermostaté à 37°C, en atmosphère enrichie à 5% de CO₂.

La culture des autres types cellulaires a été réalisée dans des conditions similaires au sein du laboratoire de biologie cellulaire d'Aptanomics.

B.3.2 Expression des aptamères

Pour leur expression en cellules humaines, les aptamères ont été sous-clonés dans les vecteurs pPER et pPERt, utilisant un promoteur rétroviral pour l'induction de l'expression. Le vecteur pPERt dispose en outre d'une cassette d'expression Tet-Off, qui permet un contrôle de l'expression des aptamères : la présence dans le milieu de culture de doxycycline inhibe l'expression du transgène.

Les vecteurs d'expression des aptamères sont transfectés dans les différentes lignées cellulaires en utilisant l'agent de transfection ExGen 500 (Euromedex), en suivant le protocole fourni par le fabricant.

B.4 Protéines recombinantes

B.4.1 Expression et Enrichissement isotopique

L'expression du domaine **SH3** de RasGAP a été réalisée en cellules *E. coli* BL21(DE3). Après 8h de pré-culture à 37°C avec agitation vigoureuse, en présence de 100 µg/mL d'ampicilline en milieu LB, les bactéries sont diluées jusqu'à $DO_{600}=0,05$ dans du LB/ampicilline et à nouveau incubées dans les mêmes conditions en erlenmeyer. Lorsque la DO_{600} atteint 0,6 à 0,8 (au bout d'environ 3h), de l'IPTG est ajouté jusqu'à 1 mM final pour induire l'expression de la protéine recombinante.

L'enrichissement homogène en ^{15}N est obtenu en utilisant un milieu de culture minimal dans lequel la seule source d'azote est $^{15}NH_4$.

Après centrifugation à 6000 g pendant 10 min à 4°C, les culots secs bactériens sont congelés pendant une nuit. Le lendemain, les cellules sont lavées deux fois sur glace dans du PBS, et culottées par centrifugation dans les mêmes conditions. Après être resuspendues dans un faible volume de PBS froid, en présence d'inhibiteurs de protéases (Cocktail™, Amersham), les bactéries sont soumises à sonication ultrasonore (trois cycles de 30 s, entrecoupées de refroidissement sur glace pendant 30 s). Après sonication, on ajoute 1% final de Triton-X100 et on laisse la lyse se poursuivre pendant 1h à 4°C avec agitation douce. Le lysat cellulaire est ensuite clarifié par centrifugation à 14000 g pendant 30 min.

B.4.2 Purification

La purification du domaine **SH3** de RasGAP, portant le tag [His]₆, a été réalisée sur colonne HIS-Select™ (Sigma) en utilisant une chaîne FPLC Amersham. Le lysat contenant la protéine recombinante a tout d'abord été chargé sur la colonne par injections successives (jusqu'à cinq injections de 2mL de lysat, entrecoupées par des lavages avec le tampon A, 1 mL/min). La colonne a ensuite été lavée pendant 10 min avec ce tampon A, avant de commencer une élution par un gradient de tampon B dilué dans le tampon A (de 0 à 100% de B dans A en 30 min). L'élution du produit majoritaire intervient vers 25% de B dans A. Après analyse par SDS-PAGE, cette protéine a la taille attendue.

Tampons :

- A : 50 mM phosphate pH 7,5 ; 300 mM NaCl ; 10 mM imidazole

– B : 50 mM phosphate pH 7,5 ; 300 mM NaCl ; 500 mM imidazole

Le tampon a ensuite été remplacé par un tampon [50 mM phosphate pH 7,5, 100 mM NaCl] et la protéine concentrée par ultrafiltration (filtres Millipore Amicon[®] 4 et 15) en suivant les recommandations du constructeur des filtres. C'est ce tampon qui a également été utilisé pour les mesures d'anisotropie de fluorescence.

B.5 Synthèse peptidique

B.5.1 Synthèse en phase solide

La synthèse des différents peptides a été réalisée sur des synthétiseurs Applied Biosystems A431 et A433, en utilisant les deux protocoles de synthèse en chimie Fmoc proposés par le fabricant, à savoir en utilisant soit les agents de couplage DCC/HOBt, soit HBTU/HOBt (chimie FastMoc[™]).

La qualité de la synthèse peptidique est vérifiée au cours de son déroulement par analyse par spectrométrie UV de la déprotection. En effet, la libération du groupement Fmoc conduit à la formation d'un sel absorbant dans l'ultraviolet. La mesure de l'absorbance UV du contenu du réacteur après la déprotection fournit donc une évaluation relativement fiable de la qualité de la déprotection du dernier acide aminé couplé, et donc directement de la qualité de son couplage.

La figure B.1 présente les principales protections utilisées pour la synthèse peptidique en phase solide.

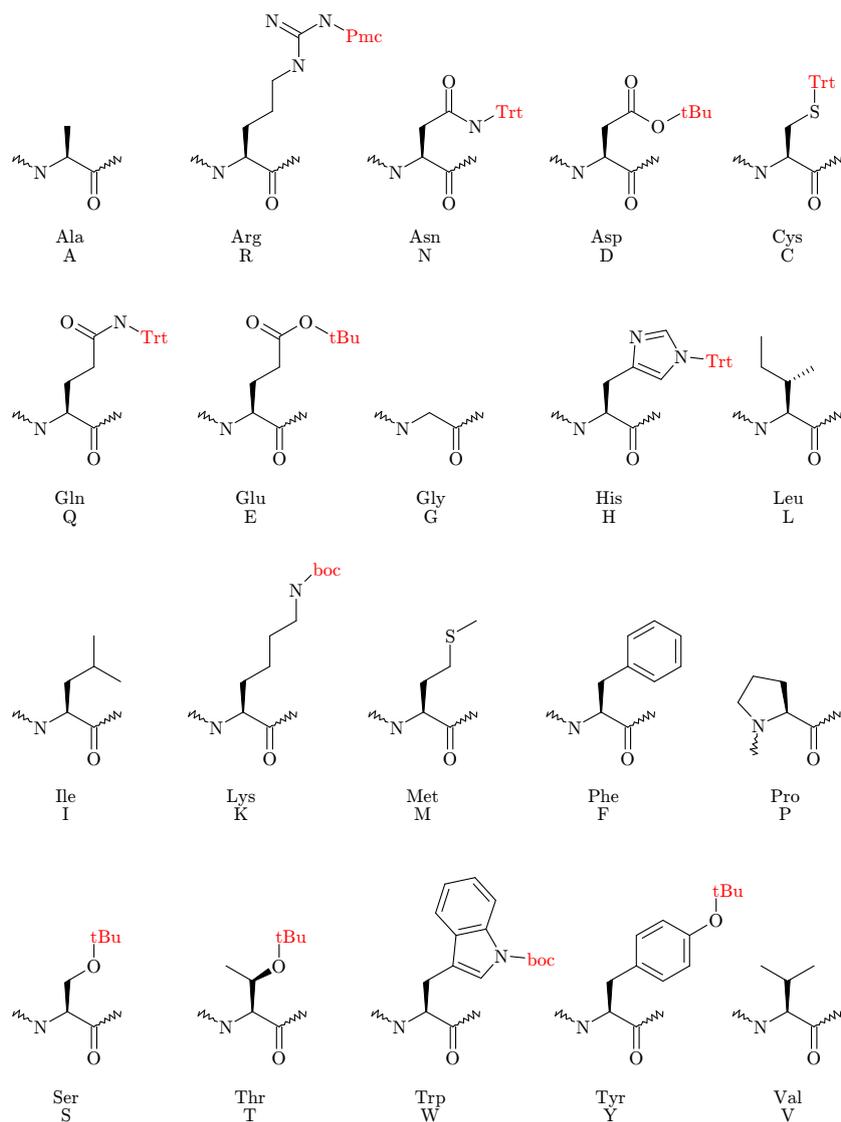


FIG. B.1 – Principales protections utilisées pour la synthèse peptidique en phase solide

Sauf mention contraire, la synthèse peptidique a été réalisée sur résine HMP (Applied Biosystems)

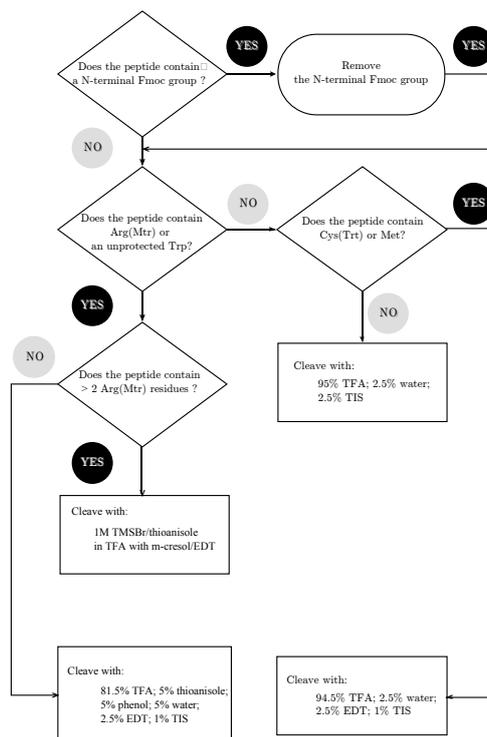


FIG. B.2 – Procédures de clivage utilisées, selon la composition du peptide synthétisé (d’après White et al., 2002)

B.5.2 Purification

Après clivage et évaporation de l’acide, nous avons précipité et lavé à l’éther les peptides (pour retirer tous les scavengers). Ensuite, les peptides sont purifiés sur colonne HPLC semi-préparative (colonne Waters Symmetry 300™ C₁₈ 7 μm, 19 × 250 mm), en utilisant une chaîne pompe/injecteur Waters 600 et un détecteur UV Waters à 214 nm. Les différentes fractions sont analysées en HPLC analytique en utilisant une colonne Vydac (colonne C₁₈ 5 μm, ref. 218TP™54, 4,6 × 250 mm).

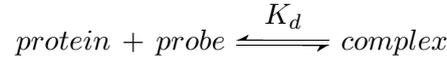
B.6 Analyse biophysique

B.6.1 Mesures d’affinités par polarisation de fluorescence

Après avoir assez longuement détaillé le principe de la mesure de la polarisation de fluorescence (cf. p. 8.2), nous allons montrer brièvement comment cette technique peut être utilisée pour mesurer l’affinité d’un ligand pour une protéine. Nous allons étudier le cas de la mesure directe de l’affinité d’un ligand fluorescent, et ensuite le cas de la mesure indirecte de l’affinité d’un ligand non fluorescent, par compétition de l’interaction avec un autre ligand « de référence » fluorescent.

Mesure directe : ligand fluorescent

Au sein d'une solution contenant une protéine et un ligand fluorescent capable de s'y fixer, à l'équilibre, nous avons coexistence de deux trois espèces, dont deux seulement sont fluorescentes :



Dès lors, à l'équilibre, les concentrations suivent évidemment l'équation suivante :

$$K_d = \frac{[protein] \cdot [probe]}{[complex]}$$

Les deux espèces *complex* et *probe* sont fluorescentes et possèdent des caractéristiques très proches pour leurs paramètres de fluorescence (notamment τ). En revanche, leurs volumes moléculaires V sont différents et on a :

$$V_{probe} < V_{complex}$$

On peut supposer en première approximation que :

$$\frac{V_{probe}}{V_{complex}} \sim \frac{MW_{probe}}{MW_{complex}}$$

où MW désigne la masse moléculaire des espèces.

La polarisation globale P_{global} de la fluorescence de l'échantillon va donc résulter de l'addition des polarisations des deux espèces *probe* et *complex*, suivant le système d'équations B.1 :

$$\left\{ \begin{array}{l} P_{global} = P_{probe} \cdot [probe] + P_{complex} \cdot [complex] \\ K_d = \frac{[protein] \cdot [probe]}{[complex]} \\ \frac{n_{probe}}{volume} = [probe] + [complex] \\ \frac{n_{protein}}{volume} = [protein] + [complex] \end{array} \right. \quad (B.1)$$

Les données de ce système sont les quantités de chacune des molécules (n_{probe} et $n_{protein}$) et la polarisation mesurée P_{global} . Il s'agit donc d'estimer le paramètre K_d et les paramètres P_{probe} , $P_{complex}$.

Les expériences que nous avons réalisées consistent tout d'abord à mesurer la polarisation de fluorescence de différents échantillons contenant une quantité fixée et connue du ligand fluorescent *probe* (dans notre cas, un peptide couplé à la fluorescéine), et des quantités variables et connues de la protéine *protein* (dans notre cas, le domaine **SH3** de RasGAP) pour laquelle nous souhaitons mesurer l'affinité.

L'étude élémentaire de ce système d'équation amène trois conclusions :

$$\frac{n_{protein}}{vol} \ll K_d \Rightarrow P \approx P_{probe}$$

$$\frac{n_{protein}}{vol} \gg K_d \Rightarrow P \approx P_{protein}$$

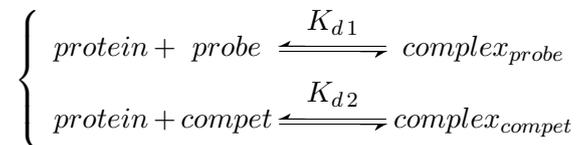
$$\frac{n_{protein}}{vol} = K_d \Rightarrow P = \frac{1}{2} (P_{probe} + P_{protein})$$

Il est donc tout à fait simple d'obtenir une bonne estimation de la valeur du K_d d'une interaction si les données sont suffisantes, c'est à dire s'il est possible d'utiliser des concentrations suffisamment importantes de protéine, pour se placer dans la condition $[protein] \gg K_d$. Dans certains cas, nous n'avons pas pu nous placer dans ces conditions, et nous avons donc eu recours à l'utilisation d'algorithmes statistiques d'estimation par régression non-linéaire de ces paramètres, notamment implémentés par Kuzmic (1996) dans le logiciel DynaFit¹.

Davantage de précisions pourront être trouvées concernant la mesure d'affinité de peptides par polarisation de fluorescence dans la revue de Burke et al. (1996).

Mesure indirecte : Compétition d'interaction

Après avoir caractérisé un ligand fluorescent de référence, il est possible de réaliser des expériences de compétition de l'interaction de ce ligand *probe* par une autre molécule *compet*.



Bien évidemment, les espèces fluorescentes en présence sont toujours uniquement *probe* et *complex_{probe}*.

L'expérience réalisée consiste alors à mesurer la polarisation de la fluorescence d'échantillons contenant des quantités constantes et connues de *probe* et de *protein*, et avec une quantité variable de la molécule *compet*.

Les équations décrivant ce système deviennent alors :

$$\left\{ \begin{array}{l} P_{global} = P_{probe} \cdot [probe] + P_{complex_{probe}} \cdot [complex] \\ K_{d1} = \frac{[protein] \cdot [probe]}{[complex_{probe}]} \\ K_{d2} = \frac{[protein] \cdot [compet]}{[complex_{compet}]} \\ \frac{n_{probe}}{volume} = [probe] + [complex_{probe}] \\ \frac{n_{compet}}{volume} = [compet] + [complex_{compet}] \\ \frac{n_{protein}}{volume} = [protein] + [complex_{probe}] + [complex_{compet}] \end{array} \right. \quad (B.2)$$

Les données de ce système sont les quantités de chacune des molécules (n_{probe} , n_{compet} et $n_{protein}$), la polarisation mesurée P_{global} et les paramètres estimés antérieurement (P_{probe} , $P_{complex_{probe}}$ et K_{d1}).

La situation est donc relativement plus compliquée que dans le cas précédent. Ce système d'équations (B.2) ne permet plus, comme le système (B.1), de tirer des conclusions simples comme celles qui permettent une lecture directe du K_d dans le cas d'un seul ligand. Le recours à un logiciel d'analyse statistique pour estimer le paramètre K_{d2} est donc nécessaire. Le logiciel DynaFit rend possible non seulement la réalisation de telles estimations, mais également celle

1. DynaFit, Biokin Ltd., Pullman, WA, USA. www.biokin.com

de simulations permettant, en faisant des hypothèses sur les affinités des molécules à tester, de déterminer les meilleures conditions expérimentales pour l'obtention de signaux suffisamment importants pour leur détection.

Aspects expérimentaux

La protéine recombinante RasGAP-**SH3**-[His]₆ produite et purifiée tel que détaillé précédemment a été utilisée. Sa concentration a été déterminée par spectrophotométrie UV à 280 nm et par le test colorimétrique de Bradford (1976).

Les ligands peptidiques fluorescents et non fluorescents, lyophilisés et pesés, ont été dissous dans quelques μL de DMSO, avant d'être dilués jusqu'aux concentrations souhaitées dans le même tampon que celui utilisé pour la préparation de la protéine RasGAP-**SH3**-[His]₆.

L'expérience élémentaire que nous avons réalisée consiste à mesurer l'anisotropie de fluorescence d'une série de dilutions du **SH3**, en restant en présence d'une concentration fixe du peptide fluorescent. D'une façon générale, nous avons utilisé comme concentration du peptide fluorescent 30 nM, et avons dilué le domaine **SH3** de 500 μM à 500 nM, en utilisant des dilutions successives. Pour les expériences de compétition d'interaction, le compétiteur, initialement fortement concentré, est dilué progressivement dans une solution contenant le peptide de référence à 30 nM et le domaine **SH3** de RasGAP à 150 μM .

Toutes les mesures ont été réalisées en plaque 384 puits (réf. 3676, plaques polystyrène NBS™ faible volume, noires, Corning®), dans un volume utile final de 12 μL .

Les filtres utilisés sur le lecteur de plaques Envision Perkin Elmer sont les suivants :

- excitation : filtre « FITC FP 480 nm,
- émission : filtres FITC FP P-pol 535 nm et FITC FP S-pol 535 nm.

L'intensité de la lampe flash, le nombre d'éclairs et la durée d'acquisition sont réglés suivant les recommandations du constructeur Perkin Elmer.

B.6.2 Corrélation de fluorescence

La corrélation $\langle G(\tau) \rangle$ se calcule à partir de la mesure l'intensité de la fluorescence $\langle F(t) \rangle$ en fonction du temps :

$$\langle G(\tau) \rangle = \frac{\langle F(t) \rangle^2 + \langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

Moyennant quelques modélisations (notamment du volume éclairé par le laser bi-photonique), on peut exprimer l'autocorrélation en fonction de la taille du volume actif (volume gaussien tridimensionnel de diamètre r_0 et de hauteur z_0), du temps de diffusion à l'intérieur de ce volume τ_D et du nombre moyen de molécules $\langle N \rangle$:

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{r_0}{z_0} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1/2}$$

Le temps de diffusion τ_D s'exprime de la façon suivante, avec D le coefficient de diffusion :

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D}$$

On peut remarquer ici que d'après la relation d'Einstein-Stokes, D est relié au rayon moléculaire r (avec η : viscosité du milieu) :

$$D = \frac{k \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot r}$$

Bien évidemment, la masse d'une molécule est plutôt reliée au cube de ce rayon moléculaire, d'après la relation suivante :

$$MW \propto \text{volume} \propto r^3$$

On conçoit donc que si la masse d'un molécule « fluorescente » est multipliée par 2 (ce qui est un ordre de grandeur cohérent pour la fixation d'un peptide sur le domaine **SH3**), son coefficient de diffusion sera multiplié par $1/\sqrt[3]{2}$ ($\approx 0,79370236$).

Annexe C

Domaines **SH3** dont la structure a été résolue

Le tableau C.1 présente la liste issue de la PDB des domaines **SH3** (seuls ou en présence de ligands) dont la structure a été résolue.

Protéine	Org.	Pdb	Technique	Ligand	Référence
α -Spectrin	<i>Gg</i>	1E7O	X-ray		
		1UUE	X-ray		
		1M8M	RMN		Castellani et al. (2002)
		1BK2	X-ray		Martinez et al. (1998)
		1NEG	X-ray		Mueller et al. (2003)
		1PWT	X-ray		Musacchio et al. (1992)
		1E6G	X-ray		Ventura et al. (2002)
		1E6H	X-ray		Ventura et al. (2002)
		1H8K	X-ray		Ventura et al. (2002)
		1HD3	X-ray		Viguera et al. (2002)
Abl	<i>Hs</i>	1AWO	RMN		Gosser et al. (1995)
		2ABL	X-ray		Nam et al. (1996)
		1BBZ	X-ray	APSYSPPPPP	Pisabarro et al. (1998)
Abl	<i>Mm</i>	1ABO	X-ray	APTMPPLPP	Musacchio et al. (1994)
		1ABQ	X-ray		Musacchio et al. (1994)
Abl	<i>n/a</i>	1BBZ	X-ray	APSYSPPPPP	Pisabarro et al. (1998)
ABP1	<i>Sc</i>	1JO8	X-ray		Fazi et al. (2002)
Adap	<i>Hs</i>	1RI9	RMN		Heuer et al. (2004)
Amphiphysin	<i>Rn</i>	1BB9	X-ray		Owen et al. (1998)
BAA76854.1	<i>Hs</i>	1UG1	RMN		
Bruton's kinase	<i>Hs</i>	1AWW	RMN		Hansson et al. (1998)
		1AWX	RMN		Hansson et al. (1998)
		1QLY	RMN		Tzeng et al. (2000)
Crk	<i>Hs</i>	1JU5	RMN	EPGPYAQPSVNTK	Donaldson et al. (2002)
		1CKB	X-ray	PPVPPRRRR	Wu et al. (1995)

TAB. C.1: Domaines SH3 dont la structure a été résolue (Suite page suivante)

Protéine	Org.	Pdb	Technique	Ligand	Référence
Crk	<i>Mm</i>	1M30	RMN		
		1M3A	RMN		
		1M3B	RMN		
		1M3C	RMN		
		1JU5	RMN	EPGPYAQPSVNTK	Donaldson et al. (2002)
		1B07	X-ray	YEVPGVPVPRRR	Nguyen et al. (1998)
		1CKA	X-ray	PPPALPPKRR	Wu et al. (1995)
		1CKB	X-ray	PPPVPVPRRR	Wu et al. (1995)
Crk	<i>n/a</i>	1B07	X-ray	YEVPGVPVPRRR	Nguyen et al. (1998)
Csk	<i>Hs</i>	1CSK	X-ray		Borchert et al. (1994)
Eps8	<i>Mm</i>	1AOJ	X-ray		Kishan et al. (1997)
		1I07	X-ray		Kishan et al. (2001)
		1I0C	X-ray		Kishan et al. (2001)
Fyn	<i>HIV-1</i>	1AVZ	X-ray		Arold et al. (1997)
		1EFN	X-ray		Lee et al. (1996)
Fyn	<i>Hs</i>	1AVZ	X-ray		Arold et al. (1997)
		1G83	X-ray		Arold et al. (2001)
		1M27	X-ray	KSLTIYAQVQK	Chan et al. (2003)
		1EFN	X-ray		Lee et al. (1996)
		1NYF	RMN		Morton et al. (1996)
		1NYG	RMN		Morton et al. (1996)
		1SHF	X-ray		Noble et al. (1993)
		1A0N	RMN	PPRPLPVAPGSSKT	Renzoni et al. (1996)
		1AZG	RMN	PPRPLPVAPGSSKT	Renzoni et al. (1996)
Garp-Like 3	<i>Mm</i>	1J0F	RMN		
GEF-6	<i>Hs</i>	1UJY	RMN		
Grb-2	<i>Ce</i>	1K76	RMN		Ferreon et al. (2003)
		1KFZ	RMN		Ferreon et al. (2003)
		1SEM	X-ray	PPPVPVPRRR	Lim et al. (1994b)
		2SEM	X-ray	PPPVPRR	Nguyen et al. (1998)
		3SEM	X-ray	PPPVPVPRRR	Nguyen et al. (1998)
Grb-2	<i>Dm</i>	1AZE	RMN	VPPPVPVPRRR	Vidal et al. (1999)
Grb-2	<i>Hs</i>	1I06	RMN	RHYRPLPPLP	
		1GFC	RMN		Kohda et al. (1994)
		1GFD	RMN		Kohda et al. (1994)
		1AZE	RMN	VPPPVPVPRRR	Vidal et al. (1999)
Grb-2	<i>Mm</i>	1SEM	X-ray	PPPVPVPRRR	Lim et al. (1994b)
		1GBR	RMN	SPLLKLPKTYKRE	Wittekind et al. (1994)
		1GBQ	RMN	VPPPVPVPRRR	Wittekind et al. (1997)
		2GBQ	RMN	VPPPVPVPRRR	Wittekind et al. (1997)
		3GBQ	RMN	VPPPVPVPRRR	Wittekind et al. (1997)
		4GBQ	RMN	VPPPVPVPRRR	Wittekind et al. (1997)
Grb-2	<i>n/a</i>	2SEM	X-ray	PPPVPRR	Nguyen et al. (1998)
		3SEM	X-ray	PPPVPVPRRR	Nguyen et al. (1998)
hck	<i>Hs</i>	1BU1	X-ray		Arold et al. (1998)
		4HCK	RMN		Horita et al. (1998)
		5HCK	RMN		Horita et al. (1998)
Internalin-B	<i>Lm</i>	1M9S	X-ray		Marino et al. (2002)

TAB. C.1: Domaines SH3 dont la structure a été résolue (Suite page suivante)

Protéine	Org.	Pdb	Technique	Ligand	Référence
Intersectin-B	<i>Hs</i>	1J3T	RMN		
		1UDL	RMN		
		1UE9	RMN		
		1UFF	RMN		
		1UHF	RMN		
KIAA0621	<i>Hs</i>	1UGV	RMN		
KIAA1010	<i>Hs</i>	1UHC	RMN		
Lck	<i>Hs</i>	1H92	RMN		
		1KIK	RMN		
		1LCK	X-ray	EGQYQPQPA	Eck et al. (1994)
Mona/Gads	<i>Mm</i>	1H3H	RMN	APSIDRSTKPA	
		1OEB	X-ray	PAPSIDRSTKPL	
		1UTI	X-ray	GQPPLVPPRKEKMRGK	
Nebulin	<i>Hs</i>	1ARK	RMN		Politou et al. (1998)
		1NEB	RMN		Politou et al. (1998)
p40.4	<i>Sc</i>	1OOT	X-ray		
p47-Phox	<i>Hs</i>	1UEC	X-ray		
		1K4U	RMN		Kami et al. (2002)
Pep	<i>Mm</i>	1JEG	RMN		Ghose et al. (2001)
Pex13p	<i>Sc</i>	1JQQ	X-ray		Douangamath et al. (2002)
		1N5Z	X-ray	EAMPPTLPHRDWKD	Douangamath et al. (2002)
		1NM7	RMN		Pires et al. (2003)
Phospholipase	<i>Hs</i>	1HSQ	RMN		Kohda et al. (1993)
		2HSP	RMN		Kohda et al. (1993)
PI3K	<i>Bt</i>	1PNJ	RMN		Booker et al. (1993)
		2PNI	RMN		Booker et al. (1993)
PI3K	<i>Hs</i>	1PKS	RMN		Koyama et al. (1993)
		1PKT	RMN		Koyama et al. (1993)
		1PHT	X-ray		Liang et al. (1996a)
PSAE	<i>Sy.</i>	1PSE	RMN		Falzone et al. (1994)
		1PSF	RMN		Falzone et al. (1994)
PSD-95	<i>Rn</i>	1KJW	X-ray		McGee et al. (2001)
		1JXM	X-ray		Tavares et al. (2001)
		1JXO	X-ray		Tavares et al. (2001)
SH3BGRL3	<i>Mm</i>	1T1V	X-ray		Nardini et al. (2004)
Src	<i>Asv</i>	1QWE	RMN	APPLPPRNRPRL	Feng et al. (1995)
		1QWF	RMN	VSLARRPLPLP	Feng et al. (1995)
Src	<i>Gg</i>	1PRL	RMN	AFAPPLPRR	Feng et al. (1994)
		1PRM	RMN	AFAPPLPRR	Feng et al. (1994)
		1RLP	RMN	RALPPLPRY	Feng et al. (1994)
		1RLQ	RMN	RALPPLPRY	Feng et al. (1994)
		1SHG	X-ray		Musacchio et al. (1992)
		1SRL	RMN		Yu et al. (1993)
		1SRM	RMN		Yu et al. (1993)
Src	<i>Hs</i>	1SHD	X-ray		Gilmer et al. (1994)
Stam-2	<i>Mm</i>	1UJ0	X-ray	TPMVNRENKPP	
Tec	<i>Mm</i>	1GL5	RMN		Pursglove et al. (2002)
Vav	<i>Hs</i>	1GCQ	X-ray		Nishida et al. (2001)

TAB. C.1: Domaines SH3 dont la structure a été résolue (Suite page suivante)

Protéine	Org.	Pdb	Technique	Ligand	Référence
Vav	<i>Mm</i>	1GCP	X-ray		Nishida et al. (2001)
		1K1Z	RMN		Ogura et al. (2002)

TAB. C.1: Domaines SH3 dont la structure a été résolue

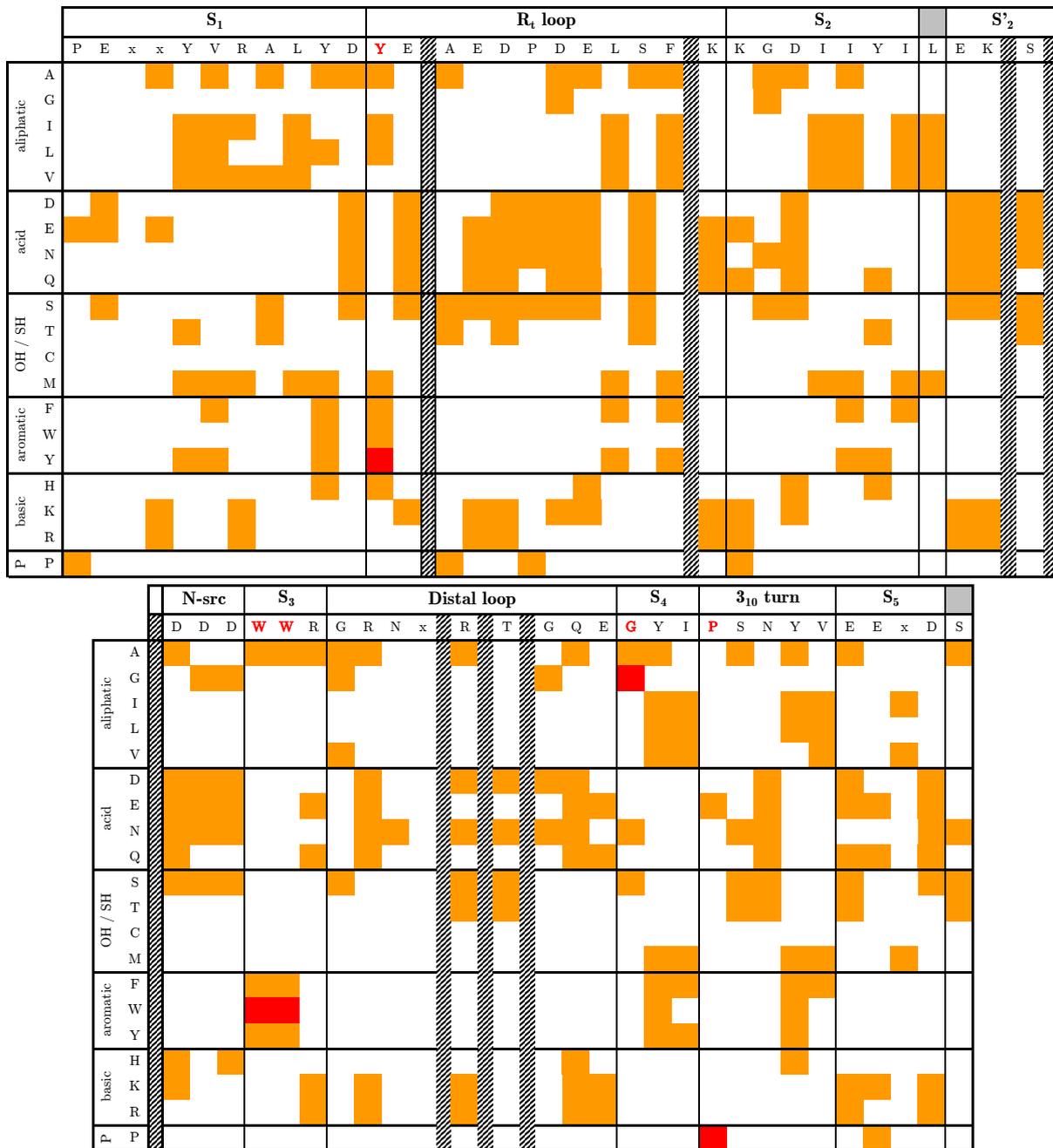


FIG. C.1 – Matrice simplifiée de définition du motif des domaines **SH3**. Le motif **SH3** a la référence PS50002 dans la base de données PROSITE (Sigrist et al., 2002). Cette matrice permet de calculer le score de n'importe quelle séquence protéique pour déterminer s'il s'agit d'un domaine **SH3**. Sur cette figure, les valeurs de score, obtenues statistiquement à partir d'un jeu initial de domaines reconnus comme étant de type **SH3**, ont été remplacées pour une facilité de lecture par un code de couleur. En haut de la figure est notée la séquence consensus. Pour chaque position au sein d'un domaine **SH3**, les acides aminés les plus fréquemment rencontrés (et donc les plus probables) sont notés en orange. On retrouve en rouge les acides aminés les plus conservés.

Annexe D

Données RMN

Dans les pages suivantes sont présentées les attributions du domaine **SH3** de RasGAP telles qu'elles ont été déterminées par M. Yinshan YANG. La nomenclature utilisée est celle proposée par **IUAPC (1998)**, et rappelée sur la figure D.1.

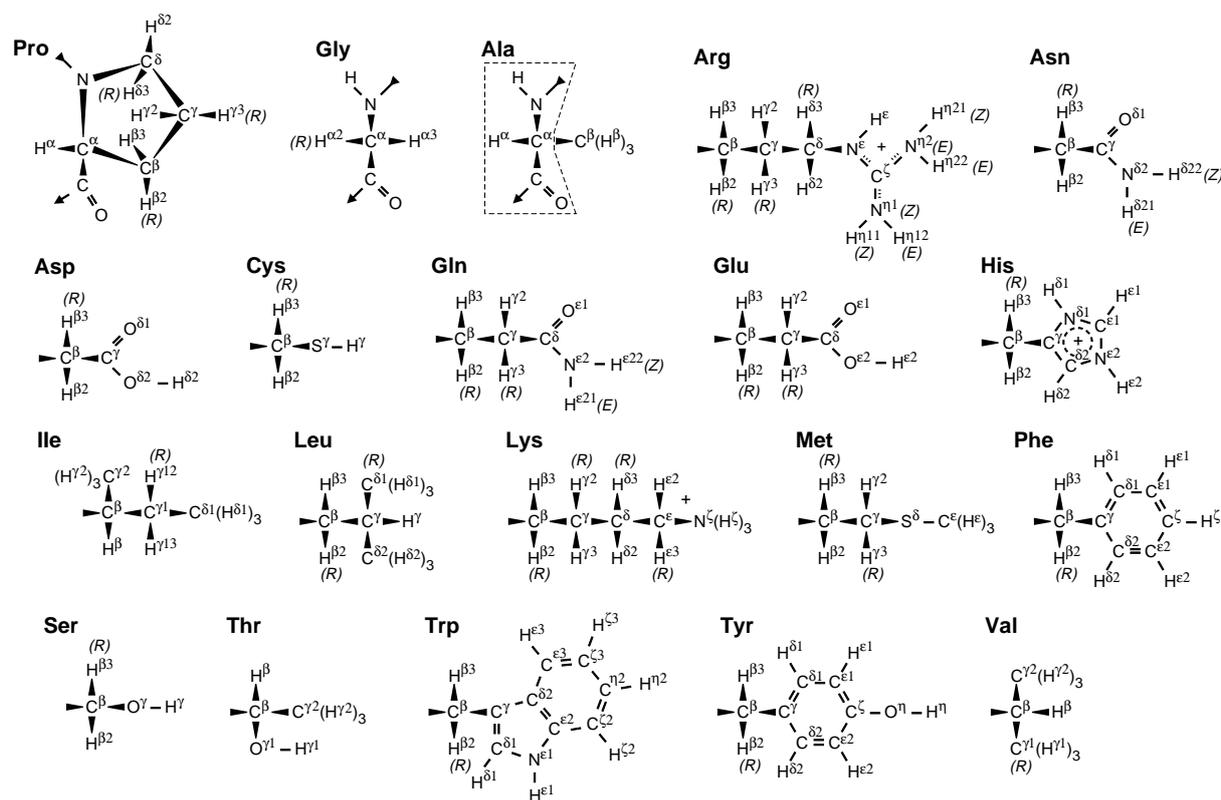


FIG. D.1 – Nomenclature des atomes des acides aminés (d'après **IUAPC, 1998**).

D.1 Attributions ^1H du domaine **SH3**²⁷⁵⁻³⁵⁰

	H	H^α	H^β	Other H
P1		4.42	2.26, 2.26	H^γ 1.98, 1.89; H^δ 3.82, 3.62
E2	8.44	4.51	2.01, 1.85	H^γ 2.30, 2.30
P3		4.46	2.26, 2.26	H^γ 2.00, 1.87; H^δ 3.80, 3.68
V4	8.31	4.07	2.35	
E5	8.60	4.49	2.03, 1.93	H^γ 2.24, 2.24
D6	8.45	4.66	2.70, 2.60	
R7	8.25	4.33	1.69, 1.69	H^γ 1.55, 1.55; H^δ 3.19, 3.19
R8	8.66	4.25	1.89, 1.89	H^γ 1.73, 1.73; H^δ 3.14, 2.92; H^ϵ , 7.99
R9	8.58	5.60	1.68, 1.68	H^γ 1.58, 1.58; H^δ 3.16, 3.16
V10	8.23	5.14	1.89	
R11	9.20	5.68	1.65, 1.50	H^γ 1.39, 1.39; H^δ 3.24, 3.13
A12	9.40	4.90		
I13	9.20	4.36	2.10	$H^{\gamma 1}$ 1.90,
L14	7.84	4.62	1.81, 1.74	H^γ 1.56
P15		4.63	2.41, 2.41	H^γ 2.08, 2.02; H^δ 3.77, 3.58
Y16	7.00	4.93	3.66, 3.37	$H^{\delta 1}$ 7.13; $H^{\delta 2}$ 7.13; $H^{\epsilon 1}$ 7.03
T17	7.15	4.30	3.54	
K18	8.22	4.63	1.86, 1.78	H^γ 1.38, 1.38; H^δ 1.59, 1.59; H^ϵ 2.93, 2.93
V19	8.28	4.09	1.87	
P20		4.21	2.26, 2.03	H^γ 1.93, 1.81; H^δ 3.95, 3.66
D21	8.94	4.37	2.92, 2.84	
T22	7.34	5.23	4.34	
D23	8.97	5.05	3.33, 2.63	
E24	7.73		2.37, 2.00	H^γ 2.60, 2.60
I25	8.75	4.69	1.59	$H^{\gamma 1}$ 1.48,
S26	8.85	4.93	4.20, 3.84	
F27	9.59		3.45, 2.99	$H^{\delta 1}$ 6.85; $H^{\epsilon 1}$ 6.97
L28	7.90	4.13	2.26, 2.26	H^γ 2.14
K29	8.18	4.62	1.74, 1.68	H^γ 1.34, 1.24; H^δ 1.10, 1.10; H^ϵ 3.40, 3.02
G30	8.66	3.41, 4.46		
D31	7.95	4.37	2.63, 2.00	
M32	8.23	5.17	1.98, 1.85	H^γ 2.60, 2.46
F33	9.02	5.74	2.61, 2.40	
I34	8.19	4.61	1.52	$H^{\gamma 1}$ 0.86
V35	8.43	3.92	1.97	
H36	9.36		3.34, 3.25	$H^{\delta 2}$ 6.87; $H^{\epsilon 1}$ 7.66
H37	7.97	5.02	2.81, 2.66	$H^{\delta 2}$ 6.74, 7.42
E38	8.82	4.48	1.95, 1.95	H^γ 2.16, 2.16
L39	8.55	4.73	1.84, 1.70	H^γ 1.56
E40	8.16	4.37	2.10, 2.00	H^γ 2.35, 2.35
D41	8.95	4.40	3.06, 2.95	
G42	8.39	4.02, 3.59		
W43	7.39	5.02	3.33, 3.24	$H^{\delta 1}$ 7.36; $H^{\epsilon 3}$ 6.74; $H^{\eta 2}$, 7.19; $H^{\zeta 2}$ 7.45; $H^{\zeta 3}$ 6.74; $H^{\epsilon 1}$, 10.18
M44	9.45	5.02	1.92, 1.65	H^γ 2.32, 2.27
W45	8.87	5.14	3.43, 3.08	$H^{\delta 1}$ 6.88; $H^{\epsilon 3}$ 7.52; $H^{\eta 2}$ 7.26; $H^{\zeta 2}$ 7.40; $H^{\zeta 3}$ 7.09; $H^{\epsilon 1}$ 10.28
V46	8.81	5.54	2.12	
T47	8.23	5.05	3.92	
H48	8.93	4.47	3.43, 2.42	$H^{\delta 2}$ 6.35, 7.48
L49	8.95	4.12	1.58, 1.58	H^γ 1.45
R50	8.60	4.26	1.90, 1.75	H^γ 1.45, 1.35
T51	6.98	4.35	4.22	
D52	8.75	4.34	3.04, 2.68	

TAB. D.1: ...suite page suivante

	<i>H</i>	<i>H</i> ^α	<i>H</i> ^β	<i>Other H</i>
E53	7.55	4.38	2.00, 1.91	H ^γ 2.32, 2.25
Q54	8.38	5.74	2.00, 1.94	H ^γ 2.55, 2.42; H ^{ε2} 6.78, 7.31
G55	7.93	3.74, 3.74		
L56	7.80	5.46	1.76, 1.76	H ^γ 1.39
I57	8.91	4.71	1.35	H ^{γ1} 0.68, 0.48
V58	7.58	4.13	0.30	
E59	8.22	3.65	2.06, 1.89	H ^γ 2.26, 2.26
D60	7.43	4.28	2.59, 1.64	
L61	7.27	4.45	2.15, 1.64	H ^γ 1.37
V62	7.52	5.46	1.76	
E63	8.98	4.91	2.03, 1.87	H ^γ 2.32, 2.32
E64	8.69	4.26	2.02, 1.90	H ^γ 2.33, 2.29
V65	8.05	4.09	1.88	
G66	8.68	4.13, 3.90		
R67	8.46	4.27	1.83, 1.74	H ^γ 1.62, 1.62; H ^δ 3.18, 3.18
E68	8.72	4.23	2.02, 1.88	H ^γ 2.22, 2.22
E69	8.31	4.21	2.00, 1.86	H ^γ 2.21, 2.21
D70	8.48	4.90	2.71, 2.50	
P71		4.42	2.32, 2.14	H ^γ 1.92, 1.82; H ^δ 3.63, 3.49
H72	8.54	4.59	3.19, 3.13	H ^{δ2} 7.14; H ^{ε1} 8.12
E73	8.26	4.22	2.02, 1.99	H ^γ 2.20, 2.20
G74	8.53	3.92, 3.92		
K75	8.12	4.35	1.83, 1.72	H ^γ 1.38, 1.38; H ^δ 1.64, 1.64; H ^ε 2.96, 2.96
I76	7.80	4.05	1.79	H ^{γ1} 1.39,

TAB. D.1: 275-350

D.2 Attributions ¹H du domaine SH3²⁷⁹⁻³⁴²

	<i>H</i>	<i>H</i> ^α	<i>H</i> ^β	<i>Other H</i>
E5	8.49	4.28	2.00, 1.90	H ^γ 2.21, 2.21
D6	8.93	4.73	2.72, 2.59	
R7	8.6	4.35	1.88, 1.88	H ^γ 1.70, 1.70; H ^δ 3.21, 3.11; H ^ε 7.55
R8	8.65	4.27	1.74, 1.74	H ^γ 1.38, 1.38; H ^δ 3.15, 2.93; H ^ε , 8.03
R9	8.59	5.60	1.68, 1.68	H ^γ 1.57, 1.57; H ^δ 3.16, 3.03; H ^ε , 7.36
V10	8.27	5.14	1.88	
R11	9.20	5.69	1.68, 1.51	H ^γ 1.41, 1.41; H ^δ 3.24, 3.13; H ^ε , 7.33
A12	9.42	4.90		
I13	9.20	4.36	2.10	H ^{γ1} 1.90
L14	7.84	4.62	1.81, 1.74	H ^γ 1.56
P15		4.63	2.41, 2.41	H ^γ 2.08, 2.02; H ^δ 3.77, 3.58
Y16	7.00	4.93	3.66, 3.37	H ^{δ1} 7.13; H ^{ε1} 7.03
T17	7.15	4.30	3.53	
K18	8.22	4.63	1.86, 1.78	H ^γ 1.38, 1.38; H ^δ 1.59, 1.59; H ^ε 2.93, 2.93
V19	8.27	4.09	1.87	
P20		4.21	2.26, 2.03	H ^γ 1.93, 1.81; H ^δ 3.95, 3.66
D21	8.94	4.37	2.92, 2.84	
T22	7.34	5.23	4.34	
D23	8.97	5.05	3.33, 3.63	
E24	7.73		2.37, 2.00	H ^γ 2.60, 2.60
I25	8.75	4.69	1.59	H ^{γ1} 1.48
S26	8.83	4.93	4.20, 3.84	
F27	9.59		3.45, 2.99	H ^{δ1} 6.85; H ^{ε2} 6.97
L28	7.90	4.13	2.26, 2.26	H ^γ 2.14

TAB. D.2: 279-342 (suite page suivante)

	<i>H</i>	<i>H^α</i>	<i>H^β</i>	<i>Other H</i>
K29	8.18	4.62	1.74, 1.68	H^γ 1.34, 1.24; H^δ 1.10, 1.10; H^ϵ 3.40, 3.02
G30	8.66	3.41, 4.46		
D31	7.95	4.37	2.63, 2.00	
M32	8.23	5.17	1.98, 1.85	H^γ 2.60, 2.46
F33	9.02	5.74	2.61, 2.40	H^{δ^1} 6.74 H^{ϵ^1} 6.68; H^ζ 6.05
I34	8.19	4.61	1.52	H^{γ^1} 0.86
V35	8.43	3.92	1.97	
H36	9.36		3.34, 3.25	H^{δ^2} 6.75; H^{ϵ^1} 6.05
H37	7.97	5.02	2.81, 2.66	H^{δ^2} 6.75, 7.44
E38	8.83	4.48	1.95, 1.95	H^γ 2.16, 2.16
L39	8.58	4.73	1.84, 1.70	H^γ 1.56
E40	8.20	4.37	2.10, 2.00	H^γ 2.35, 2.35
D41	8.92	4.40	3.06, 2.95	
G42	8.38	4.02, 3.59		
W43	7.39	5.02	3.33, 3.24	H^{δ^1} 7.36; H^{ϵ^3} 7.39; H^{η^2} 7.19; H^{ζ^2} 7.45; H^{ζ^3} 6.74; H^{ϵ^1} 10.18
M44	9.45	5.02	1.92, 1.65	H^γ 2.32, 2.27
W45	8.88	5.14	3.43, 3.08	H^{δ^1} 6.88; H^{ϵ^3} 7.09; H^{η^2} , 7.26; H^{ζ^2} 7.40; H^{ζ^3} 7.09; H^{ϵ^1} 10.28
V46	8.83	5.54	2.12	
T47	8.25	5.05	3.92	
H48	8.96	4.47	3.43, 2.42	H^{δ^2} 6.36, 7.48
L49	8.95	4.12	1.58, 1.58	H^γ 1.45
R50	8.58	4.25	1.90, 1.75	H^γ 1.42, 1.35; H^δ 2.99, 2.99
T51	6.98	4.35	4.22	
D52	8.75	4.34	3.04, 2.68	
E53	7.56	4.38	2.00, 1.91	H^γ 2.32, 2.25
Q54	8.41	5.74	2.00, 1.94	H^γ 2.55, 2.42; H^{ϵ^2} , 6.79, 7.34
G55	7.91	3.74, 3.74		
L56	7.8	5.46	1.76, 1.76	H^γ 1.39
I57	8.91	4.71	1.35	H^{γ^1} 0.68, 0.48
V58	7.62	4.10	0.30	
E59	8.21	3.65	2.06, 1.89	H^γ 2.26, 2.26
D60	7.45	4.28	2.59, 2.22	
L61	7.27	4.45	2.15, 1.64	H^γ 1.37
V62	7.52	5.46	1.76	
E63	8.98	4.91	2.03, 1.87	H^γ 2.32, 2.32
E64	8.71	4.26	2.02, 1.90	H^γ 2.33, 2.29
V65	8.08	4.12	1.88	
G66	8.54	4.09, 3.92		
R67	8.38	4.38	1.87, 1.74	H^γ 1.63, 1.63; H^δ 3.08, 3.08; H^ϵ 7.30
E68	8.38	4.09	2.02, 1.86	H^γ 2.18, 2.18

TAB. D.2: 279-342

D.3 Attributions $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ du domaine **SH3**

	<i>SH3 seul</i>						<i>SH3 + peptide SP10</i>						
	N	H	N ^{ε1}	H ^{ε1}	N ^{δ/ε2}	N ^{δ/ε22}	N	H	N ^{ε1}	H ^{ε1}	N ^{δ/ε2}	N ^{δ/ε22}	N ^{δ/ε22}
D6	122.73	8.48					122.88	8.47					
R7	120.71	8.35					120.76	8.34					
R8	121.31	8.42					121.53	8.43					
R9	122.56	8.49					122.65	8.48					
V10	111.48	8.13					111.41	8.12					
R11	120.88	9.12					120.88	9.12					
A12	127.19	9.28					127.21	9.28					
I13	119.87	9.11					119.81	9.10					
L14	123.14	7.72					123.11	7.73					
P15													
Y16	117.31	7.81					117.31	7.82					
T17	124.60	7.02					124.58	7.02					
K18	123.37	8.18					123.37	8.18					
V19	126.76	8.18											
P20													
D21	114.90	8.79					115.03	8.80					
T22	106.10	7.23					105.95	7.25					
D23	117.35	8.87					117.09	8.90					
E24	119.61	7.61					119.58	7.65					
I25	108.89	6.92					108.81	6.91					
S26	117.48	8.70					117.47	8.72					
F27	115.99	8.85					116.02	8.87					
L28	121.14	8.66					121.16	8.67					
K29	119.45	8.04					119.45	8.04					
G30	115.32	8.56					115.30	8.56					
D31	122.19	7.83					122.17	7.84					
M32	119.50	8.11					119.50	8.11					
F33	116.95	8.91					116.91	8.91					
I34	118.09	8.10					118.13	8.09					
V35	124.80	8.29					124.77	8.28					
H36	126.97	9.23					126.95	9.16					
N37	111.98	7.86			111.52	7.30	6.62	111.96	7.83		111.02	7.22	6.54
E38	123.32	8.67					123.57	8.69					
L39	125.71	8.46					125.72	8.42					
E40	117.65	8.06					118.08	8.08					
D41	116.47	8.81					116.20	8.80					
G42	104.45	8.26					104.41	8.27					
W43	119.68	7.29	129.03	10.07			119.79	7.35	128.89	10.06			

Attributions ¹⁵N/¹H du domaine **SH3** (suite page suivante)

	<i>SH3 seul</i>						<i>SH3 + peptide SP10</i>							
	N	H	N ^{ε1}	H ^{ε1}	N ^{δ/ε2}	N ^{δ/ε22}	N ^{δ/ε22}	N	H	N ^{ε1}	H ^{ε1}	N ^{δ/ε2}	N ^{δ/ε22}	N ^{δ/ε22}
M44	118.53	9.32						118.60	9.31					
W45	122.98	8.74	129.00	10.19				122.98	8.73	129.04	10.20			
V46	120.61	8.72						120.63	8.69					
T47	113.04	8.12						113.08	8.10					
N48					109.88	7.37	6.29	124.27	8.82			109.82	7.39	6.25
L49	126.65	8.84						126.65	8.84					
R50	119.26	8.49						119.26	8.49					
T51	105.20	6.86						105.21	6.87					
D52	119.83	8.66						119.88	8.66					
E53	117.55	7.46						117.53	7.45					
Q54	118.82	8.27			111.64	7.24	6.64	118.91	8.27			111.58	7.22	6.63
G55	108.50	7.81						108.45	7.80					
L56	119.28	7.70						118.99	7.74					
I57	114.03	8.79						113.94	8.77					
V58	119.91	7.44						119.33	7.41					
E59	122.86	8.10						122.58	8.14					
D60	114.45	7.34						114.47	7.36					
L61	116.32	7.16						116.28	7.18					
V62	109.78	7.44						109.76	7.44					
E63	116.24	8.88						116.19	8.87					
E64	121.56	8.59						121.64	8.59					
V65	122.82	7.94						122.79	7.94					
G66	113.26	8.53						113.28	8.53					
R67	120.72	8.30						120.69	8.30					
E68	121.32	8.58						121.36	8.58					
E69	121.18	8.21						121.22	8.20					
D70	122.99	8.36						122.95	8.35					
P71														
H72	118.52	8.45						118.49	8.45					
E73	121.18	8.19						121.17	8.18					
G74	110.11	8.41						110.09	8.40					
K75	120.68	7.95						120.69	7.95					
I76	122.56	8.13						122.00	8.08					
L77	126.81	8.12						126.83	8.11					
Q78					111.94	7.44	6.72					111.95	7.44	6.72

TAB. D.3: Attributions ¹⁵N/¹H du domaine **SH3**. Les lignes en gris correspondent aux acides aminés impliqués dans l'interaction avec le peptide SP 10.

Annexe E

Dynamique moléculaire

E.1 Lancement d'une dynamique moléculaire, en utilisant Discover

E.1.1 Préparation des fichiers

Nous avons utilisé le program Discover, installé au Cines sur la machine Athena (SGI Origin 3800, 256 processeurs, 128 Go de mémoire)

- `<job>.car` : Description de la molécule, à l'état initial (positions des atomes)
- `<job>.mdf` : Fichier complémentaire de description (liaisons, charges)
- `<job>.inp` : Protocole de minimisation / dynamique
- `<job>.para.lsf` : Script de parallélisation
- `<job>.csh` : Script de lancement de Discover. Pour créer ce fichier, il faut avoir les 4 premiers fichiers ci-dessus, se placer dans le shell `csh`, exécuter `source /usr/oem/accelrys/cshrc` et lancer `discover <job>`. On choisit ensuite les différentes options, et on ne lance pas directement le job. Le fichier `<job>.csh` est alors créé.

Pour soumettre l'exécution du job, il faut juste taper `bsub < <job>.para.lsf`

E.1.2 Protocoles de dynamique moléculaire

Dynamique moléculaire dans le vide

```
1      IGRPCK = 0
      DEMAX=5000.
```

Début de la simulation

```
      begin simulation
      *      add-automatic bond torsion valence out-of-plane
5
      set dielectric = 4.000000
```

Cette ligne ajuste la valeur de la constante diélectrique ϵ pour la simulation. La dynamique dans le vide peut être améliorée artificiellement par un choix de cette valeur à 4, ce qui se rapproche de la valeur de ϵ dans une solution aqueuse.

```
dseed = 954321
```

La première étape de ce protocole consiste à minimiser la structure une première fois...

```
10      Minimize
      *   no cross terms
      *   no morse
      *   for 9000 iterations
      *   using VA09A
15      *   until the maximum derivative is less than 0.001000000 kcal/A
```

...avant de commencer la dynamique proprement dite.

La dynamique est lancée sur 5000 pas de 1 *fs*, soit 5 *ps*.

```
      initialize dynamics
      *   at 300 K
      *   for 5000 steps of 1.0 fs
      *   with no cross terms and no morse functions
20      *   write history file every 100 steps
      *   write averages every 100 steps
      jfile=1
      lastjfile = 150

25      lop resume dynamics
      *   at 300 K for 5000 steps
      *   with no cross terms and no morse functions
      *   write averages every 5000 steps
```

Après l'évolution, la structure est à nouveau minimisée en utilisant deux algorithmes successivement (*Steepest descent*, puis *Conjugate gradient*).

```
      minimize using steepest descent for 250 steps
30      *   with no cross terms and no morse functions
      *   until the maximum derivative is less than 5.0 kcal
      minimize using conjugate gradient for 2250 steps
      *   with no cross terms and no morse functions
      minimize using conjugate gradient for 2250 steps
35
      archive as file number jfile

      jfile = jfile + 1
      log energy summary
40
      if jfile .le. lastjfile then lop

      end
```

Dynamique moléculaire en boîte d'eau

```
more sh3chem150w.inp
```

```
1      IGRPCK = 0
      DEMAX=5000.
      MXATM = 30000
      MXGRP = 30000
```

Etant donné le nombre très important de molécules en présence, il est nécessaire d'utiliser un *cutoff* pour les calculs d'énergie.

```
5      cutoff = 19.0000
      cutdis = 18.0000
      swtdis = 1.5
      overlap = 0.01
```

```
10     begin simulation
      *   add-automatic bond torsion valence out-of-plane
```

La constante diélectrique ϵ est ici réglée à 1, le solvant étant ici explicite.

```
      set dielectric = 1.000000
```

```
      dseed = 954321
```

Le protocole de dynamique/minimisation est le même que précédemment. On augmente cependant les nombres d'itérations.

```
15     minimize using steepest descent for 1000 steps
      *   with no cross terms and no morse functions
      *   until the maximum derivative is less than 5.0 kcal
      Minimize
      *   no cross terms
20     *   no morse
      *   using conjugate gradients for 100000 cycles
      *   until the maximum derivative is less than 0.001000000 kcal/A

      initialize dynamics
25     *   at 300 K
      *   for 5000 steps of 1.0 fs
      *   with no cross terms and no morse functions
      *   write history file every 100 steps
      *   write averages every 100 steps
30     jfile=1
      lastjfile = 150

      lop2 resume dynamics
      *   at 300 K for 5000 steps
35     *   with no cross terms and no morse functions
```

```
*    write averages every 5000 steps

minimize using steepest descent for 1000 steps
*    with no cross terms and no morse functions
40  *    until the maximum derivative is less than 5.0 kcal
minimize using conjugate gradient for 2250 steps
*    with no cross terms and no morse functions
minimize using conjugate gradient for 2250 steps

45  archive as file number jfile

      jfile = jfile + 1
      log energy summary

50  if jfile .le. lastjfile then lop2

end
```

Abbréviations et glossaire

A

ADN Acide DéoxyriboNucléique (en anglais : [DNA](#)), p. 251.

anti-oncogène Voir [gène suppresseur de tumeur](#), p. 28.

ARN Acide RiboNucléique (en anglais : [RNA](#)), p. 251.

ARNm [ARN](#) messenger.

ATP Adenosine Tri Phosphate.

auxotrophique se dit d'un organisme rendu dépendant de la présence dans son environnement d'un métabolite vital. Habituellement, ce type de génotype est obtenu par inactivation d'un gène (de ses deux allèles dans le cas d'un organisme diploïde) de la voie biosynthétique de ce métabolite. S'oppose à [prototrophique.](#), p. 102.

B

BOP benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino) phosphonium hexafluorophosphate, p. 222.

C

cytostatique Composé dont l'action sur des cellules empêche leur division : s'oppose à [cytotoxique.](#), p. 35.

cytotoxique Composé dont l'action sur les cellules est toxique : s'oppose à [cytostatique](#), p. 33.

D

DCC dicyclohexylcarbodiimide, p. 222.

DIEA N,N-diisopropylethylamine, p. 222.

DMSO Diméthyl sulfoxyde, p. 232.

DNA voir [ADN](#), p. 251.

domaine Un domaine protéique est un petit module dont la structure secondaire ne dépend pas des autres parties d'une protéine. Les domaines sont bien souvent les briques de constitution des protéines, et constituent des traces de l'évolution des protéines. Une protéine composée de plusieurs domaines est ainsi très probablement le produit de la juxtaposition de protéines mono-domaines. Les différents domaines d'une telle protéine sont responsables d'activités élémentaires, la fonction globale de la protéine étant obtenue par la juxtaposition de ces différentes activités. Dans le texte les domaines sont notés comme cela : domaine **SH3**, p. 63.

DTT dithiotreitol, p. 179.

E

- EGF** Endothelial Growth Factor, p. 252.
EGFR [EGF](#)-Receptor.
ELISA *Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay*, p. 78.

F

- Fmoc** 9-fluorenylmethoxycarbonyl, p. 222.

G

- gène suppresseur de tumeur** Gène dont l'activité empêche l'apparition de tumeur. Il doit nécessairement être inactivé pour qu'une cellule devienne tumorale., p. 28.
GPCR *G-Protein Coupled Receptor* : récepteur Couplé aux petites Protéines G (ou [RCPG](#)). Ces récepteurs comportent un fragment extracellulaire permettant la fixation du ligand, sept hélices transmembranaires et un fragment intracellulaire assurant la transduction du signal et l'activation de petites protéines G ([Gether & Kobilka, 1998](#), [Ji et al., 1998](#), [Lefkowitz, 1998](#))., p. 57.
GTP Guanidine Tri Phosphate.

H

- HATU** Hexafluorophosphate (o-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium.
HBTU Hydroxybenzotriazoluronium hexafluorophosphate.
HMP 4-Hydroxymethylphenoxyacetyl-4'-methylbenzylhydramine (résine pour la synthèse peptidique en phase solide, résine de Wang), p. 222.
HOBt hydroxybenzotriazole, p. 222.
homologue Gènes paralogues : Gènes homologues identiques (codant pour une même protéine) au sein d'espèces différentes. Exemple : *hs_RasGAP* (homme) et *mm_RasGAP* (souris). Gènes orthologues : gènes homologues issus de duplication de gènes, au sein d'une même espèce. Exemple : les gènes *Aurora-A*, *-B* et *-C*, chez l'homme., p. 45.
HPLC *High Pressure Liquid Chromatography*, chromatographie, p. 229.
HSQC Heteronuclear Single Quantum Correlation, p. 174.

I

- IRM** Imagerie par Résonance Magnétique nucléaire (en anglais MRI).

N

- NCBI** National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA, p. 15.
NMP N-methylpyrrolidone-2, p. 222.
NOE *Nuclear Overhauser Effect*, p. 183.
NOESY [NOE](#)-Spectroscopy, p. 183.

O

oncogène Gène qui lorsqu'il est exprimé dans une cellule provoque l'apparition d'une tumeur., p. 28.

P

PET-scan Positron Emission Tomography : tomographie par émission de positon. Technique d'imagerie très adaptée à la visualisation de tumeurs et de métastases, même de petite taille. Du glucose marqué ^{18}F (radio-isotope émettant des positons) est administré au patient, et va être réparti dans l'ensemble du corps par voie sanguine. Il va se fixer préférentiellement sur les zones de forte activité métabolique, et marque donc les tumeurs de façon relativement spécifique. L'émission de positons est détectée par un détecteur de rayonnements gamma provenant de l'annihilation des positons dès qu'ils sont émis.

proto-oncogène Gène dont une dérégulation ou une mutation peut provoquer l'apparition d'une tumeur (voir [oncogène](#)), p. 29.

prototrophique se dit d'un organisme dont la survie ne dépend pas de la présence d'un nutriment donné dans son environnement. S'oppose à [auxotrophique](#), p. 114.

PyBOP benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate.

R

RCPG Récepteur Couplé aux petites Protéines G (voir [GPCR](#)), p. 58.

RNA voir [ARN](#), p. 251.

S

shRNA short hairpin [RNA](#).

siRNA small interfering [RNA](#).

T

TFA *Tri-Fluoro acetic Acid*.

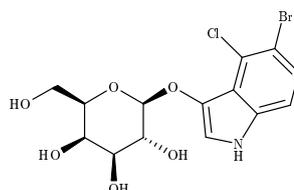
V

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor, p. 253.

VEGFR [VEGF](#)-Receptor.

X

X-Gal 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactoside



X-Gal est un sucre dont le clivage par la β -galactosidase produit un composé bleu à fort pouvoir colorant., p. 109.

Bibliographie

- Adams RR, Carmena M, Earnshaw WC (2001) Chromosomal passengers and the (Aurora) ABCs of mitosis *Trends Cell Biol* **11**: 49–54 
- Adari H, Lowy D, Willumsen B, Der C, McCormick F (1988) Guanosine triphosphatase activating protein (GAP) interacts with the p21 ras effector binding domain. *Science* **240**: 518–21
- Adessi C, Soto C (2002) Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bio-availability. *Curr Med Chem* **9**: 963–78 
- Adjei A (2001) Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* **93**: 1062–74 
- Agrawal V, Kishan R (2001) Functional evolution of two subtly different (similar) folds. *BMC Struct Biol* **1**: 5 
- Agre P, Williams T (1983) The human tumor cloning assay in cancer drug development. A review. *Invest New Drugs* **1**: 33–45
- Aladjem MI, Pasa S, Parodi S, Weinstein JN, Pommier Y, Kohn KW (2004) Molecular interaction maps—a diagrammatic graphical language for bio-regulatory networks. *Sci STKE* **2004**: pe8  
- Albericio F, Hammer RP, Garcia-Echeverria C, Molins MAN, Chang JL, Munson MC, Pons M, Giral E, Barany G (1991) Cyclization of disulfide-containing peptides in solid-phase synthesis *Int J Peptide Protein Res* **37**: 402–413
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002a) Cells in their social context in *Molecular Biology of the Cell* chapter 5 New York, NY, USA: Garland Publishing 4th edition
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002b) Internal organization of the cell in *Molecular Biology of the Cell* chapter 4 New York, NY, USA: Garland Publishing 4th edition
- Albright C, Giddings B, Liu J, Vito M, Weinberg R (1993) Characterization of a guanine nucleotide dissociation stimulator for a ras-related GTPase. *EMBO J* **12**: 339–47
- Alessi D, McManus E, Collins B, Mora A (2004) Functional analysis of PDK1 signalling pathway using knockout and knockin approaches : Evaluation of PDK1 as a cancer target in *Eur J Cancer Sup*
- Alexandropoulos K, Cheng G, Baltimore D (1995) Proline-rich sequences that bind to Src homology 3 domains with individual specificities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3110–4 
- Altieri DC (2003a) Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* **22**: 8581–9  
- Altieri DC (2003b) Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* **3**: 46–54  
- Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–10 
- Amrein K, Flint N, Panholzer B, Burn P (1992) Ras GTPase-activating protein: a substrate and a potential binding protein of the protein-tyrosine kinase p56lck. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3343–6 
- Andersen L, Fountain J, Gutmann D, Tarlé S, Glover T, Dracopoli N, Housman D, Collins F (1993) Mutations in the neurofibromatosis 1 gene in sporadic malignant melanoma cell lines. *Nat Genet* **3**: 118–21 
- Andrews P (2003) Cell of the month: Two telophase HeLa cells expressing GFP-tagged human Aurora B (picture). *Nature Cell Biology* **5**: 101 

- Arcaro A, Wymann M (1993) Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J* **296** (Pt 2): 297–301
- Arold S, Franken P, Strub M, Hoh F, Benichou S, Benarous R, Dumas C (1997) The crystal structure of HIV-1 Nef protein bound to the Fyn kinase SH3 domain suggests a role for this complex in altered T cell receptor signaling. *Structure* **5**: 1361–72 
- Arold S, O'Brien R, Franken P, Strub M, Hoh F, Dumas C, Ladbury J (1998) RT loop flexibility enhances the specificity of Src family SH3 domains for HIV-1 Nef. *Biochemistry* **37**: 14683–91  
- Arold S, Ulmer T, Mulhern T, Werner J, Ladbury J, Campbell I, Noble M (2001) The role of the Src homology 3–Src homology 2 interface in the regulation of Src kinases. *J Biol Chem* **276**: 17199–205  
- Asensio J, Martin-Pastor M, Jimenez-Barbero J (1995) The use of CVFF and CFF91 force fields in conformational analysis of carbohydrate molecules. Comparison with AMBER molecular mechanics and dynamics calculations for methyl alpha-lactoside. *Int J Biol Macromol* **17**: 137–48
- Ballester R, Marchuk D, Boguski M, Saulino A, Letcher R, Wigler M, Collins F (1990) The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell* **63**: 851–9
- Band P, Spinelli J, Gallagher R, Threlfall W, Ng V, Moody J, Raynor D, Svirchev L, Kan D, Wong M (1990) Identification of occupational cancer risks using a population-based cancer registry. *Recent Results Cancer Res* **120**: 106–21
- Banerjee S, Zoubine M, Mullick M, Weston A, Cherrian R, Campbell D (2000) Tumor angiogenesis in chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma: impact of K-ras mutations. *Pancreas* **20**: 248–55
- Bar-Sagi D, Hall A (2000) Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* **103**: 227–38 
- Barbacid M (1987) Ras genes. *Annu Rev Biochem* **56**: 779–827 
- Barnett P, Bottger G, Klein A, Tabak H, Distel B (2000) The peroxisomal membrane protein Pex13p shows a novel mode of SH3 interaction. *EMBO J* **19**: 6382–91 
- Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim Y, Mendelsohn J (1998) Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res* **58**: 2825–31
- Beliakoff J, Whitesell L (2004) Hsp90: an emerging target for breast cancer therapy. *Anticancer Drugs* **15**: 651–62
- Berezhkovskiy L, Pham S, Reich E, Deshpande S (1999) Synthesis and kinetics of cyclization of MHC class II-derived cyclic peptide vaccine for diabetes. *J Pept Res* **54**: 112–9 
- Berezhkovskiy LM, Deshpande SV (2000) On the requirement of oxidizing reagent for the formation of a disulfide bond *Biophysical Chemistry* **91**: 319–27  
- Berg T (2003) Modulation of protein-protein interactions with small organic molecules. *Angew Chem Int Ed* **42**: 2462–81  
- Berland K, So P, Gratton E (1995) Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: method and application to the intracellular environment. *Biophys J* **68**: 694–701
- Berman H, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat T, Weissig H, Shindyalov I, Bourne P (2000) The Protein Data Bank. (www.pdb.org) *Nucleic Acids Res* **28**: 235–42 
- Bertho G (1998) étude de l'interaction macrolide-ribosome par expérience RMN de NOEs transférés Master's thesis Université Paris VI
- Birnbaum R, O'Marcaigh A, Wardak Z, Zhang Y, Dranoff G, Jacks T, Clapp D, Shannon K (2000) Nf1 and Gmcsf interact in myeloid leukemogenesis. *Mol Cell* **5**: 189–95 
- Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD (1998) A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers *Embo J* **17**: 3052–65 

- Bishop JM (1982) Oncogenes *Scientific American* **246**: 68–78
- Bodenhausen G, Ruben DJ (1980) Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy *Chem Phys Lett* **69**: 185–9
- Bollag G, Clapp D, Shih S, Adler F, Zhang Y, Thompson P, Lange B, Freedman M, McCormick F, Jacks T, Shannon K (1996) Loss of NF1 results in activation of the Ras signaling pathway and leads to aberrant growth in haematopoietic cells. *Nat Genet* **12**: 144–8 
- Bolton MA, Lan W, Powers SE, McClelland ML, Kuang J, Stukenberg PT (2002) Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation *Mol Biol Cell* **13**: 3064–77 
- Booker G, Gout I, Downing A, Driscoll P, Boyd J, Waterfield M, Campbell I (1993) Solution structure and ligand-binding site of the SH3 domain of the p85 alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* **73**: 813–22
- Borchert T, Mathieu M, Zeelen J, Courtneidge S, Wierenga R (1994) The crystal structure of human CskSH3: structural diversity near the RT-Src and n-Src loop. *FEBS Lett* **341**: 79–85 
- Borreguero JM, Ding F, Buldyrev SV, Stanley HE, Dokholyan NV (2004) Multiple folding pathways of the SH3 domain. *Biophys J* **87**: 521–33 
- Bos J (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **49**: 4682–9
- Bosch F, Manos M, Muñoz N, Sherman M, Jansen A, Peto J, Schiffman M, Moreno V, Kurman R, Shah K (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* **87**: 796–802
- Bourne GT, Golding SW, Meutermans WDF, Smythe ML (2000) Synthesis of a cyclic peptide library based on the somatostatin sequence using the backbone amide linker approach *Letters in Peptide Science* **7**: 311–316 
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–54
- Bradley E, Issell B, Hellman R (1984) The human tumor colony-forming chemosensitivity assay: a biological and clinical review. *Invest New Drugs* **2**: 59–70
- Brannetti B, Via A, Cestra G, Cesareni G, Helmer-Citterich M (2000) SH3-SPOT: an algorithm to predict preferred ligands to different members of the SH3 gene family. *J Mol Biol* **298**: 313–28  
- Brase S, Kirchhoff JH, Kobberling J (2003) Palladium-catalysed reactions in solid phase organic synthesis *Tetrahedron* **59**: 885–939 
- Brekken R, Overholser J, Stastny V, Waltenberger J, Minna J, Thorpe P (2000) Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res* **60**: 5117–24 
- Brent R (2004) A partnership between biology and engineering. *Nat Biotechnol* **22**: 1211–4  
- Brent R, Ptashne M (1985) A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* **43**: 729–36
- Broach J, Hicks J (1980) Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 mu circle. *Cell* **21**: 501–8
- Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, Einhorn E, Herlyn M, Minna J, Nicholson A, Roth JA, Albelda SM, Davies H, Cox C, Brignell G, Stephens P, Futreal PA, Wooster R, Stratton MR, Weber BL (2002) BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* **62**: 6997–7000 
- Brott B, Decker S, O'Brien M, Jove R (1991) Molecular features of the viral and cellular Src kinases involved in interactions with the GTPase-activating protein. *Mol Cell Biol* **11**: 5059–67
- Broutin I, Ducruix A (2000) Domaines structuraux et signalisation *Medecine Sciences* **16**: 611–616 
- Browett P, Norton J (1989) Analysis of ras gene mutations and methylation state in human leukemias. *Oncogene* **4**: 1029–36

- Browett P, Yaxley J, Norton J (1989) Activation of Harvey ras oncogene by mutation at codon 12 is very rare in hemopoietic malignancies. *Leukemia* **3**: 86–8
- Bryan J (1980) Aspartate family and branched-chain amino acids in B Miflin (ed.) *The Biochemistry of Plants* volume 5 pp. 403–452 New York, NY, USA: Academic Press
- Büttner C, Henz B, Welker P, Sepp N, Grabbe J (1998) Identification of activating c-kit mutations in adult-, but not in childhood-onset indolent mastocytosis: a possible explanation for divergent clinical behavior. *J Invest Dermatol* **111**: 1227–31
- Budman D (1997) Vinorelbine (Navelbine): a third-generation vinca alkaloid. *Cancer Invest* **15**: 475–90
- Buerger C, Nagel-Wolfrum K, Kunz C, Wittig I, Butz K, Hoppe-Seyler F, Groner B (2003) Sequence-specific peptide aptamers, interacting with the intracellular domain of the epidermal growth factor receptor, interfere with Stat3 activation and inhibit the growth of tumor cells *J Biol Chem* **278**: 37610–21
- Burke T, Bolger R, Checovich W, Lowery R (1996) Measurement of peptide binding affinities using fluorescence polarization in B Kay, J Winter, J McCafferty (eds.) *Phage Display of Peptides and Proteins. A Laboratory Manual* pp. 305–326 San Diego, CA, USA: Academic Press Inc.
- Butz K, Denk C, Fitscher B, Crnkovic-Mertens I, Ullmann A, Schroder CH, Hoppe-Seyler F (2001) Peptide aptamers targeting the hepatitis B virus core protein: a new class of molecules with antiviral activity *Oncogene* **20**: 6579–86
- Butz K, Denk C, Ullmann A, Scheffner M, Hoppe-Seyler F (2000) Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6693–7
- Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ (1974) Breast tumour cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* **53**: 661–74
- Calés C, Hancock J, Marshall C, Hall A (1988) The cytoplasmic protein GAP is implicated as the target for regulation by the ras gene product. *Nature* **332**: 548–51
- Campbell S, Khosravi-Far R, Rossman K, Clark G, Der C (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* **17**: 1395–413
- Candé C, Vahsen N, Métivier D, Tourrière H, Chebli K, Garrido C, Tazi J, Kroemer G (2004) Regulation of cytoplasmic stress granules by apoptosis-inducing factor. *J Cell Sci* **117**: 4461–8
- Carmena M, Earnshaw WC (2003) The cellular geography of aurora kinases *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 842–54
- Carpino N, Wisniewski D, Strife A, Marshak D, Kobayashi R, Stillman B, Clarkson B (1997) p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Cell* **88**: 197–204
- Carraway H, Hidalgo M (2004) New targets for therapy in breast cancer: mammalian target of rapamycin (mTOR) antagonists. *Breast Cancer Res* **6**: 219–24
- Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM (1992) Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 4285–9
- Carver TR, Slichter CP (1953) Experimental verification of the Overhauser nuclear polarization effect *Phys Rev* **102**: 975–80
- Castellani F, van Rossum B, Diehl A, Schubert M, Rehbein K, Oschkinat H (2002) Structure of a protein determined by solid-state magic-angle-spinning NMR spectroscopy. *Nature* **420**: 98–102
- Cerny V (1985) Thermodynamical approach to the traveling salesman problem: An efficient simulation algorithm. *Journal of Optimization Theory and Applications* **45**: 41–51
- Chan B, Lanyi A, Song HK, Griesbach J, Simarro-Grande M, Poy F, Howie D, Sumegi J, Terhorst C, Eck MJ (2003) SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat Cell Biol* **5**: 155–60
- Chan C, Botstein D (1993) Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics* **135**: 677–91

- Chassaing G, Prochiantz A (1996) Peptides usable as vectors for the intracellular addressing of active molecules **PCT patent application WO 97/12912 A1**
- Cheadle C, Ivashchenko Y, South V, Searfoss GH, French S, Howk R, Ricca GA, Jaye M (1994) Identification of a Src SH3 domain binding motif by screening a random phage display library *J Biol Chem* **269**: 24034–9 
- Cheetham GM, Knegetel RM, Coll JT, Renwick SB, Swenson L, Weber P, Lippke JA, Austen DA (2002) Crystal structure of aurora-2, an oncogenic serine/threonine kinase *J Biol Chem* **277**: 42419–22 
- Chen H, Rojas-Soto M, Oguni A, Kennedy M (1998) A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron* **20**: 895–904 
- Chen JK, Lane WS, Brauer AW, Tanaka A, Schreiber SL (1993) Biased combinatorial libraries: novel ligands for the SH3 domain of phosphatidylinositol 3-kinase *J Am Chem Soc* **115**: 12591–2 
- Chipot C (2000-2003) Les méthodes numériques de la dynamique moléculaire notes de cours, École d'été du CNRS (publié en ligne sur www.edam.uhp-nancy.fr/Permanents/Chris.Chipot/).
- Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW, Leahy DJ (2003) Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* **421**: 756–60  
- Ciardello F, Bianco R, Damiano V, Lorenzo SD, Pepe S, Placido SD, Fan Z, Mendelsohn J, Bianco A, Tortora G (1999) Antitumor activity of sequential treatment with topotecan and anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225. *Clin Cancer Res* **5**: 909–16 
- Ciardello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Pomatico G, Placido SD, Bianco A, Tortora G (2000) Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* **6**: 2053–63 
- Cichowski K, Santiago S, Jardim M, Johnson BW, Jacks T (2003) Dynamic regulation of the Ras pathway via proteolysis of the NF1 tumor suppressor. *Genes Dev* **17**: 449–54  
- Clark G, Quilliam L, Hisaka M, Der C (1993) Differential antagonism of Ras biological activity by catalytic and Src homology domains of Ras GTPase activation protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 4887–91 
- Clark G, Westwick J, Der C (1997) p120 GAP modulates Ras activation of Jun kinases and transformation. *J Biol Chem* **272**: 1677–81 
- Clarke L, Carbon J (1985) The structure and function of yeast centromeres. *Annu Rev Genet* **19**: 29–55 
- Claus E, Risch N, Thompson W (1991) Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am J Hum Genet* **48**: 232–42
- Cochet O, Kenigsberg M, Delumeau I, Virone-Oddos A, Multon M, Fridman W, Schweighoffer F, Teillaud J, Tocqué B (1998) Intracellular expression of an antibody fragment-neutralizing p21 ras promotes tumor regression. *Cancer Res* **58**: 1170–6
- Cohen BA, Colas P, Brent R (1998) An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14272–7. 
- Cohen L, Pieterman E, van Leeuwen R, Overhand M, Burm B, van der Marel G, van Boom J (2000) Inhibitors of prenylation of Ras and other G-proteins and their application as therapeutics. *Biochem Pharmacol* **60**: 1061–8 
- Colas P (2000) Combinatorial protein reagents to manipulate protein function *Curr Opin Chem Biol* **4**: 54–9 
- Colas P, Cohen B, Jessen T, Grishina I, McCoy J, Brent R (1996) Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2 *Nature* **380**: 548–50 
- Colicelli J (2004) Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* **2004**: RE13  

- Colland F, Jacq X, Trouplin V, Mougin C, Groizeleau C, Hamburger A, Meil A, Wojcik J, Legrain P, Gauthier JM (2004) Functional proteomics mapping of a human signaling pathway. *Genome Res* **14**: 1324–32  
- Cong YS, Wright WE, Shay JW (2002) Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 407–25, table of contents 
- Corradini P, Ladetto M, Voena C, Palumbo A, Inghirami G, Knowles D, Boccadoro M, Pileri A (1993) Mutational activation of N- and K-ras oncogenes in plasma cell dyscrasias. *Blood* **81**: 2708–13
- Costa M, Ochem A, Staub A, Falaschi A (1999) Human DNA helicase VIII: a DNA and RNA helicase corresponding to the G3BP protein, an element of the ras transduction pathway. *Nucleic Acids Res* **27**: 817–21 
- Craenenbroeck EV, Engelborghs Y (1999) Quantitative characterization of the binding of fluorescently labeled colchicine to tubulin in vitro using fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry* **38**: 5082–8  
- Creamer TP, Campbell MN (2002) Determinants of the polyproline II helix from modeling studies. *Adv Protein Chem* **62**: 263–82
- Cress W, Triezenberg S (1991) Critical structural elements of the VP16 transcriptional activation domain. *Science* **251**: 87–90
- Crouch S, Kozlowski R, Slater K, Fletcher J (1993) The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* **160**: 81–8
- Cudic M, Wade JD, Otvos L (2000) Convenient synthesis of a head-to-tail cyclic peptide containing an expanded ring *Tetrahedron Letters* **41**: 4527–4531 
- Cui Q, Lim SK, Zhao B, Hoffmann FM (2005) Selective inhibition of TGF-beta responsive genes by Smad-interacting peptide aptamers from FoxH1, Lef1 and CBP. *Oncogene*  
- Curry H (1944) The method of steepest descent for nonlinear minimization problems *Quarterly Appl Math*
- Cussac D, Frech M, Chardin P (1994) Binding of the Grb2 SH2 domain to phosphotyrosine motifs does not change the affinity of its SH3 domains for Sos proline-rich motifs. *EMBO J* **13**: 4011–21
- Cussac D, Vidal M, Leprince C, Liu WQ, Cornille F, Tiraboschi G, Roques BP, Garbay C (1999) A Sos-derived peptidimer blocks the Ras signaling pathway by binding both Grb2 SH3 domains and displays antiproliferative activity *Faseb J* **13**: 31–8. 
- Dalgarno D, Botfield M, Rickles R (1997) SH3 domains and drug design: ligands, structure, and biological function. *Biopolymers* **43**: 383–400 
- Damm W, Frontera A, Tirado-Rives J, Jorgensen WL (1997) OPLS all-atom force field for carbohydrates *J Comp Chem* **18**: 1955–70  
- Dancey J (2002) Agents targeting ras signaling pathway. *Curr Pharm Des* **8**: 2259–67
- de Klein A, van Kessel A, Grosveld G, Bartram C, Hagemeyer A, Bootsma D, Spurr N, Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson J (1982) A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **300**: 765–7
- De Raedt T, Brems H, Wolkenstein P, Vidaud D, Pilotti S, Perrone F, Mautner V, Frahm S, Sciot R, Legius E (2003) Elevated risk for MPNST in NF1 microdeletion patients. *Am J Hum Genet* **72**: 1288–92 
- de Wet J, Wood K, DeLuca M, Helinski D, Subramani S (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **7**: 725–37 
- DeClue J, Papageorge A, Fletcher J, Diehl S, Ratner N, Vass W, Lowy D (1992) Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. *Cell* **69**: 265–73
- Degterev A, Lugovskoy A, Cardone M, Mulley B, Wagner G, Mitchison T, Yuan J (2001) Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nat Cell Biol* **3**: 173–82 
- Derossi D, Joliot A, Chassaing G, Prochiantz A (1994) The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* **269**: 10444–50 

- Dexter SJ, Cámara M, Davies M, Shakesheff KM (2003) Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomaterials* **24**: 27–34 
- Dieckmann T, Suzuki E, Nakamura G, Feigon J (1996) Solution structure of an ATP-binding RNA aptamer reveals a novel fold. *RNA* **2**: 628–40 
- Diepgen TL, Mahler V (2002) The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol* **146 Suppl 61**: 1–6 
- Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A, Ellston R, Hawthorth C, Johnson T, Mortlock A, Keen N, Taylor SS (2003) Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol* **161**: 267–80  
- Ditchfield C, Keen N, Taylor SS (2004) The *ipl1/aurora* kinase family: methods of inhibition and functional analysis in Mammalian cells. *Methods Mol Biol* **296**: 371–82
- Donaldson LW, Gish G, Pawson T, Kay LE, Forman-Kay JD (2002) Structure of a regulatory complex involving the Abl SH3 domain, the Crk SH2 domain, and a Crk-derived phosphopeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14053–8  
- Dosil M, Wang S, Lemischka I (1993) Mitogenic signalling and substrate specificity of the Flk2/Flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* **13**: 6572–85
- Douangamath A, Filipp FV, Klein ATJ, Barnett P, Zou P, Voorn-Brouwer T, Vega MC, Mayans OM, Sattler M, Distel B, Wilmanns M (2002) Topography for independent binding of alpha-helical and PPII-helical ligands to a peroxisomal SH3 domain. *Mol Cell* **10**: 1007–17 
- Downward J (2003a) Role of receptor tyrosine kinases in G-protein-coupled receptor regulation of Ras: transactivation or parallel pathways? *Biochem J* **376**: e9–10  
- Downward J (2003b) Targeting Ras signalling pathways in cancer therapy *Nat Rev Cancer* **3**: 11–22 
- Druker B, Okuda K, Matulonis U, Salgia R, Roberts T, Griffin J (1992) Tyrosine phosphorylation of rasGAP and associated proteins in chronic myelogenous leukemia cell lines. *Blood* **79**: 2215–20
- Druker BJ (2004) Imatinib as a paradigm of targeted therapies. *Adv Cancer Res* **91**: 1–30 
- Duchesne M, Schweighoffer F, Parker F, Clerc F, Frobert Y, Thang M, Tocqué B (1993) Identification of the SH3 domain of GAP as an essential sequence for Ras-GAP-mediated signaling. *Science* **259**: 525–8 
- Ebina Y, Takahara Y, Kishi F, Nakazawa A, Brent R (1983) LexA protein is a repressor of the colicin E1 gene. *J Biol Chem* **258**: 13258–61 
- Eck M, Atwell S, Shoelson S, Harrison S (1994) Structure of the regulatory domains of the Src-family tyrosine kinase Lck. *Nature* **368**: 764–9 
- Eckstein J (2000) Cdc25 as a potential target of anticancer agents. *Invest New Drugs* **18**: 149–56
- Edman L (2000) Theory of Fluorescence Correlation Spectroscopy on single molecules. *J Phys Chem* **104**: 6165–6170 
- Eerola I, Boon LM, Mulliken JB, Burrows PE, Dompmartin A, Watanabe S, Vanwijck R, Vikkula M (2003) Capillary malformation-arteriovenous malformation, a new clinical and genetic disorder caused by RASA1 mutations. *Am J Hum Genet* **73**: 1240–9 
- Eerola I, Boon LM, Watanabe S, Grynberg H, Mulliken JB, Vikkula M (2002) Locus for susceptibility for familial capillary malformation ('port-wine stain') maps to 5q. *Eur J Hum Genet* **10**: 375–80  
- Egan S, Weinberg R (1993) The pathway to signal achievement. *Nature* **365**: 781–3 
- Elgemeie GH (2003) Thioguanine, mercaptopurine: their analogs and nucleosides as antimetabolites. *Curr Pharm Des* **9**: 2627–42
- Elliott M, Maini R, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, Brennan F, Walker J, Bijl H, Ghrayeb J (1993) Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* **36**: 1681–90

- Ellis C, Moran M, McCormick F, Pawson T (1990) Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature* **343**: 377–81 
- Elmberger P, Lozano M, Weisenburger D, Sanger W, Chan W (1995) Transcripts of the nrm-alk fusion gene in anaplastic large cell lymphoma, Hodgkin's disease, and reactive lymphoid lesions. *Blood* **86**: 3517–21
- Elson E, Magde D (1974) Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers* **13**: 1–27
- Elston C, Ellis I (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* **19**: 403–10
- Ewart-Toland A, Briassouli P, de Koning JP, Mao JH, Yuan J, Chan F, MacCarthy-Morrogh L, Ponder BA, Nagase H, Burn J, Ball S, Almeida M, Linardopoulos S, Balmain A (2003) Identification of Stk6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human *Nat Genet* **34**: 403–12 
- Fabbrizio E, Cam LL, Polanowska J, Kaczorek M, Lamb N, Brent R, Sardet C (1999) Inhibition of mammalian cell proliferation by genetically selected peptide aptamers that functionally antagonize E2F activity *Oncogene* **18**: 4357–63 
- Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian H (1999) The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **341**: 164–72 
- Falzone C, Kao Y, Zhao J, Bryant D, Lecomte J (1994) Three-dimensional solution structure of PsaE from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002, a photosystem I protein that shows structural homology with SH3 domains. *Biochemistry* **33**: 6052–62 
- Fancelli D, Berta D, Bindi S, Cameron A, Cappella P, Carpinelli P, Catana C, Forte B, Giordano P, Giorgini ML, Mantegani S, Marsiglio A, Meroni M, Moll J, Pittalà V, Roletto F, Severino D, Soccin C, Storici P, Tonan R, Varasi M, Vulpetti A, Vianello P (2005) Potent and selective Aurora inhibitors identified by the expansion of a novel scaffold for protein kinase inhibition *J Med Chem*  
- Farr C, Saiki R, Erlich H, McCormick F, Marshall C (1988) Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 1629–33 
- Fazi B, Cope MJ, Douangamath A, Ferracuti S, Schirwitz K, Zucconi A, Drubin DG, Wilmanns M, Cesareni G, Castagnoli L (2002) Unusual binding properties of the SH3 domain of the yeast actin-binding protein Abp1: structural and functional analysis *J Biol Chem* **277**: 5290–8 
- Featherstone J, Griffiths S (2002) From the analyst's couch. Drugs that target angiogenesis. *Nat Rev Drug Discov* **1**: 413–4 
- Feng S, Chen J, Yu H, Simon J, Schreiber S (1994) Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science* **266**: 1241–7
- Feng S, Kapoor T, Shirai F, Combs A, Schreiber S (1996) Molecular basis for the binding of SH3 ligands with non-peptide elements identified by combinatorial synthesis. *Chem Biol* **3**: 661–70 
- Feng S, Kasahara C, Rickles R, Schreiber S (1995) Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 12408–15 
- Ferguson MR, Fan X, Mukherjee M, Luo J, Khan R, Ferreon JC, Hilser VJ, Shope RE, Fox RO (2004) Directed discovery of bivalent peptide ligands to an SH3 domain. *Protein Sci* **13**: 626–32  
- Fernandez-Ballester G, Blanes-Mira C, Serrano L (2004) The tryptophan switch: changing ligand-binding specificity from type I to type II in SH3 domains *J Mol Biol* **335**: 619–29 
- Ferreon JC, Volk DE, Luxon BA, Gorenstein DG, Hilser VJ (2003) Solution structure, dynamics, and thermodynamics of the native state ensemble of the Sem-5 C-terminal SH3 domain. *Biochemistry* **42**: 5582–91  
- Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245–6 
- Fiore PD, Pelicci P, Sorkin A (1997) EH: a novel protein-protein interaction domain potentially involved in intracellular sorting. *Trends Biochem Sci* **22**: 411–3 

- Fong T, Shawver L, Sun L, Tang C, App H, Powell T, Kim Y, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth K, McMahon G (1999) SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* **59**: 99–106 
- Francisco L, Chan C (1994) Regulation of yeast chromosome segregation by Ipl1 protein kinase and type 1 protein phosphatase. *Cell Mol Biol Res* **40**: 207–13
- Friedman E, Gejman P, Martin G, McCormick F (1993) Nonsense mutations in the C-terminal SH2 region of the GTPase activating protein (GAP) gene in human tumours. *Nat Genet* **5**: 242–7 
- Gadek TR (2003) Strategies and methods in the identification of antagonists of protein-protein interactions. *Biotechniques Suppl*: 21–4 
- Gadek TR, Nicholas JB (2003) Small molecule antagonists of proteins. *Biochem Pharmacol* **65**: 1–8 
- Gallouzi IE, Parker F, Chebli K, Maurier F, Labourier E, Barlat I, Capony JP, Tocqué B, Tazi J (1998) A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability *Mol Cell Biol* **18**: 3956–65. 
- Garay HE, Niebla O, González LJ, Menéndez T, Cruz LJ, Reyes O (2000) Disulfide bond polymerization of a cyclic peptide derived from the surface loop 4 of class 1 omp of neisseria meningitidis *Letters in Peptide Science* **7**: 97–105 
- Garbay C, Gigoux V, Camonis J, L'Hoste S, Samson J (2003) Methods to identify anti-tumoral agents inhibiting RasGAP / Aurora kinase interactions **PCT patent application WO 03/087395 A2** 
- Garbay C, Liu W, Vidal M, Roques B (2000) Inhibitors of Ras signal transduction as antitumor agents. *Biochem Pharmacol* **60**: 1165–9 
- Garbay C, Roques BP (1999) Le blocage de l'interaction Grb2-Sos par un peptide dimérique inhibe la prolifération cellulaire dans un modèle tumoral *Médecine/Sciences* **15**: 903–4 
- García-Echeverría C, Albericio F, Pons M, Barany G, Giralt E (1989) Convenient synthesis of a cyclic peptide disulfide: A type ii β -turn structural model *Tetrahedron Letters* **30**: 2441–2444
- Gattiker A, Gasteiger E, Bairoch A (2002) ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. *Appl Bioinformatics* **1**: 107–8 
- Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, Gandini O, Silvestri I, Nofroni I, Sacconi G, Frati L, Agliano AM (2003) Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer *Ann Oncol* **14**: 85–90 
- Gether U, Kobilka B (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* **273**: 17979–82 
- Geyer C, Brent R (2000) Selection of genetic agents from random peptide aptamer expression libraries. *Methods Enzymol* **328**: 171–208
- Ghose R, Shekhtman A, Goger M, Ji H, Cowburn D (2001) A novel, specific interaction involving the Csk SH3 domain and its natural ligand. *Nat Struct Biol* **8**: 998–1004 
- Gibbs J, Schaber M, Allard W, Sigal I, Scolnick E (1988) Purification of ras GTPase activating protein from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 5026–30 
- Giet R, Prigent C (1999) Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases *J Cell Sci* **112** (Pt 21): 3591–601 
- Gigoux V, L'Hoste S, Raynaud F, Camonis J, Garbay C (2002) Identification of Aurora Kinases as RasGAP Src Homology 3 Domain-binding Proteins *J Biol Chem* **277**: 23742–23746. 
- Gill S, Thomas RR, Goldberg RM (2003) New targeted therapies in gastrointestinal cancers. *Curr Treat Options Oncol* **4**: 393–403 
- Gilmer T, Rodriguez M, Jordan S, Crosby R, Allgood K, Green M, Kimery M, Wagner C, Kinder D, Charifson P (1994) Peptide inhibitors of src SH3-SH2-phosphoprotein interactions. *J Biol Chem* **269**: 31711–9 
- Goddard TD, Kneller DG (2004) Sparky 3, a NMR assignment program (university of california, san francisco) unpublished

- Gold L, Tuerk C (1993) Methods for identifying nucleic acid ligands **US Patent** 5,270,163
- Golub T, Barker G, Lovett M, Gilliland D (1994) Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* **77**: 307–16
- Golub T, Goga A, Barker G, Afar D, McLaughlin J, Bohlander S, Rowley J, Witte O, Gilliland D (1996) Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. *Mol Cell Biol* **16**: 4107–16
- Gorre M, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao P, Sawyers C (2001) Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* **293**: 876–80
- Gosser Y, Zheng J, Overduin M, Mayer B, Cowburn D (1995) The solution structure of Abl SH3, and its relationship to SH2 in the SH(32) construct. *Structure* **3**: 1075–86
- Goto H, Yasui Y, Nigg EA, Inagaki M (2002) Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells* **7**: 11–7
- Gril B, Assayag F, Poupon M, Vidal M, Liu WQ, Garbay C (2004) Sh3-grb2 inhibitors inactivate her2 signaling and enhance the anti-tumor effects of docetaxel *European Journal of Cancer Supplements* **2**: 96
- Guibé F (1998) Allylic protecting groups and their use in a complex environment part II: Allylic protecting groups and their removal through catalytic palladium π -allyl methodology *Tetrahedron* **54**: 2967
- Gutkind J (1998) The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* **273**: 1839–42
- Gyuris J, Golemis E, Chertkov H, Brent R (1993) Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**: 791–803
- Hahn W, Counter C, Lundberg A, Beijersbergen R, Brooks M, Weinberg R (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* **400**: 464–8
- Hall BE, Bar-Sagi D, Nassar N (2002) The structural basis for the transition from Ras-GTP to Ras-GDP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 12138–42
- Hall J, Lee M, Newman B, Morrow J, Anderson L, Huey B, King M (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* **250**: 1684–9
- Hallek M, Bergsagel P, Anderson K (1998) Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* **91**: 3–21
- Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature* **418**: 244–51
- Hansson H, Mattsson P, Allard P, Haapaniemi P, Vihinen M, Smith C, Hard T (1998) Solution structure of the SH3 domain from Bruton's tyrosine kinase. *Biochemistry* **37**: 2912–24
- Harari P (2004) Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* **11**: 689–708
- Harrington EA, Bebbington D, Moore J, Rasmussen RK, Ajose-Adeogun AO, Nakayama T, Graham JA, Demur C, Hercend T, Diu-Hercend A, Su M, Golec JM, Miller KM (2004) VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo *Nat Med* **10**: 262–7
- Harris SB (2002) Virtual rice: Japan sets up the Rice Simulator Project to create an in silico rice plant. *EMBO Rep* **3**: 511–3
- Hartwell L (1992) Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* **71**: 543–6
- Haslam R, Koide H, Hemmings B (1993) Pleckstrin domain homology. *Nature* **363**: 309–10
- Hauf S, Cole RW, LaTerra S, Zimmer C, Schnapp G, Walter R, Heckel A, van Meel J, Rieder CL, Peters JM (2003) The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint *J Cell Biol* **161**: 281–94
- Hayflick L, Moorhead P (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**: 585–621

- Heisterkamp N, Groffen J (2002) Philadelphia-positive leukemia: a personal perspective. *Oncogene* **21**: 8536–40  
- Heller M, Kessler H (2001) Nmr spectroscopy in drug design *Pure Appl Chem* **73**: 1429–36  
- Henkemeyer M, Rossi D, Holmyard D, Puri M, Mbamalu G, Harpal K, Shih T, Jacks T, Pawson T (1995) Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein. *Nature* **377**: 695–701 
- Heuer K, Kofler M, Langdon G, Thiemke K, Freund C (2004) Structure of a helically extended SH3 domain of the T cell adapter protein ADAP. *Structure (Camb)* **12**: 603–10  
- Hideshima T, Akiyama M, Hayashi T, Richardson P, Schlossman R, Chauhan D, Anderson KC (2003) Targeting p38 MAPK inhibits multiple myeloma cell growth in the bone marrow milieu. *Blood* **101**: 703–5  
- Higgins D, Thompson J, Gibson T (1996) Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol* **266**: 383–402
- Hill C, Doyon F (2004) La fréquence des cancers en France : quoi de neuf depuis l'année dernière *Bull Cancer* **91**: 9–14
- Hirsch-Ginsberg C, LeMaistre A, Kantarjian H, Talpaz M, Cork A, Freireich E, Trujillo J, Lee M, Stass S (1990) RAS mutations are rare events in Philadelphia chromosome-negative/bcr gene rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia, but are prevalent in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **76**: 1214–9
- Hélène C (1994) Control of oncogene expression by antisense nucleic acids. *Eur J Cancer* **30A**: 1721–6
- Holden J (2001) DNA topoisomerases as anticancer drug targets: from the laboratory to the clinic. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* **1**: 1–25
- Holmgren A (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* **264**: 13963–6 
- Hoppe-Seyler F, Crnkovic-Mertens I, Tomai E, Butz K (2004) Peptide aptamers: specific inhibitors of protein function *Curr Mol Med* **4**: 529–38  
- Horita D, Baldisseri D, Zhang W, Altieri A, Smithgall T, Gmeiner W, Byrd R (1998) Solution structure of the human Hck SH3 domain and identification of its ligand binding site. *J Mol Biol* **278**: 253–65 
- Hruban R, van Mansfeld A, Offerhaus G, van Weering D, Allison D, Goodman S, Kensler T, Bose K, Cameron J, Bos J (1993) K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* **143**: 545–54
- Hsieh C, Vogel U, Dixon R, Francke U (1989) Chromosome localization and cDNA sequence of murine and human genes for ras p21 GTPase activating protein (GAP). *Somat Cell Mol Genet* **15**: 579–90
- Hu KQ, Settleman J (1997) Tandem SH2 binding sites mediate the RasGAP-RhoGAP interaction: a conformational mechanism for SH3 domain regulation *Embo J* **16**: 473–83. 
- Huang S, Bock J, Harari P (1999) Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* **59**: 1935–40 
- Huber M, Watson KA, Selinka HC, Carthy CM, Klingel K, McManus BM, Kandolf R (1999) Cleavage of RasGAP and phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in the course of coxsackievirus B3 replication *J Virol* **73**: 3587–94. 
- Ihaka R, Gentleman R (1996) R: A language for data analysis and graphics *Journal of Computational and Graphical Statistics* **5**: 299–314
- Inglis SR, Stojkoski C, Branson KM, Cawthray JF, Fritz D, Wiadrowski E, Pyke SM, Booker GW (2004) Identification and specificity studies of small-molecule ligands for SH3 protein domains. *J Med Chem* **47**: 5405–17  
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860–921 
- Irby R, Mao W, Coppola D, Kang J, Loubeau J, Trudeau W, Karl R, Fujita D, Jove R, Yeatman

- T (1999) Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nat Genet* **21**: 187–90  
- IUAPC (1998) Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids, International Union of Pure and Applied Chemistry *Pure Appl Chem* **70**: 117–142 
- Izbicka E, Tolcher AW (2004) Development of novel alkylating drugs as anticancer agents. *Curr Opin Investig Drugs* **5**: 587–91
- Janin Y (2003) Peptides with anticancer use or potential. *Amino Acids* **25**: 1–40  
- Jeng MF, Campbell AP, Begley T, Holmgren A, Case DA, Wright PE, Dyson HJ (1994) High-resolution solution structures of oxidized and reduced *Escherichia coli* thioredoxin *Structure* **2**: 853–68 
- Ji T, Grossmann M, Ji I (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* **273**: 17299–302 
- Joensuu H (2002) Treatment of inoperable gastrointestinal stromal tumor (GIST) with Imatinib (Glivec, Gleevec). *Med Klin (Munich)* **97 Suppl 1**: 28–30
- Joensuu H, Roberts P, Sarlomo-Rikala M, Andersson L, Tervahartiala P, Tuveson D, Silberman S, Capdeville R, Dimitrijevic S, Druker B, Demetri G (2001) Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* **344**: 1052–6 
- Johnson M, DeClue J, Felzmann S, Vass W, Xu G, White R, Lowy D (1994) Neurofibromin can inhibit Ras-dependent growth by a mechanism independent of its GTPase-accelerating function. *Mol Cell Biol* **14**: 641–5
- Johnson M, Look A, DeClue J, Valentine M, Lowy D (1993) Inactivation of the NF1 gene in human melanoma and neuroblastoma cell lines without impaired regulation of GTP.Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5539–43 
- Jones H (1997) Record of the first physician to see Henrietta Lacks at the Johns Hopkins Hospital: history of the beginning of the HeLa cell line. *Am J Obstet Gynecol* **176**: S227–8
- Jones S, Thornton J (1996) Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13–20 
- Jordan MA, Wilson L (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* **4**: 253–65  
- Jousset C, Carron C, Boureux A, Quang C, Oury C, Dusanter-Fourt I, Charon M, Levin J, Bernard O, Ghysdael J (1997) A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein. *EMBO J* **16**: 69–82  
- Kaiser E, Colecott R, Bossinger C, Cook P (1970) Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem* **34**: 595–8
- Kaklamani V, O'Regan RM (2004) New targeted therapies in breast cancer. *Semin Oncol* **31**: 20–5
- Kalra R, Paderanga D, Olson K, Shannon K (1994) Genetic analysis is consistent with the hypothesis that NF1 limits myeloid cell growth through p21ras. *Blood* **84**: 3435–9
- Kami K, Takeya R, Sumimoto H, Kohda D (2002) Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67(phox), Grb2 and Pex13p. *EMBO J* **21**: 4268–76 
- Kang H, Freund C, Duke-Cohan J, Musacchio A, Wagner G, Rudd C (2000) SH3 domain recognition of a proline-independent tyrosine-based RKxxYxxY motif in immune cell adaptor SKAP55. *EMBO J* **19**: 2889–99 
- Kashige N, Carpino N, Kobayashi R (2000) Tyrosine phosphorylation of p62dok by p210bcr-abl inhibits RasGAP activity *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2093–8. 
- Kasof G, Gomes B (2001) Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* **276**: 3238–46  
- Kates SA, Sole NA, Johnson CR, Hudson D, Barany G, Albericio F (1993) A novel, convenient, three-dimensional orthogonal strategy for solid-phase synthesis of cyclic peptides *Tetrahedron Letters* **34**: 1549–1552

- Kato M, Miyazawa K, Kitamura N (2000) A deubiquitinating enzyme UBPY interacts with the Src homology 3 domain of Hrs-binding protein via a novel binding motif PX(V/I)(D/N)RXXKP *J Biol Chem* **275**: 37481–7
- Kavanaugh W, Williams L (1994) An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. *Science* **266**: 1862–5
- Kay B, Williamson M, Sudol M (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* **14**: 231–41
- Kazlauskas A, Ellis C, Pawson T, Cooper J (1990) Binding of GAP to activated PDGF receptors. *Science* **247**: 1578–81
- Keely P, Westwick J, Whitehead I, Der C, Parise L (1997) Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* **390**: 632–6
- Keen N, Taylor S (2004) Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents *Nat Rev Cancer* **4**: 927–936
- Kelekar A, Thompson C (1998) Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* **8**: 324–30
- Kennedy D, French J, Guitard E, Ru K, Tocqué B, Mattick J (2001) Characterization of G3BPs: tissue specific expression, chromosomal localisation and rasGAP(120) binding studies. *J Cell Biochem* **84**: 173–87
- Kertesz N, Samson J, Debacker C, Wu H, Labastie MC (2002) Cloning and characterization of human and mouse SNRK sucrose non-fermenting protein (SNF-1)-related kinases. *Gene* **294**: 13–24
- Khosravi-Far R, Der C (1994) The Ras signal transduction pathway. *Cancer Metastasis Rev* **13**: 67–89
- Kiat LS, Hui KM, Gopalan G (2002) Aurora-A kinase interacting protein (AIP), a novel negative regulator of human Aurora-A kinase *J Biol Chem* **277**: 45558–65
- Kim C, Oh Y, Lee T (1997) Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells. *Gene* **199**: 293–301
- Kim HJ, Chang WK, Kim MK, Lee SS, Choi BY (2002) Dietary factors and gastric cancer in Korea: a case-control study. *Int J Cancer* **97**: 531–5
- Kimoto M, Shirouzu M, Mizutani S, Koide H, Kaziro Y, Hirao I, Yokoyama S (2002) Anti-(Raf-1) RNA aptamers that inhibit Ras-induced Raf-1 activation. *Eur J Biochem* **269**: 697–704
- Kimura M, Kotani S, Hattori T, Sumi N, Yoshioka T, Todokoro K, Okano Y (1997) Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of *Drosophila* and yeast Ipl1 *J Biol Chem* **272**: 13766–71
- Kimura W, Zhao B, Futakawa N, Muto T, Makuuchi M (1999) Significance of K-ras codon 12 point mutation in pancreatic juice in the diagnosis of carcinoma of the pancreas. *Hepatogastroenterology* **46**: 532–9
- Kirkpatrick S, Jr CDG, Vecchi MP (1983) Optimization by simulated annealing *Science* **220**: 671–680
- Kishan K, Scita G, Wong W, Fiore PD, Newcomer M (1997) The SH3 domain of Eps8 exists as a novel intertwined dimer. *Nat Struct Biol* **4**: 739–43
- Kishan KV, Newcomer ME, Rhodes TH, Guillot SD (2001) Effect of pH and salt bridges on structural assembly: molecular structures of the monomer and intertwined dimer of the Eps8 SH3 domain *Protein Sci* **10**: 1046–55
- Klein C, Vassilev LT (2004) Targeting the p53-MDM2 interaction to treat cancer. *Br J Cancer* **91**: 1415–9
- Knudsen B, Zheng J, Feller S, Mayer J, Burrell S, Cowburn D, Hanafusa H (1995) Affinity and specificity requirements for the first Src homology 3 domain of the Crk proteins. *EMBO J* **14**: 2191–8
- Kochoyan M, Yang Y (2004) Etude d'aptamères peptidiques par rmn. (communications personnelles)
- Kohda D, Hatanaka H, Odaka M, Mandiyan V, Ullrich A, Schlessinger J, Inagaki F (1993) Solution structure of the SH3 domain of phospholipase C-gamma. *Cell* **72**: 953–60

- Kohda D, Terasawa H, Ichikawa S, Ogura K, Hatanaka H, Mandiyan V, Ullrich A, Schlessinger J, Inagaki F (1994) Solution structure and ligand-binding site of the carboxy-terminal SH3 domain of GRB2. *Structure* **2**: 1029–40 
- Kohlhaw GB (2003) Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 1–15, table of contents 
- Koyama S, Yu H, Dalgarno D, Shin T, Zydowsky L, Schreiber S (1993) Structure of the PI3K SH3 domain and analysis of the SH3 family. *Cell* **72**: 945–52
- Kretzschmar T, von Rüden T (2002) Antibody discovery: phage display. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 598–602 
- Kufer TA, Nigg EA, Sillje HH (2003) Regulation of Aurora-A kinase on the mitotic spindle. *Chromosoma* **112**: 159–63 
- Kufer TA, Sillje HH, Korner R, Gruss OJ, Meraldi P, Nigg EA (2002) Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J Cell Biol* **158**: 617–23 
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* **5**: 150–63
- Kunath T, Gish G, Lickert H, Jones N, Pawson T, Rossant J (2003) Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat Biotechnol* **21**: 559–61 
- Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Honda S, Kobayashi O, Hatakeyama K, Ushio Y, Saya H, Hirota T (2003) CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev Cell* **5**: 853–64 
- Kurzrock R, Gutterman J, Talpaz M (1988) The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* **319**: 990–8
- Kuzmic P (1996) Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Anal Biochem* **237**: 260–73 
- Lambert JN, Mitchell JP, Roberts KD (2001) The synthesis of cyclic peptides. *J Chem Soc, Perkin Trans 1* **5**: 471–484  
- Largaespada D, Brannan C, Jenkins N, Copeland N (1996) Nf1 deficiency causes Ras-mediated granulocyte/macrophage colony stimulating factor hypersensitivity and chronic myeloid leukaemia. *Nat Genet* **12**: 137–43 
- Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A (2003) Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Ther* **99**: 167–81 
- Leblanc V, Delumeau I, Tocqué B (1999) Ras-GTPase activating protein inhibition specifically induces apoptosis of tumour cells. *Oncogene* **18**: 4884–9. 
- Leblanc V, Tocqué B, Delumeau I (1998) Ras-GAP controls Rho-mediated cytoskeletal reorganization through its SH3 domain. *Mol Cell Biol* **18**: 5567–78 
- Lee C, Saksela K, Mirza U, Chait B, Kuriyan J (1996) Crystal structure of the conserved core of HIV-1 Nef complexed with a Src family SH3 domain. *Cell* **85**: 931–42 
- Lee H, Wu H, Chuang Y, Chang A, Chao H, Chen K, Chen H, Lai G, Huang H, Chen C (1990) Epidemiologic characteristics and multiple risk factors of stomach cancer in Taiwan. *Anticancer Res* **10**: 875–81
- Lefkowitz R (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* **273**: 18677–80 
- Lens SM, Medema RH (2003) The survivin/Aurora B complex: its role in coordinating tension and attachment. *Cell Cycle* **2**: 507–10 
- Lerner E, Qian Y, Blaskovich M, Fossum R, Vogt A, Sun J, Cox A, Der C, Hamilton A, Sefti S (1995) Ras CAAX peptidomimetic FTI-277 selectively blocks oncogenic Ras signaling by inducing cytoplasmic accumulation of inactive Ras-Raf complexes. *J Biol Chem* **270**: 26802–6 
- Li F (2005) Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *Br J Cancer* **92**: 212–6  
- Li P, Roller PP (2002) Cyclization strategies in peptide derived drug design. *Curr Top Med Chem* **2**: 325–41 
- Li T, Sparano JA (2003) Inhibiting Ras signaling in the therapy of breast cancer. *Clin Breast Cancer* **3**: 405–16; discussion 417–20

- Liang J, Chen J, Schreiber S, Clardy J (1996a) Crystal structure of P13K SH3 domain at 20 angstroms resolution. *J Mol Biol* **257**: 632–43 
- Liang S, Marmorstein R, Harrison S, Ptashine M (1996b) DNA sequence preferences of GAL4 and PPR1: how a subset of Zn₂ Cys₆ binuclear cluster proteins recognizes DNA. *Mol Cell Biol* **16**: 3773–80 
- Lilliefors H (1967) On the kolmogorov-smirnov test for normality with mean and variance unknown *Journal of the American Statistical Association*
- Lim W, Fox R, Richards F (1994a) Stability and peptide binding affinity of an SH3 domain from the *Caenorhabditis elegans* signaling protein Sem-5. *Protein Sci* **3**: 1261–6 
- Lim W, Richards F, Fox R (1994b) Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature* **372**: 375–9 
- Lipinski C, Lombardo F, Dominy B, Feeney P (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **46**: 3–26
- Liu Q, Berry D, Nash P, Pawson T, McGlade CJ, Li SSC (2003) Structural basis for specific binding of the Gads SH3 domain to an RxxK motif-containing SLP-76 peptide: a novel mode of peptide recognition. *Mol Cell* **11**: 471–81 
- Liu W, Vidal M, Gresh N, Roques B, Garbay C (1999) Small peptides containing phosphotyrosine and adjacent alphaMe-phosphotyrosine or its mimetics as highly potent inhibitors of Grb2 SH2 domain. *J Med Chem* **42**: 3737–41  
- Liu W, Vidal M, Mathé C, Périgaud C, Garbay C (2000) Inhibition of the ras-dependent mitogenic pathway by phosphopeptide prodrugs with antiproliferative properties. *Bioorg Med Chem Lett* **10**: 669–72 
- Liu WQ, Vidal M, Olszowy C, Million E, Lenoir C, Dhôtel H, Garbay C (2004) Structure-activity relationships of small phosphopeptides, inhibitors of Grb2 SH2 domain, and their prodrugs. *J Med Chem* **47**: 1223–33  
- Lockyer PJ, Wennström S, Kupzig S, Venkateswarlu K, Downward J, Cullen PJ (1999) Identification of the ras GTPase-activating protein GAP1(m) as a phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-binding protein in vivo. *Curr Biol* **9**: 265–8 
- Lohse J, Nielsen PE, Harrit N, Dahl O (1997) Fluorescein-conjugated lysine monomers for Solid Phase Synthesis of fluorescent peptides and PNA oligomers *Bioconjugate Chem* **8**: 503–509  
- Lok L, Brent R (2005) Automatic generation of cellular reaction networks with molculizer 1.0 *Nat Biotech* **23**: 131–136 
- Long Y, Voigt J, Lung F, King C, Roller P (1999a) Significant compensatory role of position Y-2 conferring high affinity to non-phosphorylated inhibitors of Grb2-SH2 domain. *Bioorg Med Chem Lett* **9**: 2267–72 
- Long Y, Yao Z, Voigt J, Lung F, Luo J, Burke T, King C, Yang D, Roller P (1999b) Structural requirements for Tyr in the consensus sequence Y-E-N of a novel nonphosphorylated inhibitor to the Grb2-SH2 domain. *Biochem Biophys Res Commun* **264**: 902–8  
- Lorenz W, McCann R, Longiaru M, Cormier M (1991) Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 4438–42 
- Lung FDT, King CR, Roller PP (1999) Development of non-phosphorylated cyclic thioether peptide binding to the grb2-sh2 domain *Letters in Peptide Science* **6**: 45–49 
- Lutz R (2000) Role of the BH3 (Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related proteins. *Biochem Soc Trans* **28**: 51–6 
- Machida K, Mayer BJ (2005) The SH2 domain: versatile signaling module and pharmaceutical target *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **1747**: 1–25 
- Maekawa M, Li S, Iwamatsu A, Morishita T, Yokota K, Imai Y, Kohsaka S, Nakamura S, Hattori S (1994) A novel mammalian Ras GTPase-activating protein which has phospholipid-binding and Btk homology regions. *Mol Cell Biol* **14**: 6879–85 

- Magde D, Elson E, Webb W (1974) Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *Biopolymers* **13**: 29–61
- Marchler-Bauer A, Bryant SH (2004) CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res* **32**: W327–31  
- Margeat E, Poujol N, Boulahtouf A, Chen Y, Müller J, Gratton E, Cavailles V, Royer C (2001) The human estrogen receptor alpha dimer binds a single SRC-1 coactivator molecule with an affinity dictated by agonist structure. *J Mol Biol* **306**: 433–42  
- Margolis B, Li N, Koch A, Mohammadi M, Hurwitz D, Zilberstein A, Ullrich A, Pawson T, Schlesinger J (1990) The tyrosine phosphorylated carboxyterminus of the EGF receptor is a binding site for GAP and PLC-gamma. *EMBO J* **9**: 4375–80
- Marino M, Banerjee M, Jonquières R, Cossart P, Ghosh P (2002) GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB are SH3-like and mediate binding to host ligands. *EMBO J* **21**: 5623–34  
- Marshall M, Hettich L (1993) Characterization of Ras effector mutant interactions with the NF1-GAP related domain. *Oncogene* **8**: 425–31
- Martin G, Yatani A, Clark R, Conroy L, Polakis P, Brown A, McCormick F (1992) GAP domains responsible for ras p21-dependent inhibition of muscarinic atrial K⁺ channel currents. *Science* **255**: 192–4
- Martinez J, Pisabarro M, Serrano L (1998) Obligatory steps in protein folding and the conformational diversity of the transition state. *Nat Struct Biol* **5**: 721–9  
- Mayer B, Baltimore D (1993) Signalling through SH2 and SH3 domains. *Trends Cell Biol* **3**: 8–13
- McCormick F (1995) Ras signaling and NF1. *Curr Opin Genet Dev* **5**: 51–5
- McGee A, Dakoji S, Olsen O, Brecht D, Lim W, Prehoda K (2001) Structure of the SH3-guanylate kinase module from PSD-95 suggests a mechanism for regulated assembly of MAGUK scaffolding proteins. *Mol Cell* **8**: 1291–301  
- McGlade J, Brunkhorst B, Anderson D, Mbamalu G, Settleman J, Dedhar S, Rozakis-Adcock M, Chen L, Pawson T (1993) The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. *EMBO J* **12**: 3073–81
- McNeish I, Bell S, Lemoine N (2004) Gene therapy progress and prospects: cancer gene therapy using tumour suppressor genes. *Gene Ther* **11**: 497–503  
- Medema J, Pronk G, de Vries-Smits A, Clark R, McCormick F, Bos J (1996) Insulin-induced tyrosine phosphorylation of a M(r) 70,000 protein revealed by association with the Src homology 2 (SH2) and SH3 domains of p120GAP and Grb2. *Cell Growth Differ* **7**: 543–50
- Melkko S, rg Scheuermann, Dumelin CE, Neri D (2004) Encoded self-assembling chemical libraries. *Nat Biotechnol* **22**: 568–74  
- Merrifield B (1986) Solid phase synthesis. *Science* **232**: 341–7  
- Merrifield R (1963) Solid phase peptide synthesis *J Am Chem Soc* **85**: 2149–2154  
- Meyer B, Peters T (2003) NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**: 864–90  
- Michod D, Yang JY, Chen J, Bonny C, Widmann C (2004) A RasGAP-derived cell permeable peptide potentially enhances genotoxin-induced cytotoxicity in tumor cells. *Oncogene* **23**: 8971–8  
- Minamoto T, Mai M, Ronai Z (2000) K-ras mutation: early detection in molecular diagnosis and risk assessment of colorectal, pancreas, and lung cancers—a review. *Cancer Detect Prev* **24**: 1–12
- Mitsiades CS, Mitsiades N, Koutsilieris M (2004) The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development. *Curr Cancer Drug Targets* **4**: 235–56
- Mitsudomi T, Friedman E, Gejman P, McCormick F, Gazdar A (1994) Genetic analysis of the catalytic domain of the GAP gene in human lung cancer cell lines. *Hum Genet* **93**: 27–31

- Miyauchi J, Asada M, Sasaki M, Tsunematsu Y, Kojima S, Mizutani S (1994) Mutations of the N-ras gene in juvenile chronic myelogenous leukemia. *Blood* **83**: 2248–54
- Molecular Probes (2004a) Technical Focus : Fluorescence Polarization (FP) in *Handbook* (www.probes.com) Eugene, OR, USA: Molecular Probes
- Molecular Probes (2004b) Technical Focus: Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) in *Handbook* (www.probes.com) Eugene, OR, USA: Molecular Probes
- Mollat P, Zhang G, Frobert Y, Zhang Y, Fournier A, Grassi J, Thang M (1992) Non-neutralizing monoclonal antibodies against Ras GTPase-activating protein: production, characterization and use in an enzyme immunometric assay. *Biotechnology (N Y)* **10**: 1151–6
- Mongiovi A, Romano P, Panni S, Mendoza M, Wong W, Musacchio A, Cesareni G, Fiore PD (1999) A novel peptide-SH3 interaction. *EMBO J* **18**: 5300–9 
- Mori T (2004) Cancer-specific ligands identified from screening of peptide-display libraries. *Curr Pharm Des* **10**: 2335–43 
- Morris MC, Depollier J, Mery J, Heitz F, Divita G (2001) A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol* **19**: 1173–6 
- Morton C, Pugh D, Brown E, Kahmann J, Renzoni D, Campbell I (1996) Solution structure and peptide binding of the SH3 domain from human Fyn. *Structure* **4**: 705–14 
- Mueller U, Büssov K, Diehl A, Bartl FJ, Niesen FH, Nyarsik L, Heinemann U (2003) Rapid purification and crystal structure analysis of a small protein carrying two terminal affinity tags. *J Struct Funct Genomics* **4**: 217–25 
- Musacchio A, Noble M, Pauptit R, Wierenga R, Saraste M (1992) Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain. *Nature* **359**: 851–5 
- Musacchio A, Saraste M, Wilmanns M (1994) High-resolution crystal structures of tyrosine kinase SH3 domains complexed with proline-rich peptides. *Nat Struct Biol* **1**: 546–51
- Nagane M, Huang H, Cavenee W (2001) The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. *Apoptosis* **6**: 191–7 
- Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J (2002) Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res* **62**: 4236–43 
- Nagata H, Worobec A, Oh C, Chowdhury B, Tannenbaum S, Suzuki Y, Metcalfe D (1995) Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 10560–4 
- Nakamura T, Cech T (1998) Reversing time: origin of telomerase. *Cell* **92**: 587–90 
- Nakata Y, Kimura A, Katoh O, Kawaiishi K, Hyodo H, Abe K, Kuramoto A, Satow Y (1995) c-kit point mutation of extracellular domain in patients with myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* **91**: 661–3
- Nam H, Haser W, Roberts T, Frederick C (1996) Intramolecular interactions of the regulatory domains of the Bcr-Abl kinase reveal a novel control mechanism. *Structure* **4**: 1105–14 
- Nardini M, Mazzocco M, Massaro A, Maffei M, Vergano A, Donadini A, Scartezzini P, Bolognesi M (2004) Crystal structure of the glutaredoxin-like protein SH3BGRL3 at 1.6 Angstrom resolution. *Biochem Biophys Res Commun* **318**: 470–6 
- Nauenburg S, Zwerschke W, Jansen-Durr P (2001) Induction of apoptosis in cervical carcinoma cells by peptide aptamers that bind to the HPV-16 E7 oncoprotein. *FASEB J* **15**: 592–4 
- Neri A, Knowles D, Greco A, McCormick F, Dalla-Favera R (1988) Analysis of RAS oncogene mutations in human lymphoid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 9268–72 
- Neri A, Murphy J, Cro L, Ferrero D, Tarella C, Baldini L, Dalla-Favera R (1989) Ras oncogene mutation in multiple myeloma. *J Exp Med* **170**: 1715–25

- Ng SSW, Tsao MS, Nicklee T, Hedley DW (2002) Effects of the epidermal growth factor receptor inhibitor OSI-774, Tarceva, on downstream signaling pathways and apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther* **1**: 777–83 
- Nguyen JT, Porter M, Amoui M, Miller WT, Zuckermann RN, Lim WA (2000) Improving SH3 domain ligand selectivity using a non-natural scaffold *Chem Biol* **7**: 463–73 
- Nguyen JT, Turck CW, Cohen FE, Zuckermann RN, Lim WA (1998) Exploiting the basis of proline recognition by SH3 and WW domains: design of N-substituted inhibitors *Science* **282**: 2088–92 
- Niemeyer C, Arico M, Basso G, Biondi A, Rajnoldi AC, Creutzig U, Haas O, Harbott J, Hasle H, Kerndrup G, Locatelli F, Mann G, Stollmann-Gibbels B, van't Veer-Korthof E, van Wering E, Zimmermann M (1997) Chronic myelomonocytic leukemia in childhood: a retrospective analysis of 110 cases. European Working Group on Myelodysplastic Syndromes in Childhood (EWOG-MDS) *Blood* **89**: 3534–43 
- Nigg EA (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 21–32 
- Nimjee SM, Rusconi CP, Sullenger BA (2005) AP-TAMERS: An Emerging Class of Therapeutics. *Annu Rev Med* **56**: 555–583  
- Nimnual A, Yatsula B, Bar-Sagi D (1998) Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science* **279**: 560–3 
- Nishida M, Nagata K, Hachimori Y, Horiuchi M, Ogura K, Mandiyan V, Schlessinger J, Inagaki F (2001) Novel recognition mode between Vav and Grb2 SH3 domains. *EMBO J* **20**: 2995–3007  
- Noble M, Musacchio A, Saraste M, Courtneidge S, Wierenga R (1993) Crystal structure of the SH3 domain in human Fyn; comparison of the three-dimensional structures of SH3 domains in tyrosine kinases and spectrin. *EMBO J* **12**: 2617–24
- Noble MEM, Endicott JA, Johnson LN (2004) Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* **303**: 1800–5  
- Norman T, Smith D, Sorger P, Drees B, O'Rourke S, Hughes T, Roberts C, Friend S, Fields S, Murray A (1999) Genetic selection of peptide inhibitors of biological pathways. *Science* **285**: 591–5 
- Nowakowski J, Cronin CN, McRee DE, Knuth MW, Nelson CG, Pavletich NP, Rogers J, Sang BC, Scheibe DN, Swanson RV, Thompson DA (2002) Structures of the cancer-related Aurora-A, FAK, and EphA2 protein kinases from nanovolume crystallography *Structure (Camb)* **10**: 1659–67 
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* **267**: 5421–6 
- Ockey DA, Gadek TR (2002) Inhibitors of protein-protein interactions *Expert Opin Ther Patents* **12**: 393–400
- Ogawa W, Hosomi Y, Roth R (1995) Activation of protein kinase C stimulates the tyrosine phosphorylation and guanosine triphosphatase-activating protein association of p60 in rat hepatoma cells. *Endocrinology* **136**: 476–81
- Ogura K, Nagata K, Horiuchi M, Ebisui E, Hasuda T, Yuzawa S, Nishida M, Hatanaka H, Inagaki F (2002) Solution structure of N-terminal SH3 domain of Vav and the recognition site for Grb2 C-terminal SH3 domain. *J Biomol NMR* **22**: 37–46 
- Oldenburg K, Vo K, Michaelis S, Paddon C (1997) Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Res* **25**: 451–2 
- Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P (2002) The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* **19**: 607–14  
- Oneyama C, Agatsuma T, Kanda Y, Nakano H, Sharma SV, Nakano S, Narazaki F, Tatsuta K (2003) Synthetic inhibitors of proline-rich ligand-mediated protein-protein interaction: potent analogs of UCS15A *Chem Biol* **10**: 443–51 
- Oneyama C, Nakano H, Sharma SV (2002) UCS15A, a novel small molecule, SH3 domain-mediated protein-protein interaction blocking drug *Oncogene* **21**: 2037–50 

- Orford K, Orford C, Byers S (1999) Exogenous expression of beta-catenin regulates contact inhibition, anchorage-independent growth, anoikis, and radiation-induced cell cycle arrest. *J Cell Biol* **146**: 855–68 
- Otterson K, Noble R, Jr PH, Shaw K, Ramage R (1993) UV monitoring of deprotection for FastMoc-SPPS on the model 433A: feedback control to optimize peptide synthesis performance *Res News, Appl Biosyst* pp. 1–10
- Owen D, Wigge P, Vallis Y, Moore J, Evans P, McMahon H (1998) Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation. *EMBO J* **17**: 5273–85  
- Pabst B, Arps S, Binmoeller K, Thul R, Walsemann G, Fenner C, Klapdor R (1999) Analysis of K-ras mutations in pancreatic tissue after fine needle aspirates. *Anticancer Res* **19**: 2481–3
- Padua R, Carter G, Hughes D, Gow J, Farr C, Oscier D, McCormick F, Jacobs A (1988) RAS mutations in myelodysplasia detected by amplification, oligonucleotide hybridization, and transformation. *Leukemia* **2**: 503–10
- Padua R, Guinn B, Al-Sabah A, Smith M, Taylor C, Pettersson T, Ridge S, Carter G, White D, Oscier D, Chevret S, West R (1998) RAS, FMS and p53 mutations and poor clinical outcome in myelodysplasias: a 10-year follow-up. *Leukemia* **12**: 887–92 
- Pagliari L, Felding J, Audouze K, Nielsen SJ, Terry RB, Krog-Jensen C, Butcher S (2004) Emerging classes of protein-protein interaction inhibitors and new tools for their development. *Curr Opin Chem Biol* **8**: 442–9  
- Papadopoulos P, Ridge S, Boucher C, Stocking C, Wiedemann L (1995) The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL. *Cancer Res* **55**: 34–8
- Parker F, Maurier F, Delumeau I, Duchesne M, Faucher D, Debussche L, Dugue A, Schweighofer F, Tocqué B (1996) A Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein *Mol Cell Biol* **16**: 2561–9. 
- Parker R, Varmus H, Bishop J (1981) Cellular homologue (c-src) of the transforming gene of Rous sarcoma virus: isolation, mapping, and transcriptional analysis of c-src and flanking regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 5842–6 
- Parkin D, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2001) Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* **94**: 153–6 
- Pearlman D, Case D, Caldwell J, Ross W, Cheatham T, DeBolt S, Ferguson D, Seibel G, Kollman P (1995) AMBER, a computer program for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to elucidate the structures and energies of molecules. *Comp Phys Commun* **91**: 1–41 
- Pellecchia M, Sem DS, Wüthrich K (2002) NMR in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **1**: 211–9
- Perrin M (1926) Polarisation de la lumière de fluorescence. vie moyenne des molécules dans l'état excité. *J Phys Radium* **7**: 390
- Persson D, Thorén PEG, Lincoln P, Nordén B (2004) Vesicle membrane interactions of penetratin analogues. *Biochemistry* **43**: 11045–55  
- Pires JR, Hong X, Brockmann C, Volkmer-Engert R, Schneider-Mergener J, Oschkinat H, Erdmann R (2003) The ScPex13p SH3 domain exposes two distinct binding sites for Pex5p and Pex14p *J Mol Biol* **326**: 1427–35 
- Pisabarro M, Serrano L (1996) Rational design of specific high-affinity peptide ligands for the Abl-SH3 domain. *Biochemistry* **35**: 10634–40  
- Pisabarro M, Serrano L, Wilmanns M (1998) Crystal structure of the abl-SH3 domain complexed with a designed high-affinity peptide ligand: implications for SH3-ligand interactions. *J Mol Biol* **281**: 513–21 
- Politou AS, Millevoi S, Gautel M, Kolmerer B, Pastore A (1998) SH3 in muscles: solution structure of the SH3 domain from nebulin *J Mol Biol* **276**: 189–202 
- Pomerance M, Thang MN, Tocqué B, Pierre M (1996) The Ras-GTPase-activating protein SH3 domain is required for Cdc2 activation and mos induction by oncogenic Ras in *Xenopus* oocytes independently of mitogen-activated protein kinase activation *Mol Cell Biol* **16**: 3179–86. 

- Ponder J, Elson E (2004) Fluctuation Spectroscopy Course notes
- Prestegard J (2004) Protein folding, amide exchange rates in *BCMB / CHEM 8190 Biomolecular NMR Course Notes* University of Georgia
- Promega (2000) *CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System* Madison, WI, USA
- Pursglove SE, Mulhern TD, Mackay JP, Hinds MG, Booker GW (2002) The solution structure and intramolecular associations of the Tec kinase SRC homology 3 domain. *J Biol Chem* **277**: 755–62  
- Rangarajan A, Weinberg RA (2003) Opinion: Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nat Rev Cancer* **3**: 952–9  
- Renzoni D, Pugh D, Siligardi G, Das P, Morton C, Rossi C, Waterfield M, Campbell I, Ladbury J (1996) Structural and thermodynamic characterization of the interaction of the SH3 domain from Fyn with the proline-rich binding site on the p85 subunit of PI3-kinase. *Biochemistry* **35**: 15646–53  
- Reuter C, Morgan M, Bergmann L (2000) Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood* **96**: 1655–69  
- Rickles RJ, Botfield MC, Zhou XM, Henry PA, Brugge JS, Zoller MJ (1995) Phage display selection of ligand residues important for Src homology 3 domain binding specificity *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 10909–13  
- Roberts KD, Lambert JN, Ede NJ, Bray AM (1998) Efficient synthesis of thioether-based cyclic peptide libraries *Tetrahedron Letters* **39**: 8357–8360  
- Romero F, Dargemont C, Pozo F, Reeves W, Camonis J, Gisselbrecht S, Fischer S (1996) p95vav associates with the nuclear protein Ku-70. *Mol Cell Biol* **16**: 37–44  
- Ross JS, Schenkein DP, Pietrusko R, Rolfe M, Linette GP, Stec J, Stagliano NE, Ginsburg GS, Symmans WF, Puztai L, Hortobagyi GN (2004) Targeted therapies for cancer 2004. *Am J Clin Pathol* **122**: 598–609  
- Rowinsky EK (2004) Targeting the molecular target of rapamycin (mTOR). *Curr Opin Oncol* **16**: 564–75
- Rubio I, Downward J (2001) Ras activation revisited *Signal Transduction* **1**: 11–24  
- Rudin C, Holmlund J, Fleming G, Mani S, Stadler W, Schumm P, Monia B, Johnston J, Geary R, Yu R, Kwoh T, Dorr F, Ratain M (2001) Phase I Trial of ISIS 5132, an antisense oligonucleotide inhibitor of c-raf-1, administered by 24-hour weekly infusion to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* **7**: 1214–20  
- Russell M, Lange-Carter C, Johnson G (1995) Direct interaction between Ras and the kinase domain of mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MEKK1). *J Biol Chem* **270**: 11757–60  
- Salmon S, Hamburger A, Soehnlen B, Durie B, Alberts D, Moon T (1978) Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. *N Engl J Med* **298**: 1321–7
- Samson J, Garbay C (2004) Conception d'inhibiteurs du domaine SH3 de RasGAP à visée antitumorale (communication orale) in *XVI^e Colloque Annuel de l'IFSBM : Nouvelles Thérapeutiques Ciblées*
- Samson J, Garbay C, Colas P (2005) Conception d'inhibiteurs du domaine SH3 de la protéine RasGAP à activité antitumorale potentielle (communication orale) in *3^e Forum de l'IFR 71 Sciences du Médicament*
- Sansal I, Sellers WR (2004) The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* **22**: 2954–63  
- Sausville EA (2004) Aurora kinases dawn as cancer drug targets *Nat Med* **10**: 234–5  
- Sawyers C (2004) Targeted cancer therapy. *Nature* **432**: 294–7  
- Sawyers C, Denny C (1994) Chronic myelomonocytic leukemia: Tel-a-kinase what Ets all about. *Cell* **77**: 171–3
- Sawyers CL (2002) Imatinib GIST keeps finding new indications: successful treatment of dermatofibrosarcoma protuberans by targeted inhibition of the platelet-derived growth factor receptor. *J Clin Oncol* **20**: 3568–9  

- Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmuller L, Lautwein A, Schmitz F, Wittinghofer A (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants *Science* **277**: 333–8. 
- Schiffman MH, Castle P (2003) Epidemiologic studies of a necessary causal risk factor: human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **95**: E2
- Schlessinger J (1993) How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci* **18**: 273–5
- Schmidt S, Diriong S, Mery J, Fabbrizio E, Debant A (2002) Identification of the first Rho-GEF inhibitor, TRIPalpha, which targets the RhoA-specific GEF domain of Trio *FEBS Lett* **523**: 35–42 
- Schmitz A, Govek E, Böttner B, Aelst LV (2000) Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res* **261**: 1–12 
- Schroy P, Brown-Shimer S, Kim K, Johnson K, Murnane M, Yang S, O'Brien M, Carney W, Kupchik H (1995) Detection of p21ras mutations in colorectal adenomas and carcinomas by enzyme-linked immunosorbent assay. *Cancer* **76**: 201–9
- Schumacher T, Mayr L, Minor D, Milhollen M, Burgess M, Kim P (1996) Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display. *Science* **271**: 1854–7
- Schwille P, Haupts U, Maiti S, Webb W (1999) Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation. *Biophys J* **77**: 2251–65 
- Sebolt-Leopold JS, Herrera R (2004) Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* **4**: 937–47 
- Seitz O, Kunz H (1995) A novel allylic anchor for solid-phase synthesis - synthesis of protected and unprotected O-glycosylated mucin-type glycopeptides *Angew Chem Int Ed* **34**: 803–805
- Sen S, Zhou H, White RA (1997) A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines *Oncogene* **14**: 2195–200 
- Senderowicz AM (2003) Small-molecule cyclin-dependent kinase modulators. *Oncogene* **22**: 6609–20 
- Shakespeare W, Yang M, Bohacek R, Cerasoli F, Stebbins K, Sundaramoorthi R, Azimioara M, Vu C, Pradeepan S, Metcalf C, Haraldson C, Merry T, Dalgarno D, Narula S, Hatada M, Lu X, van Schravendijk M, Adams S, Violette S, Smith J, Guan W, Bartlett C, Herson J, Iulucci J, Weigle M, Sawyer T (2000) Structure-based design of an osteoclast-selective, nonpeptide src homology 2 inhibitor with in vivo antiresorptive activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9373–8 
- Shangary S, Johnson DE (2002) Peptides derived from BH3 domains of Bcl-2 family members: a comparative analysis of inhibition of Bcl-2, Bcl-x(L) and Bax oligomerization, induction of cytochrome c release, and activation of cell death. *Biochemistry* **41**: 9485–95 
- Shannon K, O'Connell P, Martin G, Paderanga D, Olson K, Dinndorf P, McCormick F (1994) Loss of the normal NF1 allele from the bone marrow of children with type 1 neurofibromatosis and malignant myeloid disorders. *N Engl J Med* **330**: 597–601
- Shevelyov Y (1993) Aurora, a non-mobile retrotransposon in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Mol Gen Genet* **239**: 205–8
- Shibata K, Suzawa T, Soga S, Mizukami T, Yamada K, Hanai N, Yamasaki M (2003) Improvement of biological activity and proteolytic stability of peptides by coupling with a cyclic peptide. *Bioorg Med Chem Lett* **13**: 2583–6 
- Side L, Taylor B, Cayouette M, Conner E, Thompson P, Luce M, Shannon K (1997) Homozygous inactivation of the NF1 gene in bone marrow cells from children with neurofibromatosis type 1 and malignant myeloid disorders. *N Engl J Med* **336**: 1713–20 
- Sidhu SS, Fairbrother WJ, Deshayes K (2003) Exploring protein-protein interactions with phage display. *ChemBiochem* **4**: 14–25 
- Sigrist CJA, Cerutti L, Hulo N, Gattiker A, Falquet L, Pagni M, Bairoch A, Bucher P (2002) PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinform* **3**: 265–74

- Smith C, Luo J, Hunter J, Ordonez J, Aurelian L (1994) The transmembrane domain of the large subunit of HSV-2 ribonucleotide reductase (ICP10) is required for protein kinase activity and transformation-related signaling pathways that result in ras activation. *Virology* **200**: 598–612
- Smith CC, Nelson J, Aurelian L, Gober M, Goswami BB (2000) Ras-GAP binding and phosphorylation by herpes simplex virus type 2 RR1 PK (ICP10) and activation of the Ras/MEK/MAPK mitogenic pathway are required for timely onset of virus growth *J Virol* **74**: 10417–29. 
- Smith J, Freije D, Carpten J, Grönberg H, Xu J, Isaacs S, Brownstein M, Bova G, Guo H, Bujnovszky P, Nusskern D, Damber J, Bergh A, Emanuelsson M, Kallioniemi O, Walker-Daniels J, Bailey-Wilson J, Beaty T, Meyers D, Walsh P, Collins F, Trent J, Isaacs W (1996) Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* **274**: 1371–4
- Squatrito R, Connor J, Buller R (1995) Comparison of a novel redox dye cell growth assay to the ATP bioluminescence assay. *Gynecol Oncol* **58**: 101–5 
- Stich I, Car R, Parrinello M, Baroni S (1989) Conjugate gradient minimization of the energy functional: A new method for electronic structure calculation. *Phys Rev B Cond Matter* **39**: 4997–5004 
- Stiller C, Chessells J, Fitchett M (1994) Neurofibromatosis and childhood leukaemia/lymphoma: a population-based UKCCSG study. *Br J Cancer* **70**: 969–72
- Stites WE (1997) Protein-protein interactions: Interface structure, binding thermodynamics, and mutational analysis *Chem Rev* **97**: 1233–50  
- Stoicov C, Safari R, Cai X, Hasyagar C, Houghton J (2004) Molecular biology of gastric cancer: Helicobacter infection and gastric adenocarcinoma: bacterial and host factors responsible for altered growth signaling. *Gene* **341**: 1–17  
- Storz P, Toker A (2002) 3'-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) in PI 3-kinase signaling. *Front Biosci* **7**: d886–902 
- Sudol M, Bork P, Einbond A, Kastury K, Druck T, Negrini M, Huebner K, Lehman D (1995) Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain. *J Biol Chem* **270**: 14733–41 
- Susva M, Missbach M, Green J (2000) Src inhibitors: drugs for the treatment of osteoporosis, cancer or both? *Trends Pharmacol Sci* **21**: 489–95 
- Tam JP, Wu CR, Liu W, Zhang JW (1991) Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. scope and applications *J Am Chem Soc* **113**: 6657–62 
- Tanaka K, Takechi M, Asaoku H, Dohy H, Kamada N (1992) A high frequency of N-RAS oncogene mutations in multiple myeloma. *Int J Hematol* **56**: 119–27
- Taparowsky E, Shimizu K, Goldfarb M, Wigler M (1983) Structure and activation of the human N-ras gene. *Cell* **34**: 581–6
- Tavares G, Panepucci E, Brunger A (2001) Structural characterization of the intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. *Mol Cell* **8**: 1313–25 
- The I, Murthy A, Hannigan G, Jacoby L, Menon A, Gusella J, Bernards A (1993) Neurofibromatosis type 1 gene mutations in neuroblastoma. *Nat Genet* **3**: 62–6 
- The Multinational Coordinated Arabidopsis 2010 Project (2000) A blueprint for understanding how plants are built and how to improve them in *Functional Genomics and the Virtual Plant* The Salk Institute for Biological Studies
- Tickle I, Sharff A, Vinković M, Yon J, Jhoti H (2004) High-throughput protein crystallography and drug discovery *Chem Soc Rev* **33**: 558–565 
- Tisné C, Dardel F (2002) Optimisation of a peptide library for screening specific RNA ligands by flow-injection NMR. *Comb Chem High Throughput Screen* **5**: 523–9
- Tobal K, Pagliuca A, Bhatt B, Bailey N, Layton D, Mufti G (1990) Mutation of the human FMS gene (M-CSF receptor) in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Leukemia* **4**: 486–9

- Tocqué B, Delumeau I, Parker F, Maurier F, Multon MC, Schweighoffer F (1997) Ras-GTPase activating protein (GAP): a putative effector for Ras *Cell Signal* **9**: 153–8
- Toogood PL (2002) Inhibition of protein-protein association by small molecules: approaches and progress. *J Med Chem* **45**: 1543–58
- Tortola S, Marcuello E, González I, Reyes G, Arribas R, Aiza G, Sancho F, Peinado M, Capella G (1999) p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol* **17**: 1375–81
- Tourrière H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, Bertrand E, Tazi J (2003) The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol* **160**: 823–31
- Tourrière H, Gallouzi I, Chebli K, Capony J, Mouaikel J, van der Geer P, Tazi J (2001) RasGAP-associated endoribonuclease G3BP: selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization. *Mol Cell Biol* **21**: 7747–60
- Trahey M, McCormick F (1987) A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* **238**: 542–5
- Tschumper G, Carbon J (1983) Copy number control by a yeast centromere. *Gene* **23**: 221–32
- Tsubouchi A, Sakakura J, Yagi R, Mazaki Y, Schaefer E, Yano H, Sabe H (2002) Localized suppression of RhoA activity by Tyr31/118-phosphorylated paxillin in cell adhesion and migration. *J Cell Biol* **159**: 673–83
- Tzeng S, Lou Y, Pai M, Jain M, Cheng J (2000) Solution structure of the human BTK SH3 domain complexed with a proline-rich peptide from p120cbl. *J Biomol NMR* **16**: 303–12
- van der Geer P, Henkemeyer M, Jacks T, Pawson T (1997) Aberrant Ras regulation and reduced p190 tyrosine phosphorylation in cells lacking p120-Gap *Mol Cell Biol* **17**: 1840–7
- Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA (2004) In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **303**: 844–8
- Venter JC (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304–51
- Ventura S, Vega MC, Lacroix E, Angrand I, Spagnolo L, Serrano L (2002) Conformational strain in the hydrophobic core and its implications for protein folding and design. *Nat Struct Biol* **9**: 485–93
- Vidal M, Gigoux V, Garbay C (2001) SH2 and SH3 domains as targets for anti-proliferative agents *Crit Rev Oncol Hematol* **40**: 175–86
- Vidal M, Goudreau N, Cornille F, Cussac D, Gincel E, Garbay C (1999) Molecular and cellular analysis of Grb2 SH3 domain mutants: interaction with Sos and dynamin *J Mol Biol* **290**: 717–30
- Vidal M, Liu WQ, Lenoir C, Salzmann J, Gresh N, Garbay C (2004) Design of peptoid analogue dimers and measure of their affinity for Grb2 SH3 domains. *Biochemistry* **43**: 7336–44
- Vidal M, Montiel JL, Cussac D, Cornille F, Duchesne M, Parker F, Tocqué B, Roques BP, Garbay C (1998) Differential interactions of the growth factor receptor-bound protein 2 N-SH3 domain with son of sevenless and dynamin. Potential role in the Ras-dependent signaling pathway *J Biol Chem* **273**: 5343–8
- Viguera A, Arrondo J, Musacchio A, Saraste M, Serrano L (1994) Characterization of the interaction of natural proline-rich peptides with five different SH3 domains. *Biochemistry* **33**: 10925–33
- Viguera AR, Vega C, Serrano L (2002) Unspecific hydrophobic stabilization of folding transition states. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 5349–54
- Vigushin D, Coombes R (2004) Targeted histone deacetylase inhibition for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* **4**: 205–18
- Vogelstein B, Civin C, Preisinger A, Krischer J, Steuber P, Ravindranath Y, Weinstein H, Elfe-rich P, Bos J (1990) RAS gene mutations in childhood acute myeloid leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Genes Chromosomes Cancer* **2**: 159–62

- Vogelstein B, Kinzler K (1992) p53 function and dysfunction. *Cell* **70**: 523–6
- Vojtek A, Der C (1998) Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* **273**: 19925–8 
- Vojtek A, Hollenberg S, Cooper J (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**: 205–14
- Waggott W, Lo Y, Bastard C, Gatter K, Leroux D, Mason D, Boulwood J, Wainscoat J (1995) Detection of NPM-ALK DNA rearrangement in CD30 positive anaplastic large cell lymphoma. *Br J Haematol* **89**: 905–7
- Waksman G, Kominos D, Robertson S, Pant N, Baltimore D, Birge R, Cowburn D, Hanafusa H, Mayer B, Overduin M (1992) Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature* **358**: 646–53 
- Walensky LD, Kung AL, Escher I, Malia TJ, Barbuto S, Wright RD, Wagner G, Verdine GL, Korsmeyer SJ (2004) Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science* **305**: 1466–70  
- Wallace A, Laskowski R, Thornton J (1995) LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng* **8**: 127–34
- Warne P, Viciano P, Downward J (1993) Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* **364**: 352–5 
- Weissbach L, Settleman J, Kalady M, Snijders A, Murthy A, Yan Y, Bernards A (1994) Identification of a human rasGAP-related protein containing calmodulin-binding motifs. *J Biol Chem* **269**: 20517–21
- Wen L, Madani K, Martin G, Rosen G (1998) Proteolytic cleavage of ras GTPase-activating protein during apoptosis. *Cell Death Differ* **5**: 729–34  
- Weng Z, Rickles R, Feng S, Richard S, Shaw A, Schreiber S, Brugge J (1995) Structure-function analysis of SH3 domains: SH3 binding specificity altered by single amino acid substitutions. *Mol Cell Biol* **15**: 5627–34 
- White P, Dörner B, Steinauer R (eds.) (2002) *2002/3 Catalog* chapter Synthesis Notes, p. 4.15 Novabiochem
- Widmann C, Gibson S, Johnson G (1998) Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem* **273**: 7141–7 
- Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, Jain RK (2004) Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. *Nat Med* **10**: 145–7  
- Williams L (1992) Missing links between receptors and ras. *Curr Biol* **2**: 601–3 
- Wittekind M, Mapelli C, Farmer B, Suen K, Goldfarb V, Tsao J, Lavoie T, Barbacid M, Meyers C, Mueller L (1994) Orientation of peptide fragments from Sos proteins bound to the N-terminal SH3 domain of Grb2 determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **33**: 13531–9 
- Wittekind M, Mapelli C, Lee V, Goldfarb V, Friedrichs MS, Meyers CA, Mueller L (1997) Solution structure of the Grb2 N-terminal SH3 domain complexed with a ten-residue peptide derived from SOS: direct refinement against NOEs, J-couplings and 1H and 13C chemical shifts *J Mol Biol* **267**: 933–52 
- Wood J, Bold G, Buchdunger E, Cozens R, Ferrari S, Frei J, Hofmann F, Mestan J, Mett H, O'Reilly T, Persohn E, Rösel J, Schnell C, Stover D, Theuer A, Towbin H, Wenger F, Woods-Cook K, Menrad A, Siemeister G, Schirner M, Thierauch K, Schneider M, Dreves J, Martiny-Baron G, Totzke F (2000) PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res* **60**: 2178–89 
- Wu X, Knudsen B, Feller S, Zheng J, Sali A, Cowburn D, Hanafusa H, Kuriyan J (1995) Structural basis for the specific interaction of lysine-containing proline-rich peptides with the

- N-terminal SH3 domain of c-Crk. *Structure* **3**: 215–26 
- Xiao T, Gardner KH, Sprang SR (2002) Cosolvent-induced transformation of a death domain tertiary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 11151–6  
- Xu CW, Luo Z (2002) Inactivation of Ras function by allele-specific peptide aptamers. *Oncogene* **21**: 5753–7  
- Xu CW, Mendelsohn AR, Brent R (1997) Cells that register logical relationships among proteins *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 12473–8 
- Xu G, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R (1990) The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* **62**: 599–608
- Yanagisawa A, Ohtake K, Ohashi K, Hori M, Kitagawa T, Sugano H, Kato Y (1993) Frequent c-Ki-ras oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res* **53**: 953–6
- Yang JY, Michod D, Walicki J, Widmann C (2004) Surviving the kiss of death. *Biochem Pharmacol* **68**: 1027–31  
- Yang JY, Widmann C (2001) Antiapoptotic signaling generated by caspase-induced cleavage of RasGAP *Mol Cell Biol* **21**: 5346–58. 
- Yang JY, Widmann C (2002a) The RasGAP N-terminal fragment generated by caspase cleavage protects cells in a Ras/PI3K/Akt-dependent manner that does not rely on NFκB activation *J Biol Chem* **14**: 14 
- Yang JY, Widmann C (2002b) A subset of caspase substrates functions as the Jekyll and Hyde of apoptosis. *Eur Cytokine Netw* **13**: 404–6
- Yang T, Zhang J, Massa S, Han X, Longo F (1999) Leukocyte common antigen-related tyrosine phosphatase receptor: increased expression and neuronal-type splicing in breast cancer cells and tissue. *Mol Carcinog* **25**: 139–49 
- Yang YS, Garbay C, Duchesne M, Cornille F, Julian N, Fromage N, Tocqué B, Roques BP (1994) Solution structure of GAP SH3 domain by 1H NMR and spatial arrangement of essential Ras signaling-involved sequence *Embo J* **13**: 1270–9. 
- Yarden Y (2001) The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* **37 Suppl 4**: S3–8 
- Yatani A, Okabe K, Polakis P, Halenbeck R, McCormick F, Brown A (1990) ras p21 and GAP inhibit coupling of muscarinic receptors to atrial K⁺ channels. *Cell* **61**: 769–76
- Yeo EJ, Chun YS, Park JW (2004) New anticancer strategies targeting HIF-1. *Biochem Pharmacol* **68**: 1061–9  
- Yu H, Chen J, Feng S, Dalgarno D, Brauer A, Schreiber S (1994) Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* **76**: 933–45
- Yu H, Rosen M, hreiber S (1993) 1H and 15N assignments and secondary structure of the Src SH3 domain. *FEBS Lett* **324**: 87–92 
- Yu K, Toral-Barza L, Discafani C, Zhang W, Skotnicki J, Frost P, Gibbons J (2001) mTOR, a novel target in breast cancer: the effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **8**: 249–58 
- Zarrinpar A, Bhattacharyya RP, Lim WA (2003) The structure and function of proline recognition domains. *Sci STKE* **2003**: RE8  
- Zeng J, Treutlein H (1999) A method for computational combinatorial peptide design of inhibitors of Ras protein. *Protein Eng* **12**: 457–68 
- Zhang JY (2002) Apoptosis-based anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* **1**: 101–2 
- Zhang Y, Zhang G, Mollat P, Carles C, Riva M, Frobert Y, Malassiné A, Rostène W, Thang D, Belchev B (1993) Purification, characterization, and cellular localization of the 100-kDa human placental GTPase-activating protein. *J Biol Chem* **268**: 18875–81 
- Zhao Y, Brown T, Kohler H, Müller S (2003) MTS-conjugated-antiactive caspase 3 antibodies inhibit actinomycin D-induced apoptosis. *Apoptosis* **8**: 631–7  

Zou X, Calame K (1999) Signaling pathways activated by oncogenic forms of Abl tyrosine kinase. *J Biol Chem* **274**: 18141-4 

(531 références)

Table des figures

1.1	Causes de mortalité en Europe	24
1.2	Mortalité en France en 1999 par classes d'âges, en pourcentages.	25
1.3	Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs	29
1.4	Imatinib inséré dans le site ATP de la kinase Abl	36
1.5	Prévisions de ventes des nouvelles classes de médicaments anti-cancéreux	40
2.1	Modèle simplifié de signalisation	44
2.2	Différentes modalités de signalisation intercellulaire	45
2.3	La voie de signalisation impliquant la protéine Bad	51
2.4	La superfamille des petites GTPases Ras	53
2.5	Les différentes protéines de la famille Ras	54
2.6	Les différentes modifications post-traductionnelles de Ras	54
2.7	Le cycle d'activation / inactivation de Ras	55
2.8	Structure du complexe Ras/RasGAP	56
2.9	Ras GDP/GTP	56
2.10	La voie de signalisation activée par la fixation de l'EGF sur EGF-R.	58
2.11	Voies de signalisation amorcées par les différents effecteurs de Ras	59
3.1	Alignement des domaines SH3 de différentes protéines	65
3.2	Le domaine SH3 de RasGAP	66
3.3	Structure schématique des hélices polyprolines de type II	67
3.4	Le domaine SH3 N-terminal de Grb2 complexé par le peptide VPPPVPPIRRR	68
3.5	UCS15A : inhibiteur de l'interaction Sam68/Src	70
3.6	L'importance de la N-substitution des peptides riches en Prolines	71
3.7	Inhibiteurs du domaine SH3 de Src	71
4.1	Les différents domaines composant la protéine RasGAP	73
4.2	Alignement des séquences des domaines GAP identifiés chez l'homme	76
4.3	Modèles décrivant les conditions de l'accessibilité de RasGAP- SH3	80
4.4	Clivage de RasGAP par les Caspases en deux positions	82
4.5	Comparaison entre les structures des domaines SH3 de RasGAP et Grb2	84
4.6	Le domaine SH3 de RasGAP	85
4.7	Structure secondaire du domaine SH3 de RasGAP	85
4.8	Poche hydrophobe sur le domaine SH3 de RasGAP	86
4.9	Séquence de la protéine G3BP.	87
4.10	La famille des protéines Aurora	89
4.11	Localisation des protéines Aurora au cours du cycle cellulaire	90
4.12	Structures cristallographiques du domaine kinase d'Aurora-A	91
4.13	Inhibiteurs des kinases Aurora	92
5.1	Principe du criblage en double hybride d'aptamères peptidiques	100

5.2	Vecteur d'expression des appâts pEG-202	103
5.3	Vecteurs pJG4-5 et pSH18-34	103
5.4	Tests d'autoactivation en cellules haploïdes	106
5.5	Tests d'autoactivation en cellules diploïdes	107
5.6	Principe de l'expérience de validation de la fonctionnalité de l'appât	108
5.7	Validation de l'appât pEG202- SH3 contre pActII-Aurora	110
5.8	Le biais introduit par l'utilisation d'oligonucléotides dégénérés	111
5.9	Vecteur d'expression de la banque pJM-1	112
5.10	Séquence de la Thioredoxin native TrxA et recodée TrxR	113
5.11	Vérification du phénotype double hybride après récupération de clones positifs	115
5.12	Dépôt des produits de PCR obtenus à partir des aptamères isolés au cours du crible	116
5.13	Reconstitution des aptamères pour reconfirmation par recombinaison homologue	117
5.14	Reconfirmation des aptamères obtenus dans le premier crible	118
5.15	Première vérification de la spécificité des aptamères 618, 825 et 831	119
5.16	Séquences des aptamères issus de la banque de première génération	121
5.17	Séquences des aptamères obtenus lors du second crible	123
5.18	Alignement de la région variable de RG 01 et d'une partie de l'isoforme 3 de Livine.	124
5.19	Comparaison des distributions théoriques et observées des compositions en acides aminés des régions variables	124
5.20	Alignements de séquences d'aptamères	125
5.21	Vérification de la spécificité de l'interaction des différents aptamères obtenus vis à vis de différents appâts	127
5.22	Sites de mutagenèse	130
5.23	Analyse par mutagenèse ponctuelle du domaine SH3 de RasGAP des sites de reconnaissance des différents aptamères obtenus	131
5.24	Analyse des profils d'interaction des aptamères sélectionnés contre le domaine SH3	132
5.25	<i>Clusters</i> 2 et 7	133
6.1	Vecteurs d'expression bactérienne	136
6.2	Production d'aptamères en fusion avec la GST	137
6.3	Pull-down de SH3 purifié par des aptamères fusionnés à GST	137
6.4	Pull-down de RasGAP par des aptamères taggés GST	138
6.5	Réduction de la resazurin en resorufin	139
6.6	Résultats du test de viabilité cellulaire	140
6.7	Réduction de la capacité à former des colonies liée à l'expression d'aptamères	142
6.8	Principe du système et vecteurs pour le double hybride en cellules de mammifère	144
6.9	Résultats du test d'interaction double-hybride en cellules de mammifères	144
7.1	Thioredoxine native et avec une boucle de 16 acides aminés insérée dans le site actif	151
7.2	Synthèse peptidique en phase solide du peptide JS08	152
7.3	Pont disulfure entre deux cystéines	154
7.4	Deux types de cyclisations du peptide RG 01	154
7.5	Suivi UV de la synthèse du peptide JS 37	156
7.6	<i>Capping</i> des amines non protégées par l'anhydride acétique	156
7.7	Suivi HPLC de la cyclisation du peptide issu de la région variable de RG27	159
7.8	Cyclisation par formation d'un pont thioéther du peptide issu de l'aptamère RG 27	160
8.1	Vérification de l'expression de RasGAP- SH3	162
8.2	Purification de RasGAP- SH3	163
8.3	Principe de l'expérience de polarisation de fluorescence	163
8.4	Dispositif de mesure de la polarisation de fluorescence	164
8.5	Différents analogues de la florescéine	166
8.6	Interaction SH3 / peptides issus de RG27	167

8.7	Compétition de l'interaction du peptide JS 21 avec le domaine SH3 de RasGAP, par le peptide JS 15	168
8.8	Principe de la spectroscopie par corrélation de fluorescence	171
8.9	Autocorrélation de fluorescence lors de la fixation de JS 21 sur RasGAP-SH3	171
9.1	Séquence HSQC $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ classique	174
9.2	Spectres HSQC $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ du domaine SH3 de RasGAP, en présence ou non de peptides issus de régions variables d'aptamères	176
9.3	Détails de la figure 9.2	177
9.4	Modifications du spectre HSQC de RasGAP- SH3 en présence de peptides	178
9.5	Détail de la figure 9.6, montrant la nette disparition du pic correspondant au couple N-H de V ₁₉	180
9.6	Spectres HSQC du domaine SH3 seul (noir) et en présence du peptide SP10 (rouge).	181
9.7	Empreinte du peptide SP10 sur le domaine SH3 de RasGAP	182
9.8	Déplacements des raies du spectre HSQC de RasGAP- SH3 suite à la fixation de SP10	184
9.9	Détail du site de fixation du peptide SP10 sur le domaine SH3 de RasGAP.	185
9.10	Exemples de conformations obtenues par modélisation moléculaire	186
9.11	Structure du peptide SP10 docké sur le domaine SH3 de RasGAP	187
9.12	Comparaison entre les structures modélisées des peptides SP10 et SP10L12K	189
A.1	Complexe Aurora/RasGAP dans cellules COS	222
A.2	Pull-down de RasGAP par son domaine SH2	223
A.3	Compétition de l'interaction de RasGAP avec les billes couplées au peptide issu de p62dok par ce peptide en solution	223
B.1	Principales protections utilisées pour la synthèse peptidique en phase solide	228
B.2	Procédures de clivage utilisées, selon la composition du peptide synthétisé (d'après White et al., 2002)	229
C.1	Matrice simplifiée de définition du motif des domaines SH3	239
D.1	Nomenclature des atomes des acides aminés	241
E.1	<i>How to get rich using drug design</i>	286

Liste des tableaux

1	Organismes	15
2	Références OMIM	16
3	Types cellulaires utilisés	17
1.1	Cancer : incidences et taux de mortalités en fonction du niveau de développement	23
1.2	Incidences et taux de mortalité par types de cancer	26
1.3	Principales classes de molécules anti-tumorales	34
1.4	Leaders du marché de l'oncologie, et leurs principaux produits	39
2.1	Les principaux domaines d'interaction protéine/protéine	48
2.2	Critères de définition des effecteurs de Ras	59
2.3	Les différentes modifications de protéines de la voie Ras impliquées dans les cancers sanguins	61
3.1	Affinités de différents peptides riches en prolines pour des domaines SH3	68
3.2	Domaines SH3 non conventionnels et motifs de reconnaissance proposés	70
4.1	Expériences montrant le rôle de RasGAP en tant qu'effecteur de Ras	78
4.2	Les ligands des domaines SH2 de RasGAP	83
4.3	Acides aminés de RasGAP- SH3 potentiellement impliqués dans la reconnaissance de ligands	86
5.1	Longueurs et occurrences des aptamères obtenus à partir de la banque de première génération	120
5.2	Séquences et occurrences des aptamères issus de la banque de seconde génération	122
6.1	Résultats des validations	146
7.1	Peptides linéaires issus de RG01	152
8.1	Caractéristiques de fluorescence de la fluorescéine FITC	166
8.2	Résultats des mesures d'affinité par anisotropie de fluorescence obtenues avec des peptides synthétiques	169
C.1	Domaines SH3 dont la structure a été résolue (Suite page suivante)	235
C.1	Domaines SH3 dont la structure a été résolue (Suite page suivante)	236
C.1	Domaines SH3 dont la structure a été résolue (Suite page suivante)	237
C.1	Domaines SH3 dont la structure a été résolue	238
D.1	...suite page suivante	242
D.1	275-350	243
D.2	279-342 (suite page suivante)	243
D.2	279-342	244
D.3	Attributions $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ du domaine SH3	246

Stratégie

Un beau dessin valant bien un long discours, voici un petit schéma résumant la stratégie que nous avons choisie. Nous sommes actuellement à l'étape 6... Je souhaite bon courage à mes successeurs sur ce sujet.

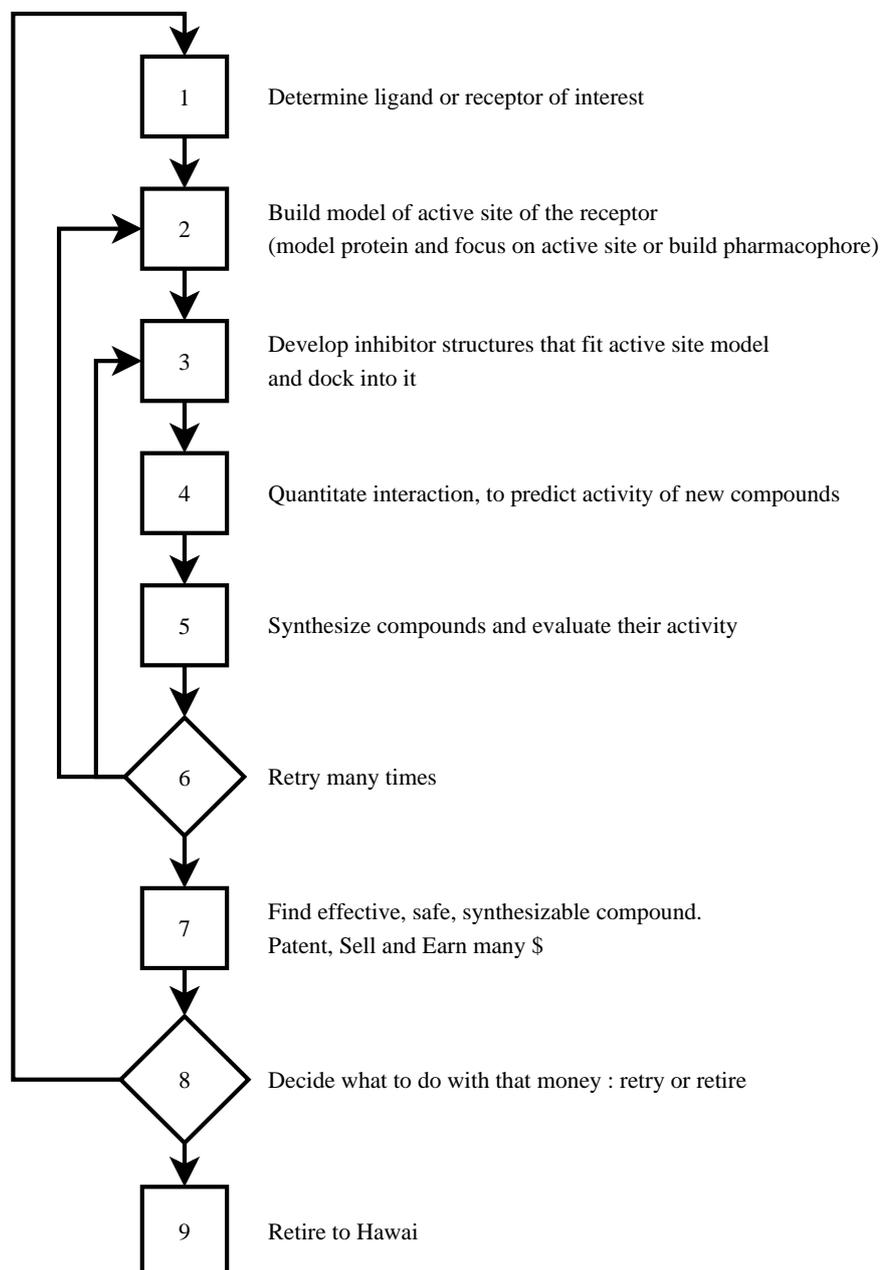


FIG. E.1 – « *How to get rich using drug design* » (d'après « *Guide to Rational (Computer-Aided) Drug Design* », by [Lisa M. Balbes](#), 1992)

Conception d'inhibiteurs du domaine SH3 de la protéine RasGAP à activité anti-tumorale potentielle

Jérôme SAMSON

Laboratoire de Pharmacochimie Moléculaire et Cellulaire
INSERM U648 – CNRS FRE 2718 – Université Paris 5

45 rue des Saints-Pères
75006 Paris

L'objectif de cette thèse consiste à inhiber la voie de signalisation liée aux protéines Ras, très fréquemment impliquée dans les tumeurs humaines, en concevant des inhibiteurs d'interactions protéine-protéine. Au sein de cette voie, la protéine RasGAP joue un rôle particulier, à la fois régulateur négatif et effecteur de Ras.

La cible thérapeutique constituée par le domaine SH3 de la protéine RasGAP avait déjà été identifiée par plusieurs équipes (Tocqué et al., 1997). Plus récemment, notre laboratoire a complété ces travaux par l'identification des protéines Aurora comme partenaires de RasGAP-SH3. En collaboration avec Aptanomics, en mettant en œuvre la technique des aptamères peptidiques, nous avons apporté une nouvelle validation de cette cible : nous avons obtenu par un crible double-hybride de nouvelles protéines synthétiques (aptamères) interagissant spécifiquement avec le domaine SH3 de RasGAP, et dont l'expression dans des cellules tumorales provoque une diminution de la capacité à former des colonies et de la viabilité cellulaire.

Afin d'amorcer une démarche de conception rationnelle d'inhibiteurs de ce SH3, nous avons synthétisé les peptides exposés à la surface de ces aptamères et responsables de leur interaction avec RasGAP-SH3. Nous avons ensuite mesuré l'affinité de ces peptides pour RasGAP-SH3 par anisotropie de fluorescence. Nous avons ainsi obtenu un peptide cyclique dont l'affinité pour le domaine SH3 est de l'ordre de quelques centaines de nanomolaire, et dont nous avons déterminé l'empreinte sur ce domaine enrichi en ¹⁵N par RMN, en nous appuyant sur la structure du domaine, déjà résolue au laboratoire (Yang et al., 1994).

Les données structurales que nous avons obtenues devraient permettre, dans un court délai, de proposer des modifications de ces peptides, afin d'augmenter l'affinité de nos inhibiteurs et de les vectoriser pour leur conférer une activité sur cellules tumorales en culture. Enfin, ces peptides, rendus fluorescents par leur couplage à un fluorophore, vont être utilisés comme ligands de référence dans un crible de chimiothèque à haut débit, afin de découvrir de petites molécules inhibitrices du domaine SH3 de RasGAP.

Design and identification of RasGAP-SH3 domain inhibitors exhibiting potential antitumoral activity

This work aims at the inhibition of the Ras signaling pathway by protein-protein interaction targeted drug design. Within this frequently implicated in human tumors pathway, the RasGAP protein plays two apparently contrary roles, both as a negative regulator and a positive Ras effector.

The SH3 domain of RasGAP has already been identified by independent teams as a relevant therapeutic target (Tocqué et al., 1997). More recently, we have brought a new evidence of this relevance by the identification of Aurora kinases as RasGAP-SH3 binding partners. In the present work in collaboration with Aptanomics, by the use of peptide aptamers, we bring a new validation of this target. Using a yeast two-hybrid screening, we have discovered new synthetic proteins (aptamers) specifically interacting with RasGAP-SH3 domain. Moreover, the expression of these aptamers in tumoral cultured cells leads to antitumoral-like phenotypes : colony forming capacity and cell viability decrease.

This aptamers representing only the first step towards rational design of small molecule inhibitors of RasGAP-SH3, we have then synthesized peptides derived from aptamers variable loops which are responsible for their interaction with the SH3 domain, and evaluated their affinity by fluorescence anisotropy experiments. To date, our best molecule is a sub-micromolar-affinity cyclic peptide. Using ¹⁵N-enriched purified SH3 domain and its previously solved structure (Yang et al., 1994), we have determined by NMR spectroscopy the binding fingerprint of this molecule on our target.

This structural data should lead within a short time to modifications of our peptide inhibitors, in order to increase their affinity, solubility and cell-penetrating capacity. These molecules would then be subjected to *in vitro* and *in vivo* evaluation of their anti-tumoral activity. In the meanwhile, the fluorescently-labeled peptides we have synthesized will be used as reference competitors during fluorescence anisotropy-based chemical libraries screenings. Both rational and screening approach will certainly soon lead to the identification of small molecule-inhibitors of the RasGAP-SH3 domain.

Mots clés • cancer • signalisation cellulaire • interactions protéine-protéine • RasGAP • SH3 • aptamères peptidiques • conception rationnelle • double-hybride

