



**HAL**  
open science

# Chromatographie de faible affinité pour la découverte de médicament : nouvelle méthodologie de criblage ultra miniaturisée pour les protéines membranaires

Aurélien Renaudin

## ► To cite this version:

Aurélien Renaudin. Chromatographie de faible affinité pour la découverte de médicament : nouvelle méthodologie de criblage ultra miniaturisée pour les protéines membranaires. Sciences pharmaceutiques. 2021. hal-04042728

**HAL Id: hal-04042728**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-04042728>**

Submitted on 23 Mar 2023

**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  
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES  
UNIVERSITAIRES**

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)  
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE



FACULTÉ  
DE PHARMACIE

UNIVERSITE DE LORRAINE  
2021

---

FACULTE DE PHARMACIE

**T H E S E**

Présentée et soutenue publiquement

Le 10/02/21, sur un sujet dédié à :

Chromatographie de faible affinité pour la découverte de  
médicament - Nouvelle méthodologie de criblage ultra  
miniaturisée pour les protéines membranaires

pour obtenir

**le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par RENAUDIN Aurélien

Né le 06/09/1995

**Membres du Jury**

**Président :** M. Igor CLAROT Professeur universitaire

**Juges :** M. Arnaud PALLOTTA, Maître de conférences

Mme. Claire DEMESMAY Professeur universitaire

M. Jean-Jacques LAHET Pharmacien,

# **SERMENT DE GALIEN**

**En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :**

**D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances**

**D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité**

**En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession**

**De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens**

**De coopérer avec les autres professionnels de santé**

**Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.**

**Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.**

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2020-2021**

**DOYEN**

Raphaël DUVAL

**Vice-Doyen**

Julien PERRIN

**Directrice des études**

Marie SOCHA

**Conseil de la Pédagogie**

Présidente, Brigitte LEININGER-MULLER

Vice-Présidente, Alexandrine LAMBERT

**Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier**

Présidente, Béatrice DEMORE

**Commission Prospective Facultaire**

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

**Commission de la Recherche**

Présidente, Caroline GAUCHER

**Chargés de Mission**

**Communication**

**Innovation pédagogique**

**Référente ADE**

**Référente dotation sur projet (DSP)**

**Référent vie associative**

Aline BONTEMPS

Alexandrine LAMBERT

Virginie PICHON

Marie-Paule SAUDER

Arnaud PALLOTTA

**Responsabilités**

**Filière Officine**

**Filière Industrie**

**Filière Hôpital**

**Pharma Plus ENSIC**

**Pharma Plus ENSAIA**

**Pharma Plus ENSGSI**

**Cellule de Formation Continue et Individuelle**

**Commission d'agrément des maîtres de stage**

**ERASMUS**

Caroline PERRIN-SARRADO

Julien GRAVOULET

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Marie SOCHA

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Xavier BELLANGER

Igor CLAROT

Luc FERRARI

François DUPUIS

Mihayl VARBANOV

**DOYENS HONORAIRES**

Chantal FINANCE

Francine PAULUS

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Pierre LEROY

Philippe MAINCENT

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Jean-Claude BLOCK

Pierre DIXNEUF

Chantal FINANCE

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Pierre LABRUDE

Vincent LOPPINET

Alain NICOLAS

Janine SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

François BONNEAUX

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Dominique DECOLIN

Marie-Claude FUZELLIER

Louis SCHWARTZBROD

Françoise HINZELIN  
Marie-Hélène LIVERTOUX  
Bernard MIGNOT  
Blandine MOREAU  
Dominique NOTTER  
Francine PAULUS  
Christine PERDICAKIS  
Marie-France POCHON  
Anne ROVEL  
Gabriel TROCKLE  
Maria WELLMAN-ROUSSEAU  
Colette ZINUTTI

**ASSISTANTS HONORAIRES**

Marie-Catherine BERTHE  
Annie PAVIS

**ENSEIGNANTS**

Section CNU  
\*

Discipline d'enseignement

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS  
HOSPITALIERS**

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Nathalie THILLY	81	Santé publique et Epidémiologie

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique, Audioprothèse
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie, Biologie cellulaire
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

**MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Alexandre HARLE	82	Biologie cellulaire oncologique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Loïc REPEL	82	Biothérapie
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique

**MAITRES DE CONFÉRENCES**

Xavier BELLANGER <sup>H</sup>	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT <sup>H</sup>	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND <sup>H</sup>	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN <sup>H</sup>	86	Chimie thérapeutique

Cédric BOURA <sup>H</sup>	86	Physiologie
Sandrine CAPIZZI	87	Parasitologie
Antoine CAROF	85	Informatique
Frédérique CHANGEY	87	Microbiologie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Natacha DREUMONT <sup>H</sup>	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Florence DUMARCAÏ <sup>H</sup>	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS <sup>H</sup>	86	Pharmacologie
Reine EL OMAR	86	Physiologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER <sup>H</sup>	86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD <sup>H</sup>	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT <sup>H</sup>	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire

**ENSEIGNANTS (suite)**

Section CNU

\*

Discipline d'enseignement

Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD <sup>H</sup>	86/01	Droit en Santé
Christophe MERLIN <sup>H</sup>	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER <sup>H</sup>	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Arnaud PALLOTTA	85	Bioanalyse du médicament
Marianne PARENT	85	Pharmacie galénique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL <sup>H</sup>	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET <sup>H</sup>	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Sabrina TOUCHET	86	Pharmacochimie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT <sup>H</sup>	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU <sup>H</sup>	87	Biochimie et Biologie moléculaire

**PROFESSEUR ASSOCIE**

Julien GRAVOULET	86	Pharmacie clinique
------------------	----	--------------------

**PROFESSEUR AGREGÉ**

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

<sup>H</sup> Maître de conférences titulaire HDR

\* Disciplines du Conseil National des Universités :

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

## Table des matières

Introduction.....	1
I. Méthode de criblage.....	3
1. Le <i>High Throughput Screening</i> .....	3
1.1 Historique.....	3
1.2 Principe.....	5
Bibliothèques de composés.....	5
Techniques de criblages.....	6
1.3 Avantages et limites du criblage à haut débit.....	10
2. Le <i>Fragment Based Drug Design</i> .....	12
2.1 Historique.....	12
2.2 Principe.....	16
2.3 Avantages et limites.....	18
II. La Chromatographie d'affinité.....	19
1. Historique.....	19
2. Principe général.....	20
2.1 Analyse Zonale : Criblage des fragments.....	22
2.2 Analyse frontale : quantification des interactions et caractérisation des colonnes.....	23
III. La chromatographie d'affinité utilisé pour le criblage des fragments.....	26
1. Applications de la chromatographie de faible affinité au <i>FBDD</i> .....	28
2. Miniaturiser cette technique pour étudier des fragments membranaires.....	32
2.1 Des capillaires comme colonnes.....	32
2.2 Le Récepteur A2A de l'adénosine comme modèle d'étude des protéines membranaires...	33
2.3 Choix d'une membrane biomimétique : les Nanodisques.....	35
IV. Partie expérimentale.....	36
1. Matériel et méthodes.....	36
1.1. Produits.....	36
1.2. Préparation des capillaires.....	37
1.3. Analyse Frontale.....	38
2. Résultats.....	39
2.1. Préparation des colonnes capillaires d'affinité.....	40
2.2. Caractérisation des colonnes d'affinité : quantité de protéine totale greffée suivie en analyse frontale avec suivi UV.....	42
2.3. Comparaison de plusieurs modes de détermination de $K_d$ en analyse frontale.....	51
2.4. Etude de potentiels fragments d'A2A.....	57
Conclusion.....	61
Bibliographie.....	63



## Table des Illustrations

Figure 1 Cycle de développement d'un médicament .....	1
Figure 2 évolution du débit, des coûts et des ressources du HTS chez Novartis, évolution de 1998 à 2007, la quantité de composés en vert est estimée en pourcentage par rapport en 2007 et le cout par entité en orange est estimé en pourcentage par rapport à 1998. (7)4	
Figure 3 Deux techniques d'optimisation en FBDD: <i>Linking</i> , liaison entre plusieurs fragments de faibles affinités pour former un ligand avec une forte affinité. <i>Growing</i> , le fragment est agrandi progressivement pour créer de nouvelles interactions avec la protéine.....	17
Figure 4 Principe chromatographie d'affinité.....	20
Figure 5 Liaison soluté ligand, A est le composé injecté, L le ligand fixé sur la colonne et $K_A$ est la constante d'équilibre de la liaison entre A et L .....	21
Figure 6 Principe du mode Zonal.....	22
Figure 7 Principe du mode Frontal.....	23
Figure 8 A : Courbe de percée en fonction de la concentration, B : Droite $1/q=f(1/[L])$ ....	24
Figure 9 Principe du Staircase .....	25
Figure 10 Compétition en analyse frontale .....	26
Figure 11 Détermination de l'affinité de 3-ABA par WAC (A) et par SPR (B, C) : Pour la WAC, $t_{spec}$ est la différence de temps de rétention de 3-ABA (0,1 mM) sur les colonnes actives (ligne continue) et inhibées (ligne pointillée). Pour le SPR (B), des réponses en triple ont été obtenues en soustrayant le canal inhibé in situ du canal actif. Les réponses à l'état d'équilibre résultantes (en triple) sont ajustées à une isotherme de Langmuir (C) afin de calculer $K_D$ . RU : unité de réponse. (42) .....	28
Figure 12 Analyse d'un mélange de fragments par WAC en mode Frontal : Chromatogrammes d'un groupe de 16 fragments criblés sur une colone HSP90 (39) .....	29
Figure 13 Lipodisque contenant les protéines, greffés perpendiculairement au support (43) .....	30
Figure 14 Chromatogrammes à ions extraits du fragment <i>Hit</i> sur la colonne AQP1-lipodisque (en bleu) et sur la colonne de contrôle-lipodisque (en rouge). (43).....	31
Figure 15 Structure d'un nanodisque : En bleu la tête polaire et en rouge les deux queues aliphatiques des phospholipides, en vert des morceaux dérivés de l'apolipoprotéine A1 comme ceinture .....	35
Figure 16 Schéma de synthèse des colonnes .....	40

Figure 17 Chromatogramme de suivi d'un greffage de colonne avec de l'HSA biotinylée à 0.89mg/L : Colonne streptavidine de 8,5cm, à 12 bars, suivi à 214 nm.....	42
Figure 18 Chromatogramme de suivi d'un greffage de colonne avec des nanodisques A2A : Colonne streptavidine de 8,5cm, à 12 bars, suivi à 214 nm.....	44
Figure 19 Schéma du processus de regreffage de Nanodisque sur une colonne : Le rond rouge représente la biotine, le carré bleu la streptavidine et le cercle verre le nanodisque contenant l'A2A.....	46
Figure 20 Mesure du nombre de nanodisques actifs A : Courbe de percée sur colonne NDA2A de 8.5 cm à 12 bars à 3 concentrations allant de 2,5 $\mu\text{M}$ à 10 $\mu\text{M}$ B : $1/q=f(1/[L])$ de la théophylline sur colonne NDA2A : Colonne de 8,5 cm ; pression à 12 bars ; $K_d$ déterminé = 6 $\mu\text{M}$ ; $B_{\text{act}}=0.224 \text{ pmol.cm}^{-1}$ A chaque nouveau greffage le nombre de nanodisques actifs est mesuré en répétant cette expérimentation.....	48
Figure 21 Histogramme du nombre de ND ajouté par cycle de greffage : Nombre de cycles de greffage en abscisse, quantité greffée en $\text{pmol.cm}^{-1}$ en ordonnée .....	49
Figure 22 Mesure $K_d$ Furosémide en Analyse frontale : A : Courbe de percée du furosémide obtenue sur colonne HSA de 8.5 cm à 12 bar à 4 concentrations allant de 4,16 à 25 $\mu\text{M}$ B : Droite représentant $1/q = f(1/L)$ avec $1/q$ en $\text{mol}^{-1}$ et $1/L$ en $10^5 \text{ L}^{-1}$ .....	52
Figure 23 Mesure $K_d$ Furosémide en Analyse frontale en staircase : A : Courbe de percée du furosémide obtenue sur colonne HSA de 8.5 cm à 12 bar à 4 concentrations allant de 4,16 à 25 $\mu\text{M}$ sans rinçage en les différentes concentrations B : Droite représentant $1/q = f(1/L)$ avec $1/q$ en $\text{mol}^{-1}$ et $1/L$ en $10^5 \text{ L}^{-1}$ .....	53
Figure 24 Courbe de percée Warfarine 10 $\mu\text{M}$ en présence de Furosémide : Solution de warfarine 10 $\mu\text{M}$ avec présence croissante du compétiteur de 0 à 500 $\mu\text{M}$ sur colonne HSA, Absorbance normalisée en fonction du temps rapporté au temps mort.....	55
Figure 25 Courbe de simulation du $\Delta T/t_0$ en fonction de la concentration : Simulation pour des colonnes possédant 10 $\text{pmol}$ de protéine, simulation pour 7 $K_d$ allant de 0,1 à 500 $\mu\text{M}$ concentration en $\mu\text{M}$ en abscisse, $\Delta T/t_0$ en ordonnée.....	58
Figure 26 Analyse de fragment sur ND A2A immobilisé en chromatographie frontal pour des fragments présentant de l'affinité : Courbe de percée obtenus sur une colonne ND A2A pour plusieurs fragment préparé dans du tampon phosphate 6,67 mM. La courbe rouge représente la concentration à 1000 $\mu\text{M}$ et la courbe bleue représente la concentration à 10 $\mu\text{M}$ .....	59
Figure 27 Analyse de fragment sur ND A2A immobilisé en chromatographie frontal pour fragment sans affinité : Courbe de percée obtenus sur une colonne ND A2A pour plusieurs	

fragment préparé dans du tampon phosphate 6,67 mM. La courbe rouge représente la plus haute concentration et la courbe bleu représente la plus faible concentration.....60

## Table des tableaux

Tableau 1 Différentes méthodes de criblages.....	9
Tableau 2 Les 10 articles les plus cités en FBDD.....	13
Tableau 3 Listes des articles les plus citées sur le FBDD depuis 2010 .....	14
Tableau 4 Résumé du greffage d'une colonne HSA.....	43
Tableau 5 Résumé du greffage d'une colonne ND A2A .....	45
Tableau 6 Résumé du greffage des nanodisques A2A sur une colonne .....	47
Tableau 7 Résumé de la quantité de nanodisques actifs par greffage .....	49
Tableau 8 Résumé des valeurs de $K_d$ mesurées par différentes méthodes .....	56

## Liste des abréviations

AMM : Autorisation de mise sur le Marché

AQP1 : Aquaporine 1

AIBN : Azobisisobutyronitrile

DMSO : Diméthylsulfoxyde

FBDD : Fragment based drug discovery

GMA-co-EDMA : glycidylméthacrylate/diméthacrylate d'éthylène

HTS : High-throughput screening

LE : Ligand efficiency

MPS : Membrane protein Scaffold

PBS : Phosphate Buffered Saline

RCPG : Récepteurs couplés à la protéine G

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SPR : Surface plasmonic resonance

TEA: TriEthylAmine

WAC: Weak affinity chromatography

$\beta_2$ AR : Récepteur bêta 2 adrénergique

$\gamma$ -MAPS: triméthoxysilyl)propylméthacrylate

## Introduction

L'industrie pharmaceutique est toujours à la recherche de nouveaux principes actifs pour pouvoir développer de nouveaux médicaments. Ce développement est long, de 10 à 15 ans, et cher, de l'ordre du milliard d'euro d'investissement. Il est composé de 5 étapes (1), (2):

- La découverte de la cible et du composé possédant l'effet recherché
- La recherche préclinique
- La recherche clinique
- Le dépôt de dossier de l'Autorisation de mise sur le marché, AMM
- Le suivi sanitaire après l'obtention de l'AMM

Le développement est représenté par la figure 1. La première étape consiste à identifier une cible thérapeutique intéressante et la valider (3), (4). Une fois la cible thérapeutique identifiée et validée l'étape la plus importante est la découverte de la molécule *Hit*. Une molécule *Hit* est le composé qui présente l'activité recherchée parmi plusieurs composés. Cette recherche de la molécule *Hit* se fait parmi plus de 10000 candidats. Une fois optimisée cette molécule donnera une molécule *lead*. La molécule lead sera la chef de file pour la recherche des principes actifs. Parmi les principes actifs de la molécule lead un seul passera les différentes étapes et finira commercialisé.

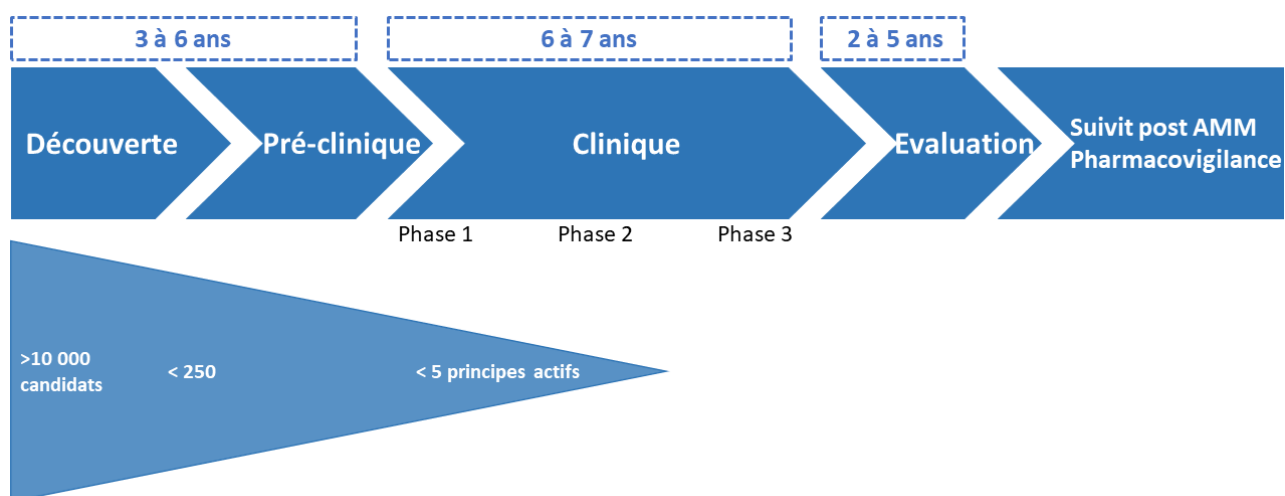


Figure 1 Cycle de développement d'un médicament

La découverte de molécules *Hit* se fait par un criblage(5). Il faut trouver cette molécule parmi un grand nombre d'autres. Il faut donc des méthodes rapides et efficaces pour économiser du temps et de l'argent. La méthode de référence est d'effectuer un criblage à haut débit, le *High Throughput Screening*. Bien qu'historiquement elle ait permis de développer de nombreux médicaments cette méthode montre de nos jours certaines limites comme le manque de propriété intellectuelle de la découverte ou la difficulté à optimiser la molécule découverte. Dans un contexte où il est de plus en plus difficile de développer de nouveaux médicaments de nouvelles approches sont envisagées pour l'étape de criblage. Cette recherche de nouvelles approches et de nouvelles techniques complémentaires en renfort du criblage à haut débit est nécessaire et est un champ d'étude important pour continuer de manière efficace la recherche de nouveaux médicaments.

Dans ce travail, la première partie présentera deux modes de criblages, la méthode de référence et une nouvelle, le *Fragment Based Drug Design*. Cette partie exposera tout d'abord un historique de ces méthodes. Puis leur principe sera décrit ainsi que leurs avantages et leurs limites. La deuxième décrira le principe général de la chromatographie d'affinité puis une utilisation particulière comme nouvelles techniques de criblage biophysique pour identifier les fragments de protéines membranaires appelée la chromatographie de faible affinité ainsi que ces atouts. Pour finir la troisième partie reportera la partie expérimentale de ce travail. L'objectif expérimental sera de préparer des colonnes d'affinité miniaturisées, d'y greffer des protéines (les cibles thérapeutiques), d'évaluer leurs performances et d'identifier de potentiels fragments pour une protéine membranaire modèle : le récepteur A2A de l'adénosine qui sera mentionné dans la suite de ce travail par A2A.

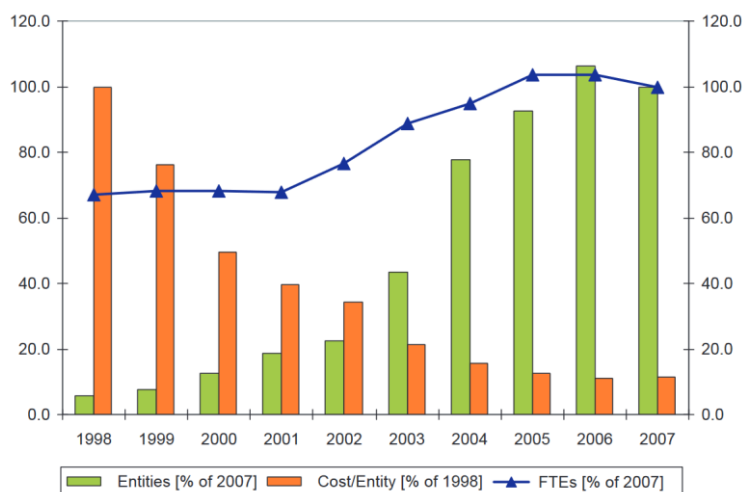
# I. Méthodes de criblage

## 1. Le *High Throughput Screening*

### 1.1 Historique

Dans les années 80, les essais pour découvrir de nouveaux composés étaient effectués en éprouvettes à l'aide de tests biochimiques. A raison de 10 composés par jour une personne pouvait évaluer 2000 composés par an ce qui était un facteur limitant la recherche de nouveaux *hits*. La première présentation officielle du concept de criblage à haute densité fut faite en 1988 lors des conférences annuelles de l'*American Society for Microbiology* et de la *Society for Industrial Microbiology* (6). Le premier article citant le *High Throughput Screening (HTS)* dans son titre date de 1991. En 1994 est fondée la *Society for Biomolecular Screening* qui discute de l'expansion de l'utilisation du *HTS* pour l'identification des *Hits*.

Depuis la première présentation du concept l'*HTS* a fortement évolué pour répondre à l'augmentation du nombre de composés à tester et à l'augmentation du nombre de cibles découvertes (7). Ces évolutions ont été possibles grâce à l'apparition des technologies de miniaturisation et de robotisation des tests. L'approche pour optimiser ce criblage est d'augmenter la qualité et la quantité tout en réduisant les coûts. La miniaturisation se voit par l'évolution des plaques utilisées. Les premières plaques utilisées en 1994 étaient composées de 96 puits de 100 à 200  $\mu\text{L}$ . Ces plaques ont évolué en plaques de 384 puits de 30-100  $\mu\text{L}$  en 1998 pour évoluer finalement en plaques de 1536 puits de 2,5-10  $\mu\text{L}$  permettant de passer de 10 000 à 200 000 composés par jour. Cette miniaturisation et l'automatisation du *HTS* a permis de réduire le personnel nécessaire tout en augmentant le nombre de composés criblés. La figure 2 montre l'évolution des coûts et du nombre de composés criblés par Novartis de 1998 à 2007. Les coûts ont diminué plus de 5 fois pour plus de 20 fois de composés criblés. En plus du coût le nombre de cibles et de composés a augmenté au fur et à mesure des années. Les bibliothèques sont passées de 50 000 – 350 000 composés à plus d'1 million.



**Figure 2 Evolution du débit, des coûts et des ressources du HTS chez Novartis : évolution de 1998 à 2007, la quantité de composés en vert est estimée en pourcentage par rapport en 2007 et le coût par entité (en orange) est estimé en pourcentage par rapport à 1998. (7)**

Toutes ces évolutions au cours des 15 années de développement depuis les premières utilisations font que 3 générations de HTS peuvent être distinguées. La première était très similaire au criblage qui était effectué dans les laboratoires dans les années 1980 mais avec une capacité beaucoup plus importante. La deuxième génération a développé des tests spécifiques et des outils dédiés pour optimiser le criblage en utilisant la miniaturisation et la robotisation. La génération actuelle travaille sur l'optimisation de la stratégie pour rechercher des leads appropriés (des échantillons de 50 000 composés sur des bibliothèques d'1 million) et sur la validation des résultats en s'appuyant sur de forts outils de contre criblage et statistiques.

Fin 2003, il a été estimé que depuis sa mise en place cette approche a généré 74 leads utilisés en phase de recherche clinique et 2 nouveaux médicaments mis sur le marché. 20 ans après sa mise en œuvre l'HTS est devenu universel dans l'industrie pharmaceutique comme première et principale approche pour identifier de nouvelles cibles. Cette approche constitue maintenant un marché de près de 1 milliard de dollars et est utilisée dans de nombreux domaines allant de la recherche de nouveaux médicaments à la recherche de pesticides en passant par la cosmétique et la toxicologie.



## 1.2 Principe

Pour fonctionner, un système *HTS* a besoin d'une bibliothèque de composés, de techniques qui sont automatisées et testent les composés de la bibliothèque sur la cible, un traitement de collectes et un traitement des données (8); (9).

### Bibliothèques de composés

La composition et la gestion des bibliothèques de composés est un aspect majeur du criblage (9). Assembler une bibliothèque coûtant très cher, les grandes entreprises ont donc créé des groupes centralisés pour stocker et gérer ces bibliothèques. Les bibliothèques dans l'industrie pharmaceutique dépassent le million de composés. Cette évolution résulte d'une volonté d'accroître ces collections pour accroître la diversité et la nouveauté des composés. Les grandes entreprises doivent donc gérer plus d'un million d'échantillons sous formes de poudres diluées dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). La quantité pouvant aller de quelques milligrammes jusqu'à plusieurs kilogrammes, la technique classiquement utilisée est de stocker les échantillons dans des flacons normalisés portant un code barre pour permettre une automatisation. Pour les composés possédés en plus grande quantité un autre récipient de plus grande taille non standardisé contiendra le reste du produit.

Les composés sont ensuite pesés à partir de ces flacons pour être dilués dans le DMSO dans d'autres flacons standardisés ou directement dans les plaques utilisées dans le criblage

La nouvelle génération d'*HTS* se base sur une utilisation plus ciblée de ces bibliothèques. L'augmentation des connaissances sur les familles cibles a permis de créer des bibliothèques ciblées qui regroupent des composés en fonction de l'affinité de liaison prévue aux principaux domaines d'une classe cible.

Exemple : une bibliothèque focalisée sur les récepteurs à la protéine G (RCPG) sera composée des ligands et des sites allostériques connues. Les bibliothèques composées des ligands et sites connus sont plus petites, de 5000 à 25 000 composés et peuvent être criblées en peu de temps. L'utilisation d'une bibliothèque complète n'est effectuée que si l'approche avec une bibliothèque ciblée n'a pas fonctionné et économise donc du temps et de l'argent.

Cette segmentation des bibliothèques joue aussi un rôle dans le stockage des composés qui ne sont plus tous stockés au même endroit mais dans différentes unités de stockage autonomes passant donc du million à des unités de 10 000 à 200 000 composés. L'utilisation permet de se passer d'unités d'automatisation de très grandes tailles et de pouvoir ajouter ou soustraire des unités de stockage en fonction des besoins permettant une approche beaucoup plus souple et dynamique des bibliothèques. Ces unités de stockage modulaires sont gérées par des logiciels tel que *comPOUND* de TTP Labtech, *Sample Store II* de Brooks ou *Sample Vault* de HiRes Bio.

## Techniques de criblages

La miniaturisation et l'augmentation nécessaires du débit de criblage a amené à s'éloigner des techniques de tests classiques effectués par une personne dans des tubes à essais. Ces tests nécessitaient des séparations, des lavages et mesuraient des changements d'intensité de fluorescence ou des mesures par marquage radioactif.

Pour effectuer correctement un criblage, il faut utiliser plusieurs technologies ou approches pour atteindre l'objectif de trouver un lead ou une molécule thérapeutique. Ces techniques doivent être très reproductibles et très robustes tout en étant automatisables.

Pour effectuer efficacement un criblage il vaut mieux utiliser différents types de tests et donc avoir un panel de techniques large. Les tests principalement utilisés pour un criblage à haut débits sont les suivants (10) :

- **Dosage par mesure de la fluorescence**
- **Dosage de la scintillation par proximité** : Des billes appelées fluomicrosphères contiennent un scintillant ( $^3\text{H}$  ;  $^{125}\text{I}$ ). Ces billes sont fabriquées pour se lier à une molécule spécifique. Si une molécule radioactive se lie à la bille, elle est suffisamment proche pour stimuler le scintillant qui émet une lumière (11).

- **Dosage immunologique par polarisation de fluorescence** : Une molécule fluorescente stimulée par une lumière polarisée émet une lumière polarisée dans le même plan. La durée de fluorescence et le taux de rotation dépendent de la taille de la molécule. Lorsque la molécule se lie à une autre molécule le mouvement de rotation change et entraîne une modification de l'intensité. Cette modification peut être dosée (12).
  
- **Transfert d'énergie par résonance de fluorescence** : Cette technique permet de déterminer si deux molécules fluorophores sont à proximité l'une de l'autre en excitant une des molécules à sa longueur d'onde et en lisant à la longueur d'onde de l'autre (13).
  
- **Alphascreen®** : Cette technique commercialisée par PerkinElmer® se base sur un appariement de billes chimio-luminescentes. Deux molécules sont à proximité. L'une est greffée à une bille donneuse et l'autre à une bille accepteuse. Le donneur est excité à 680 nm, il convertit le dioxygène ambiant en oxygène. Ce singulet a une demi-vie très courte dans un environnement aqueux et peut parcourir 200nm. Si la molécule accepteuse se trouve dans ce rayon elle émet une lumière entre 520 et 620 nm (14) .
  
- **Criblage à haut contenu** : Des microscopes automatisées et des analyseurs d'images analysent des changements de localisation tels que la translocation, l'internalisation des récepteurs, le trafic intracellulaire, la prolifération des neurites (15).
  
- **Protein complementation assay** : Deux moitiés d'apoprotéine active, fluorescence ou enzymatique, sont clonées sur deux protéines différentes et deviendront actives si les deux protéines interagissent ensemble (16).
  
- **La microfluidique** : Cette technique consiste à manipuler les fluides avec une dimension de l'ordre du micromètre. Cette miniaturisation permet de fabriquer des puces qui peuvent analyser des petites quantités de protéines. Plusieurs puces peuvent être installées en parallèle pour augmenter le débit de criblage (17).

- **Cytométrie en flux** : A la base développée pour étudier les cellules puis adaptée pour les molécules. Les molécules passent à grande vitesse devant le faisceau d'un laser. La lumière réémise permet de déterminer différents paramètres (tailles, structure, ...). Avec un logiciel adapté, il est possible de déterminer si des molécules sont liées à la cible et cela sert d'outil de criblage. (18)

Les tests de criblages sont divisés en deux catégories, les tests basés sur des cibles ou les tests basés sur le phénotype (9) ; (10). Dans les tests basés sur les cibles une protéine jouant un rôle dans la pathologie est identifiée et sélectionnée comme cible. La protéine cible est ensuite analysée en mesurant les interactions de cette protéine avec les composés de la bibliothèque ou en mesurant des signaux de sorties exprimant cette protéine en présence des composés. Dans la deuxième catégorie, les tests phénotypiques, une cellule cible ou une voie métabolique jouant un rôle dans la physiopathologie est sélectionnée. Les changements dans les caractéristiques cellulaires (morphologie, nombre de cellules) ou dans les voies métaboliques (glycogénèse, apoptose, adénosine monophosphate cyclique) sont ensuite mesurées.

Toutes ces techniques permettent de couvrir la plupart des besoins en *HTS* pour découvrir un *hit*. Elles possèdent chacune leurs avantages et leurs faiblesses résumés dans le tableau 1.

**Tableau 1 Différentes méthodes de criblages**

<b>Techniques</b>	<b>Cibles</b>	<b>Avantages</b>	<b>Limites</b>
<b>Dosage par mesure de la Fluorescence</b>	Cellules, peptides, protéines	Simple, prix	Hauts taux d'interférences dus à la fluorescence
<b>Dosage de la scintillation par proximité (11)</b>	Interactions récepteur ligand, cinétique enzymatique	Pas besoin d'ajouter de la fluorescence, polyvalent, pas d'étape de séparation ; étude cinétique	Radioactif, nécessité de traiter les déchets
<b>Dosage immunologique par polarisation de fluorescence (12) (19)</b>	Interactions récepteur-ligand, interaction protéine-protéine,	Rapide et simple à mettre en place, précis ; reproductible,	Nécessite un lecteur spécialisé, interférence avec les composés fluorescents,
<b>Transfert d'énergie par résonance de fluorescence (13) (20)</b>	Interactions récepteur-ligand, interaction protéine-protéine, cinétique enzymatique	Non radioactif, peut être lu de façon ratiométrique, large gamme de protéines fluorescentes	Interférences dues à la fluorescence, sensible à la distance d'interaction, sensible aux changements de l'environnement local (pH ; température ...) ; faible rapport S/B
<b>Alphascreen® (14)</b>	Interactions récepteur-ligand, interactions protéine-protéine,	Peu d'interaction fluorescentes, possibilité de fixer sur les billes un grand nombre de protéine, sensible, facile d'utilisation, polyvalent	Interférences par les réactifs chélateurs, nécessité d'acheter les kits.
<b>Criblage à haut contenu (15)</b>	Translocation, internalisation des récepteurs, trafic intracellulaire, prolifération des neurites et la toxicité	Peu d'interférences, évaluation simultanée de la toxicité, mesures multiparamétriques	Complexe, débits plus faible
<b>Protein complementation assay (16)</b>	Interactions protéine-protéine ; interactions protéine, récepteur-ligand ; cinétique enzymatique	Possibilité de l'utiliser de façon enzymatique ou fluorescente, étude cinétique	Interférences si utilisation de la fluorescence, possibilité de mal interpréter le nombre d'interaction
<b>La microfluidique (17)</b>	Interactions récepteur-ligand, interactions protéine-protéine ; cinétique enzymatique	Précision, exactitude, faibles taux de faux positifs et de faux négatifs, très faibles taux d'interférences	Complexité, pas présent dans le marché du criblage
<b>Cytométrie en flux (18)</b>	Interactions récepteur-ligand, interactions protéine-protéine ; cinétique enzymatique	Peu d'interférences, évaluation simultanée de la toxicité, mesures multiparamétriques, miniaturisé	Débit, complexité de l'instrumentation

### 1.3 Avantages et limites du criblage à haut débit

Le criblage à haut débit a plusieurs avantages. Cette approche a permis de remplacer les tests manuels en laboratoire pour chaque composé qui étaient fastidieux et longs. Un des autres avantages est de pouvoir automatiser les tests et d'effectuer en parallèle plusieurs tests et de travailler sur plusieurs composés en même temps permettant de gagner du temps. La quantité nécessaire à chaque test a également été réduite ce qui est important pour les produits disponibles en faible quantité. De plus, cette automatisation a permis de travailler sur davantage de composés et d'augmenter la taille des bibliothèques permettant d'obtenir plus de candidats pour chercher un hit et de pouvoir cribler près de 100 000 composés par jours de façon robuste et répétable.

L'*HTS* même s'il est devenu la méthode de référence pour effectuer le criblage de nouvelles molécules dans l'industrie pharmaceutique présente des limites (21) ;(22). Les molécules criblées en *HTS* présentent un poids moléculaire autour de 500 Da et une forte affinité pour leur cible thérapeutique. Cette affinité se traduit par une constante de dissociation à l'équilibre ( $K_d$ ) propre au complexe protéine/ligand. Cette valeur s'exprime en mol. L<sup>-1</sup>. Plus la valeur du  $K_d$  est faible plus l'affinité entre la molécule et sa cible est élevée. Les molécules trouvées en *HTS* ont un  $K_d$  de l'ordre du nM. Cette forte affinité due à leur grande taille peut amener à une non-spécificité de la molécule pour le site visé sur la cible thérapeutique. Ils vont se fixer sur plusieurs sites de la cible et amener des effets secondaires indésirables pour le patient. De plus, étant de base de grosses molécules il est difficile voire impossible d'optimiser les ligands trouvés et donc difficile d'obtenir le médicament avec l'effet bénéfice/risque le plus élevé. Un autre problème de leur grande taille est qu'elle couvre un très faible pourcentage de l'espace chimique disponible.

Une autre limite du *HTS* est le manque de propriété intellectuelle. Les bibliothèques de composés pouvant être partagées entre plusieurs entreprises rien ne garantit que le *Hit* criblé n'ait pas été déjà découvert. Le taux de découverte de *Hits* grâce au criblage haut débit peut être critiqué, peu de molécules criblées donneront un *Hit* par rapport à l'énorme quantité de produit criblés et étant difficilement optimisables peu donneront encore un candidat médicament. A ces limites il faut aussi tenir compte de l'investissement important nécessaire à la mise en place du *HTS* ne pouvant être supporté que par des grosses entreprises (21).

Le *HTS* comme toute approche a ses avantages et ses défauts et de nouvelles approches doivent être développées pour pouvoir venir en renfort aux besoins de la découverte de nouveaux *Hits* qui ne seraient pas découverts par le *HTS*. Le Fragment Based Drug Design est une de ces nouvelles approches.

## 2. Le *Fragment Based Drug Design*

### 2.1 Historique

Le *FBDD* est mentionné pour la première en 1996 par les laboratoires Abbott (23). Dans leur article ils montrent la détection et le classement de petit ligand à faible affinité en utilisant une approche relation structure par résonance magnétique nucléaire. Cependant, la première utilisation du terme « *fragment based drug discovery* » ne date que de 2002 par Murray et Verdonk mais deviendra le terme le plus utilisé par les chercheurs comme mots clefs en 2009 suivit par « *Fragment based drug design* ». Le terme *discovery* est plus utilisé pour parler d'un nouveau candidat médicament ou médicament tandis que *design* est utilisé pour décrire les approches pour découvrir un nouveau médicament. En 2016 l'utilisation de l'abréviation *FBDD* comme mot clef est préféré au terme complet.

Dans les premières années, après sa première démonstration par Abbott, la plupart des articles ont été publiés par des chercheurs de l'industrie, chose rare car souvent une rétention de l'information du milieu privé est observée pour garder un avantage concurrentiel et ce n'est qu'à partir des années 2010 qu'il y a eu une augmentation des publications universitaires sur le *FBDD*. L'importance du secteur privé peut aussi être observée par la présence de 9 articles de chercheurs privés dans les 10 articles les plus cités dans ce domaine de recherche (23) ; ces articles sont listés dans le tableau 2



Tableau 2 Les 10 articles les plus cités en FBDD

Rang	Auteurs	Titre	Journal	Affiliation	Année	Nombre de fois citées
1	Shuker, S.B., Hajduk, P.J., Meadows, R.P., Fesik, S.W	Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR (24)	Science	Abbot Labs	1996	454
2	Hopkins, A.L., Groom, C.R., Alex, A.	Ligand efficiency: a useful metric for lead selection (25)	Drug Discovery Today	Pfizer	2004	403
3	Hajduk, P.J., Greer, J.	A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned (26)	Nature Review Drug Discovery	Abbot Labs	2007	353
4	Congreve, M., Carr, R., Murray, C., Jhoti, H.	A rule of three for fragment-based lead discovery? (27)	Drug Discovery Today	Astex	2003	342
5	Congreve, M., Chessari, G., Tisi, D., Woodhead, A.J.	Recent developments in fragment-based drug discovery (28)	Journal of Medicinal Chemistry	Astex	2008	290
6	Hann, M.M., Leach, A.R., Harper, G.	Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery (29)	<i>Journal of Chemical Information and Computer Science</i>	GlaxoSmithKline	2001	287
7	Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J.	Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings (30)	Advanced Drug Delivery Reviews	Pfizer	1997	286
8	Rees, D.C., Congreve, M., Murray, CW., Carr, R	Fragment-based lead discovery (31)	Nature Review Drug Discovery	Astex	2004	275
9	Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E.	The Protein Data Bank (30)	Nucleic Acid Research	Rutgers University, National Institute of Standards and Technology, Burnham Institute, University of California, San Diego	2000	257
10	Erlanson, D.A., McDowell, R.S., O'Brien, T.	Fragment-based drug discovery (22)	Journal of Medicinal Chemistry	Sunesis	2004	219

C'est du privé que viennent certains des grands principes du *FBDD* comme le principe du *Ligand Efficiency* (LE) par Hopkins et ses collègues qui travaillaient chez Pfizer ou le travail de Hann et al chez GlaxoSmithKline qui a défini que les fragments devaient être des petites et simples molécules et qui aboutira plus tard à la règle des 3. Cependant depuis 2009 la tendance s'inverse et le milieu universitaire redevient un acteur important du développement du *FBDD*. En effet 7 des articles les plus cités à partir de 2010 sont des articles universitaires, ces articles sont listés dans le tableau 3.

**Tableau 3 Listes des articles les plus cités sur le FBDD depuis 2010**

<b>Rang</b>	<b>Institution</b>	<b>Nombre de fois citées</b>
1	Université d'Oxford	368
2	Université de Cambridge	348
3	GlaxoSmithKline	304
4	Astex	232
5	Université de Californie, San Francisco	156
6	AstraZeneca	139
7	Heptares	120
8	Pfizer	110
9	Cancer Research UK	105
10	Université de Dundee	104

Pour son développement le *FBDD* a particulièrement profité de l'industrie pharmaceutique même si la plupart des bases théoriques viennent du milieu universitaire des années 70 (Brandeis). Les laboratoires Abbott ont eu un grand impact en développant la technique de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) mais aussi en développant un criblage de ligand par cristallographie aux rayons X permettant d'étudier la structure des ligands. Ces nouvelles technologies biophysiques permettent de mesurer et visualiser la liaison de fragment de faible affinité. Une fois les bases du *FBDD* lancées en 1996 des petites sociétés tel que Astex, Vertex et Sunesis joueront un rôle important dans le développement de cette approche au début des années 2000.

Elles vont se spécialiser dans des technologies et approches du *FBDD*. Elles perfectionneront ces approches pour la recherche de *leads* et elles obtiendront des résultats sans avoir à investir des millions dans les bibliothèques de composés et dans les systèmes robotisés nécessaires au criblage à haute densité.

A partir des années 2000 une collaboration entre le milieu privé et universitaire a lieu et le *FBDD* est appliqué à davantage de cible. En 2006 tous les grands groupes pharmaceutiques repensent leur bibliothèque et

intègrent les fragments. Le domaine du *FBDD* s'est développé en même temps que le paysage de la recherche pharmaceutique. Les grandes entreprises sous-traitent une quantité croissante de travaux précliniques et le *FBDD* prend sa place car il nécessite moins d'investissement que le *HTS*. Depuis 1996 grâce au *FBDD* plus de 30 principes actifs ont été développés et sont en phases cliniques. Certains sont dans leur dernière phase clinique. En 2015 une dizaine était en phase clinique 2 et 14 en phase 1. Actuellement un médicament découvert grâce au *FBDD* est sorti sur le marché, le Vemurafenib qui est un anticancéreux utilisé dans la prise en charge de mélanomes malins non résecables ou métastasés avec une mutation BRAF V600. Le Vemurafenib est une substance de bas poids moléculaires (489 Da) qui inhibe la sérine thréonine kinase BRAF. Une mutation du gène BRAF, la substitution de la valine par un autre acide aminé en position 600 active les protéine BRAF et entraîne une prolifération cellulaire. Cette méthode de criblage s'inscrit donc comme une véritable alternative au *HTS*.

## 2.2 Principe

Le *Fragment Based Drug Design* est basé sur la découverte de petits fragments qui serviront de hits et à terme à donner un candidat médicament (21) ; (22). Pour définir ce qu'est un fragment les chercheurs d'Astex ont défini la règle de 3. Un fragment doit posséder :

- Un poids moléculaire inférieur à 300 Da
- Un nombre d'hydrogène donneur ou accepteur inférieur à 3
- Un coefficient de partage octanol/eau inférieur à 3

Cette classification n'est que qu'une ligne directrice et certains vont définir la limite de poids moléculaire à 250 ou 350 Da et d'autres ne considèrent pas les donneurs ou les accepteurs de protons.

Un autre point important et caractéristique de ces fragments dû à leur petite taille est leur faible affinité avec la cible. Le  $K_d$  d'un fragment pour sa cible est compris entre le  $\mu\text{M}$  et le  $\text{mM}$  et cette faible affinité est spécifique d'un site de la cible thérapeutique. La petite taille du fragment minimise l'apparition d'effets secondaires car il ne se fixe que sur un site thérapeutique contre plusieurs pour un composé de taille plus importante. Cette action thérapeutique en minimisant l'apparition d'effets secondaires est un bénéfice non négligeable.

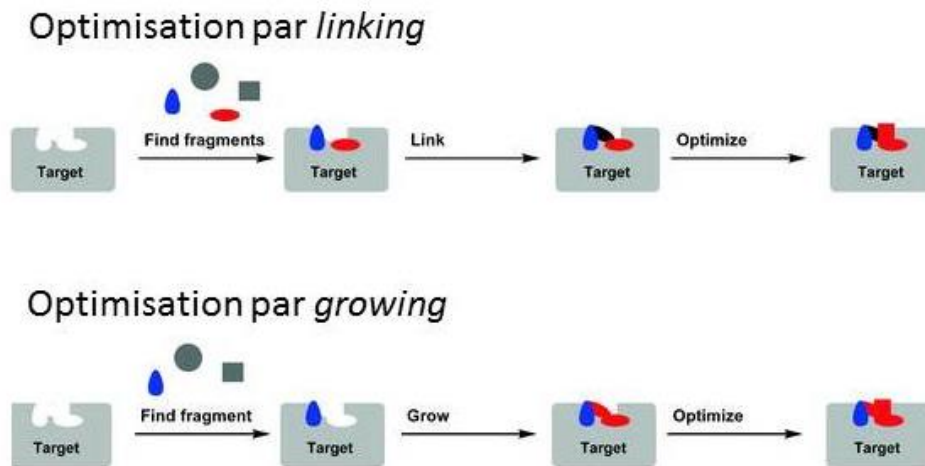
Une autre valeur utilisée dans la littérature pour mesurer cette faible affinité est le : *ligand efficiency* ou LE. Cette valeur est définie par la relation ci-dessous.

$$LE = \frac{\text{Energie libre de liaison du ligand}}{\text{nombre d'atome lourd}}$$

L'énergie libre est exprimée en kilocalories par moles ( $\text{Kcal.mol}^{-1}$ ) et dépend de la température et de la constante de dissociation  $K_d$ . Le nombre d'atomes lourds correspond lui au nombre d'atome non-hydrogène du ligand. L'avantage de cette valeur est sa simplicité à être calculée.

Il existe plusieurs techniques pour détecter la faible affinité entre les fragments et la cible thérapeutique et identifier les fragments qui sont spécifiques et sélectifs à cette cible. Les 3 méthodes les plus utilisées pour cribler des bibliothèques de fragments sont la RMN, la cristallographie aux rayons X et la résonance plasmonique de surface .

Une fois un fragment identifié contrairement au *HTS* il est possible d'optimiser ce fragment. Cette optimisation a pour but d'augmenter son affinité pour la cible et d'augmenter son *LE*. Deux approches d'optimisation sont possibles (Figure 3) :



**Figure 3** Deux techniques d'optimisation en *FBDD*: *Linking*, liaison entre plusieurs fragments de faibles affinités pour former un ligand avec une forte affinité. *Growing*, le fragment est agrandi progressivement pour créer de nouvelles interactions avec la protéine.

- Le *linking* qui consiste à associer entre eux plusieurs fragments qui se lient sur des sites voisins pour obtenir un ligand avec une forte affinité pour la protéine mais avec une interaction spécifique aux sites des fragments.
- Le *growing* qui consiste à faire croître progressivement un seul fragment pour augmenter les interactions avec la protéine

Ces deux approches permettent d'optimiser le fragment découvert et il n'est pas rare que les deux approches soient utilisées sur le même fragment.

## 2.3 Avantages et limites

La découverte de fragments de faible affinité comme hits présente plusieurs avantages. Leur petite taille permet d'avoir des molécules spécifiques et pouvant être optimisées, ce qui à terme permet d'avoir des candidats ayant l'effet thérapeutique voulu en minimisant l'apparition d'effets secondaires. De plus étant petits et peu complexes la probabilité de trouver une relation avec la cible est augmentée car en grossissant et en se complexifiant chaque élément augmente la probabilité d'interférer avec la liaison. Le *FBDD* peut aussi être appliqué à des nouvelles classes ou de nouvelles cibles comme les interactions protéines-protéines. Un autre des avantages est la taille plus réduite de bibliothèques de fragments. Cependant même si les bibliothèques sont plus réduites, les fragments couvrent un espace chimique plus important et permettent un criblage plus efficace. Cribler 1000 fragments revient à cribler une bibliothèque classique.

Le *FBDD* peut réussir là où le *HTS* a échoué et venir compléter la panoplie d'outils des chercheurs.

Le *FBDD* n'est pas une technique miracle. Il requiert des méthodes plus sensibles que le *HTS* pour pouvoir mesurer des faibles activités ce qui nécessite de travailler avec de haute concentration et demande une grande quantité de protéines ce qui peut être problématique et coûteux. Un autre problème est que les fragments sont souvent hydrophobes et peuvent être compliqués voire impossibles à diluer dans un tampon biologique ce qui est contraignant dans leur manipulation et engendre des problèmes pour la galénique. Les bibliothèques de fragments sont majoritairement constituées de molécules commerciales manquant un peu de diversité mais de nombreuses équipes travaillent sur l'étoffement de ces bibliothèques.

## II. La Chromatographie d'affinité.

### 1. Historique

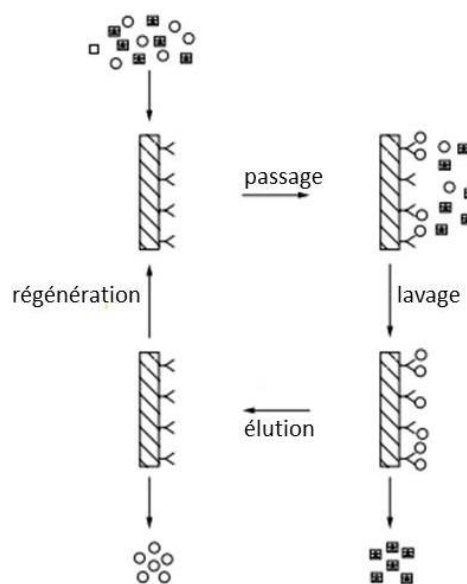
La chromatographie d'affinité est une ancienne méthode de chromatographie liquide (34). La première utilisation de la chromatographie d'affinité est en 1910 par Emil Starckenstein pour examiner la liaison de l'amidon à l'enzyme  $\alpha$ -amylase (35). Cette utilisation survient seulement 7 ans après la première utilisation de chromatographie liquide sur colonne. Les premières applications utilisaient des matières insolubles qui servaient simultanément de phase stationnaire et de support comme pour l'amidon insoluble utilisé par Starckensteins ou l'utilisation de polygalacturonase comme support et ligand pour purifier l'acide alginique. Les premiers travaux travaillaient donc essentiellement dans la purification d'enzymes.

En 1920 Landsteiner montre que les anticorps peuvent reconnaître et lier des structures appelées antigènes. En 1930 se développe l'immunoprécipitation comme technique de purification d'anticorps ou l'antigène sert d'agent liant pour se lier spécifiquement à une cible d'intérêt, l'anticorps. Cependant, cette fois l'agent liant est différent du support et est seulement lié dessus. Dans les années 40 le développement des techniques de synthèse pour lier le ligand au support a permis d'augmenter la gamme de ligand utilisable.

La grande gamme de ligand disponible permet un grand domaine d'application de cette méthode et elle est utilisée notamment en biochimie, dans les sciences pharmaceutiques et même les études cliniques.

## 2. Principe général

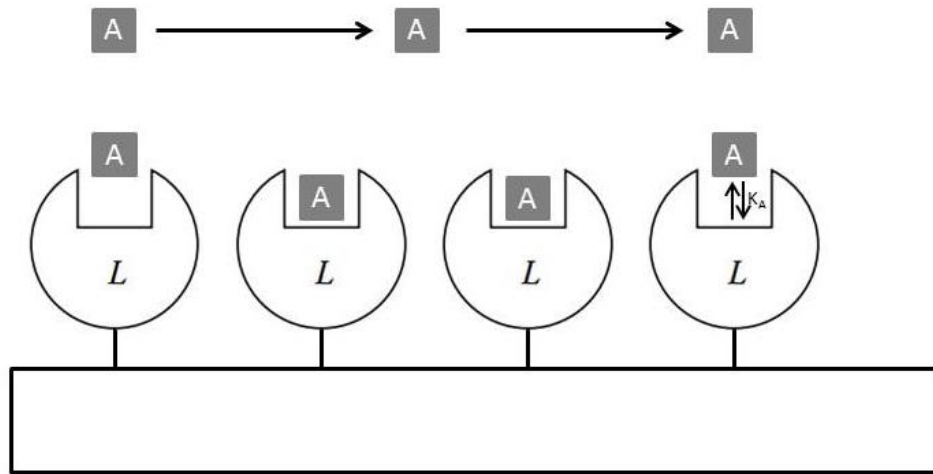
La chromatographie d'affinité est une forme de chromatographie liquide très polyvalente (34). Elle peut être définie comme de la chromatographie liquide qui utilise un agent liant pour purifier ou analyser des composés dans des échantillons. Cette technique utilise les capacités d'interactions réversibles qu'on trouve dans divers systèmes biologiques comme les interactions entre les enzymes et leurs substrats ou encore entre les anticorps et les antigènes. L'utilisation de cette interaction se fait en fixant sur un support dans la colonne un des deux composés responsables de l'interaction. Le composé fixé est alors appelé ligand d'affinité et constitue la phase stationnaire de la colonne. Après utilisation, la phase stationnaire peut être régénérée en lavant la colonne avec un tampon qui va élué le composé qui interagit avec le ligand d'affinité. Cette réversibilité des réactions d'affinités permet de séparer les composés et de pouvoir réutiliser les colonnes (figure 4).



**Figure 4 Principe chromatographie d'affinité**

Quand la chromatographie d'affinité est utilisée pour étudier les interactions entre deux ou plus d'espèces chimiques plutôt que pour les séparer ou les purifier, elle est alors appelée chromatographie d'affinité quantitative, chromatographie d'affinité analytique ou encore biochromatographie (36). En examinant le temps ou le volume d'éluion, il est possible de déterminer la constante d'équilibre qui décrit la liaison du composé avec le ligand d'affinité (figure 5).





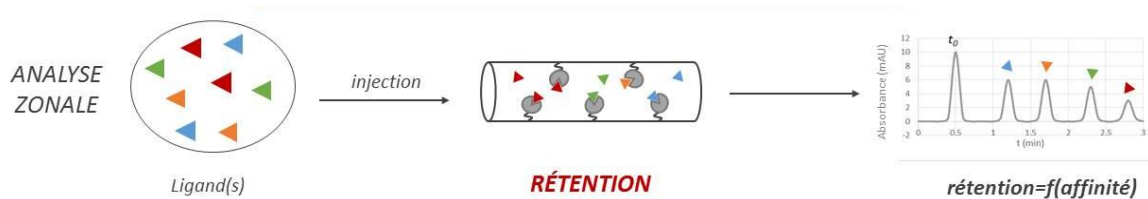
**Figure 5 Liaison soluté ligand, A est le composé injecté, L le ligand fixé sur la colonne et  $K_A$  est la constante d'équilibre de la liaison entre A et L**

Un des avantages de cette méthode est le fait de pouvoir réutiliser la même préparation de cible pour plusieurs expériences. Cette réutilisation permet de consommer peu de cible, ce qui est recherché surtout quand elle est disponible en faible quantité comme dans le cadre d'une nouvelle cible thérapeutique.

Il existe deux modes d'éluion en chromatographie d'affinité -l'analyse zonale classique et l'analyse frontale- qui vont être privilégiées en fonction de la nature des informations recherchées. Le mode zonal est utilisé en screening avec l'injection de plusieurs fragments pour déterminer s'il y a de l'affinité lors de l'éluion (l'éluion des fragments est d'autant plus retardée qu'ils présentent une forte affinité). L'analyse frontale consomme plus de fragments mais permet de mesurer quantitativement cette affinité. Ces deux méthodes sont décrites ci-dessous.

## 2.1 Analyse Zonale : Criblage des fragments

En analyse zonale, une injection de faible volume de solution contenant un ou plusieurs fragments (ligands) de concentration connue est réalisée. En couplage avec un spectromètre de masse, le fragment est identifié par son ratio m/z et son facteur de rétention est directement relié à son affinité relative pour la cible. Plus il est retenu plus il a d'affinité avec la cible (figure 6).



**Figure 6 Principe du mode Zonal**

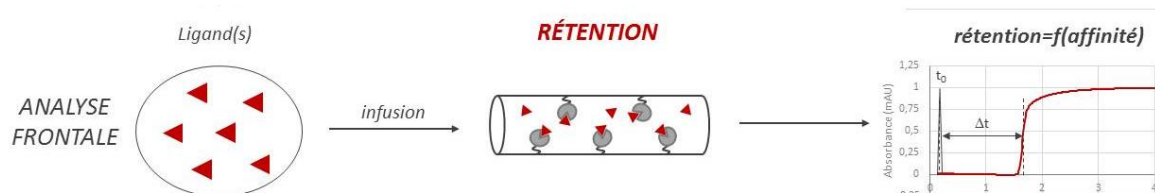
Dans la partie linéaire de l'isotherme d'adsorption, c'est-à-dire dans des conditions où le facteur de rétention est ( $k$ ) indépendant de la concentration en ligand (ce qui est vrai si cette concentration est largement inférieure au  $K_d$ ), en déterminant le facteur de rétention  $k$  où  $k = \frac{t_{fragment} - t_{mort}}{t_{mort}}$  et en connaissant le nombre de sites actifs sur la colonne il est possible de déterminer le  $K_d$  du ligand grâce à l'équation 1:

$$k = \frac{B_{actif}}{V_{mort}} \times \frac{1}{K_D} \quad (1)$$

Avec  $k$  le facteur de rétention,  $K_d$  la constante de dissociation cible/ligand,  $V_{mort}$  le volume mort de la colonne et  $B_{act}$  la quantité de sites actifs dans la colonne.

## 2.2 Analyse frontale : quantification des interactions et caractérisation des colonnes

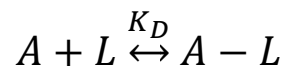
La chromatographie en analyse frontale est la deuxième technique de chromatographie quantitative la plus utilisée. En analyse frontale, une solution contenant une concentration connue d'un ligand est infusée en continu sur la colonne. Le soluté se lie à la protéine cible immobilisée sur la colonne jusqu'à saturation. A saturation, la concentration en sortie de colonne augmente progressivement jusqu'à atteindre un maximum : courbe de percée (figure 7). Lorsqu'il y a affinité, le volume de percée est d'autant plus élevé que la concentration en fragment infusée est faible. L'absorbance, elle, va augmenter proportionnellement avec la concentration de la solution.



**Figure 7 Principe du mode Frontal**

Si la cinétique d'association protéine-ligand est rapide, la courbe de percée est liée à la concentration de la solution mais aussi à la quantité de protéine cible fixée sur la colonne et aux constantes de dissociation soluté cible. Cette méthode permet de mesurer l'affinité et le nombre de sites de liaison en mesurant le temps d'apparition de la courbe de percée avec des solutions de concentrations différentes. De ces données un système d'équation est déterminé.

Pour un modèle de liaison type :



Avec A la protéine cible et L le ligand. Les relations suivantes sont déterminées par l'équation 2:

$$q = \Delta t \times D \times [L] \quad (2)$$

Avec q la quantité d'analyte capturée,  $\Delta t$  l'écart entre la courbe de percée et le temps mort, D le débit et [L] la concentration de la solution en ligand.

En traçant  $1/q$  en fonction de  $1/[L]$  (équation 3) il est possible d'obtenir la quantité de sites actifs de la colonne et de trouver le  $K_d$  du ligand (figure 8).

$$\frac{1}{q} = \frac{K_d}{Bact} \times \frac{1}{[L]} + \frac{1}{Bact} \quad (3)$$

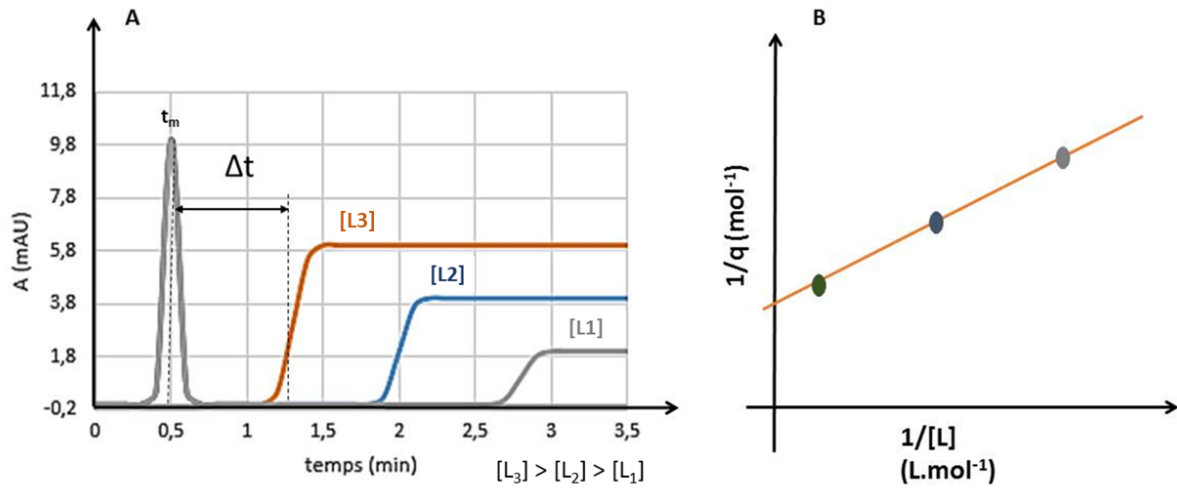
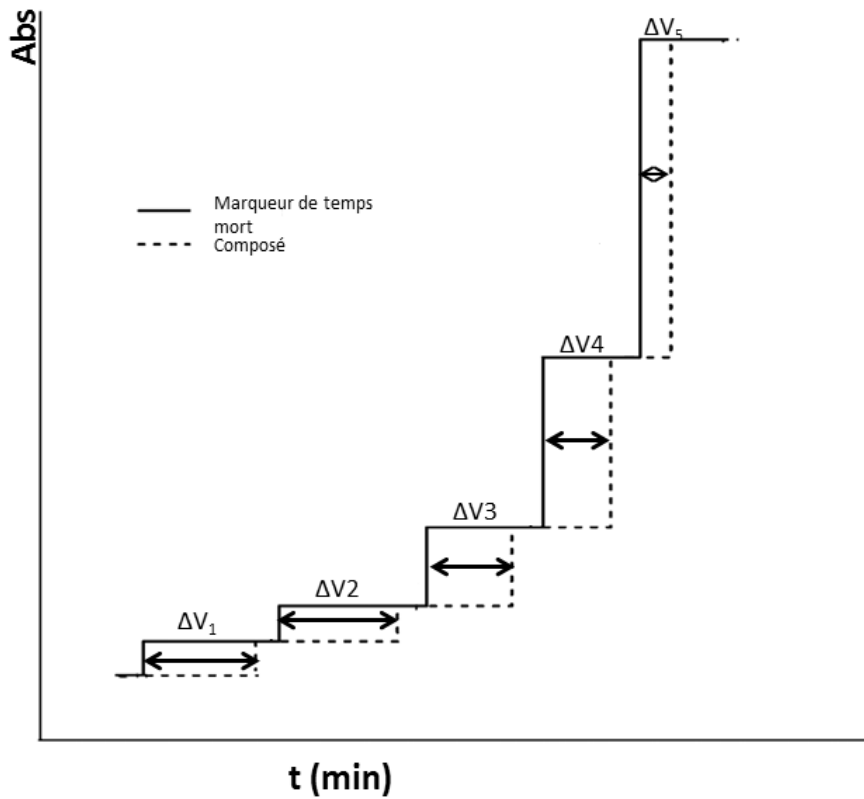


Figure 8 A : Courbe de percée en fonction de la concentration, B : Droite  $1/q=f(1/[L])$

Après l'analyse d'une solution en chromatographie d'affinité frontale, il faut rincer abondamment la colonne pour enlever le ligand qui s'est associé à la cible avant de pouvoir percoler une nouvelle solution de concentration différente. Si l'on veut pouvoir s'affranchir des durées de rinçage entre la percolation de chaque concentration différente, il est possible de réaliser une analyse frontale en mode *staircase*.

La méthode d'analyse frontale dite *staircase* permet de s'affranchir des étapes de rinçage : les solutions de concentrations croissantes sont percolées à la suite sans rincer (36) (37) (38). Avec cette méthode, seul un rinçage après la dernière concentration est nécessaire (figure 9).



**Figure 9 Principe du Staircase**

La quantité de ligand capturée lors du passage sur la colonne est exprimée par l'équation 4:

$$q_n = \Delta V_n \times (C_n - C_{n-1}) \quad (4)$$

Avec  $q_n$  la quantité de ligand capturé pour la concentration  $n$ ,  $\Delta V_n$  l'écart entre le volume mort et le volume de percée pour la concentration  $n$ ,  $C_n$  la concentration  $n$  et  $C_{n-1}$  la concentration précédente.

Il n'y a pas de rinçage entre chaque passage, la quantité capturée est donc cumulée à chaque passage selon l'équation 5 :

$$q_b = (q_n + q_a) \quad (5)$$

Avec  $q_b$  la quantité cumulée pour la concentration  $n$  ;  $q_n$  la quantité calculée avec l'équation précédente pour la concentration  $n$  et  $q_a$  la quantité cumulée précédente.

$1/q_{\text{cumulée}}$  est ensuite exprimé en fonction de  $1/[L]$  et on trace la droite  $1/q_{\text{cumulée}} = f(1/[L])$ . Cette droite permet ensuite comme précédemment de retrouver la valeur du  $K_d$  et la quantité de sites actifs sur la colonne.

## Analyse frontale en mode compétition,

L'analyse frontale peut aussi servir à mesurer la compétition entre différents ligands pour la cible immobilisée et à confirmer le site d'interaction (36) (38). Le temps de percée du ligand est mesuré en fonction de la concentration du compétiteur ajouté à la phase mobile. Une même concentration de ligand est donc infusée avec des concentrations croissantes du compétiteur, dans la phase mobile. La présence du compétiteur se traduit par l'apparition plus rapide de la courbe de percée de façon proportionnelle à la concentration du compétiteur (figure 10). Cette méthode peut aussi mettre en évidence des effets d'allostérie positifs ou négatifs. La courbe de percée apparaîtra plus tardivement dans le premier cas et plus rapidement dans le deuxième.

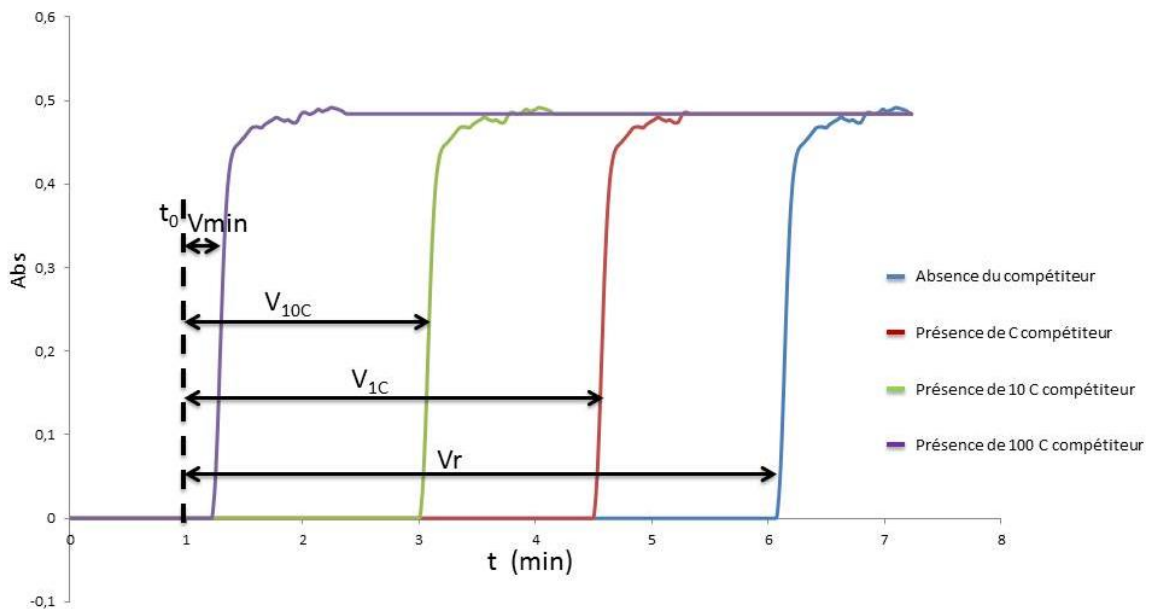


Figure 10 Compétition en analyse frontale

La différence de volume de percée observée en absence de compétiteur et en présence d'une concentration de compétiteur suffisamment forte pour enlever l'affinité de l'analyte est définie par l'équation 6 :

$$(Vr - Vmin) = \frac{B_{act} \times \frac{K_d C}{K_{dA}}}{(K_d C + [C])} \quad (6)$$

Avec Vr le volume de percée sans compétiteur, Vmin le volume de percée avec une grande concentration de compétiteur,  $K_{dC}$  le  $K_d$  du compétiteur,  $K_{dA}$  le  $K_d$  de l'analyte et [C] la concentration du compétiteur.

Avec cette équation, le  $K_d$  de l'un peut être retrouvé par le  $K_d$  de l'autre.

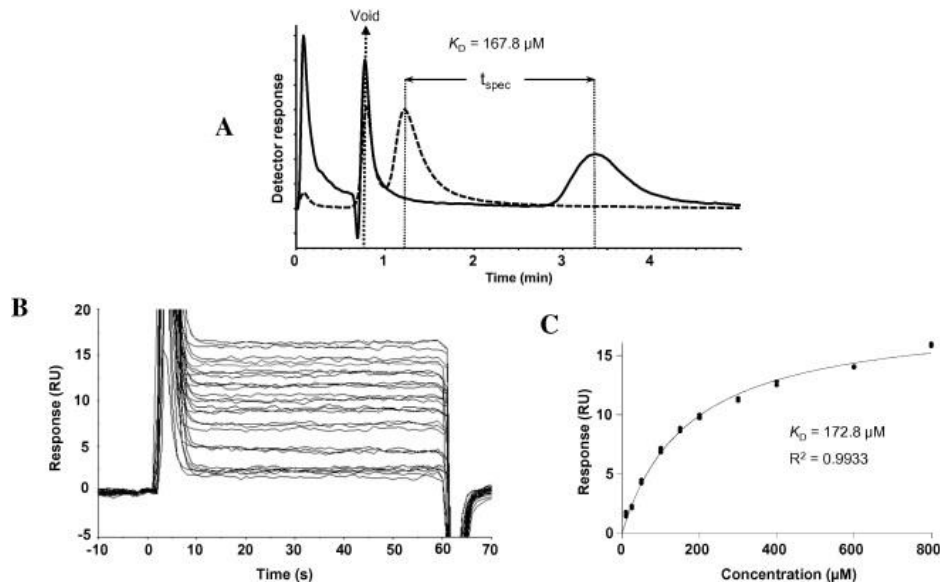
## III. La chromatographie d'affinité utilisé pour le criblage des fragments

Pour identifier les fragments, plusieurs techniques capables de détecter la faible affinité et de cribler des bibliothèques sont disponibles. Les 3 méthodes les plus utilisées sont la RMN (32), la cristallographie aux rayons X et la résonance plasmonique de surface (SPR) (39). Cependant, ces méthodes présentent des inconvénients. La RMN (en mode *ligand observed*) par exemple consomme une quantité importante de protéine (au minimum 150  $\mu\text{L}$  de solution de protéine à  $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) par expérience et ne peut évaluer que 5 à 10 fragments par analyse ce qui augmente le nombre d'expérimentations et le temps de criblage. La SPR, pour laquelle la cible est immobilisée sur un support, consomme une faible quantité de protéine mais ne permet le criblage des fragments que 1 par 1. Chaque méthode présentant ces limitations de nouvelles techniques complémentaires est nécessaire. Une méthode rapide consommant peu de protéine semble être idéale dans la recherche de fragment notamment pour les protéines membranaires car actuellement aucune méthode déjà établie n'est disponible pour les protéines membranaires comme les RCPG. Ces protéines sont disponibles en très petites quantités et nécessitent un milieu mimant la membrane cellulaire. La chromatographie de faible affinité ou *weak affinity chromatography (WAC)* est une nouvelle approche qui a déjà été développée pour le *FBDD* (40) ; (41).

## 1. Applications de la chromatographie de faible affinité au *FBDD*

La chromatographie de faible affinité a déjà été utilisée à l'échelle classique pour le criblage de fragments, notamment sur protéine soluble.

Une application visait à comparer deux méthodes de criblage, la chromatographie de faible affinité et la *SPR*, mises en œuvre pour la recherche de fragments de la thrombine  $\alpha$  humaine (42). Cette comparaison est effectuée sur 27 composés. La colonne utilisée en *WAC* a comme dimension ( $35 \times 0.5$  mm id). Les composés sont passés 1 à 1 pour les deux méthodes. Pour déterminer le  $K_d$  d'un composé la *SPR* nécessite 120 min pour passer 3 fois 10 concentrations. La *WAC* détermine un  $K_d$  en 175 minutes en moyenne. La *SPR* a consommé 25  $\mu$ g de protéine cible alors que la *WAC* 0,5 mg de protéine. Cependant, la *WAC* n'a consommé que 40 pmol de fragment alors que la *SPR* a consommé jusqu'à plus de 60 nmol pour un fragment. La figure 11 montre la détermination d'un  $K_d$  en utilisant la *WAC* et la *SPR*.



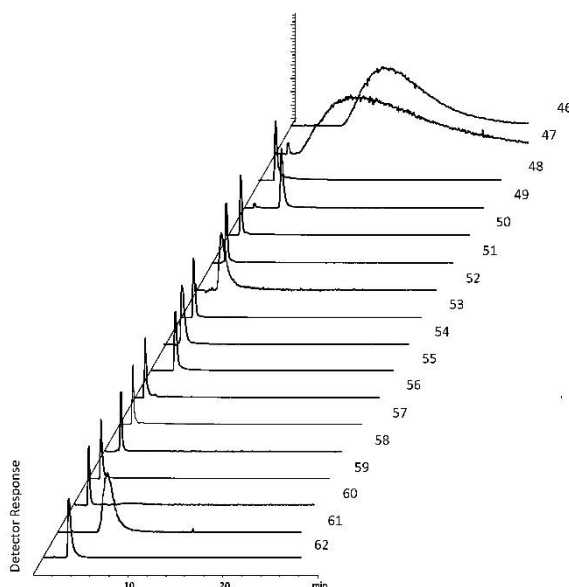
**Figure 11** Détermination de l'affinité de 3-ABA par *WAC* (A) et par *SPR* (B, C) : Pour la *WAC*,  $t_{spec}$  est la différence de temps de rétention de 3-ABA (0,1 mM) sur les colonnes actives (ligne continue) et inhibées (ligne pointillée). Pour le *SPR* (B), des réponses en triple ont été obtenues en soustrayant le canal inhibé in situ du canal actif. Les réponses à l'état d'équilibre résultantes (en triple) sont ajustées à une isotherme de Langmuir (C) afin de calculer  $K_D$ . RU : unité de réponse. (42)

Sur les 27 fragments seulement 13 ont pu être déterminés de façon fiable en *SPR* contre 27 pour la *WAC*. De plus, pour les 13 composés déterminés comme ayant de l'affinité par les deux méthodes les  $K_d$  mesurés sont similaires. Cette similarité s'explique car les mêmes conditions ont été utilisées pour la *WAC* et la *SPR*. Pour conclure, les auteurs disent que la *WAC* et la *SPR* montrent une corrélation significative dans la détermination de  $K_d$  (42). La *SPR* consomme moins de protéine cible et la *WAC*, elle, consomme moins de ligands. Cependant, une optimisation des colonnes ou le couplage à un spectromètre de masse pour cribler



plusieurs fragments permettrait de diminuer la consommation de protéine cible. La WAC reste tout de même très intéressante en cas de faible disponibilité des fragments à cribler.

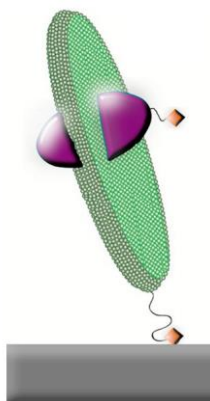
Des études sur la protéine HSP90 qui est un modèle d'étude ont comparé l'utilisation de la WAC pour trouver des fragments aux autres méthodes déjà utilisées (la RMN, la titration calorimétrique isotherme et la SPR) (39). Ces méthodes sont comparées sur 100 fragments. Les colonnes utilisées sont des colonnes en acier de dimension (100 × 0,5 id mm) garnies de particules sphérique de 5 µm de diamètre et de porosité de 300 Å. Trois colonnes ont été produites avec en moyenne 22,4 pmol de protéine greffée dessus. Le système était couplé à un spectromètre de masse. Les 100 fragments ont été criblés par groupe de 16 ou 17 fragments à 0,1 mM avec des injections de 0,4µL. Les analyses sont effectuées en mode zonal. Le criblage de 16 fragments est illustré figure 12.



**Figure 12 Analyse d'un mélange de fragments par WAC en mode Frontal : Chromatogrammes d'un groupe de 16 fragments criblés sur une colonne HSP90 (39)**

Les auteurs concluent que sur les 100 fragments, la WAC a montré une bonne corrélation avec la RMN (88%) et la SPR (83%) (39). Cette technique a montré aussi sa stabilité et la reproductibilité de ses mesures. Le couplage à un spectromètre de masse permet d'augmenter le débit grâce au passage simultané de plusieurs fragments. Pour les auteurs, cette technique présente un grand potentiel pour le criblage de fragments.

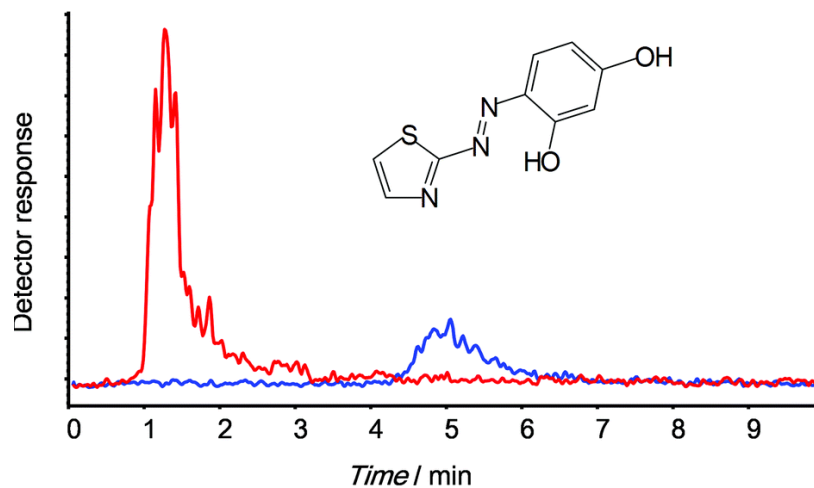
Seule une application a été faite sur une protéine membranaire, l'aquaporine 1 (l'AQP1) dans une membrane biomimétique de type lipodisques (43). Les lipodisques sont composés d'une bicouche lipidique circulaire plane stabilisée par des lipides modifiés par un groupe de tête en polyéthylène glycol (lipides PEGylés). Ces lipodisques peuvent être fixés sur un support de manière stable. Ils sont fixés perpendiculairement au support pour éviter les interactions entre la protéine cible et le support. Les lipodisques sont illustrés figure 13.



**Figure 13 Lipodisque contenant les protéines, greffés perpendiculairement au support (43)**

Les colonnes utilisées sont des colonnes de dimension (35 × 0.5 id mm). Ces colonnes sont remplies par 3,2 mg de silice dont les particules mesurent 10 µm de diamètre avec des pores de 2100 Å. Sur la silice des lipodisques ont été greffés. Des colonnes lipodisques AQP1 et lipodisques vides ont été préparées.

Les auteurs sur une bibliothèque de 200 composés ont trouvé un fragment qui présentait un temps de rétention spécifique supérieur à 0,72 min (3,413 min) et considèrent ce fragment comme un hit. Les résultats pour ce fragment sont illustrés figure 14 (43).



**Figure 14** Chromatogrammes à ions extraits du fragment *Hit* sur la colonne AQP1-lipodisque (en bleu) et sur la colonne de contrôle-lipodisque (en rouge). (43)

Les auteurs ont démontré que si cette application pouvait identifier des fragments pour des protéines membranaires elle montre cependant une limite. Pour pouvoir identifier des fragments avec un  $K_d$  supérieur à l'ordre du  $\mu\text{M}$  la colonne nécessitait une plus grande densité de protéine dans la colonne or ces protéines sont difficiles à obtenir.

## 2. Miniaturiser cette technique pour étudier des fragments membranaires

La miniaturisation de cette technique (nano-WAC) permettrait de réduire la consommation de protéines lors d'un criblage et d'être couplée à la spectrométrie de masse pour cribler plusieurs dizaines de fragments simultanément. Réduire la géométrie des colonnes est un moyen de réduire la consommation de protéines. Les colonnes utilisées pour la WAC sont habituellement des colonnes de dimensions 35 × 2,1 mm. Pour miniaturiser, des tubes de silice fondue de 85 × 0.075 mm ont été choisis. Le volume est plus de 100 fois plus faible et nécessite donc une quantité 100 fois plus faible de protéine à fixer sur la colonne et des plus petits volumes d'analyte, diminuant ainsi leur consommation. Le choix des colonnes, de la protéine cible et du modèle membranaire utilisé pour ce travail sont décrit ci-dessous.

### 2.1 Des capillaires comme colonnes

Pour remplir ces colonnes, les particules de silice classiquement utilisées au format classique sont trop difficiles à incorporer dans le capillaire. Ces particules peuvent être remplacées par des phases stationnaires monolithiques synthétisées in situ, évitant l'étape de remplissage. Les monolithes sont soit à base de silice ou à base de polymère organique (organique (type glycidylméthacrylate/diméthacrylate d'éthylène GMA-co-EDMA). Un monolithe organique a été choisi car il est simple à synthétiser par photopolymérisation dans le capillaire et possède directement des groupements époxyde réactifs qui sont utiles pour pouvoir y greffer des protéines et évitent d'ajouter une étape de fonctionnalisation

## 2.2 Le Récepteur A2A de l'adénosine comme modèle d'étude des protéines membranaires

Les protéines membranaires sont un élément essentiel des cellules. Ces protéines sont responsables de nombreuses voies de signalisation cellulaire. Les protéines membranaires représentent près de 60% des cibles thérapeutiques. Chercher de nouvelles molécules pour agir sur ces protéines est une des principales voies de recherche dans l'industrie pharmaceutique (44).

Parmi ces protéines membranaires, les récepteurs couplés à la protéine G (RCPG) sont une large famille de récepteurs présents dans la membrane et omniprésents dans les tissus humains. Ils jouent un rôle majeur dans la régulation de procédés physiologiques ou physiopathologiques. Leur importance fait qu'ils sont une cible importante pour la recherche pharmaceutique. 35% des médicaments sur le marché agissent directement sur ces récepteurs et de nombreux autres agissent de façon indirecte en modifiant la production, le transport ou le métabolisme de leurs différents ligands. Ces médicaments couvrent un large domaine thérapeutique qui s'explique par cette omniprésence des RCPG. Cependant, seulement 20% des RCPG ont un principe actif associé et sur les 390 identifiés et on ne connaît pas de ligands pour une centaine d'entre eux, qu'on appelle RCPG orphelins.

Une protéine membranaire jouant un rôle dans de nombreux processus connus et étant la cible pour la recherche de futurs médicaments a été choisie dans le but de tester la mesure de l'affinité grâce à la nano-WAC.

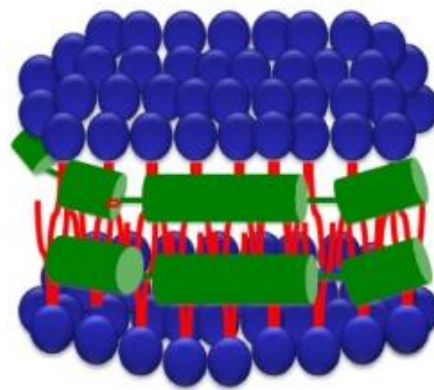
L'adénosine joue un grand rôle dans de multiples processus physiologiques comme la signalisation neuronale, la fonction astrocytaire ou encore dans l'apprentissage, la mémoire l'alimentation, le contrôle du sommeil etc... L'adénosine par son importance possède aussi un grand rôle dans des processus physiopathologiques comme les accidents vasculaires cérébraux, l'épilepsie ou encore la maladie de parkinson. Le récepteur A2A est un des 4 récepteurs à l'adénosine avec les récepteurs A1, A2B et A3 (45) .

Les récepteurs A2A sont principalement localisés dans le striatum, le tubercule olfactif et le noyau accumbens. Ils ont été décrits comme ayant un effet neurodégénératif. Un antagoniste aux récepteurs A2A a montré un effet protecteur ; cet effet est aussi observé avec un antagoniste non spécifique à A2A comme la caféine. Pouvoir trouver des molécules agonistes de ces récepteurs permettrait de moduler ces effets neurodégénératifs et pourrait être un moyen de traiter certaines pathologies neurodégénératives (45) ; (46). Les récepteurs A2A sont donc une cible intéressante dans la recherche de nouveaux médicaments et des ligands connus existent pour cette protéine comme le ZM 241385 (47) qui est un antagoniste de l'A2A réduisant la durée de l'activité épileptique ou le CPCA (48) qui est un agoniste de l'A2A mais n'a pas démontré une activité antiépileptique efficace.

Cependant, ces protéines membranaires sont difficiles à étudier car peu stables en dehors de la membrane. Il est nécessaire de choisir un système qui mime l'environnement membranaire qui soit utilisable en mode dynamique sans ajout de tensioactif dans le milieu pour pouvoir réaliser le criblage.

## 2.3 Choix d'une membrane biomimétique : les Nanodisques

La protéine choisie doit se situer dans un environnement mimant la membrane pour pouvoir être étudiée. Il existe plusieurs systèmes qui miment la membrane cellulaire (46). Ces différents modèles simplifient la membrane cellulaire et permettent d'étudier la structure des protéines membranaires et leur activité. Cependant, l'activité des protéines dépend de la composition de la membrane cellulaire comme la longueur des chaînes des acides gras qui définit l'hydrophobicité. Chaque modèle a sa propre structure et composition. L'activité des protéines est donc différente selon le modèle choisi. 4 modèles existent : la monocouche lipidique, la bicouche lipidique sur un support, le liposome et le nanodisque. Le nanodisque est le dernier modèle développé. Les nanodisques ont été découverts par le groupe Sligar<sup>®</sup> (49), il y a une dizaine d'années. C'est un assemblage de phospholipides et de morceaux de protéines dérivés de l'apolipoprotéine humaine A1. Les phospholipides sont associés en bicouche et sont entourés par de l'apolipoprotéine A1 comme une ceinture (Membrane Scaffold protéine, MSP) (figure 12). La taille des nanodisques peut varier entre 9,8 et 17 nm en changeant le nombre d'hélices amphipathiques de la protéine A1. L'avantage des nanodisques est de garder la protéine en solution aqueuse dans un environnement en bicouche lipidique soluble et sans détergent. Les nanodisques permettent d'étudier les récepteurs couplés à la protéine G. Le premier récepteur assemblé dans un nanodisque et qui était actif était le récepteur bêta 2 adrénergique ( $\beta$ 2AR). Deux RCPG,  $\beta$ 2AR et la rhodopsine ont été étudiés grâce aux nanodisques. Ce système est donc intéressant pour étudier des RCPG et plus précisément le récepteur A2A et les interactions avec différents fragments dans le cadre d'un screening par FBDD.



**Figure 15 Structure d'un nanodisque : En bleu la tête polaire et en rouge les deux queues aliphatiques des phospholipides, en vert des morceaux dérivés de l'apolipoprotéine A1 comme ceinture**

## IV. Partie expérimentale

### 1. Matériel et méthodes

#### 1.1. Produits

L'eau ultra pure utilisée vient d'un système Milli-Q (18.2 M.cm, Purelab Classic®, Elga®). Le méthanol (MeOH>99%, Sigma) est utilisé pour solubiliser les fragments en solution. Le DiMethylSulfoxyde (DMSO, >99%, Sigma) est utilisé pour réaliser la mesure du temps mort. Du phosphate de potassium dibasique et de l'acétate d'ammonium ont été utilisés pour réaliser les solutions tampon. Du 3-(triméthoxysily)propylméthacrylate( $\gamma$ -MAPS, >98%, Sigma), de la TriEthylAmine (TEA, >99%, Sigma), du 1-propanol (>99.5%, Merck), de l'EDMA (>98%, Sigma), de l'Azobisisobutyronitrile (AIBN, 98% Acros), de l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 95%, VWR), du périodate de sodium (NaIO<sub>4</sub>, 99,8%, Sigma), et de l'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>, 65% Carlo Erba), du cyanoborohydrure de sodium (NaBH<sub>3</sub>CN>95,0%, Fluka) et du tétraborohydrure de sodium (NaBH<sub>4</sub>, Sigma) ont été utilisés pour préparer les capillaires.

De la streptavidine (de streptomyces avidinii, Sigma) a été utilisée pour préparer les capillaires.

Le Furosémide (Sigma) et la Warfarine (Sigma) sont préparés dans du MeOH à 10 mM.

La HSA biotinyllée greffée sur les colonnes comme cible modèle est à 0.89 mg.mL<sup>-1</sup>.

Les nanodisques vide et contenant la protéine A2A sont fournis par le laboratoire de Strasbourg Integral Membrane Proteins Research and Services de l'école de Biotechnologie de Strasbourg.

Les Fragments utilisés comme potentiels fragments d'A2A sont le F489, le F534, le F462, le F359, le F040 et le F141. Ils sont dans l'ordre le 2-Benzyl-1,3-thiazole-4-acide carboxylique, le Methyl 4-[3-(4-piperidinyl) - 1H-pyrazol-5-yl]-phenyl ether, le 6-(Diméthylamino) purine, la Praxadine, l'acide 4,5-dihydroorotique et l'acide 2-thiophène acétique.



## 1.2. Préparation des capillaires

Les différentes étapes sont réalisées in situ par la circulation de différents mélanges réactionnels sous pression grâce à une pompe (MFCS, Fluigent<sup>®</sup>, Merck<sup>®</sup>).

Activation du capillaire : Silanisation de la paroi de silice vierge par un mélange de 50  $\mu\text{L}$   $\gamma$ -MAPS et de 25  $\mu\text{L}$  de TEA dilués dans 1 mL de mélange ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ , 5/95, v/v). Mélange circulant pendant 1 heure.

Polymérisation photochimique : Préparation d'une solution constituée de 1050  $\mu\text{L}$  de 1-propanol, 600  $\mu\text{L}$  de 1,4-butanediol, 150  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 600  $\mu\text{L}$  d'EDMA et 12 g d'AIBN, 98%. Polymérisation photochimique par un four UV (Bio-Link) par irradiation à 365 nm à une puissance de 6 J sur 8.5 cm de colonne.

Hydrolyse acide et oxydation : Une solution d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 95%, VWR) à 1M a été utilisée pendant 2h pour ouvrir les fonctions époxyde du support. Ensuite un mélange de 512 mg de  $\text{NaIO}_4$  et 600  $\mu\text{L}$  d'acide nitrique dilué dans 16 mL d' $\text{H}_2\text{O}$  ajusté à pH 5.5 par une solution en LiOH saturé est passé pendant une heure pour oxyder les fonctions diols en aldéhyde.

Greffage de la streptavidine : La solution de streptavidine à  $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans du tampon phosphate pH 6 en présence de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  à  $4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  est greffée pendant 18h sous circulation.

Réduction des aldéhydes résiduels : Les aldéhydes résiduels sont réduits avec une solution à  $2.5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de  $\text{NaBH}_4$  pendant 2h sous circulation.

Les capillaires sont stockés au réfrigérateur.

### 1.3. Analyse Frontale

Les analyses frontales sont réalisées avec une électrophorèse 7100 CE system d'Agilent® en mode pressurisation externe à 12 bars. La détection se fait par un détecteur UV à barrette de diodes couplé à l'électrophorèse. Le greffage de la *HSA* sur les colonnes est réalisé sur l'appareil et suivi par l'apparition de deux paliers à 214 nm (temps mort puis protéine biotinyllée). Le greffage des nanodisques sur les colonnes est réalisé sur l'appareil et suivi par l'apparition de deux paliers à 214 nm (temps mort) puis à 230 nm et 280 nm (nanodisques).

Entre chaque analyse de fragment un rinçage au tampon phosphate est effectué pendant 30 minutes.

## 2. Résultats

Cette partie regroupe le travail effectué. Dans cette partie, en premier est présentée la description du mode de préparation des colonnes. Ensuite, vient le suivi du greffage des protéines sur les colonnes en UV pour connaître le nombre de sites totaux présent sur la colonne. Les résultats du greffage d'une protéine soluble la *HSA* et d'une protéine membranaire en nanodisque sont comparés. L'optimisation du greffage de nanodisque est ensuite présentée. Une évaluation des capacités de reconnaissance de la colonne avec des fragments modèles (le furosémide et la warfarine) puis une comparaison de trois méthodes pour déterminer le  $K_d$  du modèle est effectuée. Enfin l'étude de fragments potentiels pour l'A2A est effectuée sur les colonnes nanodisques A2A.

## 2.1. Préparation des colonnes capillaires d'affinité

Les colonnes capillaires d'affinité sont préparées dans des capillaires de silice fondue de 75 µm de diamètre interne et d'une dizaine de cm de long. L'incorporation d'une phase stationnaire particulaire traditionnelle en silice est trop difficile à effectuer dans un capillaire. Le remplacement par une phase stationnaire monolithique organique synthétisée in-situ permet de s'affranchir de l'étape d'incorporation de la phase stationnaire.

La première étape consiste à préparer les capillaires en activant leur surface. Cette activation se fait par une silanisation des groupements silanols du capillaire grâce à un mélange de γ-MAPS et de TEA. Cette étape permet d'introduire des fonctions acrylates à la surface qui permettront d'assurer un fort ancrage du monolithe aux parois du capillaire.

La synthèse du monolithe ainsi que le greffage de la protéine cible sont réalisés comme indiqué Figure 16.

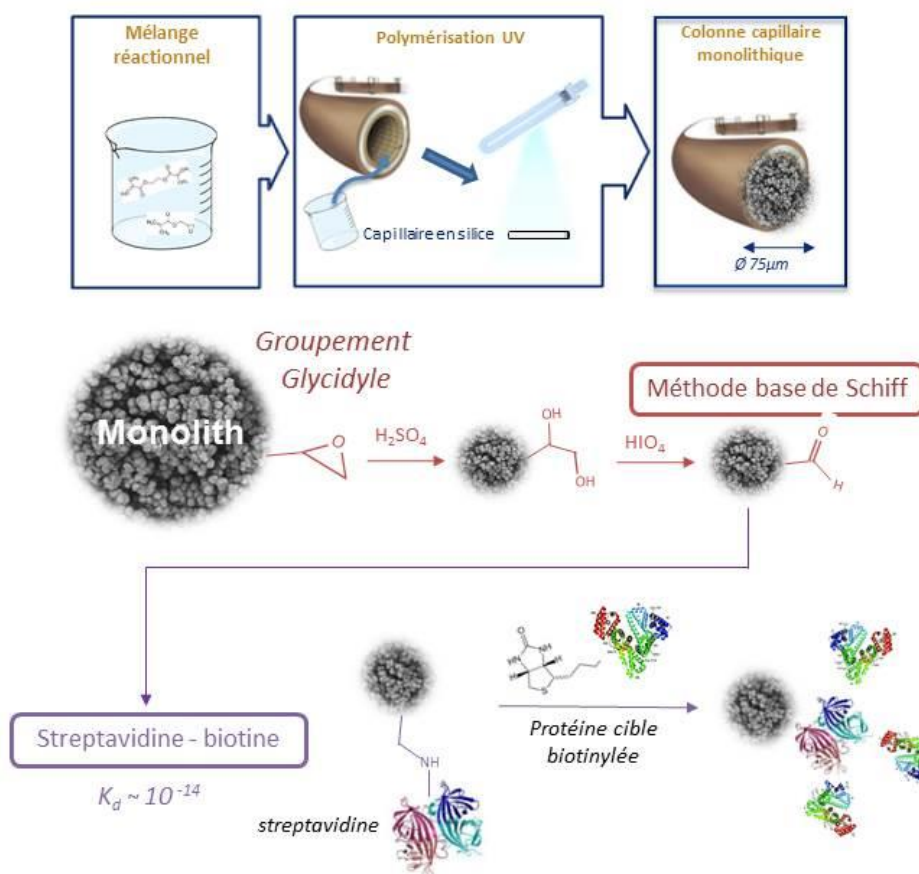


Figure 16 Schéma de synthèse des colonnes

Une fois préparé, un mélange de polymérisation contenant du GMA, de l'EDMA, du 1-4 propanolol, du 1.4 butanediol et de l'eau est passé dans le capillaire. Ce mélange est polymérisé photochimiquement par

rayonnement UV. Après cette polymérisation les capillaires contiennent une phase stationnaire monolithique porteuse de groupements fonctionnels réactifs de type époxyde.

Le greffage de protéines sur le monolithe se fait grâce à l'utilisation de deux méthodes ; la méthode de base de Schiff (pour le greffage de la streptavidine) et la méthode Streptavidine /Biotine pour le greffage de la protéine cible biotinylée.

La première étape est de greffer la streptavidine en utilisant la méthode de base de Schiff. Les groupements époxydes à la surface du monolithe sont hydrolysés en diols par hydrolyse acide par le passage d'une solution d'acide sulfurique. Après un rinçage pour éliminer l'acide, les diols présents à la surface du monolithe sont oxydés en aldéhydes par une solution de  $\text{NaIO}_4$ . Enfin, une solution contenant de la streptavidine et du  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  est percolée sur la colonne pour y greffer la streptavidine. Le cyanoborohydrure de sodium réduit les groupements imines ce qui est obligatoire pour obtenir une immobilisation fiable.

Une fois la streptavidine greffée, la protéine cible est fixée par la méthode streptavidine biotine. Cette méthode utilise la forte affinité streptavidine biotine ( $K_d$  de l'ordre du femtomolaire). La protéine cible biotinylée est passée sur la colonne et se fixe sur la streptavidine.

Les colonnes streptavidine et streptavidine-protéine biotinylée sont conservées dans un vial d'eau à  $+4^\circ\text{C}$  et sont stables dans ces conditions pendant 6 mois.

L'utilisation de ces deux méthodes permet de fixer des protéines sur les colonnes et de suivre ce greffage en UV permettant de déterminer la quantité totale de protéine fixée.

## 2.2. Caractérisation des colonnes d'affinité : quantité de protéine totale greffée suivie en analyse frontale avec suivi UV

Le greffage des protéines biotinylées est effectué à 12 bars sur une colonne streptavidine.

La protéine est infusée dans la colonne et cette infusion est suivie en UV. L'apparition du premier palier correspond au changement de tampon et indique le temps mort. (Le tampon contenant la protéine est un tampon PBS tandis que le tampon utilisé pour rincer les colonnes, mesurer les temps ou faire les dilutions des différents composés est un tampon phosphate à 67 mM). Le deuxième palier correspond à la protéine : Il indique qu'il y a saturation de la colonne et que les protéines biotinylées ne sont plus capturées par la streptavidine. Le temps entre les deux paliers est le temps de capture (ou temps de greffage) de la protéine. En connaissant la concentration en protéine de l'échantillon, il est possible de déterminer la quantité exacte de protéine cible fixée sur la colonne  $B_{tot}$ .

### Cas d'une Protéine soluble (HSA) :

Le greffage de la HSA est suivi à 214 nm. Un premier palier d'une dizaine de mAu apparaît au temps mort. Un second palier plus important d'une valeur de 70 mAU apparaît une dizaine de minutes après le début du passage de la protéine biotinylée. Le suivi de ce greffage est illustré figure 17.

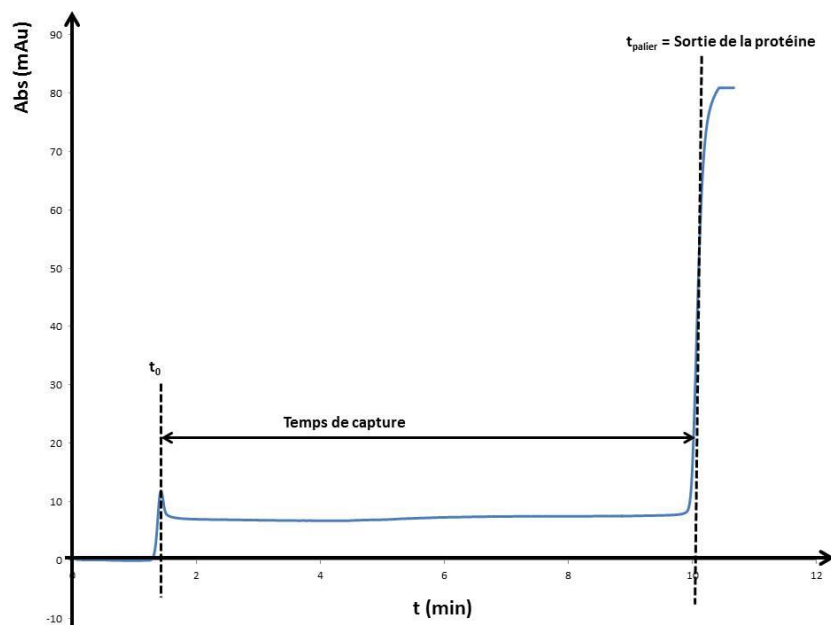


Figure 17 Chromatogramme de suivi d'un greffage de colonne avec de l'HSA biotinylée à 0.89mg/L : Colonne streptavidine de 8,5cm, à 12 bars, suivi à 214 nm

La concentration de la *HSA* étant de  $0,89 \text{ mg.mL}^{-1}$  soit  $13,5 \text{ }\mu\text{mol.mL}^{-1}$  il est possible de déterminer la quantité d'*HSA* qui s'est fixée sur la colonne. La colonne possède un temps mort de 1,38 min et le deuxième palier est apparu après 10,1 minutes de greffage. Le temps de capture est donc de 8,72 min. Le volume de capture est de  $2,3.10^{-3} \text{ mL}$  et la quantité totale greffée est donc de 31,9 pmol. La colonne fait 8,5 cm dont 8 cm de monolithe : il y a  $3,98 \text{ pmol.cm}^{-1}$  dans la colonne. Ces données sont résumées dans le tableau 4.

**Tableau 4 Résumé du greffage d'une colonne HSA**

Concentration HSA ( $\mu\text{M}$ )	$t_0$ (min)	$t_{\text{palier}}$ (min)	$t_{\text{capture}}$ (min)	$V_{\text{capturé}}$ (mL)	$n_{\text{capturé}}$ (pmol)	$B_{\text{tot}}$ ( $\text{pmol.cm}^{-1}$ )
13,5	1,38	10,1	8,72	$2,3.10^{-3}$	31,9	3,98

Sur 5 colonnes une moyenne de  $4.16 \pm 0.45 \text{ pmol.cm}^{-1}$  a été obtenue. Le greffage des colonnes avec la *HSA* est donc facilement suivi en UV et permet de déterminer précisément la quantité d'*HSA* greffée par colonne. Ces colonnes consomment une faible quantité de protéine et leur préparation est reproductible

## Cas d'une protéine membranaire en Nanodisque :

Le greffage des nanodisques A2A est suivi à 214, 230 et 280 nm. L'intensité des paliers est plus importante à 214 nm mais d'autres longueurs d'onde plus spécifiques sont ajoutées pour confirmer la présence des nanodisques contenant A2A. Un premier palier apparaît au temps mort ( $t_0$ ). Un second palier de plus faible intensité apparaît après plus de 70 minutes ( $t_{\text{palier}}$ ) aux trois longueurs d'ondes dont 280 nm et confirme la sortie des nanodisques contenant A2A. Le suivi de ce greffage à 214 nm est montré figure 18

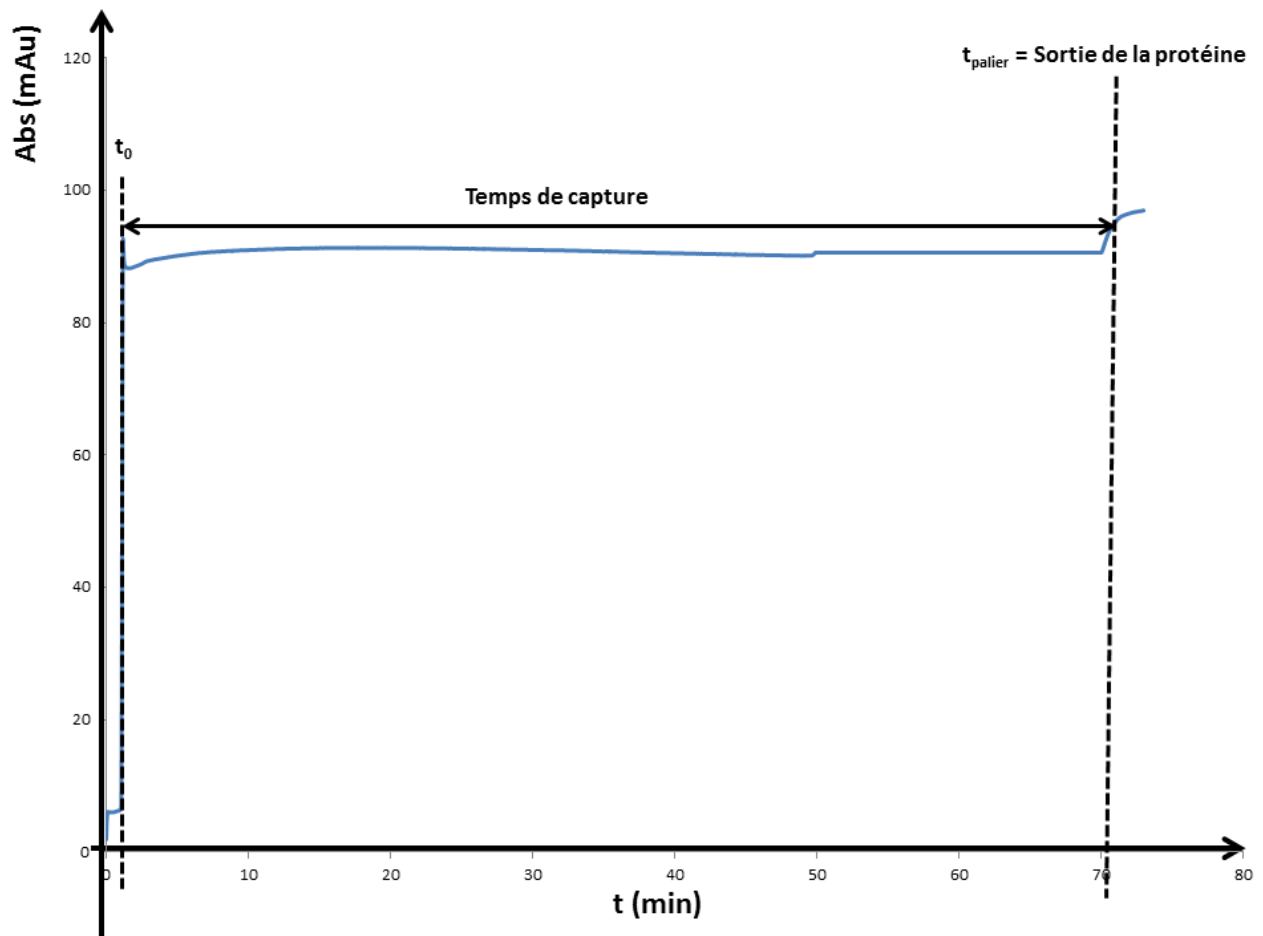


Figure 18 Chromatogramme de suivi d'un greffage de colonne avec des nanodisques A2A : Colonne streptavidine de 8,5cm, à 12 bars, suivi à 214 nm



La concentration en nanodisque dans l'échantillon est de 1  $\mu\text{M}$ . La colonne a un temps mort de 1,38 min et le deuxième palier est apparu après 72 minutes de greffage. Le temps de capture est donc de 70,62 min. Le volume de capture est de  $19 \cdot 10^{-3}$  mL et la quantité totale greffée est donc de 16,52 pmol. La colonne fait 8,5 cm dont 8 cm de monolithe il y a  $2,06 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-1}$  dans la colonne. Ces données sont résumées dans le tableau 5

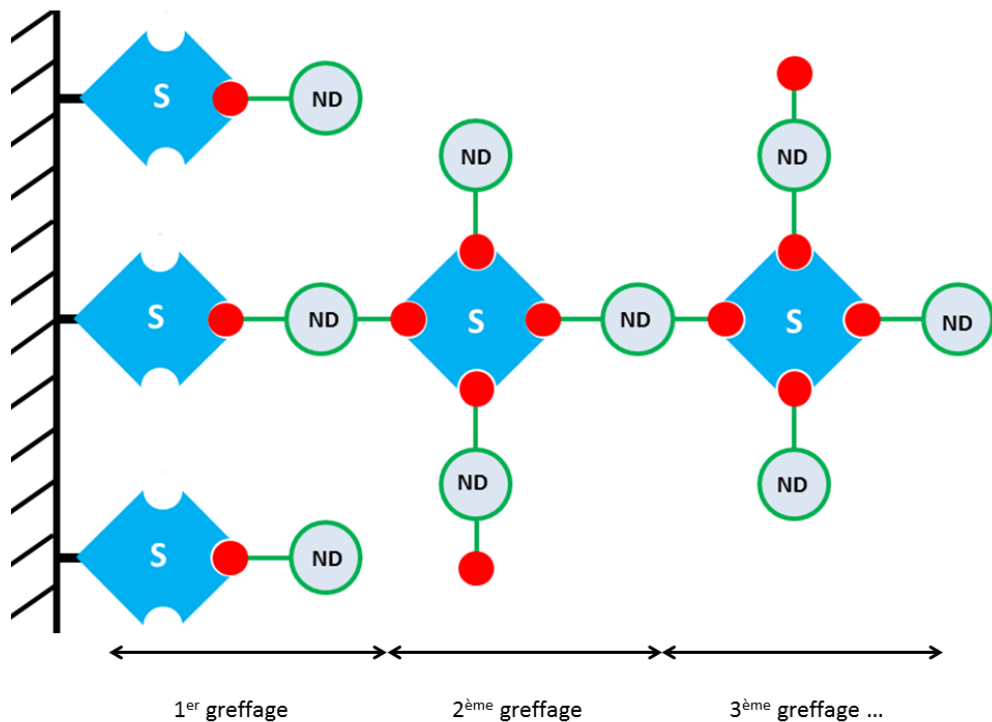
**Tableau 5 Résumé du greffage d'une colonne ND A2A**

Concentration ND A2A ( $\mu\text{M}$ )	$t_0$ (min)	$t_{\text{palier}}$ (min)	$t_{\text{capture}}$ (min)	$V_{\text{capturé}}$ (mL)	$n_{\text{capturé}}$ (pmol)	$B_{\text{tot}}$ ( $\text{pmol} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
1	1,38	72	70,68	$19 \cdot 10^{-3}$	16,52	2,06

Pour le greffage *HSA*  $3,99 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-1}$  de protéine se sont greffées sur la colonne contre seulement  $2,06 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-1}$  pour les nanodisques A2A. Près de deux fois plus de *HSA* s'est donc greffée à la colonne. La plus faible quantité de nanodisque greffée est sûrement liée à l'encombrement stérique. En effet, la taille d'un nanodisque est comprise entre 15 et 20 nm alors que la *HSA* a une taille de 8 à 10 nm. Cette plus faible quantité greffée aura pour conséquence de rendre plus difficile la détection des faibles affinités car la rétention est directement liée aux nombres de sites actifs sur la colonne.

## Optimisation du nombre de Nanodisques greffés

Augmenter le nombre de nanodisques greffés faciliterait la détection de plus faibles affinités. L'idée pour augmenter le nombre de nanodisques greffés est de profiter des 4 sites actifs de la streptavidine et du degré de biotinylation de 1,6 des nanodisques. Plus d'un nanodisque sur deux est biotinylé deux fois. Il est donc possible d'envisager des greffages successifs en repassant sur la colonne une solution de streptavidine qui pourra être fixée par les biotines libres des nanodisques déjà immobilisés puis de réaliser un nouveau greffage de nanodisques. En effet, la streptavidine grâce à ses 4 sites permettra de fixer de nouveaux nanodisques. L'objectif est de répéter ce cycle streptavidine-nanodisque plusieurs fois pour augmenter le nombre de nanodisques dans la colonne comme illustré sur la figure 19.



**Figure 19 Schéma du processus de regreffage de Nanodisque sur une colonne : Le rond rouge représente la biotine, le carré bleu la streptavidine et le cercle vert le nanodisque contenant l'A2A**

A chaque infusion, la quantité de nanodisques capturée est mesurée et ajoutée à la quantité capturée précédente pour obtenir la quantité totale  $q_{\text{tot}}$ . Le passage de la streptavidine est suivi à 214 nm comme pour le suivi de la *HSA*. La quantité de streptavidine greffée est déterminée de la même manière que pour déterminer la quantité d'*HSA*. Le suivi de greffage des nanodisques est similaire à celui expliqué précédemment.

3 cycles streptavidine/nanodisque ont pu être effectués et ajoutés au 1<sup>er</sup> greffage initial. Ces cycles correspondent au 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> greffage. Les 3 cycles ont ajouté un total de  $0.66 \text{ pmol.cm}^{-1}$  de nanodisque passant d'un total de 2,06 à 2,72  $\text{pmol.cm}^{-1}$ . Les quantités de nanodisques greffés en fonction du nombre de greffages sont résumées dans le tableau 6.

**Tableau 6 Résumé du greffage des nanodisques A2A sur une colonne**

	1 <sup>er</sup> greffage	2 <sup>ème</sup> greffage	3 <sup>ème</sup> greffage	4 <sup>ème</sup> greffage
Quantité de streptavidine greffée ( $\text{pmol.cm}^{-1}$ )	\	0,09	0,04	0,04
Quantité de nanodisque greffée ( $\text{pmol.cm}^{-1}$ )	2,06	0,3	0,18	0,19
Quantité de nanodisque totaux ( $\text{pmol.cm}^{-1}$ )	2,06	2,36	2,54	2,72

L'ajout de streptavidine est deux fois plus faible entre le premier et le deuxième cycle ; cette limitation est peut-être due au degré de biotinylation des nanodisques qui est inférieur à 2. Il n'est pas possible de remettre de la streptavidine sur un nanodisques sur 2. La diminution de l'ajout de streptavidine diminue aussi l'ajout de nanodisques lors du passage de ces derniers.

L'ajout de nanodisques par ces cycles streptavidine-biotine fonctionne et a permis d'ajouter 32% de nanodisques. Cependant cet ajout est limité par le degré de biotinylation d'1,6 de la *MSP* des nanodisques. Augmenter ce degré de biotinylation devrait permettre d'augmenter le nombre de nanodisques par colonnes.

## Quantité de nanodisques actifs

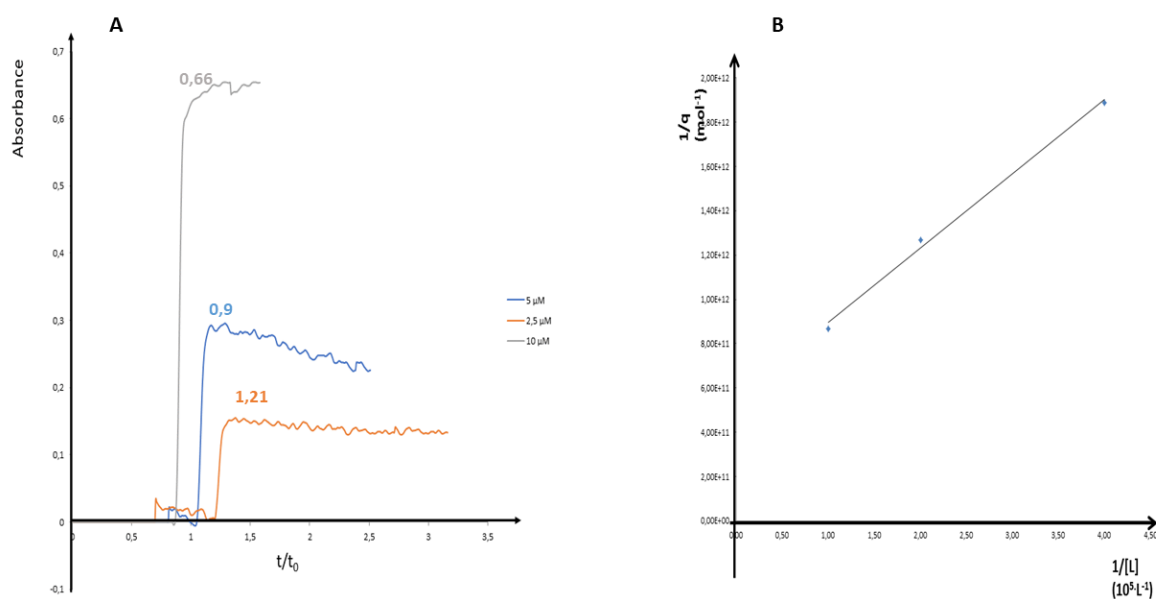
Grâce à ces cycles streptavidine/nanodisque la quantité totale de nanodisques capturés a pu être augmentée d'environ 30%. Mais est ce que la quantité de protéines actives a augmenté elle aussi ? Pour cela il faut déterminer la quantité active de nanodisques sur les colonnes.

La quantité active est déterminée avec un fragment d'affinité connue selon la méthode décrite précédemment. Plusieurs solutions de concentrations croissantes sont analysées en mode frontal Le fragment choisi est la théophylline qui a un  $K_d$  de  $25\mu\text{M}$  pour la protéine A2A. 3 concentrations sont passées et suivies à 272 nm. Une injection de DMSO suivie à 214 nm sert à mesurer le temps mort. Les 3 concentrations sont 2,5 ; 5 et  $10\mu\text{M}$  de théophylline dans du tampon phosphate à 6.67 mM et à pH 7,4. Pour les différentes concentrations, plus les concentrations sont croissantes plus les courbes de percées se décalent vers le temps. Ces courbes sont représentées figure 20 A. Le décalage des temps de palier avec la concentration en fragment est caractéristique de la reconnaissance (affinité spécifique).

En fonction du temps de plateau, la quantité capturée  $q$  est mesurée.

En traçant  $1/q$  en fonction de  $1/[\text{Concentration}]$  il est possible d'obtenir la quantité de ligand d'affinité de la colonne et de trouver le  $K_d$  de l'analyte (figure 8B) comme décrit précédemment.

La valeur obtenue pour le  $K_d$  est de  $6\mu\text{M}$ . Le nombre de protéines actives  $B_{\text{act}}$  sur la colonne est de  $0,224\text{ pmol.cm}^{-1}$ . Il y a 11% de protéine actif sur l'ensemble des nanodisques greffés. La droite présente un  $R^2$  de 0.99 (figure 20 B).



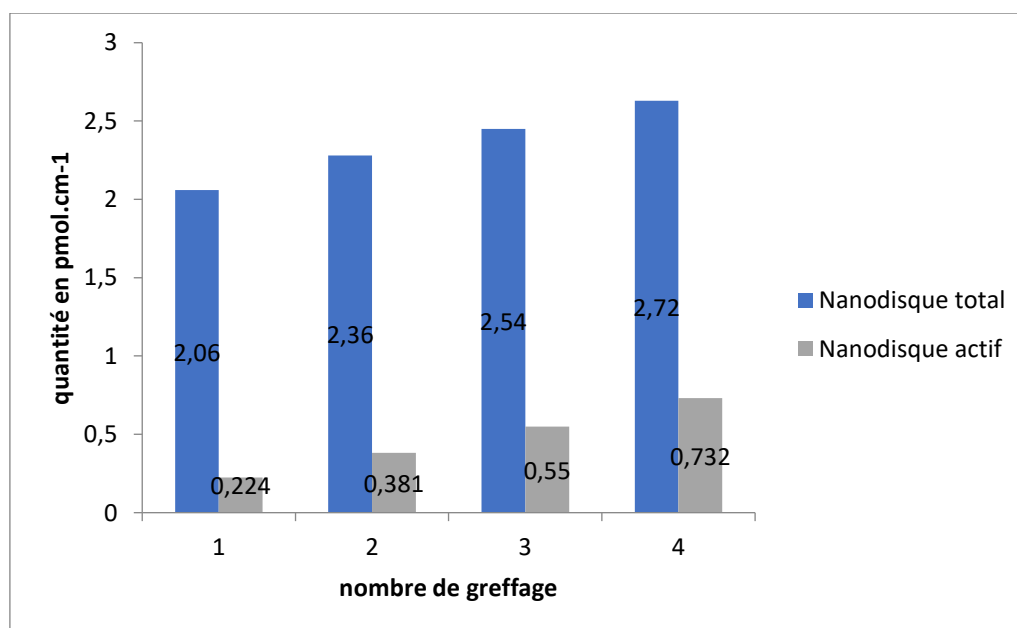
**Figure 20** Mesure du nombre de nanodisques actifs A : Courbe de percée sur colonne NDA2A de 8.5 cm à 12 bars à 3 concentrations allant de 2,5  $\mu\text{M}$  à 10  $\mu\text{M}$  B :  $1/q=f(1/[L])$  de la théophylline sur colonne NDA2A : Colonne de 8,5 cm ; pression à 12 bars ;  $K_d$  déterminé =  $6\mu\text{M}$  ;  $B_{\text{act}}=0.224\text{ pmol.cm}^{-1}$  A chaque nouveau greffage le nombre de nanodisques actifs est mesuré en répétant cette expérimentation.

Lors du premier greffage il y a donc  $0,224 \text{ pmol.cm}^{-1}$  de nanodisques actifs soit 11% des nanodisques totaux. Après les 4 greffages il y a  $0,731 \text{ pmol.cm}^{-1}$  de nanodisques actifs pour  $2,69 \text{ pmol.cm}^{-1}$  de nanodisques totaux soit 28% d'activité. Les quantités de nanodisques actifs en fonction du nombre de greffages sont résumées dans le tableau 7.

**Tableau 7 Résumé de la quantité de nanodisques actifs par greffage**

	1 <sup>er</sup> greffage	2 <sup>ème</sup> greffage	3 <sup>ème</sup> greffage	4 <sup>ème</sup> greffage
Quantité de nanodisques actifs greffée ( $\text{pmol.cm}^{-1}$ )	0,224	0,381	0,551	0,731

Le nombre de nanodisques actifs augmente avec l'ajout de nouveaux nanodisques totaux. Les 3<sup>èmes</sup> et 4<sup>èmes</sup> cycles streptavidine/nanodisque ajoutent chacun sur la colonne  $0,18$  et  $0,19 \text{ pmol.cm}^{-1}$  et ces  $0,35 \text{ pmol.cm}^{-1}$  sont presque tous actifs car le nombre de nanodisques actifs augmente de  $0,17 \text{ pmol.cm}^{-1}$  après chacun de ces greffages. Cela se traduit par l'augmentation du taux de nanodisques actifs qui passe de 11% activité après le premier greffage à 28 % soit près du triple. Les greffages permettent l'ajout de nouveaux nanodisques mais permettent surtout d'augmenter le nombre de nanodisques actifs. Cette augmentation du taux d'activité s'explique peut-être par le fait qu'en s'éloignant de la surface du monolithe, les nanodisques sont plus accessibles, compte tenu de la diminution de l'encombrement stérique. La figure 21 regroupe le nombre de nanodisques totaux greffés et le nombre de nanodisques actifs en fonction du nombre de greffages.



**Figure 21** Histogramme du nombre de ND ajouté par cycle de greffage : Nombre de cycles de greffage en abscisse, quantité greffée en  $\text{pmol.cm}^{-1}$  en ordonnée

Cette approche rend possible l'augmentation du nombre de nanodisques par colonne mais surtout d'augmenter le taux d'activité de ces nanodisques. Cependant elle est limitée par le degré de biotinylation d'1,6 de la MSP qui entoure les nanodisques. Près d'un nanodisque sur deux n'étant biotinylé qu'une seule fois il n'est pas possible de lui regreffer de la streptavidine. Il faudrait réessayer avec des nanodisques avec un degré de biotinylation de 2 pour voir jusqu'où peut aller cet ajout de nanodisque par colonne et s'il est répétable.

### 2.3. Comparaison de plusieurs modes de détermination de $K_d$ en analyse frontale

Dans la littérature, les déterminations de  $K_d$  sont essentiellement réalisées en mode frontal classique : infusion de ligand à des concentrations variables avec rinçage entre chaque concentration. Cette méthode s'avère longue à mettre en place en raison des temps de rinçage nécessaires entre deux infusions (environ 30 minutes). Nous avons envisagé la mise en œuvre d'une méthode d'analyse frontale plus originale et beaucoup plus rapide : l'analyse en mode *staircase*. Par ailleurs, dans le cas où un ligand de  $K_d$  connu a déjà été identifié, une mesure de  $K_d$  par compétition a également été envisagée.

Pour comparer l'analyse frontale et la méthode *staircase* pour déterminer le  $K_d$  un composé dont l'affinité pour la HSA est connue a été choisi. Le furosémide a dans la littérature un  $K_d$  pour la HSA estimé entre 5 et 50  $\mu\text{M}$ . Les mesures sont effectuées pour les deux modes à 12 bars et sur des colonnes de 8,5 cm.

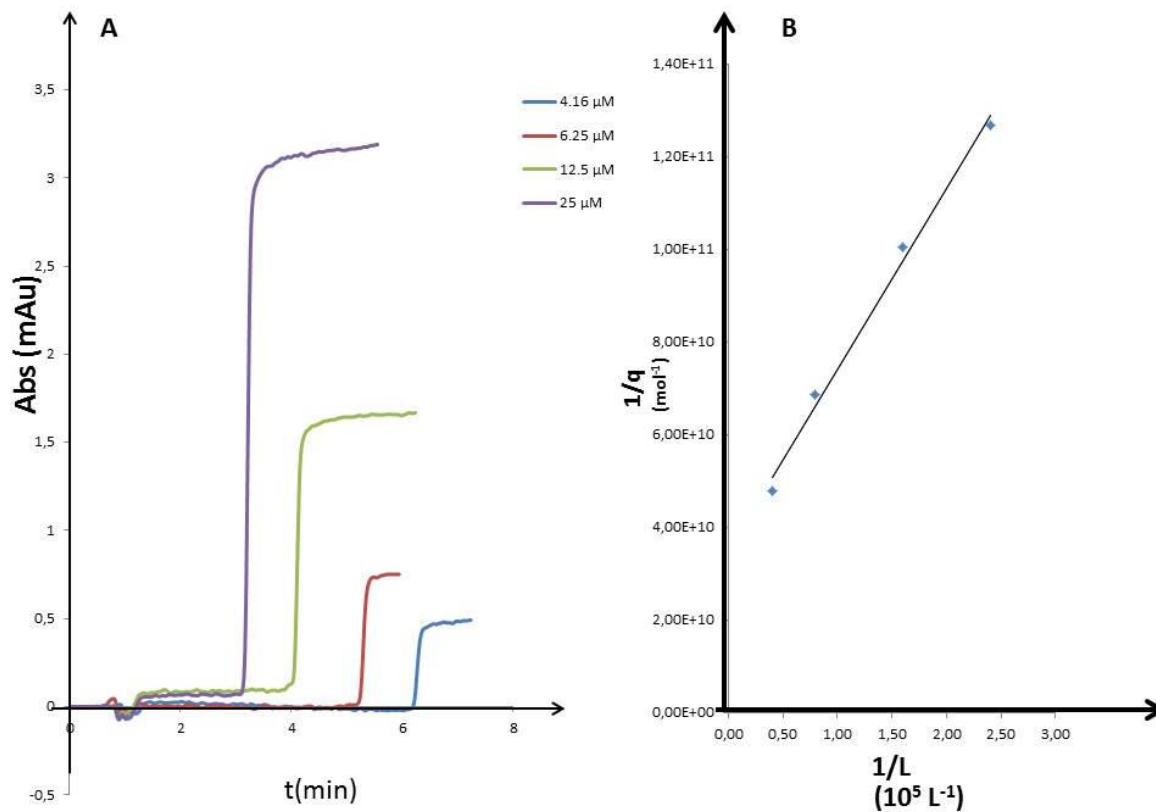
#### Analyse Frontale classique

La mesure du  $K_d$  du Furosémide en analyse frontale est réalisée sur une colonne HSA. 4 concentrations sont préparées dans du tampon phosphate pH 7,4. Les 4 concentrations sont 4,16 ; 6,25 ; 12,5 ; et 25  $\mu\text{M}$ .

L'apparition de la courbe de percée se fait de plus en plus rapidement avec une absorbance plus importante lorsque la concentration augmente ce qui est caractéristique d'une interaction spécifique. Les courbes de percées sont illustrées par la figure 22 A.

En traçant  $1/q$ , l'inverse de la quantité capturée, en fonction de  $1/[L]$  (Figure 22 B), l'inverse de la concentration, la valeur obtenue pour le  $K_d$  est de 11  $\mu\text{M}$  pour un total de molécule active sur la colonne de 28,3 pmol. La droite présente un  $R^2$  de 0,99.

La valeur mesurée est dans l'ordre de grandeur du  $K_d$  de la littérature du furosémide pour la HSA. Le haut taux de protéine active permet d'avoir une meilleure rétention du composé.



**Figure 22** Mesure  $K_d$  Furosémide en Analyse frontale : **A** : Courbe de percée du furosémide obtenue sur colonne HSA de 8.5 cm à 12 bar à 4 concentrations allant de 4,16 à 25 $\mu\text{M}$   
**B** : Droite représentant  $1/q = f(1/L)$  avec  $1/q$  en  $\text{mol}^{-1}$  et  $1/L$  en  $10^5 \text{ L}^{-1}$

L'analyse frontale permet de déterminer le  $K_d$  d'un composé mais le temps de rinçage de 30 minutes entre chaque concentration allonge l'analyse de 2h pour une durée totale de 3h pour 4 concentrations.



## Analyse frontale en mode Staircase

Les conditions sont les mêmes qu'en mesure classique, seul le rinçage entre les différentes percolations est supprimé.

5 concentrations sont préparées dans du tampon phosphate pH 7,4. Les 5 concentrations sont 2,08 ; 4,16 ; 6,25 ; 12,5 ; et 25  $\mu\text{M}$ .

Le temps d'apparition du palier est plus rapide plus la concentration est importante. L'absorbance est plus faible qu'en analyse frontale classique car le blanc est effectué sur la concentration précédente. Les courbes de percées cumulées sont illustrées par la figure 23 B.

La quantité capturée est mesurée pour chaque concentration puis cumulée avec la quantité capturée par la concentration précédente. Les quantités capturées, cumulées, calculées selon l'équation 4 pour 4,16 ; 6,25 ; 12,5 ; et 25  $\mu\text{M}$  sont respectivement 3,18 ; 5,12 ; 6,59 ; 10,0 ; 14,8 pmol.

En traçant  $1/q_{\text{cumulée}}$ , l'inverse de la quantité capturée cumulée, en fonction de  $1/[L]$ , l'inverse de la concentration, la valeur obtenue pour le  $K_d$  est de 12  $\mu\text{M}$  pour un total de molécule active sur la colonne de 28,6 pmol. La droite présente un  $R^2$  de 0,99 (figure 23 B).

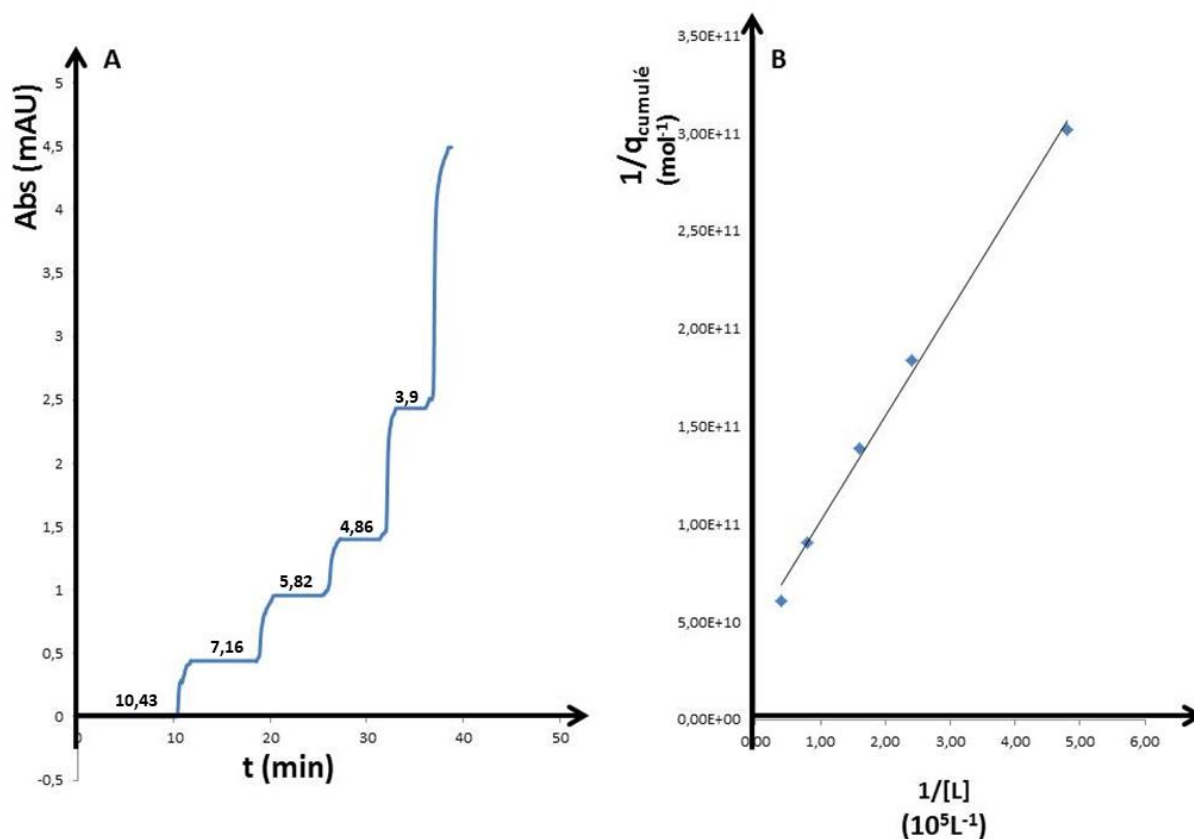


Figure 23 Mesure  $K_d$  Furosémide en Analyse frontale en staircase : A : Courbe de percée du furosémide obtenue sur colonne HSA de 8.5 cm à 12 bar à 4 concentrations allant de 4,16 à 25 $\mu\text{M}$  sans rinçage entre les différentes concentrations  
B : Droite représentant  $1/q = f(1/L)$  avec  $1/q$  en  $\text{mol}^{-1}$  et  $1/L$  en  $10^5 \text{ L}^{-1}$

Le  $K_d$  mesuré en *staircase* est très proche de la valeur mesurée de façon classique et est cohérent avec les valeurs retrouvées dans la littérature. Ces valeurs sont résumées tableau 7.

Le temps d'analyse totale pour la mesure du  $K_d$  en *Staircase* prend moins d'une heure pour analyser les 5 solutions de concentrations différentes auquel s'ajoutent 30 minutes de rinçage après le passage de la dernière concentration. Le temps total est d'1h30 pour déterminer le  $K_d$  du furosémide en *Staircase*.

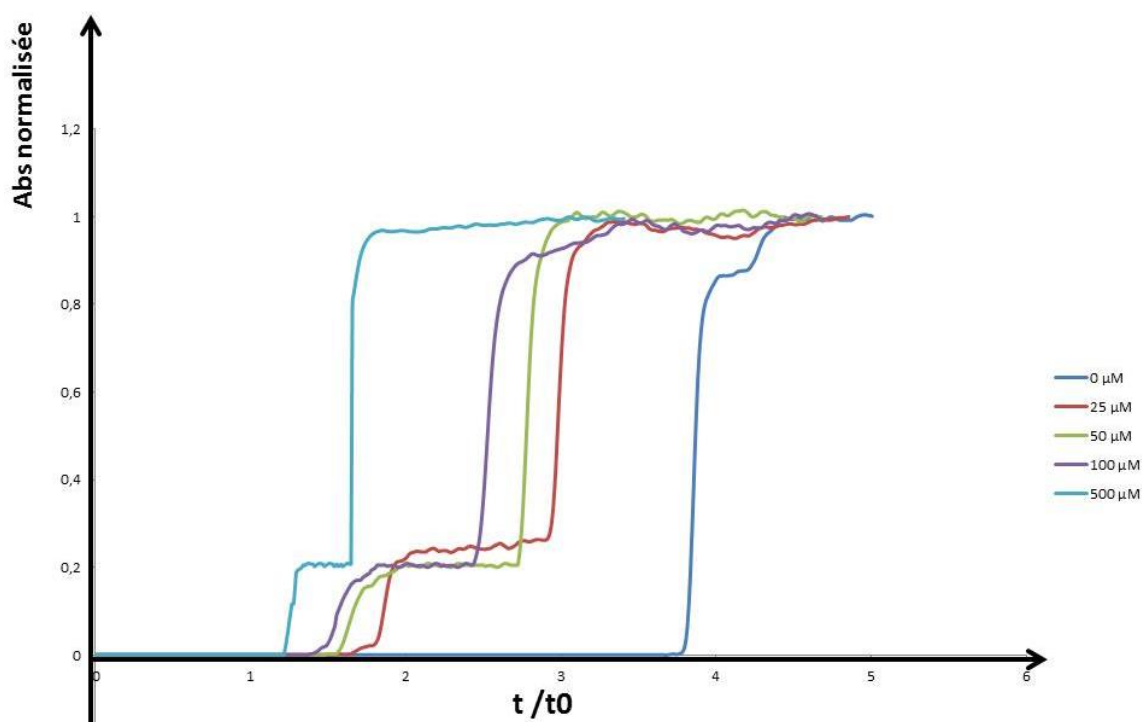
Le temps d'analyse est deux fois plus court qu'en mode frontal classique pour une valeur de  $K_d$  déterminée similaire. Le mode *Staircase* permet donc de réduire le temps d'analyse de moitié et est une bonne méthode pour mesurer le  $K_d$  de composé rapidement.

### 3<sup>ème</sup> méthode de détermination de $K_d$ : Compétition

Pour mesurer le  $K_d$  il existe une troisième alternative, la compétition. Il faut un compétiteur connu interagissant sur le même site pour déplacer le composé d'intérêt.

Le composé choisi pour cette expérience est la warfarine. La warfarine possède deux énantiomères ayant comme  $K_d$  dans la littérature  $4,2 \mu\text{M}$  pour l'énantiomère R et  $3,8 \mu\text{M}$  pour l'énantiomère S. Le compétiteur choisi est le furosémide qui a déjà été utilisé et qui interagit avec la HSA sur le même site que la warfarine et a un  $K_d$  dans la littérature de  $5$  à  $50 \mu\text{M}$ . 5 solutions sont préparées avec une concentration constante de  $10 \mu\text{M}$  de warfarine auxquelles une concentration croissante de compétiteur est ajoutée. Les 5 solutions sont donc des solutions de  $10 \mu\text{M}$  de warfarine avec dans l'ordre croissant  $0$ ,  $25$  ;  $50$  ;  $100$  et  $500 \mu\text{M}$  de furosémide. La colonne est conditionnée par percolation pendant 30 minutes d'une solution contenant la même concentration en furosémide que la solution de warfarine qui va être analysée. Les temps des courbes de percées sont rapportés au temps mort  $t_0$ .

La présence de deux énantiomères provoque l'apparition de deux paliers. Le premier palier est associé à l'énantiomère R car son  $K_d$  étant plus élevé il est moins retenu que l'énantiomère S. En présence de compétiteur l'ordre d'apparition des paliers s'inverse. Les courbes de percées sont représentées figure 24.



**Figure 24** Courbe de percée Warfarine  $10 \mu\text{M}$  en présence de Furosémide : Solution de warfarine  $10 \mu\text{M}$  avec présence croissante du compétiteur de  $0$  à  $500 \mu\text{M}$  sur colonne HSA, Absorbance normalisée en fonction du temps rapporté au temps mort

Quand la concentration en compétiteur augmente les courbes de percée se décalent vers des temps plus faibles (les temps d'apparition de plateau diminuent). Cette diminution des temps de plateau se fait jusqu'à

un minima observé pour une concentration en compétiteur de 500 µM. A ce temps minimal est associé un volume appelé  $V_{min}$ . Ce volume correspond à la rétention non spécifique et n'est plus dépendant de l'affinité entre la warfarine et la HSA.

Il faut aussi noter que l'ordre des deux paliers correspondant aux deux énantiomères s'inverse en présence du compétiteur. La warfarine S semble plus sensible à la présence du compétiteur. Cette sensibilité est aussi visible par une diminution plus importante du temps de plateau en fonction de la concentration en compétiteur que pour la warfarine R.

En connaissant le  $K_d$  d'un des composés, la concentration du compétiteur, le  $V_{min}$  et le nombre de sites actifs sur la colonne déterminé auparavant grâce au furosémide il est possible d'utiliser l'équation 6 pour trouver le  $K_d$  de l'autre.

$$\text{Avec l'équation : } (Vr - Vmin) = \frac{B_{act} \times \frac{K_d C}{K_d A}}{(K_d C + [C])}$$

Le  $K_d$  de la warfarine R mesuré est de 2.48 µM et le  $K_d$  de la warfarine S mesuré est de 1.55 µM. Ces deux valeurs sont dans l'ordre de grandeur des  $K_d$  de la littérature, 4,2 et 3,8 µM et le  $K_d$  de la warfarine S mesuré est bien inférieur à celui de la warfarine R.

Le  $K_d$  du furosémide a été déterminé avec 2 méthodes différentes. En mode frontal et en *staircase*. Un  $K_d$  de 11 et 12 µM a été déterminé et est cohérent avec la littérature. Ces deux méthodes sont pertinentes si les interactions non spécifiques sont faibles (ou négligeables). Le mode *staircase* permet de s'affranchir des interactions non spécifiques en plus d'éviter le rinçage entre chaque concentration et réduit considérablement le temps d'analyse.

La méthode de compétition donne des valeurs cohérentes pour le  $K_d$  des deux énantiomères de la warfarine par rapport à la littérature. La compétition n'est pas impactée par les interactions non spécifiques donc un décalage dû au compétiteur prouve la présence d'affinité et peut remplacer l'analyse frontale et le mode *staircase* dans ce cas-là. Le résumé des valeurs de  $K_d$  est répertorié dans le tableau 8.

**Tableau 8 Résumé des valeurs de  $K_d$  mesurées par différentes méthodes**

	$K_d$ Littérature	$K_d$ mode Frontal	$K_d$ Staircase	$K_d$ compétition
Furosémide	5-50 µM	11 µM	12µM	/
Warfarine R	4,2 µM	/	/	2,48 µM
Warfarine S	3,8 µM	/	/	1,55 µM

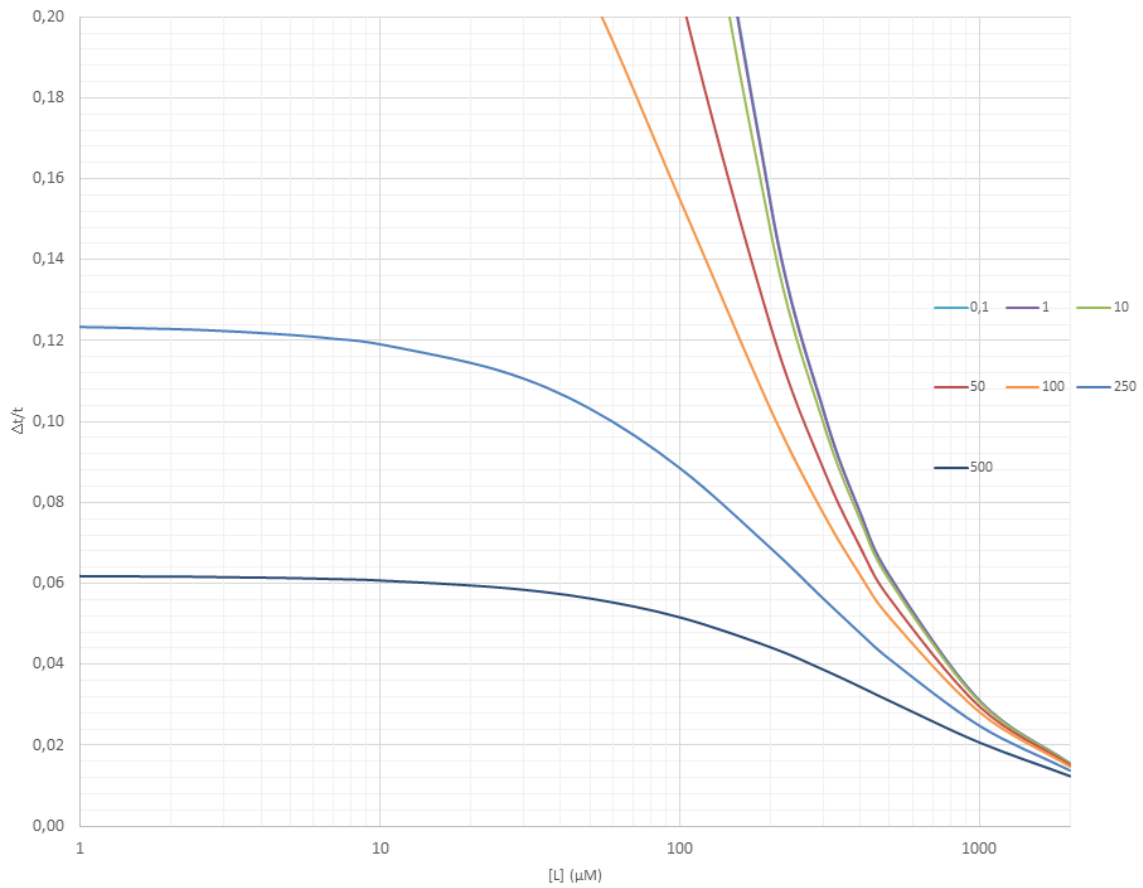
## 2.4. Etude de potentiels fragments d'A2A

Pour rechercher des fragments, l'approche classique consiste à comparer la rétention ou les temps de plateaux entre une colonne sans protéine cible et une avec protéine cible. La colonne sans protéine cible sert à mesurer les interactions non spécifiques et à s'assurer que la rétention ou le temps de plateau sur la colonne avec protéine cible sont bien dus à l'interaction entre le fragment et la protéine cible.

Dans le cas de recherche de fragment pour des protéines membranaires dans des nanodisques, utiliser des nanodisques vides pour comparer avec des nanodisques pleins amène des inconvénients. En effet, avec des nanodisques vides le cœur hydrophobe du nanodisque est plus facilement accessible aux fragments. Si les fragments sont hydrophobes, ils vont interagir (de façon non spécifique) avec l'intérieur du nanodisque probablement de façon plus importante que si le nanodisque contenait la protéine, conduisant à une surestimation des interactions non-spécifiques. Une alternative est de travailler avec des nanodisques contenant la protéine d'intérêt mais désactivée ou contenant une autre protéine n'ayant pas d'affinité avec les fragments criblés. Ces approches nécessitent d'avoir soit la protéine désactivée soit de connaître une protéine n'ayant pas d'affinité avec les fragments criblés et de l'incorporer dans des nanodisques.

Une autre approche, plus simple à mettre en place, consiste à comparer deux expériences à deux concentrations très différentes. Si le temps d'apparition de plateau est identique alors il n'y a que des interactions non spécifiques. S'il y a un décalage alors il y a une interaction spécifique entre la protéine et le fragment.

Pour choisir la différence de concentration optimale entre les deux expériences des courbes de  $\Delta T/t_0$  ont été simulées. Ces courbes ont été simulées pour des colonnes possédant 10 pmol de protéine par colonne (ce qui est obtenu avec A2A en nanodisques) et pour différentes valeurs de  $K_d$ . Ces courbes sont représentées figure 25.



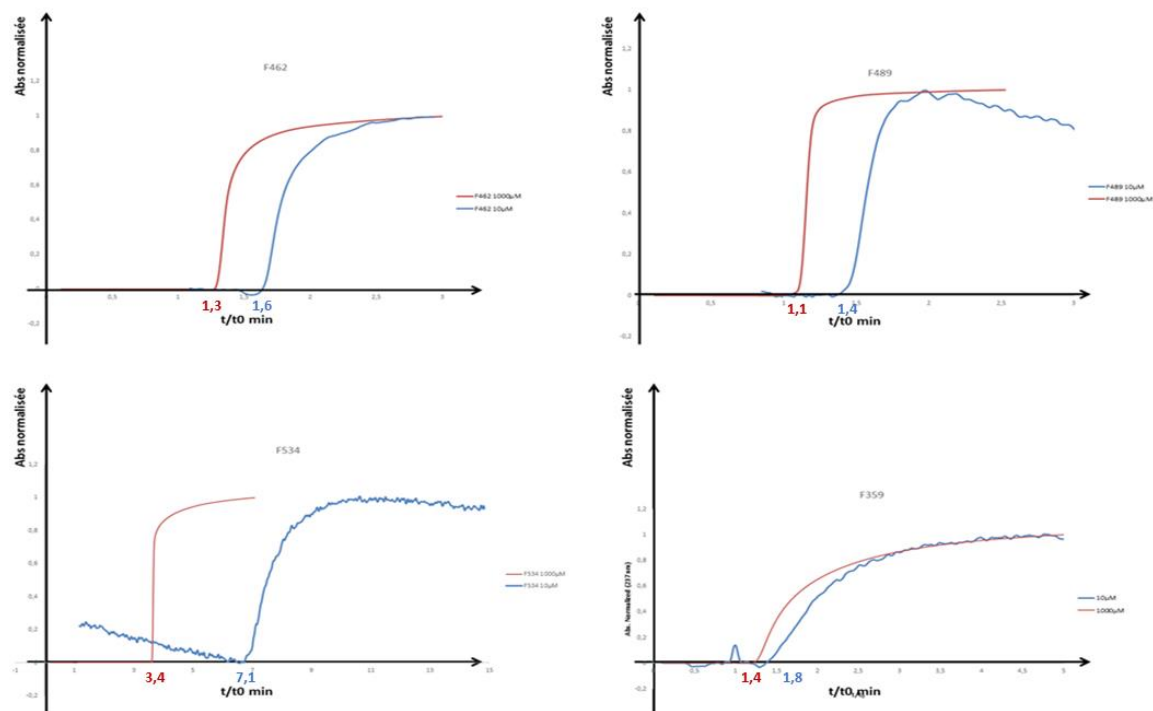
**Figure 25** Courbe de simulation du  $\Delta T/t_0$  en fonction de la concentration : Simulation pour des colonnes possédant 10 pmol de protéine, simulation pour 7  $K_d$  allant de 0,1 à 500  $\mu\text{M}$  concentration en  $\mu\text{M}$  en abscisse,  $\Delta T/t_0$  en ordonnée

Pour détecter des faibles affinités (environ 250  $\mu\text{M}$ ) l'écart de concentration entre les deux expériences doit se situer entre 10  $\mu\text{M}$  et 1 mM pour maximiser l'écart de temps entre les plateaux mesurés.

Deux concentrations sont donc préparées pour chaque fragment, une à 10  $\mu\text{M}$  et l'autre à 1mM.

Cette stratégie a été utilisée sur des fragments déjà identifiés en RMN. 4 Fragments, F534 ; F489 ; F462 et F359 ayant été identifiés comme ayant de l'affinité et 2, F040 et F141 identifiés comme n'en n'ayant pas (50)

Les temps de paliers des fragments rapportés au temps mort aux deux concentrations sont montrés figure 26.

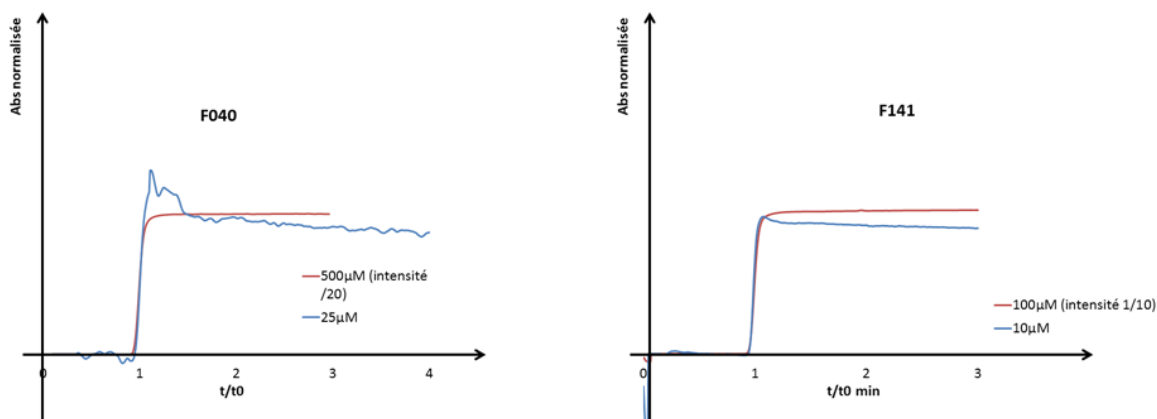


**Figure 26** Analyse de fragment sur ND A2A immobilisé en chromatographie frontal pour des fragments présentant de l'affinité : Courbe de percée obtenus sur une colonne ND A2A pour plusieurs fragment préparé dans du tampon phosphate 6,67 mM. La courbe rouge représente la concentration à 1000  $\mu\text{M}$  et la courbe bleue représente la concentration à 10  $\mu\text{M}$ .

Pour ces 4 fragments, un décalage des temps de plateaux a été observé. Ces décalages attestent la présence d'une affinité de ces fragments pour les nanodisques A2A. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus en RMN.

Les mêmes expériences ont été réalisées sur des fragments confirmés en RMN comme non ligands.

Les temps de paliers rapportés au temps mort des fragments aux deux concentrations sont montrés figure 27.



**Figure 27 Analyse de fragment sur ND A2A immobilisé en chromatographie frontal pour fragment sans affinité : Courbe de percée obtenus sur une colonne ND A2A pour plusieurs fragment préparé dans du tampon phosphate 6,67 mM. La courbe rouge représente la plus haute concentration et la courbe bleu représente la plus faible concentration**

Ces deux fragments n'ont pas d'affinité pour les ND A2A. La non-présence d'affinité est cohérente avec les résultats obtenus en RMN.

Les résultats obtenus pour ces 6 fragments par WAC sont cohérents avec ceux de la RMN. Cette méthode permet d'étudier des potentiels fragments pour une protéine membranaire et de servir de méthode de criblage.



## Conclusion

Le développement d'un nouveau médicament est un travail de longue haleine nécessitant un investissement lourd. Toutes les étapes pour y arriver sont donc faites pour économiser du temps et de l'argent. Pour découvrir de nouvelles molécules actives d'intérêts durant la première étape du cycle de développement la méthode de référence est le *High Throughput Screening*. Comme toutes les méthodes, elle présente des limites et de nouvelles approches permettent de venir en renfort. Une de ces nouvelles approches est le *Fragment Based Drug Design*. De nouvelles techniques de criblages biophysiques efficace et consommant toujours moins de substances à tester qui utilisent cette approche sont donc nécessaires.

Dans ce travail, il a été montré qu'il était possible de préparer des capillaires avec une phase stationnaire monolithique pour qu'ils servent de colonne de chromatographie d'affinité miniaturisée. Ce monolithe est ensuite greffé avec de la streptavidine pour obtenir des colonnes génériques capables de capturer n'importe quelle protéine biotinylée. Ces colonnes peuvent être préparées en avance et stockées à 4°C pendant 6 mois avant d'être utilisées.

Sur ces colonnes, deux types de protéines ont été greffés : une protéine soluble, la HSA et une protéine membranaire dans des nanodisques l'A2A. La quantité exacte de protéine cible greffée sur les colonnes est connue grâce à un suivi UV. De plus, le greffage des protéines est rapide et consomme peu de cible. Pour les colonnes HSA près de 32 pmol d'HSA ont été greffées tandis que près de 16 pmol de nanodisque A2A ont été greffés sur les colonnes A2A. Cette faible consommation de cible est un atout considérable quand les protéines sont difficiles à produire. Une augmentation de 30% du nombre de nanodisques greffés total ainsi qu'une augmentation du près du double du taux de nanodisques actifs a été rendue possible par la réalisation de cycles successifs de greffage streptavidine/nanodisque permettant d'augmenter les capacités de reconnaissance des colonnes A2A.

Les colonnes HSA ont permis de mesurer le  $K_d$  du furosémide avec 3 méthodes différentes et d'obtenir des valeurs cohérentes avec la littérature.

Avec les colonnes A2A il a été possible d'étudier 6 fragments dont 4 ayant de l'affinité confirmée en RMN et 2 non-ligands en RMN et d'obtenir les mêmes résultats pour les 6 fragments. La nano-WAC permet donc d'étudier des potentiels fragments pour une protéine membranaire et est applicable pour toutes protéines membranaires incorporées à des nanodisques.

Le couplage de cette technique avec la spectrométrie de masse via une interface nanospray devrait permettre un criblage rapide d'une bibliothèque de fragments. En prenant compte une durée totale d'analyse de 30 minutes pour un mélange de 10 à 20 composés, une journée devrait permettre de cribler 500 à 1000 composés tout en consommant peu de protéine grâce à la réutilisabilité des colonnes entre chaque expérience et à la miniaturisation du système.

## Bibliographie

1. le\_parcours\_du\_medicaments\_en\_france.pdf [En ligne]. [Cité 19 mars 2020]. Disponible sur : [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2019-03/le\\_parcours\\_du\\_medicaments\\_en\\_france.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2019-03/le_parcours_du_medicaments_en_france.pdf)
2. 100questions-Fiche-1.pdf [En ligne]. [Cité 19 mars 2020]. Disponible sur : <https://www.leem.org/sites/default/files/100questions-Fiche-1.pdf>
3. Commissioner O of the. Step 1: Discovery and Development. FDA [En ligne]. 18 avr 2019 [cité 19 mars 2020] ; Disponible sur : <http://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-1-discovery-and-development>
4. Understanding the Drug Discovery Process [En ligne]. Compound Interest. 2016 [cité 19 mars 2020]. Disponible sur : <https://www.compoundchem.com/2016/01/16/drug-discovery/>
5. Hughes J, Rees S, Kalindjian S, Philpott K. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol*. mars 2011;162(6):1239-49.
6. Pereira DA, Williams JA. Origin and evolution of high throughput screening. *Br J Pharmacol*. sept 2007;152(1):53-61.
7. Mayr LM, Fuerst P. The Future of High-Throughput Screening. *J Biomol Screen*. 1 juill 2008;13(6):443-8.
8. Mishra KP, Ganju L, Sairam M, Banerjee PK, Sawhney RC. A review of high throughput technology for the screening of natural products. *Biomed Pharmacother*. févr 2008;62(2):94-8.
9. Wu G, Doberstein SK. HTS technologies in biopharmaceutical discovery. *Drug Discov Today*. août 2006;11(15-16):718-24.
10. Janzen WP. Screening Technologies for Small Molecule Discovery: The State of the Art. *Chem Biol*. sept 2014;21(9):1162-70.
11. Cook N, Harris A, Hopkins A, Hughes K. Scintillation Proximity Assay (SPA) Technology to Study Biomolecular Interactions. *Curr Protoc Protein Sci* [En ligne]. Mars 2002 [cité 4 mai 2020];27(1). Disponible sur : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471140864.ps1908s27>
12. Checovich WJ, Bolger RE, Burke T. Fluorescence polarization--a new tool for cell and molecular biology. *Nature*. 18 mai 1995;375(6528):254-6.
13. González JE, Negulescu PA. Intracellular detection assays for high-throughput screening. *Curr Opin Biotechnol*. 1 déc 1998 ;9(6):624-31.
14. Beaudet L, Bédard J, Breton B, Mercuri RJ, Budarf ML. Homogeneous assays for single-nucleotide polymorphism typing using AlphaScreen. *Genome Res*. avr 2001;11(4):600-8.
15. Zock JM. Applications of high content screening in life science research. *Comb Chem High Throughput Screen*. nov 2009;12(9):870-6.
16. Remy I, Michnick SW. Application of protein-fragment complementation assays in cell biology. *BioTechniques*. févr 2007;42(2):137, 139, 141 passim.
17. Dittrich PS, Manz A. Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. mars 2006;5(3):210-8.
18. Black CB, Duensing TD, Trinkle LS, Dunlay RT. Cell-based screening using high-throughput flow cytometry. *Assay Drug Dev Technol*. févr 2011;9(1):13-20.

19. Smith DS, Eremin SA. Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules. *Anal Bioanal Chem.* 1 juill 2008;391(5):1499-507.
20. Leavesley SJ, Rich TC. Overcoming Limitations of FRET Measurements. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* avr 2016;89(4):325-7.
21. Cherry M, Mitchell T. Introduction to Fragment-Based Drug Discovery. In: Zartler ER, Shapiro MJ, éditeurs. *Fragment-Based Drug Discovery* [En ligne]. Chichester, UK : John Wiley & Sons, Ltd ; 2008 [cité 8 avr 2019]. p. 1-13. Disponible sur : <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470721551.ch1>
22. Erlanson DA. Introduction to Fragment-Based Drug Discovery. In: Davies TG, Hyvönen M, éditeurs. *Fragment-Based Drug Discovery and X-Ray Crystallography* [En ligne]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012 [cité 8 avr 2019]. p. 1-32. (Topics in Current Chemistry). Disponible sur: [https://doi.org/10.1007/128\\_2011\\_180](https://doi.org/10.1007/128_2011_180)
23. Romasanta AKS, van der Sijde P, Hellsten I, Hubbard RE, Keseru GM, van Muijlwijk-Koezen J, et al. When fragments link: a bibliometric perspective on the development of fragment-based drug discovery. *Drug Discov Today.* 1 sept 2018;23(9):1596-609.
24. Shuker SB, Hajduk PJ, Meadows RP, Fesik SW. Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR. *Science.* 29 nov 1996;274(5292):1531-4.
25. Hopkins AL, Groom CR, Alex A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. *Drug Discov Today.* 15 mai 2004;9(10):430-1.
26. Hajduk PJ, Greer J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nat Rev Drug Discov.* mars 2007;6(3):211-9.
27. Congreve M, Carr R, Murray C, Jhoti H. A 'Rule of Three' for fragment-based lead discovery? *Drug Discov Today.* 1 oct 2003;8(19):876-7.
28. Congreve M, Chessari G, Tisi D, Woodhead AJ. Recent Developments in Fragment-Based Drug Discovery. *J Med Chem.* 1 juill 2008;51(13):3661-80.
29. Hann MM, Leach AR, Harper G. Molecular Complexity, and Its Impact on the Probability of Finding Leads for Drug Discovery. *J Chem Inf Comput Sci.* 1 mai 2001;41(3):856-64.
30. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings<sup>1</sup>PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25.1. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 mars 2001;46(1):3-26.
31. Rees DC, Congreve undefined M, Murray CW, Carr R. Fragment-based lead discovery. *Nat Rev Drug Discov.* août 2004;3(8):660-72.
32. Pellecchia M, Bertini I, Cowburn D, Dalvit C, Giralt E, Jahnke W, et al. Perspectives on NMR in drug discovery: a technique comes of age. *Nat Rev Drug Discov.* sept 2008;7(9):738-45.
33. Perspicace S, Banner D, Benz J, Müller F, Schlatter D, Huber W. Fragment-based screening using surface plasmon resonance technology. *J Biomol Screen.* avr 2009;14(4):337-49.
34. David S. Hage. *Handbook of Affinity Chromatography*. In: *Handbook of Affinity Chromatography*. Second. CRC Press.
35. Starkenstein E. Ferment action and the influence upon it of neutral salts, *Biochem.* 1910; 24:210-8.
36. Draczkowski P, Matosiuk D, Jozwiak K. Affinity Chromatography as a Tool for Quantification of Interactions Between Drug Molecules and Their Protein Targets. In 2012.
37. He X, Sui Y, Wang S. Stepwise frontal affinity chromatography model for drug and protein interaction. *Anal Bioanal Chem.* sept 2018;410(23):5807-15.

38. Chan NWC, Lewis DF, Rosner PJ, Kelly MA, Schriemer DC. Frontal affinity chromatography-mass spectrometry assay technology for multiple stages of drug discovery: applications of a chromatographic biosensor. *Anal Biochem.* 1 août 2003 ;319(1) :1-12.
39. Meiby E, Simmonite H, le Strat L, Davis B, Matassova N, Moore JD, et al. Fragment screening by weak affinity chromatography: comparison with established techniques for screening against HSP90. *Anal Chem.* 16 juill 2013;85(14):6756-66.
40. Duong-Thi M-D, Meiby E, Bergström M, Fex T, Isaksson R, Ohlson S. Weak affinity chromatography as a new approach for fragment screening in drug discovery. *Anal Biochem.* 1 juill 2011;414(1):138-46.
41. Ohlson S, Duong-Thi M-D. Fragment screening for drug leads by weak affinity chromatography (WAC-MS). *Methods San Diego Calif.* 15 2018; 146:26-38.
42. Duong-Thi M-D, Bergström G, Mandenius C-F, Bergström M, Fex T, Ohlson S. Comparison of weak affinity chromatography and surface plasmon resonance in determining affinity of small molecules. *Anal Biochem.* 15 sept 2014; 461:57-9.
43. Duong-Thi M-D, Bergström M, Edwards K, Eriksson J, Ohlson S, Ying JTY, et al. Lipodisks integrated with weak affinity chromatography enable fragment screening of integral membrane proteins. *The Analyst.* 7 févr 2016;141(3):981-8.
44. Price AJ, Howard S, Cons BD. Fragment-based drug discovery and its application to challenging drug targets. *Essays Biochem.* 08 2017;61(5):475-84.
45. Stockwell J, Jakova E, Cayabyab FS. Adenosine A1 and A2A Receptors in the Brain: Current Research and Their Role in Neurodegeneration. *Mol J Synth Chem Nat Prod Chem [En ligne].* 23 avr 2017 [cité 8 avr 2019];22(4). Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6154612/>
46. Yuan G, Gedeon NG, Jankins TC, Jones GB. Novel approaches for targeting the adenosine A<sub>2A</sub> receptor. *Expert Opin Drug Discov.* 2 janv 2015 ;10(1):63-80.
47. Etherington L-AV, Frenguelli BG. Endogenous adenosine modulates epileptiform activity in rat hippocampus in a receptor subtype-dependent manner. *Eur J Neurosci.* mai 2004;19(9):2539-50.
48. Malhotra J, Gupta YK. Effect of adenosine receptor modulation on pentylenetetrazole-induced seizures in rats. *Br J Pharmacol.* 9 janv 1997;120(2):282-8.
49. Rouck J, Krapf J, Roy J, Huff H, Das A. Recent Advances in Nanodisc Technology for Membrane Proteins Studies (2012–2017). *FEBS Lett.* juill 2017;591(14):2057-88.
50. Igonet S, Raingeval C, Cecon E, Pučić-Baković M, Lauc G, Cala O, et al. Enabling STD-NMR fragment screening using stabilized native GPCR: A case study of adenosine receptor. *Sci Rep.* 25 mai 2018 ;8(1) :1-14.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance :

<p align="center"><b>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</b></p> <p>présenté par : <b>RENAUDIN Aurélien</b></p> <p>Sujet : Chromatographie de faible affinité pour la découverte de médicament : nouvelles méthodologies de criblage miniaturisées pour les protéines membranaires.</p> <p><u>Jury :</u> Président : M. Igor CLAROT, Professeur Directeur : M. Arnaud, PALLOTTA, Maître de conférences Juges : M Jean Jacques LAHET, Pharmacien Mme Claire DEMESMAY, Professeur</p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 16/12/20</p> <p align="center">Le Président du Jury      Directeur de Thèse</p> <p align="center">M. I. Clarot      M. A. PALLOTTA</p>  
<p align="center">Vu et approuvé, Nancy, le 16.01.2021</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p>  <p align="center">Pr. Raphaël DUBREUIL</p>	<p align="center">Vu, Nancy, le</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p>  <p align="center">N° d'enregistrement : 11598 c</p>

N° d'identification :

**TITRE**

**Chromatographie de faible affinité pour la découverte de médicament : nouvelles méthodologies de criblage miniaturisées pour les protéines membranaires.**

**Thèse soutenue le 10/02/2021**

**Par RENAUDIN Aurélien**

**RESUME :**

L'industrie Pharmaceutique est toujours à la recherche de nouveaux principes actifs. La première étape consiste à identifier une cible thérapeutique. Une fois cette cible identifiée il faut découvrir une molécule qui présente l'activité recherchée sur la cible thérapeutique. Cette molécule est identifiée lors d'une étape de criblage. La méthode de référence est le high throughput screening est a été majoritairement utilisée pour découvrir des principes actifs ces dernières années, mais comme toute techniques elle présente ses avantages et ses limites. Pour pallier ces limites de nouvelles approches sont développée. Une nouvelle approche pour trouver des molécules actives est le Fragment based drug design qui repose sur l'identification de petit fragment ayant une faible affinité pour la cible. Plusieurs techniques capables de détecter la faible affinité sont utilisées pour cribler des bibliothèques de fragments. Cependant ces méthodes présentent des limitations comme une grande consommation de protéine et de nouvelles techniques complémentaires sont nécessaires. La chromatographie de faible affinité ou weak affinity chromatography est une nouvelle approche qui a déjà été développée pour le FBDD. La miniaturisation de cette technique (nano-WAC) permettrait de réduire la consommation de protéines. L'objectif expérimental de ce travail est de préparer des colonnes d'affinité miniaturisées, d'y greffer des protéines (les cibles thérapeutiques), d'évaluer leurs performances et d'identifier de potentiels fragments pour une protéine membranaire modèle : A2A. Des colonnes HSA et nanodisques A2A ont été préparées et le nombre de protéines greffées est suivi en UV. Une augmentation du nombre de nanodisques greffés a été réalisée par ajout de cycle de greffage. Une évaluation des capacités de reconnaissance de la colonne avec des fragments modèles (le furosémide et la warfarine) puis une comparaison de trois méthodes pour déterminer le Kd des modèles a été effectuée et montre des valeurs cohérentes entre elles et avec la littérature. Enfin l'étude de fragments potentiels pour l'A2A a été effectuée sur les colonnes nanodisques A2A. 4 fragments confirmés comme ayant de l'affinité en RMN ont bien montré une affinité avec cette méthode. La nano-WAC permet donc d'étudier des potentiels fragments pour une protéine membranaire et est applicable pour toutes protéines membranaires incorporées à des nanodisques.

**MOTS CLES : Criblage-Criblage à haut débit-Fragment based Drug Design--Chromatographie de faible affinité-Protéine membranaire**

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
<u>ARNAUD PALLOTA</u>	<u>CITHEFOR</u>	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème <b>1</b>

- Thèmes**
- |                            |                              |
|----------------------------|------------------------------|
| 1 – Sciences fondamentales | 2 – Hygiène/Environnement    |
| 3 – Médicament             | 4 – Alimentation – Nutrition |
| 5 - Biologie               | 6 – Pratique professionnelle |