

Activation des petites protéines G par leurs facteurs d'échange

Pierre Chardin
Bruno Antonny
Jacqueline Cherfils

Les protéines G sont des commutateurs moléculaires contrôlant de multiples aspects de la vie cellulaire tels que la transduction des signaux. Elles sont présentes alternativement sous forme inactive, liée au GDP, et sous forme active, liée au GTP, leur activation étant contrôlée par des « facteurs d'échange ». La connaissance des structures de ces différents facteurs d'échange et des complexes formés avec leur petite protéine G cible permet de mieux comprendre les mécanismes qui provoquent la sortie du GDP d'une protéine G et son remplacement par le GTP. La flexibilité de deux régions des petites protéines G appelées *switch* joue un rôle essentiel lors de l'échange de nucléotide. La compréhension du mécanisme par lequel la bréfelidine A inhibe l'un des facteurs d'échange suggère que les réarrangements de ces régions pourraient représenter le « talon d'Achille » par lequel de nouvelles molécules permettraient d'inhiber certains de ces facteurs d'échange.

De nombreux processus cellulaires essentiels, tels que la transduction du signal, les réarrangements du cytosquelette et la plupart des mécanismes de transport sont contrôlés par des commutateurs moléculaires : les protéines G. Ces protéines fixent alternativement les nucléotides GDP et GTP et adoptent ainsi deux conformations : une forme de repos, associée au GDP, et une forme active, associée au GTP. Cette dernière peut interagir avec des protéines cibles appelées « effecteurs » et ainsi moduler leur activité. L'activation des protéines G a lieu lors de l'échange du GDP par du GTP. Alors que la dissociation spontanée du GDP *in vitro* et dans un tampon phy-

siologique est très lente (de quelques minutes à plusieurs heures), il existe dans les cellules des « facteurs d'échange », qui provoquent la sortie rapide du GDP, permettant ensuite au GTP de le remplacer [1] (*figure 1*). La structure tridimensionnelle de plusieurs de ces facteurs d'échange a récemment été déterminée, dans certains cas sous forme de complexe avec leur protéine G cible. Ces données représentent une magnifique moisson d'information, qui permettent de comprendre les mécanismes par lesquels les facteurs d'échange déstabilisent le GDP. Celui-ci est associé à la protéine G *via* de multiples liaisons qui vont de la base aux groupements phosphates. Si ces mécanismes s'avèrent semblables dans

ADRESSES

P. Chardin, B. Antonny : Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire, Cnrs, 660, route des Lucioles, 06560 Valbonne, France. J. Cherfils : Laboratoire d'enzymologie et biochimie structurales, Cnrs-UPR 9063, avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France.

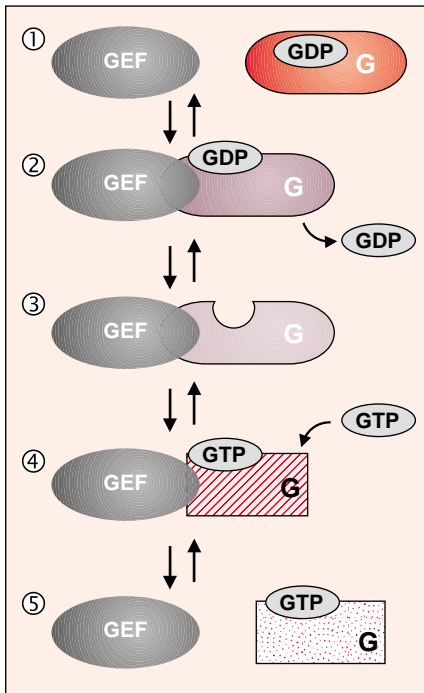


Figure 1. **Les étapes successives de la réaction d'échange.** Les structures cristallines ont démontré que les petites protéines G ont des conformations différentes (symbolisées par des couleurs et des formes différentes) aux étapes 1, 3 et 5, et il est probable que c'est aussi le cas pour les étapes intermédiaires. GEF: guanine nucleotide exchange factor.

leurs grandes lignes pour tous les complexes connus, ils diffèrent considérablement dans leurs détails. Il faut préciser qu'on est loin de connaître la structure des facteurs d'échange de toutes les protéines G décrites dans le *Tableau I*, le grand absent étant un facteur d'échange de protéine G hétérotrimérique. La cristallisation d'un récepteur à 7 hélices transmembranaires pose en effet un problème d'une autre nature que celle des facteurs d'échange solubles. La diversité de structure des facteurs d'échange est étonnante. Ainsi, celle des domaines Sec7 ou Dbl est constituée exclusivement d'hélices α , alors que RCC1 est constitué de 7 feuilletts β en « hélice de bateau » (*figure 2*). Dès lors, aucun argument ne plaide *a priori* pour une conservation du mécanisme catalytique d'accélération de l'échange nucléotidique par ces différents facteurs. Néanmoins, nous allons voir qu'il existe un point commun entre les structures des trois

complexes protéine G/facteur d'échange qui ont été déterminées à ce jour [2-5]. Ces facteurs d'échange interagissent en effet avec les régions « switch » des protéines G, c'est-à-dire avec les régions qui changent de conformation lors de l'échange du GDP par le GTP.

Les régions switch des petites protéines G

Toutes les protéines G comportent un domaine d'environ 160 acides aminés, dont la structure est conservée, qui inclut le site nucléotidique [6]. Comme cela est le cas pour la plupart des protéines qui fixent un nucléotide, un ion Mg^{2+} interagit avec les phosphates de ce dernier et contribue à le stabiliser en formant également des contacts avec certaines chaînes latérales de la protéine. En bordure du site nucléotidique se trouvent deux régions, appelées *switch 1* et *switch 2*, qui présentent la particularité de changer de conformation entre les formes associées au GDP et au GTP. Ces deux régions sont flexibles sous forme GDP et acquièrent une conformation plus stable dans la forme active GTP (*figure 3*). On savait déjà que les deux régions

switch sont essentielles dans l'interaction des protéines G avec leurs partenaires cellulaires. En effet, par définition, l'interaction entre une protéine G et ses effecteurs n'a lieu que lorsque la protéine G est sous forme GTP: ces effecteurs doivent donc reconnaître au moins l'une des deux régions dont la conformation change lors de l'association au GTP. De même, il n'est pas étonnant que les protéines GAP (*GTPase activating protein*), qui contrôlent l'inactivation de la protéine G et catalysent l'hydrolyse du GTP en GDP, interagissent avec les régions *switch*. En effet, la cible des GAP est la forme GTP, dont elles doivent « attaquer » le troisième phosphate, c'est-à-dire la partie du nucléotide la plus proche des régions *switch*. En revanche, il était *a priori* moins évident que les facteurs d'échange eux-mêmes interagissent avec les régions *switch*. Un facteur d'échange doit d'abord reconnaître la protéine sous forme liée au GDP, provoquer la sortie du GDP, former un complexe avec la protéine G vide de nucléotide, pour lui permettre de lier ensuite le GTP (*figure 1*). Ce facteur d'échange doit donc interagir avec la protéine G sous différentes conformations: forme GDP, forme

Familles de protéines G	Fonctions	Facteurs d'échange
Ras	Transduction du signal	Domaines Cdc25 Sos, Ras GRF
Rho	Réarrangements du cytosquelette d'actine	Domaines homologues à Dbl (DH)
Rab	Trafic vésiculaire	Sec2 levure, RabEx5 (?)
Ran	Transport noyau/cytosol	RCC1
Arf	Formation de vésicules/trafic	Domaines Sec7: ARNO, Gea
Protéines G $\alpha\beta\gamma$ hétérotrimériques	Transduction de signaux hormonaux, neuronaux, sensoriels	Récepteurs à 7 hélices transmembranaires
EF-Tu	Élongation de la synthèse protéique sur le ribosome	EF-Ts

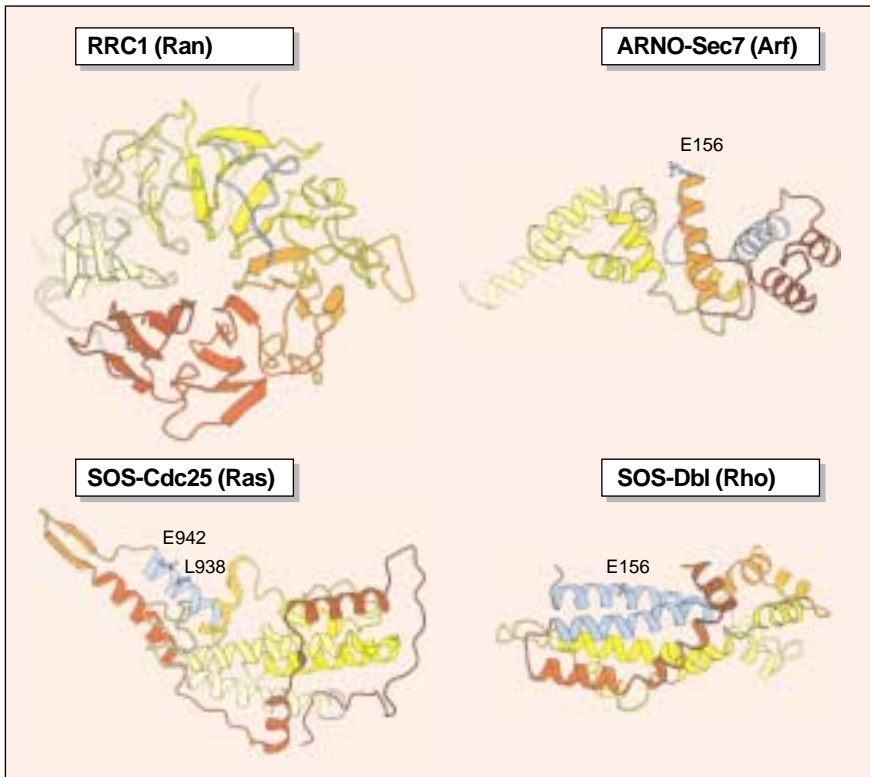


Figure 2. **Structures cristallines de représentants des 4 familles de facteurs d'échange connus à ce jour.** Le repliement de l'extrémité amino-terminale vers l'extrémité carboxy-terminale est mis en évidence par un dégradé du jaune au rouge foncé, sauf pour les régions correspondant au site actif connu (ARNO, Sos-cdc25) ou présumé (RCC1, Sos-Dbl) représentées en bleu avec les acides aminés jouant ou pouvant jouer un rôle dans la catalyse. RCC1 a une structure en feuillets β appelée «hélice de bateau», avec une répétition de 7 pales. Les autres structures sont entièrement en hélices, mais d'organisation complètement différente.

vide, puis forme GTP. De telles interactions pourraient se concevoir sans impliquer nécessairement les régions *switch*, par exemple par le biais d'interactions situées à l'opposé du site nucléotidique, le facteur d'échange pouvant alors agir sur ce site à distance. Cependant l'étude des structures cristallines démontre que ce n'est pas le cas.

Trois complexes facteurs d'échange/protéine G

Les trois complexes facteurs d'échange/protéine G dont les structures ont été déterminées à ce jour sont Ef-Tu/Ef-Ts [2, 3], Ras/Sos [4] et Arf/domaine Sec7 [5]. Dans ces trois cas, la protéine G est vide de nucléotide. La comparaison avec les structures des formes associées au GDP et au GTP des mêmes protéines

G montre que leurs trois facteurs d'échange respectifs interagissent avec les régions *switch*, les déforment, et modifient les sites de fixation des phosphates, du nucléotide et du Mg^{2+} de façon à les rendre incompatibles avec la fixation du nucléotide. Cela s'accompagne, pour les protéines Ras et Arf, de l'intrusion de chaînes latérales du facteur d'échange qui viennent occuper le site normal des phosphates et du Mg^{2+} . En revanche, le site de fixation du groupement guanine du nucléotide n'est masqué dans aucun des trois complexes.

Les trois surfaces d'interaction facteur d'échange/protéine G sont nettement plus étendues que les surfaces de contact entre protéines décrites pour d'autres complexes. La contribution des régions *switch* dans l'interface est très importante: la

capacité de ces régions à changer de conformation et/ou à alterner entre des conformations mobiles et stables permet des réarrangements spectaculaires qui, en quelque sorte, adaptent la protéine G à son facteur d'échange. Une protéine G isolée se dénature si son site nucléotidique est vide, sans doute en partie parce que les régions *switch* ne peuvent être structurées que *via* les phosphates du nucléotide auquel se lie la protéine. En interagissant avec les régions *switch*, les facteurs d'échange stabilisent donc l'état vide. Si le point commun essentiel est la reconnaissance des régions *switch*, les détails des interactions mises en jeu diffèrent selon les complexes. Dans le cas du domaine cdc25 de Sos [4], deux résidus, une leucine et un glutamate (hélice H), viennent directement s'insérer dans le site nucléotidique de Ras. La leucine occupe le site du Mg^{2+} , alors que le glutamate interagit avec une sérine ligand du Mg^{2+} et du phosphate- β . L'hélice H contribue aussi à réorganiser le *switch 1* dans une conformation qui l'éloigne du site de fixation du GDP. Le *switch 2*, mobile dans la forme GDP, est stabilisé par de multiples interactions, notamment hydrophobes, dans le complexe Ras/Sos (figure 4).

L'activité de facteur d'échange pour Arf est portée par les domaines «Sec7» [8, 9] qui comportent une gorge hydrophobe dont la séquence est bien conservée [10-12]. Avant que la structure du complexe ne soit connue, nous avons proposé un modèle selon lequel: (1) la gorge hydrophobe du domaine Sec7 interagissait avec des résidus hydrophobes du *switch 1* de la protéine Arf; et (2) une lysine conservée du *switch 2* formait un pont salin avec un aspartate du domaine Sec7 [13]. Notre modèle prévoyait aussi – et c'est là le point le plus important – qu'un glutamate invariant, situé sur les bords de la gorge du domaine Sec7, allait perturber le site de liaison du phosphate- β et du Mg^{2+} sur Arf. L'élucidation de la structure d'un complexe Arf/domaine Sec7 a confirmé chacun des points de ce modèle, mais a également révélé l'existence de réarrangements de structures sans équivalent chez les autres petites protéines G [5]. Comme dans le cas du complexe Ras/Sos, l'interface Arf/domaine

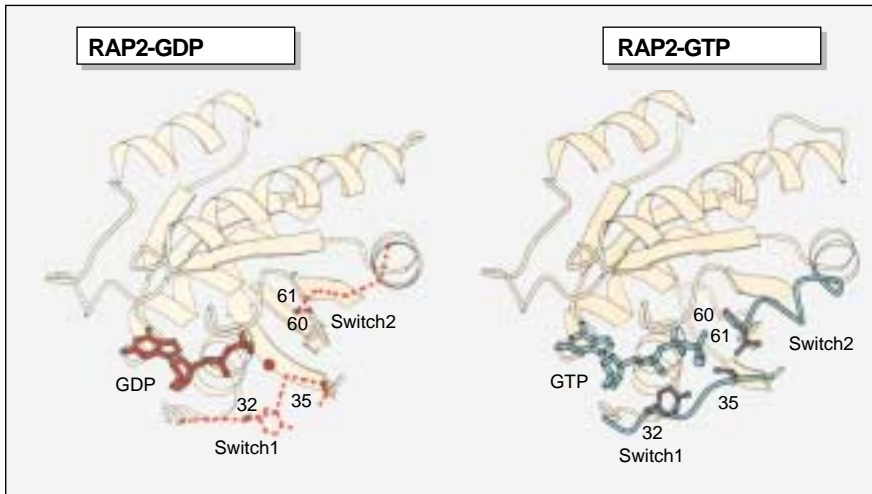


Figure 3. **Structure de la protéine G Rap2 sous sa forme inactive liée au GDP (à gauche) et sous sa forme active liée au GTP (à droite) [7].** Les régions flexibles sont indiquées par des pointillés. Le nucléotide est reconnu par des séquences « consensus » très conservées reconnaissant spécifiquement le groupement guanine, les phosphates et le magnésium, qui constitue une « signature » des protéines G [29]. Les régions switch 1 et switch 2 sont au contraire plus variables d'une famille à l'autre. Ce sont ces régions qui répondent par des changements de conformation à la nature du nucléotide, GDP ou GTP, et qui permettent aux formes active et inactive d'interagir avec des partenaires distincts. Selon les protéines G, la structure et la flexibilité du switch 1 sous forme associée au GDP est très variable. La région switch 1 de beaucoup de petites protéines G contient un motif YxPT où la thréonine (T) et la tyrosine (Y) interagissent avec le magnésium et/ou le phosphate- γ dans la forme GTP, alors que sous la forme associée au GDP ces chaînes latérales sont exposées au solvant [7]. C'est l'interaction de ces deux résidus avec le phosphate- γ du GTP qui constitue l'élément déclencheur du changement de conformation de la région switch 1. La région switch 2 est généralement flexible sous la forme GDP et se stabilise en présence de GTP, une glycine très conservée (ici Gly 60) interagissant avec le phosphate- γ du GTP. Ceci va alors organiser la région en aval de la glycine en hélice α . Le résidu voisin de la glycine est en général une glutamine qui vient aussi se positionner à proximité du phosphate- γ , pour participer ensuite à l'hydrolyse du GTP. Cette glutamine 61 est l'un des deux résidus de Ras pour lesquels on trouve souvent des mutations dans les tumeurs.

Sec7 est très étendue et implique largement les régions *switch*. Le *switch 2*, très mobile dans le cas de la forme Arf-GDP, adopte une conformation stable lors de l'interaction avec le domaine Sec7. La réorganisation la plus remarquable est celle du *switch 1* et des structures secondaires voisines. Au cours de la formation du complexe avec le domaine Sec7, le brin β caractéristique de la région *switch 1* change de conformation, et une phénylalanine, initialement enfouie dans la forme associée au GDP, s'insère alors dans la gorge hydrophobe du domaine Sec7. Un déplacement latéral important de deux feuilletts β se produit d'une extrémité à l'autre de la protéine, dont la conformation se

rapproche alors de celle de la forme associée au GTP.

Dans le cas des complexes EF-Ts/EF-Tu [2, 3], la conséquence majeure de l'interaction protéine G/facteur d'échange est l'insertion d'une chaîne latérale hydrophobe à l'arrière de la région *switch 2*, qui le déplace et provoque une déformation des résidus en contact avec le phosphate- β du GDP, déstabilisant ainsi le nucléotide. Cependant, à l'inverse des complexes décrits ci-dessus, aucune chaîne latérale du facteur d'échange ne s'insère dans le site nucléotidique.

On peut donc dégager deux points communs entre les « stratégies » existantes qui provoquent la sortie du

nucléotide : l'interaction avec les régions *switch*, et la déstabilisation préférentielle du groupement phosphate et du Mg^{2+} . Ceux-ci sont essentiels à l'interaction des nucléotides avec les protéines G, puisqu'on sait que l'affinité du GMP est 100 000 fois plus faible que celle du GDP. Ces deux points communs sont d'ailleurs liés puisque les régions *switch* sont proches des groupements phosphates du nucléotide.

Un rôle essentiel du doigt glutamate pour dissocier le GDP ?

Tous les domaines Sec7 possèdent un résidu glutamate dans leur région d'interaction avec Arf, et la mutation de ce résidu abolit l'activité catalytique. Sa substitution par une lysine empêche toute activité d'échange et permet même la formation d'un complexe Arf-GDP/domaine Sec7, en l'absence de magnésium [13]. Ce glutamate contribue à dissocier le nucléotide en prenant la place du magnésium et du phosphate- β du GDP. Dans le complexe Arf vide/domaine Sec7, il interagit directement avec l'un de ses ligands, la lysine située en position 30 de la molécule Arf.

Dans le cas de Sos, il existe également un glutamate (Glu942) qui, d'après la structure du complexe formé avec Ras, pourrait jouer un rôle analogue. Ce glutamate est en contact avec la sérine en position 17 qui interagit à la fois avec le magnésium et le phosphate- β dans la forme Ras-GDP. Cependant, ce glutamate, ainsi qu'une leucine (Leu 938) qui occupe le site du Mg^{2+} , ne sont pas conservés dans chaque facteur d'échange appartenant à cette famille, ce qui suggère que l'attaque du Mg^{2+} et des phosphates ne joue qu'un rôle secondaire.

D'autres facteurs d'échange possèdent-ils un tel doigt glutamate ? L'analyse des structures de plusieurs domaines Dbl des facteurs d'échange de la famille Rho [14-16] permet d'identifier deux groupes d'acides aminés très conservés (figure 2), qui constituent vraisemblablement leur site catalytique. Une modélisation fondée sur l'homologie locale de cette région avec la structure de Sos suggère qu'un glutamate de ce site pourrait jouer un rôle important.

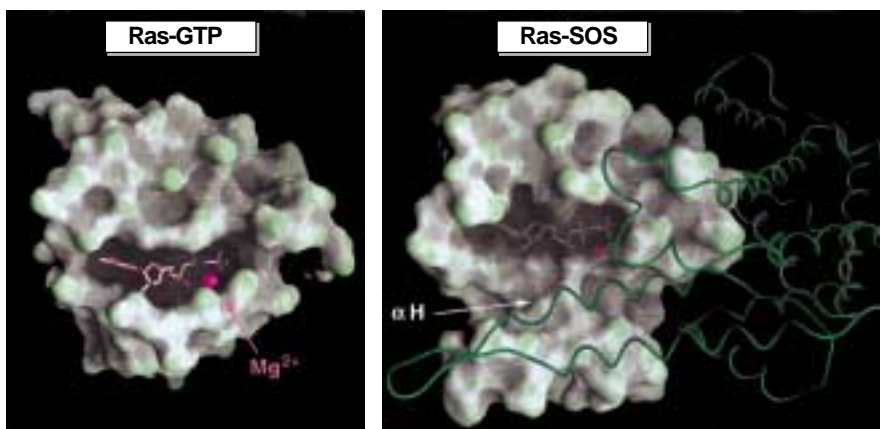


Figure 4. **Comparaison de Ras-GTP et du complexe Ras-SOS.** Dans la forme associée au GTP, les régions switch 1 et 2 ferment le site nucléotidique (en dessous et à droite du nucléotide). Dans le complexe formé avec le facteur d'échange (représenté par un ruban vert), la région switch 1 (en bas) est relativement flexible et ne peut pas adopter sa conformation GTP qui est occultée par le facteur d'échange. La région switch 2 (à droite) forme de nombreuses interactions avec le facteur d'échange dans une conformation distincte de la forme GTP. Le site vide est donc beaucoup plus « ouvert » que le site occupé par le GTP. Il est aussi plus ouvert que pour la forme inactive Ras-GDP, qui est le substrat cellulaire de Sos, et dans laquelle les deux régions switch de Ras sont peu ou pas structurées (voir figure 3). Reproduite de [4] avec l'autorisation des auteurs.

Cependant, ce résidu n'est pas non plus strictement conservé et sa mutation n'a qu'un effet modeste sur l'activité mesurée *in vitro* [14]. Il joue donc probablement un rôle moins important que dans le cas du glutamate des domaines Sec7.

La plupart des domaines Dbl étudiés jusqu'à présent possèdent une activité d'échange très faible, voire inexistante lorsqu'ils sont analysés en solution *in vitro*. Cependant, la surexpression de ces protéines dans des fibroblastes permet d'observer des effets sur l'actine corticale (*membrane ruffling*) ce qui suggère l'existence d'une activation de la petite protéine G Rac *in vivo*. Il semble donc qu'il « manque » une pièce essentielle dans les tests *in vitro*. Une hypothèse attrayante serait que ces domaines Dbl nécessitent d'être phosphorylés pour être activés. La phosphorylation de résidus sérine, thréonine ou tyrosine, apportant plusieurs charges négatives, pourrait leur permettre de jouer un rôle semblable à celui du glutamate des domaines Sec7. Le rôle stimulateur d'une phosphorylation de tyrosine a déjà été décrit dans le cas de Vav [17]. Il existe plu-

sieurs résidus sérine ou thréonine conservés dans le domaine considéré comme le site catalytique (figure 2), et dont la phosphorylation pourrait augmenter l'activité. Cependant la mutation en alanine de certains de ces résidus spécifiques a peu d'effet sur l'activité d'échange. En outre, leur mutation en glutamate, qui pourrait mimer les phospho-sérines, a au contraire un effet légèrement inhibiteur [16]. A l'heure actuelle, la faible activité détectée *in vitro* des domaines Dbl reste donc un mystère. Il est possible que, comme dans le cas d'Arf et des domaines Sec7, l'activité soit fortement dépendante de la membrane ou que les domaines Dbl ne reconnaissent Rho que sous la forme associée à son partenaire (Rho/GDI), qui représente la forme majoritaire sous laquelle existe Rho dans la cellule au repos. La surface du facteur d'échange RCC1, qui interagit avec Ran, possède plusieurs résidus acides, l'un d'entre eux étant impliqué dans la réaction d'échange [18]. Il serait intéressant de déterminer si l'un de ces résidus fonctionne de manière similaire au glutamate des domaines Sec7.

Mécanisme de dissociation du complexe protéine G/facteur d'échange par le GTP

La structure d'un complexe entre une petite protéine G vide de nucléotide et son facteur d'échange permet d'avoir une représentation de l'une des étapes cruciales de la réaction d'échange. Cependant on sait encore peu de chose des étapes qui précèdent (reconnaissance de la protéine G sous forme GDP par son facteur d'échange) et qui suivent (fixation du GTP au complexe transitoire protéine G/facteur d'échange). Celles-ci seront probablement beaucoup plus difficilement accessibles à l'analyse structurale. Les études cinétiques réalisées *in vitro* ont donc aussi un rôle important pour mieux comprendre la dynamique de l'échange.

Aussi bien dans le cas du complexe Ras/Sos que dans celui des complexes Arf/domaine Sec7 ou EF-Tu/EF-Ts, la partie guanine du site nucléotidique reste accessible, car le facteur d'échange ne bloque pas l'entrée dans ce site. Celui-ci est peu modifié dans Arf ou EF-Tu vide, alors qu'il l'est plus sensiblement dans Ras. Il est cependant difficile de déterminer s'il s'agit là d'une cause ou d'une conséquence du départ du nucléotide. L'accessibilité du site de la guanine dans ces complexes suggère que les phosphates sont déplacés en premier. Réciproquement, il est possible que le groupement guanine du GTP entre d'abord dans ce site, puis que les phosphates réorganisent la région *switch 2* pour aboutir à la dissociation du facteur d'échange. Il s'agit là d'une étape limitante de la cinétique d'échange qui est malgré tout favorisée sur le plan thermodynamique, le complexe Ras-GTP étant plus stable que le complexe Ras « vide »/facteur d'échange.

Régulation de l'activité des facteurs d'échange et rôle des interactions avec la membrane

La protéine Ras est farnésylée à son extrémité carboxy-terminale, ce qui lui permet de s'associer à la membrane plasmique [19]. En réponse aux facteurs de croissance, l'activa-

tion de tyrosine kinase, et le recrutement du facteur d'échange Sos à la membrane se produit par l'intermédiaire de la protéine Grb2. Ce recrutement de Sos à proximité de Ras joue un rôle essentiel puisqu'il concentre ces deux protéines à la même place, et permet sans doute une orientation favorable de l'une par rapport à l'autre. Il n'y a cependant pas de raison d'envisager une intervention directe de la membrane dans le mécanisme d'échange proprement dit [20].

En revanche, dans le cas des protéines Arf, qui sont myristylées en position amino-terminale, nous avons pu montrer que le facteur d'échange ARNO n'a pratiquement aucune activité sur la forme Arf-GDP en l'absence d'une surface lipidique [8]. L'hélice amino-terminale amphiphile bloque Arf-GDP dans une conformation ne permettant pas l'échange avec le GTP. Les résidus hydrophobes situés sur une face de cette hélice s'insèrent dans une crevasse elle aussi hydrophobe. En présence de membranes, le myristate situé à l'extrémité amino-terminale de cette hélice peut s'insérer dans les lipides et contribuer à la faire basculer dans une conformation où les résidus hydrophobes s'insèrent dans la membrane. Sous la forme associée au GTP, cette hélice reste insérée dans les lipides [21, 22]. La structure d'Arf-GTP montre en effet que les changements de conformation font disparaître la gorge hydrophobe où s'insérerait l'hélice amino-terminale dans la forme GDP. Dans le complexe Arf vide/domaine Sec7, cette région a une conformation proche de celle de la forme associée au GTP [5], ce qui suggère que l'un des rôles du facteur d'échange pourrait être d'empêcher le retour de l'hélice amino-terminale dans la conformation « GDP » et de stabiliser ainsi l'interaction d'Arf avec la membrane. Dans ce cas, l'interaction entre Arf et les lipides membranaires joue donc un rôle essentiel pour permettre l'échange. Les facteurs d'échange de la famille ARNO (ceci n'est pas le cas pour tous les facteurs d'échange d'Arf) portent, immédiatement après le domaine Sec7, un domaine homologue à la pleckstrine (PH) qui lie la tête polaire du phosphatidyl-inositol 4, 5 bisphosphate (PIP2) ou du phos-

phatidyl-inositol 3, 4, 5 trisphosphate (PIP3), et permet le recrutement du domaine Sec7 à la surface membranaire, là seulement où la réaction d'échange peut avoir lieu.

Les facteurs d'échange de la famille Dbl contiennent toujours un domaine PH situé immédiatement après le domaine Dbl [23]. Dans le cas de Sos, la délétion du domaine PH est requise pour détecter l'activité d'échange du domaine Dbl sur Rac *in vitro*. *In vivo*, l'activation aurait lieu par interaction du domaine PH avec les têtes polaires des phospholipides, et éventuellement après interaction du domaine Cdc25 voisin avec Ras [24]. Au contraire, dans un autre cas, l'activité serait fortement stimulée par la présence du domaine PH [14]. Curieusement, la présence invariable d'un domaine PH après le domaine Dbl semblerait, selon les cas, exercer des effets opposés sur l'activité d'échange. Le très faible degré de conservation des résidus situés à l'interface entre domaines Dbl et PH plaide en faveur de cette possibilité. Cependant, en l'absence de données cinétiques fiables, la question reste posée. La détermination des structures des complexes va sans aucun doute stimuler ces études biochimiques détaillées.

Pour les protéines de la famille Rho, comme pour Arf, la présence d'une surface membranaire pourrait être essentielle, puisque la proximité des lipides joue un rôle direct dans l'échange, en modifiant le positionnement de la petite protéine G par rapport à son facteur d'échange. En outre, un effet direct des phospholipides sur la conformation du site nucléotidique, bien que probablement moins spectaculaire que dans le cas d'Arf, n'est pas exclue.

Protéines G hétérotrimériques

La fixation d'un agoniste sur un récepteur à 7 domaines transmembranaires induit un changement de conformation des boucles intracellulaires du récepteur, provoquant l'échange GDP → GTP sur la sous-unité α et la dissociation des sous-unités $\beta\gamma$. Quelques années de travail sont probablement encore nécessaires avant que la structure d'une protéine G hétérotrimérique vide

associée à un récepteur à sept domaines transmembranaires soit déterminée. Cependant, des considérations topologiques appuyées par des résultats obtenus par mutagenèse dirigée permettent d'affirmer que les boucles intracellulaires des récepteurs ne peuvent pas interagir avec le domaine nucléotidique des sous-unités α de la même façon que Sos ou les domaines Sec7 interagissent avec Ras ou Arf. Cela a conduit Henry Bourne à proposer une hypothèse séduisante selon laquelle les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G jouent un rôle important dans la transmission du changement de conformation du récepteur vers la sous-unité α [25]. Effectivement, G β interagit avec les régions *switch 1* et *switch 2*, et l'extrémité carboxy-terminale de G γ interagit avec le récepteur. Dans ce modèle, le récepteur prendrait appui sur la région de G α proche de la membrane, et utiliserait G $\beta\gamma$ comme relais afin qu'il provoque l'ouverture du site nucléotidique en agissant sur les régions *switch 1* et *switch 2*, de façon analogue à Sos ou ARNO. La sous-unité β des protéines G hétérotrimériques a une structure en « hélice de bateau ». Or, malgré l'absence d'homologie de séquence significative, RCC1, le facteur d'échange de Ran, présente ce même type de structure [26]. Il serait intéressant de voir si, dans le complexe, la position de RCC1 par rapport à Ran est semblable à celle de G β par rapport à G α .

Éventuelles applications thérapeutiques

Un grand nombre de médicaments utilisés à l'heure actuelle agissent depuis l'extérieur de la cellule en modulant l'activité de récepteurs couplés à des protéines G hétérotrimériques. Pour les autres protéines G décrites dans cet article, les facteurs d'échange sont des protéines intracellulaires, d'accès moins facile. Cependant, pour la plupart de ces protéines, il est désormais possible de définir le site d'interaction avec la protéine G correspondante, ce qui devrait aider à concevoir des analogues peptidiques (peptido-mimétiques) capables d'interagir avec la même région et de bloquer par compétition l'activation d'une protéine G

déterminée. Une autre approche a été suggérée par l'étude de la bréfeldine A (BFA), un métabolite de champignon couramment utilisé pour bloquer le transport intracellulaire, et qui procède selon un autre mécanisme d'inhibition (*m/s* 2000, n° 1, p. 112) [27]. La BFA inhibe l'activité facteur d'échange de certains domaines Sec7 sur Arf. A l'inverse d'un inhibiteur compétitif, la BFA n'empêche pas l'interaction entre les domaines Sec7 et Arf, mais a au contraire pour cible le complexe Arf-GDP-Sec7, et le bloque dans cet état. Il est possible que la BFA s'intercale entre les régions *switch* d'Arf-GDP et la gorge hydrophobe du domaine Sec7, et empêche ainsi la réorganisation de l'interface Arf/Sec7 lors de la dissociation du GDP. Cette étude fournit un résultat très important car elle montre qu'une drogue peut transformer une petite protéine G dans sa forme majoritaire (associée au GDP) en un « dominant négatif ». Celui-ci va alors former un complexe abortif avec son facteur d'échange et l'inhiber. La compréhension du mécanisme d'action de la BFA pourrait donc aider à concevoir de nouvelles molécules inhibant spécifiquement l'activité de certains facteurs d'échange [28] ■

RÉFÉRENCES

- Quilliam LA, Khosravi-Far R, Huff SY, Der CJ. Guanine nucléotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins. *Bioessays* 1995; 17: 395-404.
- Kawashima T, Berthet-Colominas C, Wulff M, Cusack S, Leberman R. The structure of the *Escherichia coli* EF-Tu.EF-Ts complex at 2,5 Å resolution. *Nature* 1996; 379: 511-8.
- Wang Y, Jiang Y, Meyering-Voss M, Sprinzl M, Sigler PB. Crystal structure of the EF-Tu. EF-Ts complex from *Thermus thermophilus*. *Nat Struct Biol* 1997; 4: 650-6.
- Boriack-Sjodin PA, Margarit SM, Bar-Sagi D, Kuriyan J. The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* 1998; 394: 337-43.
- Goldberg J. Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* 1998; 95: 237-48.
- Kjeldgaard M, Nyborg J, Clark BF. The GTP binding motif: variations on a theme. *Faseb J* 1996; 10: 1347-68.
- Cherfils J, et al. Crystal structures of the small G protein Rap2A in complex with its substrate GTP, with GDP and with GTPγS. *EMBO J* 1997; 16: 5582-91.
- Chardin P, et al. A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* 1996; 384: 481-4.
- Peyroche A, Paris S, Jackson CL. Nucléotide exchange on ARF mediated by yeast Geal protein. *Nature* 1996; 384: 479-81.
- Cherfils J, et al. Structure of the Sec7 domain of the Arf exchange factor ARNO. *Nature* 1996; 392: 101-5.
- Mossessova E, Gulbis JM, Goldberg J. Structure of the guanine nucleotide exchange factor Sec7 domain of human ARNO and analysis of the interaction with ARF GTPase. *Cell* 1998; 92: 415-23.
- Betz SF, et al. Solution structure of the cytohesin-1 (B2-1) Sec7 domain and its interaction with the GTPase ADP ribosylation factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7909-14.
- Beraud-Dufour S, et al. A glutamic finger in the guanine nucleotide exchange factor ARNO displaces Mg²⁺ and the beta-phosphate to destabilize GDP on ARF1. *EMBO J* 1998; 17: 3651-9.
- Liu X, et al. NMR structure and mutagenesis of the N-terminal Dbl homology domain of the nucleotide exchange factor Trio. *Cell* 1998; 95: 269-77.
- Soisson SM, Nimnual AS, Uy M, Bar-Sagi D, Kuriyan J. Crystal structure of the Dbl and pleckstrin homology domains from the human Son of sevenless protein. *Cell* 1998; 95: 259-68.
- Aghazadeh B, Zhu K, Kubiseski TJ, Liu GA, Pawson T, Zheng Y, Rosen MK. Structure and mutagenesis of the Dbl domain. *Nat Struct Biol* 1998; 5: 1098-107.
- Crespo P, Schuebel KE, Ostrom AA, Gutkind JS, Bustelo XR. Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature* 1997; 385: 169-72.
- Azuma Y, et al. Conserved histidine residues of RCC1 are essential for nucleotide exchange on Ran. *J Biochem (Tokyo)* 1996; 120: 82-91.
- Magee T, Marshall C. New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane. *Cell* 1999; 98: 9-12.
- Chardin P. Rôle du domaine PH dans le recrutement membranaire des facteurs d'échange pour les petites protéines G. *Med Sci* 1997; 13: 731-4.
- Antonny B, Beraud-Dufour S, Chardin P, Chabre M. N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry* 1997; 36: 4675-84.
- Franco M, Chardin P, Chabre M, Paris S. Myristoylation-facilitated binding of the G protein ARF1GDP to membrane phospholipids is required for its activation by a soluble nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 1996; 271: 1573-8.
- Cerione RA, Zheng Y. The Dbl family of oncogenes. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 216-22.
- Nimnual AS, Yatsula BA, Bar-Sagi D. Coupling of Ras and Rac guanine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science* 1998; 279: 560-3.
- Iiri T, Farfel Z, Bourne HR. G-protein diseases furnish a model for the turn-on switch. *Nature* 1998; 394: 35-8.
- Renault L, et al. The 1,7 Å crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller. *Nature* 1998; 392: 97-101.
- Peyroche A, Antonny B, Robineau S, Acker J, Cherfils J, Jackson CL. Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell* 1999; 3: 275-85.
- Chardin P, McCormick F, Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell* 1999; 97: 153-5.
- Valencia A, Chardin P, Wittinghofer A, Sander C. The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* 1991; 30: 4637-48.

Summary

Mechanisms of small GTP-binding proteins activation by their exchange factors

GTP-binding proteins are molecular switches that control multiple aspects of cellular life and signal transduction. These molecules alternate between an inactive, GDP-bound form and an active, GTP-bound form, and their activation is controlled by « exchange factors ». The structures of several exchange factors and their complexes formed with target small G proteins provide a better understanding of the mechanisms inducing the release of GDP and its subsequent replacement by GTP. The flexibility of two « switch » regions is essential during the exchange process and the understanding of the mechanism of inhibition of one of these exchange factors by the drug Brefeldin A suggests that the rearrangements that occur in these switch regions might represent the « Achilles's heel » by which new drugs might inhibit some of these exchange factors.

TIRÉS À PART

P. Chardin.