



Université Claude Bernard



# DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **13 décembre 2019**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **LECAS Lucile**

Titre de la thèse : *« Développement d'une nouvelle approche de criblage et de caractérisation d'interactions ligand-protéines membranaires par chromatographie de faible affinité miniaturisée ».*



## Résumé

Comprendre et quantifier les interactions biomoléculaires est au cœur de la recherche pharmaceutique aujourd'hui, dans le but de développer de nouvelles molécules thérapeutiques. Parmi les différentes approches, le Fragment-Based Drug Discovery consiste à identifier des fragments (petites molécules organiques de faible affinité pour une cible thérapeutique), puis à les assembler ou les modifier pour élaborer des molécules de plus forte affinité (meilleure activité) et spécificité. Cette approche requiert des méthodes de criblage adaptées à la détection de faibles affinités ( $\mu\text{M}$  -  $\text{mM}$ ).

Si plusieurs méthodes biophysiques sont actuellement utilisées (RMN, SPR, MST, ...), il a été démontré que la Chromatographie de Faible Affinité peut être une approche alternative intéressante pour le criblage de fragments. Cette méthode consiste à immobiliser la protéine cible sur un support chromatographique puis à mesurer la rétention des fragments (directement liée à leur affinité pour la cible). Ainsi, la consommation en protéine cible est limitée et le temps de criblage réduit par la possibilité d'analyse de mélanges complexes (facilité par son pouvoir séparatif et la possibilité de couplage avec la spectrométrie de masse). Cependant, comme la consommation en protéine est un paramètre critique pour les cibles difficiles à produire et purifier, notre objectif est de développer cette technique à échelle miniaturisée. En réduisant la consommation en protéine à l'échelle du  $\mu\text{g}$ , nous ouvrons alors la possibilité d'étudier les protéines membranaires, cibles au cœur des programmes de recherche pharmaceutique aujourd'hui.

Pour atteindre cet objectif, un monolithe est synthétisé in-situ dans un capillaire de  $75 \mu\text{m}$  et la protéine est également greffée in-situ. Nous avons dans un premier temps comparé différentes combinaisons de monolithes et de voies de greffage et les colonnes d'affinité ainsi préparées ont été évaluées par analyse frontale avec des ligands d'affinité connue pour une protéine soluble modèle. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec un monolithe organique fonctionnalisé streptavidine qui permet l'immobilisation rapide de la protéine cible biotinylée grâce à la forte interaction streptavidine-biotine. Cette voie de biofonctionnalisation a engendré la quantité de protéine active la plus importante (avec environ  $4 \text{ pmol.cm}^{-1}$ ), des interactions non-spécifiques négligeables et un taux d'activité de la protéine supérieur à 80 %. De plus, ce greffage peut être suivie en UV donc la quantité de protéine capturée peut être directement déterminée et seule la quantité exacte de protéine nécessaire est consommée. Ajouté à cela la rapidité d'immobilisation ( $\sim 10 \text{ min}$ ), cette procédure répond à toutes les exigences concernant les protéines sensibles.

Nous avons ensuite travaillé sur une protéine membranaire, le récepteur  $A_{2A}$  de l'adénosine ( $AA_{2A}R$ ), insérée dans un nanodisque pour assurer sa stabilité.  $AA_{2A}R$  a été greffée sur des colonnes streptavidine par le nanodisque portant un tag biotine. Concernant la quantité de protéine, moins de 1  $\mu\text{g}$  suffisent pour préparer une colonne. Ensuite, des essais par analyse frontale sur des antagonistes et agonistes ont confirmé que la protéine a gardé son activité après immobilisation. Des affinités de quelques dizaines à quelques centaines de  $\mu\text{M}$  ont pu être détectées et quantifiées (détermination de  $K_d$ ) et des expériences de compétition ont permis de valider le site d'interaction des ligands. Enfin l'identification de ligands parmi différents fragments illustre tout le potentiel de la chromatographie de faible affinité ultra miniaturisée pour le Fragment Based Drug Discovery appliqué aux protéines membranaires.

**Mots clés :** chromatographie de faible affinité ; miniaturisation ; phase stationnaire monolithique ; analyse frontale ; analyse zonale ; protéine membranaire ; nanodisque