



Proposition de Stage de Master (M2) Année Universitaire 2022-2023

Développement de peptides macrocycliques dans le but d'inhiber l'interaction LIMKs-cofiline : une nouvelle approche thérapeutique ciblée

Résumé du projet :

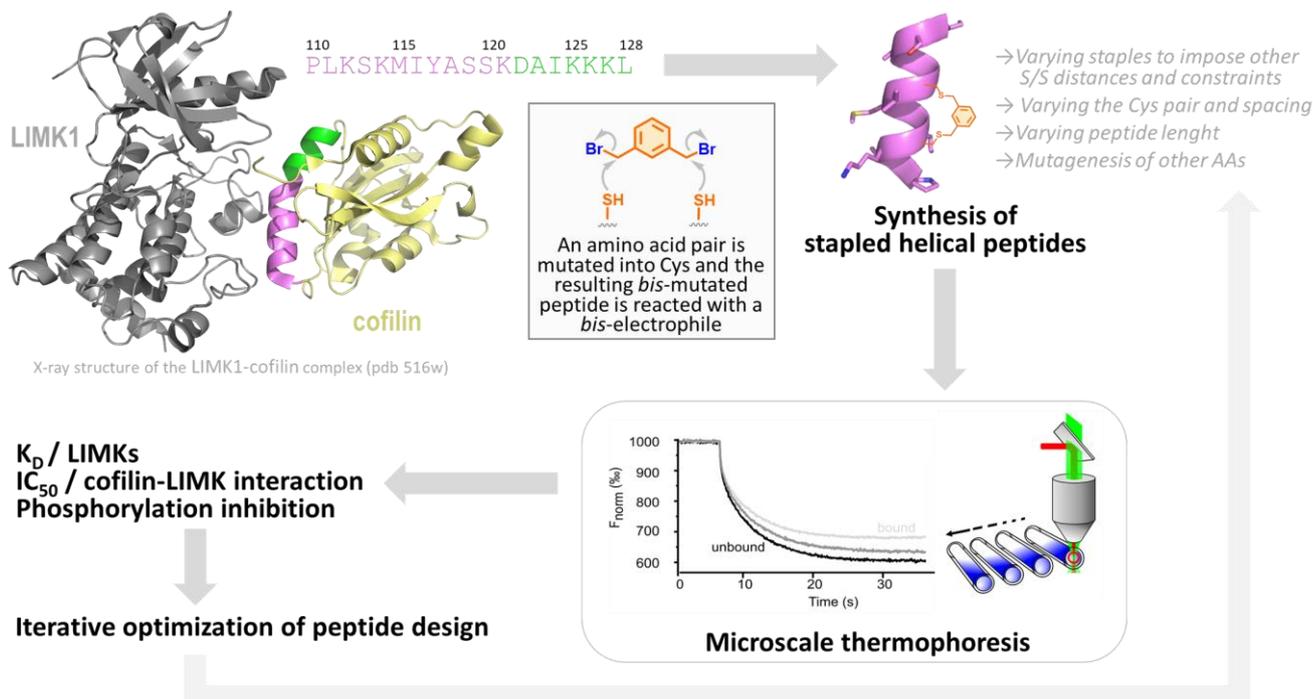
Les LIM kinases, LIMK1 et LIMK2 (LIMKs), jouent un rôle clé dans le remaniement du cytosquelette en régulant le remodelage des filaments d'actine et des microtubules. Ces processus dynamiques sont cruciaux dans de nombreux phénomènes physiologiques mais aussi pathologiques. L'intérêt des LIM kinases comme cibles thérapeutiques est assez récent et lié à la découverte de leur implication dans de nombreuses pathologies (cancer, maladies neurologiques, infections virales, et neurofibromatoses, Manetti et al., 2012). Depuis 2008, de nombreux inhibiteurs de type « petites molécules » ciblant l'activité kinase de ces protéines ont été synthétisés, mais aucune de ces molécules n'a franchi le cap des essais cliniques. Il semble opportun d'envisager une autre approche. Les LIMKs régulent le remaniement des filaments d'actine en phosphorylant et ainsi inhibant la cofiline, un facteur de dépolymérisation de l'actine, unique substrat connu des LIMKs à ce jour. L'interaction entre la cofiline et les LIMKs est totalement atypique (Hamill et al. 2016, Salah et al., 2019) et repose intégralement sur l'interaction spécifique entre une hélice de la cofiline et un sillon des LIMKs.

Dans ce projet, nous voulons développer des peptides macrocycliques mimant cette hélice afin d'inhiber cette interaction atypique entre les LIMKs et la cofiline. Cette approche constituerait une alternative originale et inédite pour développer de nouveaux inhibiteurs des LIMKs extrêmement sélectifs.

En s'appuyant sur le savoir-faire du groupe de Vincent Aucagne (Beltramo et al. 2021), des peptides courts structurés en hélice α grâce à la formation d'un macrocycle entre deux chaînes latérales seront synthétisés (*stapled* peptides, Pelay-Gimeno et al. 2015). Leur séquence sera optimisée grâce aux données structurales du complexe LIMK-cofiline qui a été résolu par cristallographie aux Rayons X (Hamill et al. 2016, Salah et al., 2019). L'activité de ces peptides sera ensuite testée sur l'interaction entre les LIMKs et la cofiline, protéines produites dans le groupe de Béatrice Vallée et Hélène Bénédicti. Cette interaction LIMKs-cofiline +/- *stapled* peptides sera suivie par thermophorèse à microéchelle (MST) dans le groupe de Reine Nehmé et Rouba Nasreddine.

Le programme du stagiaire est divisé en plusieurs étapes qui seront réalisées au CBM dans le groupe de Vincent Aucagne et dans le groupe de Béatrice Vallée, et à l'ICOA sous l'encadrement de Rouba Nasreddine.

1. Synthèse d'une librairie de *stapled* peptides dans le groupe de Vincent Aucagne
2. Production de la cofiline en bactérie, production des LIMKs fusionnées RFP en cellules HEK dans le groupe de Béatrice Vallée
3. Evaluation de l'interaction LIMKs-cofiline en présence des *stapled* peptides synthétisés avec Rouba Nasreddine et détermination des constantes d'affinités K_d
4. Tests fonctionnels *in vitro* de l'inhibition de phosphorylation de la cofiline par les LIMKs par les *stapled* peptides inhibiteurs les plus prometteurs dans le groupe de Béatrice Vallée



Références :

- Beltramo *et al.* (2021). Composés cycliques agonistes du recepteur KISS1R et leurs utilisations thérapeutiques. Demande de brevet FR 2111886 déposée le 9/11/2021.
- Hamill *et al.* (2016). Structural Basis for Noncanonical Substrate Recognition of Cofilin/ADF Proteins by LIM Kinases. *Molecular cell* 62, 397-408.
- Nasreddine, R. et Nehmé, R. (2021). Microscale thermophoresis for studying protein-small molecule affinity: Application to hyaluronidase. *Microchem. J.* 170, 106763.
- Manetti, F. (2012). Recent findings confirm LIM domain kinases as emerging target candidates for cancer therapy. *Current cancer drug targets* 12, 543-560.
- Pelay-Gimeno *et al.* (2015) Structure-based design of inhibitors of protein-protein interactions: mimicking peptide binding epitopes. *Angewandte Chemie Int. Ed.* 54, 8896-8927.
- Salah *et al.* (2019). Lessons from LIMK1 enzymology and their impact on inhibitor design. *The Biochemical journal* 476, 3197-3209.

Laboratoire d'Accueil :

Unité : Centre de Biophysique Moléculaire UPR CNRS 4301

Equipes d'accueil : « Protéines de Synthèse et Chimie Bio-orthogonale » dirigée par Vincent Aucagne, « Signalisation cellulaire et Neurofibromatose » co-dirigée par Béatrice Vallée, « Stratégies Analytiques, Affinités et Bioactifs », ICOA, dirigée par Reine Nehmé

Encadrement : Vincent Aucagne, co-encadrant Béatrice Vallée et Rouba Nasreddine.

Le Centre de Biophysique Moléculaire est une unité propre de recherche du CNRS créée en 1967 pour favoriser la collaboration interdisciplinaire entre biologistes, physiciens et chimistes, dans le but de comprendre la structure, la dynamique et les interactions des biomacromolécules, du niveau atomique jusqu'à la cellule et à l'organisme. Cette approche implique la recherche des mécanismes moléculaires sous-jacents des fonctions biologiques ainsi que des dysfonctionnements déclencheurs du développement de maladies. Les quatre départements qui composent le Centre développent des recherches dans les domaines de la chimie de synthèse, de la chemobiologie, de la biologie structurale, moléculaire et cellulaire, de l'imagerie biomédicale, de l'exobiologie et de la biophysique théorique. La présence d'une large gamme d'instruments scientifiques mi-lourds de pointe est une autre caractéristique importante du Centre.

Candidature :

CV et lettre de motivation à envoyer aux trois adresses suivantes :

vincent.aucagne@cns-orleans.fr ; beatrice.vallee@cns-orleans.fr ; rouba.nasreddine@univ-orleans.fr