



HAL
open science

Méthodes RMN pour la découverte de nouveaux ligands ciblant les récepteurs couplés aux protéines G

Claire Raingeval

► **To cite this version:**

Claire Raingeval. Méthodes RMN pour la découverte de nouveaux ligands ciblant les récepteurs couplés aux protéines G. Autre. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1215 . tel-02460994

HAL Id: tel-02460994

<https://theses.hal.science/tel-02460994v1>

Submitted on 30 Jan 2020

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.



THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Opérée au sein de :

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED206 Chimie

Soutenue publiquement le 23/10/2019, par :

Claire RAINGEVAL

Méthodes RMN pour la découverte de nouveaux ligands ciblant les récepteurs couplés aux protéines G

Devant le jury composé de :

Claire DEMESMAY-GUILHIN

Professeur des universités, Institut des sciences analytiques

Présidente

Jean-Louis BANERES

Directeur de recherche, Institut des Biomolécules Max Mousseron

Rapporteur

Nicolas WOLFF

Directeur de recherche, Institut Pasteur

Rapporteur

Renaud WAGNER

Ingénieur de recherche, Biotechnologie et Signalisation Cellulaire

Examineur

Isabelle KRIMM

Chargé de recherche, Centre de RMN à très hauts champs

Directrice de thèse

"Premier principe : ne se laisser abattre ni par les êtres, ni par les événements."

- Marie Curie, prix Nobel de physique (1903) et de chimie (1911)

Résumé

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) constituent la plus grande famille de protéines membranaires encodée dans le génome humain. Ces protéines de signalisation exercent leur action à la surface des cellules, en réponse à une grande variété de stimuli. Elles jouent un rôle primordial dans une multitude de fonctions physiologiques et leur dysfonctionnement est à l'origine de diverses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, métaboliques, neuro-dégénératives, psychiatriques et oncologiques. Avec plus de 30% des médicaments actuellement disponibles sur le marché qui exercent leur action via un RCPG, ces protéines représentent la plus importante famille de cibles thérapeutiques. Cependant, la découverte de nouveaux ligands reste un challenge pour ces récepteurs membranaires peu stables et aux modes d'activation complexes. L'objectif de ces travaux de thèse a été de mettre en place des protocoles de criblage, basés sur l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'état liquide, pour permettre l'identification de molécules de bas poids moléculaires, appelées fragments. La méthode des fragments, d'abord développée et appliquée sur des cibles pharmaceutiques solubles, est aujourd'hui considérée comme une stratégie innovante pouvant impulser la recherche de nouveaux ligands de RCPGs. Cette approche permet non seulement de découvrir de nouveaux châssis moléculaires mais aussi de nouveaux sites de liaison. Pour faire la démonstration de la faisabilité, le récepteur A_{2A} de l'adénosine ($AA_{2A}R$) a été choisi comme modèle. Le criblage d'une chimiothèque de 640 fragments a été réalisé en employant l'expérience RMN de *saturation transfer difference* (STD) sur $AA_{2A}R$ pleine taille, solubilisé en micelles de détergent. Puis, les travaux se sont focalisés sur l'étude du récepteur enchâssé dans des membranes et la faisabilité d'un criblage de fragments dans ces échantillons plus natifs a été investiguée. Les avantages, inconvénients et artefacts des expériences RMN pour l'identification de fragments se liant aux RCPGs sont présentés et discutés dans ce manuscrit.

Abstract

G protein-coupled receptors (GPCRs) represent the largest class of membrane proteins encoded in the human genome. These signalling proteins operate at cell surface in response to a wide variety of stimuli. They play a critical role in most physiological processes and therefore are also prominent in many associated dysfunctions including cardiovascular, metabolic, neurodegenerative, psychiatric and oncologic diseases. With more than 30% of all drugs on the market exerting their action via GPCRs, this family of proteins also constitutes the largest commercial drug target. However, the discovery of new ligands remains a major challenge for these unstable receptors with complex mechanisms of activation. The aim of this thesis work is to implement screening protocols, based on the use of solution nuclear magnetic resonance (NMR), to allow the identification of low-molecular weight molecules known as fragments. Fragment-based drug discovery, firstly developed and broadly applied to soluble pharmaceutical targets, is now considered as an innovative strategy able to boost GPCR hit discovery. This approach not only allows the exploration of new chemical patterns but also new binding sites. In order to demonstrate the feasibility, the adenosine receptor A_{2A} ($A_{2A}AR$) has been chosen as a model. The screening of 640 fragments has been conducted using the saturation transfer difference (STD) NMR experiment on full-length $A_{2A}AR$, solubilized in detergent micelles. Then, the research has been focused on the study of $A_{2A}AR$ embedded in membranes and the feasibility of a fragment screening in this close-to-native environment has also been investigated. Benefits, drawbacks and artefacts related to NMR experiments for the identification of fragments binding GPCRs are presented and discussed in this manuscript.

Abréviations

A _{2A} AR	Récepteur A _{2A} de l'adénosine
AR	Récepteur de l'adénosine
DDM	N-dodecyl- β -D-maltopyranoside
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
C-ter	Carboxy-terminale
CHS	Cholestérol hemisuccinate
CMC	Concentration micellaire critique
DQSQ	Double-quanta simple-quantum
etNOESY	<i>Exchange-transferred nuclear Overhauser spectroscopy</i>
EXSY	<i>Exchange spectroscopy</i>
FBDD	<i>Fragment-based drug design</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
HA	Atome lourd
HMQC	Corrélation hétéronucléaire multiple-quanta
HSA	Albumine sérique humaine
HSQC	Corrélation hétéronucléaire simple-quantum
HTS	<i>High throughput screening</i>
ILOE	<i>interligand overhauser effect</i>
INPHARMA	<i>Interligand NOEs for pharmacophore mapping</i>
LE	Efficacité de liaison
MAPK	<i>Mitogen-associated protein kinases</i>
N-ter	Amino-terminale
NAM	Modulateur allostérique négatif
NOE	Effet Overhauser nucléaire
NOESY	<i>Nuclear Overhauser spectroscopy</i>
PAM	Modulateur allostérique positif

RCPGs	Récepteurs couplés aux protéines G
RO5	Règles des cinq
RO3	Règles des trois
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SAM	Modulateur allostérique silencieux
SBDD	<i>Structure-based drug design</i>
SPR	Résonance plasmonique de surface
STD	<i>Saturation transfert difference</i>
STDD	<i>Saturation transfert double difference</i>
TCS	<i>Transferred cross-saturation</i>
TINS	<i>Target immobilized nuclear magnetic resonance screening</i>
TROSY	<i>Transverse relaxation optimized spectroscopy</i>
WAC	<i>Weak affinity chromatography</i>
WaterLOGSY	<i>Water ligand observed via gradient spectroscopy</i>

Table des matières

I	Introduction	1
1	Les récepteurs couplés aux protéines G : un engouement passé, présent et futur	3
1.1	Portrait de famille	4
1.2	Les nouveaux paradigmes de signalisation	7
1.2.1	De l'analogie restrictive de l'interrupteur...	7
1.2.2	...au concept de signalisation biaisée	9
1.2.3	Coopérativité et allostérie	10
1.3	Les challenges techniques de la préparation d'échantillons et leurs solutions	13
1.3.1	Production de protéines	13
1.3.2	Solubilisation et stabilisation	13
1.4	Recherche et développement de composés pharmaceutiques ciblant les récepteurs couplés aux protéines G	16
2	La résonance magnétique nucléaire : un puissant outil d'analyse des interactions impliquant les récepteurs couplés aux protéines G	20
2.1	La détection et la caractérisation des ligands	21
2.1.1	L'effet Overhauser nucléaire à la base du travail d'investigation	21
2.1.2	Identification de ligands	27
2.1.3	Caractérisation des site et mode de liaison des ligands	30
2.1.4	Elucidation structurale	34
2.2	La dynamique des récepteurs à l'étude	35
2.2.1	Sélectivité conformationnelle	36

2.2.2	Sélectivité fonctionnelle	38
2.2.3	Modulation allostérique	39
3	Conception de molécules bioactives par la méthode des fragments : découverte et développement	41
3.1	La genèse de la méthode des fragments	41
3.2	Une voie avantageuse pour la conception de médicaments	43
3.2.1	Taux de touches	43
3.2.2	Efficacité de liaison	44
3.2.3	Couverture de l'espace chimique	45
3.3	À la recherche de points de départ	48
3.3.1	Essais biologiques	48
3.3.2	Résonance plasmonique de surface	52
3.3.3	Résonance magnétique nucléaire	52
3.4	Des fragments aux médicaments	55
4	Description du projet de thèse	58
4.1	Le récepteur A _{2A} de l'adénosine comme modèle	58
4.1.1	Localisation et rôles physiopathologiques	59
4.1.2	Développements cliniques	59
4.2	Mise au point et application du criblage de fragments par RMN	63
II	Matériels et méthodes	65
5	Production et purification de protéine	67
5.1	Préparation d'échantillons en cellules d'insectes <i>Spodoptera frugiperda</i>	67
5.2	Préparation d'échantillons en levures <i>Pichia Pastoris</i>	68
6	Les expériences de résonance magnétique nucléaire	70
6.1	Instrumentation	70
6.2	Echantillons	70
6.2.1	A _{2A} AR solubilisé en micelles de détergent	70

6.2.2	A _{2A} AR enchâssé dans des préparations de membranes	71
6.3	Expériences	72
6.3.1	L'expérience STD	72
6.3.2	L'expérience NOESY	73
III	Résultats et discussion	74
7	Criblage de fragments sur A_{2A}AR solubilisé en micelles de détergent : preuve de concept et application	76
7.1	Investigation de la liaison de ligands connus	77
7.1.1	Liaison d'antagonistes	77
7.1.2	Liaison d'agonistes	79
7.1.3	Cartographie des épitopes STD	80
7.2	A la recherche de nouveaux ligands	82
7.2.1	Preuve de concept	83
7.2.2	Criblage d'une librairie complète de fragments en présence d'ANR-94	88
7.2.3	Evaluation de l'influence d'ANR-94 sur la liaison des fragments	91
8	Vers le criblage de fragments sur A_{2A}AR en préparations de membranes	93
8.1	L'impossible STD	93
8.2	Application de l'expérience NOESY	96
8.2.1	Investigation de la liaison de ligands connus	96
8.2.2	Le criblage de fragments sur membranes au banc d'essai	97
8.2.3	Analyse de mélange de fragments en présence de la caféine	101
IV	Conclusions et perspectives	106

Liste des figures

1.1	Topologie commune des RCPGs	5
1.2	Variabilité de structures entre familles de RCPGs.	6
1.3	Mécanismes théoriques d'activation des RCPGs	7
1.4	Modèle du complexe ternaire	8
1.5	Modulation allostérique	12
1.6	Différents environnements de solubilisation	14
1.7	Effet de médicaments orthostériques et allostériques sur la signalisation des RCPGs	18
1.8	Structures de médicaments allostériques ciblant des RCPGs	19
2.1	Diagramme énergétique et transitions induites par la relaxation dipolaire	22
2.2	Evolution du facteur NOE η en fonction de $\omega_0\tau_C$	24
2.3	Schématisation des spectres 2D NOESY d'une petite molécule libre et liée	24
2.4	Principe illustré des expériences WaterLOGSY et STD	28
2.5	Application du STDD pour l'identification de ligands de RCPGs	30
2.6	Principe illustré des expériences ILOE et INPHARMA	31
2.7	Elucidation du mode de liaison de ligands par cartographie des épitopes STD	33
2.8	Mode de liaison privilégié du 4-méthylcatéchol sur PRDX5	34
2.9	Expériences RMN pour l'étude de la dynamique du récepteur β_2 adrénergique	37
3.1	Règles des cinq de Lipinsky et règles des trois d'Astex	42
3.2	La méthode des fragments	43
3.3	Appréhension des concepts d'affinité et efficacité de liaison	45

3.4	Evolution de l'efficacité de liaison en fonction de l'affinité et de la complexité moléculaire	46
3.5	Comparaison de bibliothèques de fragments et HTS	47
3.6	Expérience de déplacement d'un ligand de référence marqué	49
3.7	Principe illustré de l'expérience SPR	53
3.8	Principe illustré de l'expérience TINS	54
3.9	Des fragments aux médicaments vemurafenib et venetoclax	57
4.1	Ligands connus du récepteur A _{2A} AR de l'adénosine	62
4.2	Structure de l'antagoniste ANR-94	64
7.1	Validation de la liaison d'antagonistes sur A _{2A} AR en micelles par STD	78
7.2	Validation de la liaison d'agonistes sur A _{2A} AR en micelles par STD	79
7.3	Cartographie des épitopes STD de l'adénosine sur A _{2A} AR	81
7.4	Elucidation du mode de liaison de l'adénosine sur A _{2A} AR par STD, assistée par le dynamique moléculaire	82
7.5	Visualisation de l'interaction non-spécifique entre ZM241385 et les micelles de détergent par NOESY	83
7.6	Initiation du criblage de fragment sur A _{2A} AR en micelles par STD	84
7.7	Structures et catégorisation d'un échantillon de fragments criblés sur A _{2A} AR en micelles par STD	85
7.8	Validation fonctionnelle des fragments touchés d'A _{2A} AR sur la voie de signalisation de l'AMPc	87
7.9	Validation de l'interaction du fragment F462 dans le site orthostérique d'A _{2A} AR par STD	88
7.10	Criblage d'une bibliothèque de fragments sur A _{2A} AR en micelles de détergent par STD	89
7.11	Vérification des touches identifiées lors du criblage	89
7.12	Estimation de la part d'interaction non-spécifique des touches avec les micelles de détergent	90
7.13	Investigation de l'impact du compétiteur orthostérique ANR-94 sur la liaison des touches	91

7.14	Structures des fragments allostériques liants A _{2A} AR	92
8.1	Investigation de la liaison d'un agoniste et d'un antagoniste connus sur A _{2A} AR en membranes par STD	95
8.2	Validation de la liaison d'antagonistes sur A _{2A} AR en membranes par NOESY . .	96
8.3	Tests préliminaires d'investigation de l'interaction de fragments sur A _{2A} AR en membranes par NOESY	98
8.4	Criblage d'un mélange de dix fragments sur A _{2A} AR en micelles de détergent par STD	99
8.5	Criblage d'un mélange de dix fragments sur A _{2A} AR en membranes par NOESY .	100
8.6	Validation des fragments touches F410 et F429 en présence de l'antagoniste caféine par NOESY	102
8.7	Criblage d'un mélange de dix fragments sur A _{2A} AR en micelles de détergent par STD	102
8.8	Criblage d'un mélange de dix fragments sur A _{2A} AR en membranes par NOESY .	103
8.9	Validation des fragments touches F63, F64, G66, F70 et F90 en présence d'A _{2A} AR par NOESY	104

Liste des tableaux

2.1	Expériences RMN pour la détection et la caractérisation de ligands de RCPGs .	26
2.2	Expériences RMN pour l'examen du processus d'activation de RCPGs lors de la liaison de ligands	36
3.1	Méthodes de criblage pour la découverte de nouveaux ligands de RCPGs par la méthode des fragments	48

Première partie

Introduction

Chapitre 1

Les récepteurs couplés aux protéines G : un engouement passé, présent et futur

Les récepteurs membranaires sont des protéines d'intérêt biologique majeur puisqu'ils permettent aux cellules de percevoir les informations venues de leur environnement et d'y apporter une réponse adaptée en régulant les différentes voies de signalisation (Pierce et al., 2002). Avec plus de 800 membres, exprimés dans tous les organes du corps humain, la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) en est la plus grande représentante (Katritch et al., 2013). Ils reconnaissent et transfèrent l'information portée par une très grande diversité de signaux incluant des photons, des ions, des nucléotides, des neurotransmetteurs, des lipides et des hormones (Lagerström & Schiöth, 2008). Les RCPGs sont au coeur de la plupart des grands processus physiologiques, avec chacun une fonction qui lui est spécifique, tels que la vision, le système immunitaire, la neurotransmission, la prolifération cellulaire, et sont, par conséquent, impliqués dans de nombreux dysfonctionnements pathologiques comme l'asthme, le diabète, les maladies respiratoires, cardiaques, neurodégénératives, et le cancer (Heng et al., 2013). Approximativement 30% des médicaments actuellement disponibles sur le marché exercent leur action via un RCPG (Overington et al., 2006 ; Hauser et al., 2017). Ces récepteurs constituent une importante réserve de cibles thérapeutiques potentielles dont une part significative n'a pas encore de ligand endogène identifié (Chung et al., 2008). L'attribution du prix Nobel de chimie 2012

aux professeurs Robert Lefkowitz et Brian Kobilka pour leurs travaux et avancées spectaculaires dans le champ de recherches des RCPGs, tant pour la compréhension des mécanismes régissant leur signalisation que pour la détermination de leurs structures, souligne encore leur importance (Bockaert, 2012).

1.1 Portrait de famille

L’alignement des séquences en acides aminés des RCPGs, déduites des séquences nucléotidiques des gènes correspondants, et l’étude des profils d’hydropathicité¹, ont permis de mettre en avant l’existence d’une architecture commune, confirmée *a posteriori* par la résolution de structures tridimensionnelles (Hibert et al., 1993). Ainsi, les RCPGs sont constitués de sept hélices α transmembranaires (notées TM1 à 7), connectées entre-elles par trois boucles extracellulaires (notées ECL1 à 3) et trois boucles intracellulaires (notées ICL1 à 3), d’une extrémité aminotermine (N-ter) extracellulaire et d’une extrémité carboxy-terminale (C-ter) intracellulaire (Figure 1.1). Cette similarité, imputable à une origine évolutive commune, est particulièrement observable au niveau des segments transmembranaires qui présentent la plus forte identité de séquence avec la présence de résidus fondamentaux pour l’intégrité structurale et fonctionnelle. À côté de cela, les régions hydrophiles exposées présentent plus de divergences, en particulier la boucle ICL3 et les extrémités N-ter et C-ter. De la variabilité est également amenée entre les membres de la superfamille, par les sites de liaison des ligands endogènes (qui peuvent impliquer l’extrémité N-ter) et peut être directement liée à la diversité des messagers capables d’interagir avec les récepteurs (Manglik & Kobilka, 2014).

Les points de divergence, ou de convergence, ont été utilisés pour catégoriser les centaines de RCPGs répertoriés (Kumari et al., 2009). Les répartitions les plus connues organisent les RCPGs en classes (A à F) (Kolakowski, 1994) ou familles (système GRAFS) (Schiöth & Fredriksson, 2005), en se basant, respectivement, sur la recherche de similarités ou sur le séquençage et la phylogénie des récepteurs. Elles permettent ainsi de distinguer chez l’homme : la famille des récepteurs de type rhodopsine (classe A, 701 membres), la famille des récepteurs de type sécrétine (classe B, 15 membres), la famille *adhesion* (classe B, 24 membres), la famille des récepteurs métabotropes (classe C, 15 membres) et les familles *frizzled/smoothened* (classe F, 24 membres).

1. Hydrophobie ou hydrophilie

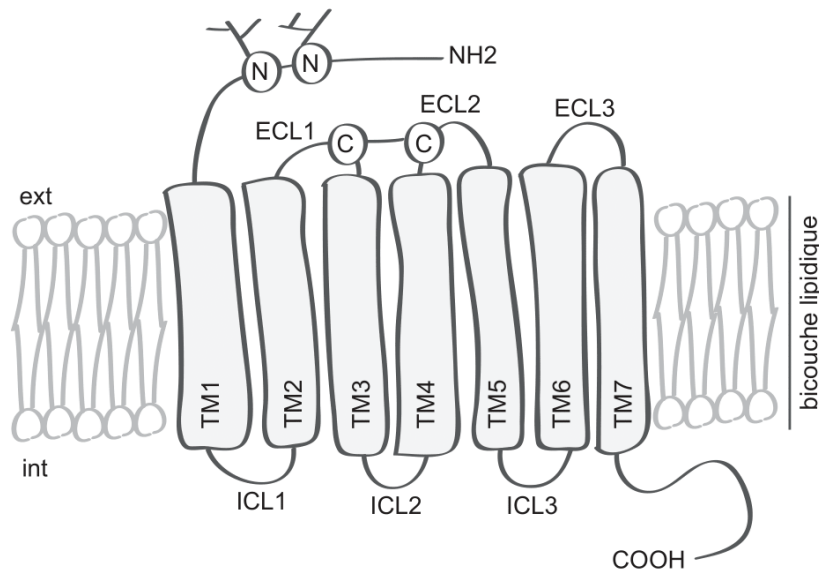


FIGURE 1.1 – **Topologie commune des RCPGs.** Les RCPGs partagent une même structure constituée de sept hélices alpha hydrophobes transmembranaires (TM1-7) connectées entre elles par trois boucles extracellulaires (ECL1-3) et trois boucles intracellulaires (ICL1-3). Deux cystéines (C) particulièrement conservées chez les RCPGs, localisées sur ECL1 et ECL2, peuvent former un pont disulfure entre ces deux boucles. L'extrémité N-terminale (NH₂) extracellulaire (ext) peut subir des modifications post-traductionnelles de type N-glycosylation. Et l'extrémité C-terminale (COOH) intracellulaire (int) peut être phosphorylée sur certains résidus par différentes kinases.

La famille des récepteurs de type rhodopsine est la plus grande famille de RCPGs et la plus diversifiée puisqu'elle comprend près de 90% des RCPGs totaux. Elle est également, de fait, la mieux caractérisée. L'homologie globale entre les récepteurs de cette classe est faible et les différents RCPGs constituant cette première famille peuvent être subdivisés en trois groupes selon le mode et le site de fixation du ligand au récepteur (Figure 1.2 A). Le premier groupe contient les récepteurs aux petites molécules et le plus grand cluster de récepteurs olfactifs (388 membres). Les ligands de ce groupe se lient dans une poche hydrophobe située entre les hélices transmembranaires (Figure 1.2 A-1). Le second groupe contient les récepteurs des peptides et notamment les récepteurs de neuropeptides, ainsi que les récepteurs de certaines cytokines. Le site de liaison de ce groupe implique l'extrémité N-ter, ECL1 et ECL2 et la partie supérieure des TM (Figure 1.2 A-2). Enfin, le troisième groupe réunit les récepteurs aux grosses hormones glycoprotéiques dont le site de liaison est essentiellement localisé dans la partie N-ter (Figure 1.2 A-3). La famille des récepteurs de type sécrétine est toujours caractérisée par une extrémité N-ter de grande taille où se lient principalement de grosses hormones peptidiques (Figure 1.2

B). Pour la famille des récepteurs métabotropiques du glutamate, des récepteurs GABA ou encore des récepteurs au calcium et aux phéromones, la liaison des ligands a la particularité de s'effectuer sur l'extrémité N-ter dont le repliement aboutit à la formation de deux lobes qui constituent le site de d'interaction (Figure 1.2 C). Les familles adhésion et *frizzled/smoothened* sont relativement peu décrites dans la littérature.

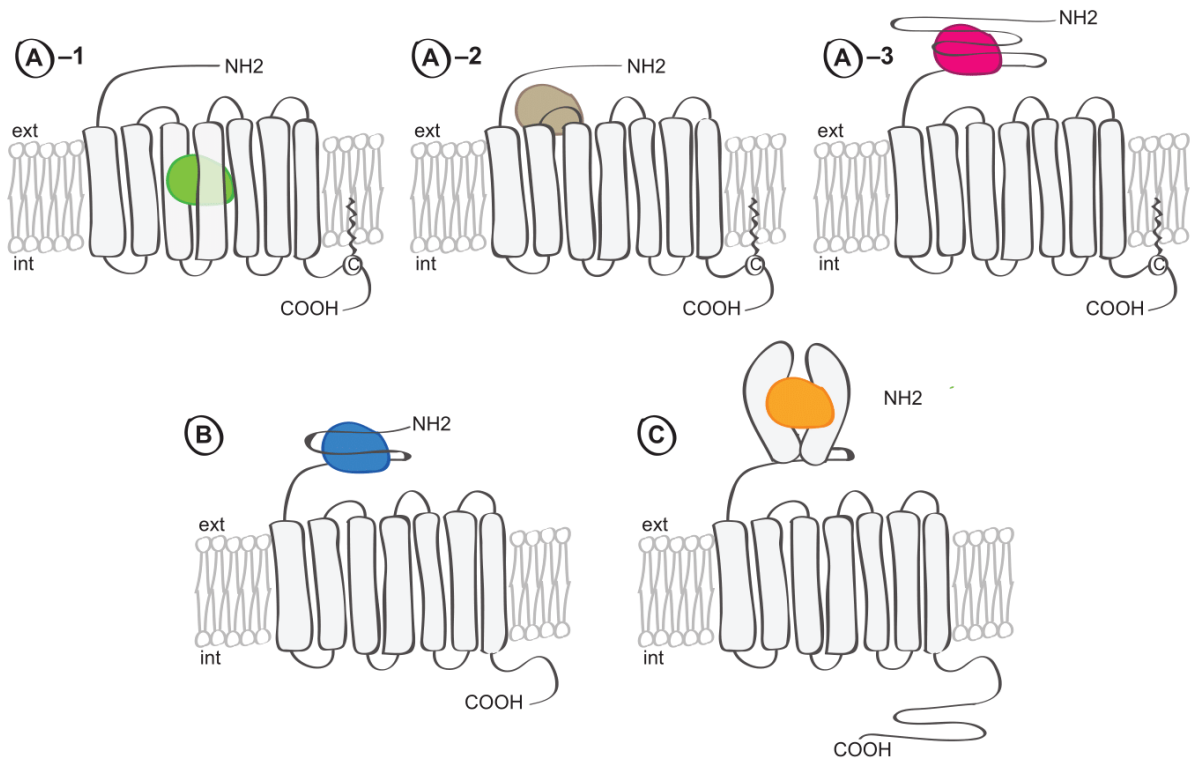


FIGURE 1.2 – Variabilité de structures entre familles de RCPGs. (A1-3) Structures des différents sous-groupes de la famille rhodopsine. Elle se distingue, au niveau structural, par la présence de sites d'ancrage lipidique à la membrane, au niveau de l'extrémité C-terminale (COOH) intracellulaire (int), résultant d'une modification réversible de cystéines par palmitoylation. Le premier sous-groupe contient les récepteurs aux petites molécules, types amines, nucléotides, opiacés et neurotransmetteurs, qui se lient dans une poche hydrophobe située entre les TM. Le second sous-groupe contient notamment les récepteurs de neuropeptides et de certaines cytokines, qui interagissent au niveau de l'extrémité N-ter, de ECL1 et ECL2 et de la partie supérieure des TM. Enfin, le troisième sous-groupe réunit les récepteurs aux hormones glycoprotéiques, dont le site de liaison est essentiellement localisé dans la partie N-ter. (B) Structure de la famille sécrétine. L'extrémité N-terminale (NH2) extracellulaire (ext) contient plusieurs cystéines (C) à l'origine d'un important réseau de ponts salins. La morphologie des récepteurs de cette famille est proche de celle des récepteurs de la famille rhodopsine, sauf qu'ils ne possèdent pas de site de palmitoylation. Les ligands de cette classe sont principalement des hormones peptidiques. (C) Structure de la famille des récepteurs métabotropiques. Elle regroupe notamment les récepteurs du glutamate et les récepteurs GABA. La liaison des ligands a la particularité de s'effectuer sur l'extrémité N-ter dont le repliement aboutit à la formation de deux lobes.

1.2 Les nouveaux paradigmes de signalisation

1.2.1 De l'analogie restrictive de l'interrupteur...

Aux prémices de la recherche centrée sur l'élucidation du mécanisme d'action des RCPGs, il est établi que la liaison d'un ligand sur son récepteur apo, à la surface externe des cellules, génère une réponse biologique (Gilchrist, 2010) (Figure 1.3 A). L'acquisition de connaissances sur le couplage avec les protéines G hétérotrimériques a permis d'implémenter les premières théories et d'élaborer le modèle du complexe ternaire. Dans ce modèle, le ligand, le récepteur, ainsi que la protéine G, interagissent de manière coopérative. Le complexe qu'ils forment est considéré comme indispensable à la communication cellulaire (De Lean et al., 1980) (Figures 1.3 B et 1.4).

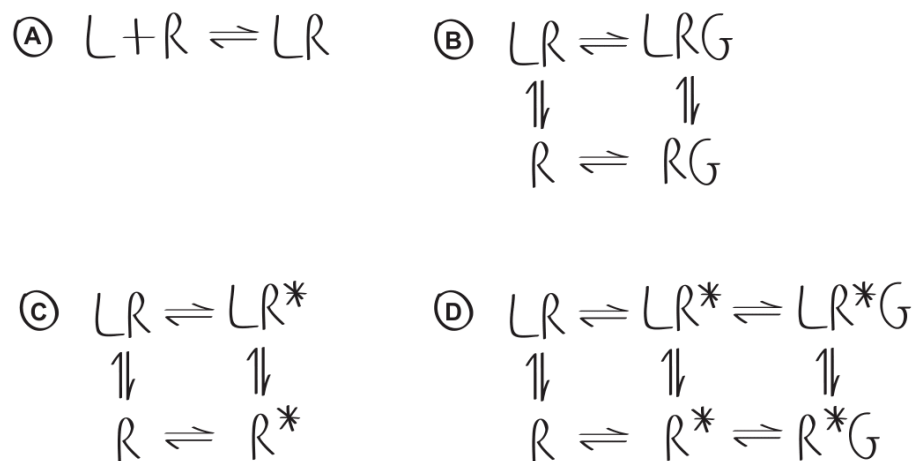


FIGURE 1.3 – Mécanismes théoriques d'activation des RCPGs (A) Dans les premiers modèles élaborés, le ligand endogène (L) interagit avec son récepteur (R) pour former un complexe (LR) à l'origine d'une réponse cellulaire. (B) Le modèle du complexe ternaire introduit l'intervention d'un troisième partenaire dans la signalisation, les protéines G hétérotrimériques (G). (C) Le modèle à deux états suggère qu'un récepteur apo existe sous deux formes, inactive (R) et active (R*) à l'origine de son activité constitutive. (D) Le modèle du complexe ternaire étendu est une combinaison du modèle du complexe ternaire et du modèle à deux états.

À côté de cela, la quantification d'une activité basale des RCPGs, pouvant être inhibée par certaines molécules actives, remet en question l'idée selon laquelle la formation d'un complexe entre le récepteur et son ligand endogène est un prérequis absolu à l'activation des récepteurs (Samama et al., 1993; Chidiac et al., 1994) (Figure 1.3 C). Le mécanisme d'action des RCPGs est corrigé pour reposer sur un modèle à deux états qui implique qu'un récepteur puisse exister

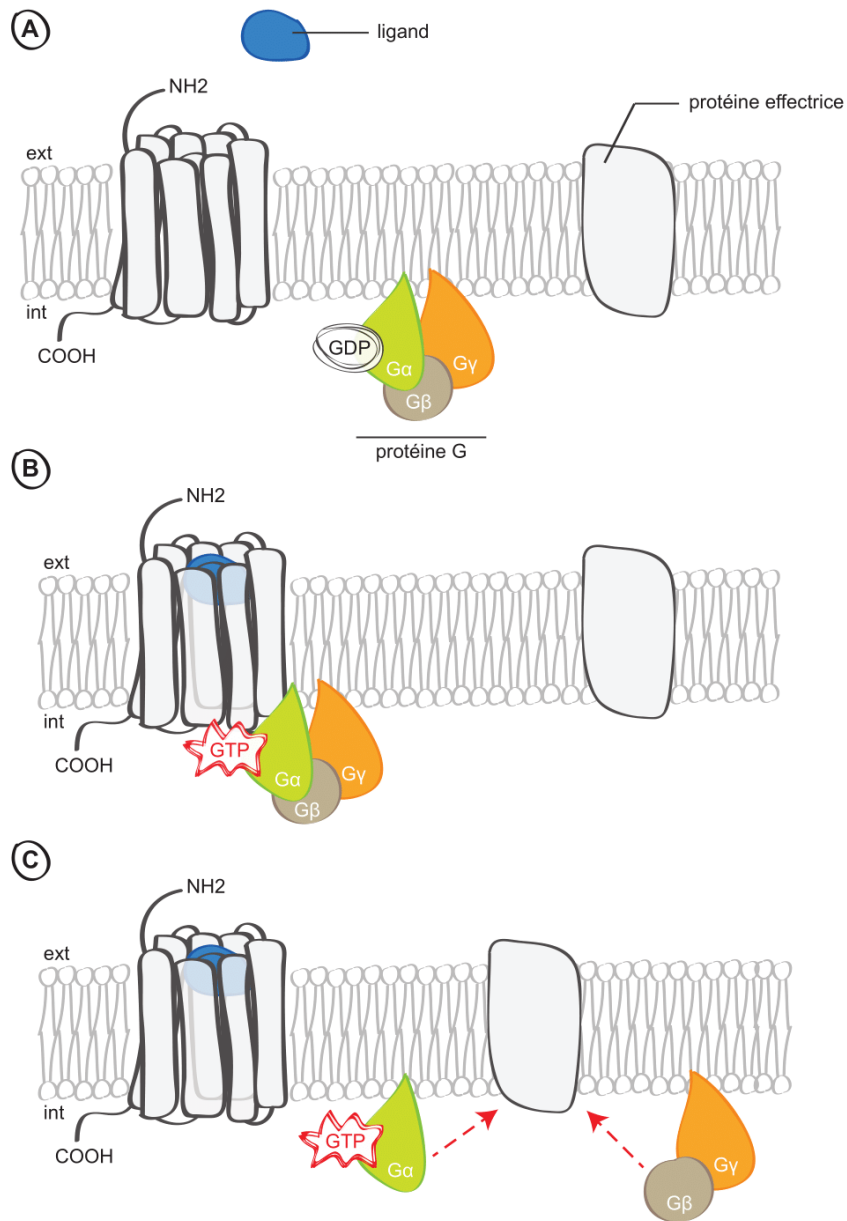


FIGURE 1.4 – **Modèle du complexe ternaire.** La liaison d'un ligand agoniste sur un RCPG stabilise le récepteur dans une conformation active capable d'interagir avec une protéine G hétérotimérique composée de trois sous-unités différentes, appelées G α , G β et G γ . Les sous-unités G α et G γ sont ancrées à la membranes. Quand la protéine G est inactive, la sous-unité alpha lie le GDP. Consécutivement à l'association à un RCPG, le GDP est échangé par du GTP, entraînant la dissociation de la protéine G en deux entités, la sous-unité G α d'un côté et l'ensemble G β -G γ de l'autre, qui peuvent alors moduler l'activité de différents effecteurs intracellulaires de types enzymes, canaux ou transporteurs, engendrant ainsi des messagers secondaires qui vont relayer à leur tour le signal. **(A)** État au repos. **(B)** Activation du récepteur et activation de la protéine G. **(C)** Régulation de l'activité des effecteurs. Les mécanismes de régulation de l'activité des RCPGs ne sont pas abordés dans ce manuscrit.

en équilibre entre deux conformations, inactive R et active R* (Leff, 1995). Ce modèle sert toujours de référence, associé à l'analogie de l'interrupteur qui bascule entre les positions *on* et *off*. Il peut être couplé au modèle du complexe ternaire pour donner le modèle du complexe ternaire étendu (Gether & Kobilka, 1998) (Figure **1.3 D**), et celui du complexe ternaire cubique. Les ligands interviennent pour moduler leur activité basale (Lamichhane et al., 2015) à travers une sélection conformationnelle qui consiste à stabiliser préférentiellement la conformation du RCPG pour laquelle il possède la plus grande affinité. Cela entraîne une modification des équilibres et la distribution des populations entre les états R et R* du récepteur. Les effets cellulaires observés en réponse à cette interaction permettent de classer le ligand comme agoniste entier, partiel, inverse ou antagoniste. Un agoniste, lorsqu'il se lie au récepteur, provoque un réarrangement conformationnel systématiquement à l'origine d'une réponse cellulaire. On distingue les agonistes entiers et partiels des agonistes inverses. Les premiers stabilisent le récepteur dans la conformation active R* et stimulent l'activité du récepteur en déclenchant une réponse similaire à celle du ligand naturel, tandis que les agonistes inverses stabilisent la conformation inactive R et inhibent l'activité constitutive. Un antagoniste ne possède pas d'activité intrinsèque et ne déplace pas l'équilibre de la population à l'état basal. Ainsi, il doit présenter une affinité similaire sur les états actif et inactif. S'ils sont neutres, les antagonistes sont en revanche souvent compétitifs au niveau du site de liaison orthostérique vis-à-vis d'autres composés, empêchant ainsi l'action du ligand endogène.

1.2.2 ...au concept de signalisation biaisée

Les avancées de la recherche ont finalement révélé que les RCPGs ne sont pas de simples systèmes bimodaux, et que les modèles à deux états, différenciant uniquement l'état inactif de l'état actif d'un récepteur, sont restrictifs et très éloignés de la réalité car ils ne suffisent pas à expliquer certains phénomènes associés aux RCPGs (Park, 2012). Le répertoire d'activité des RCPGs est considérablement diversifié et leur signalisation n'a rien d'une séquence linéaire d'événements. Un seul RCPG est capable d'affecter plusieurs voies de signalisation au travers de la régulation d'un grand nombre de protéines G différentes qui vont elle-mêmes moduler l'activité d'une multitude d'effecteurs. De plus, les protéines G ne sont pas les seules à pouvoir interagir avec les RCPG. Ceux-ci peuvent également transmettre des signaux en interagissant

avec d'autres partenaires intracellulaires, comme les β -arrestines, trahissant au passage les limites de la nomenclature (Luttrell & Lefkowitz, 2002; Jean-Charles et al., 2017). Il apparaît manifeste qu'une telle plasticité de signalisation n'est possible que si les RCPGs transitent de manière réversible, entre une multitude de conformations distinctes, chacune capable de se lier à un partenaire protéique particulier. La découverte de ligands capables d'activer sélectivement certaines voies de signalisation dépendantes des protéines G ou des β -arrestines (Rajagopal et al., 2010) a fortement renforcé la pertinence d'un modèle multi-états et permis de concevoir le concept de sélectivité fonctionnelle, aussi appelé signalisation biaisée (Wacker et al., 2017). Il faut noter que la théorie des interactions récepteur-ligand ayant longtemps reposé sur un modèle à deux états, la classification des molécules actives, très souvent réalisée en ne tenant compte que d'une seule voie de signalisation, est incomplète. Il apparaît aujourd'hui qu'un ligand peut très bien être un agoniste inverse au regard d'une voie de signalisation donnée et un agoniste partiel au regard d'une autre. C'est notamment le cas avec le propranolol, un ligand du récepteur beta2-adrénérique, reconnu comme agoniste partiel de la voie des MAPK (*mitogen-associated protein kinases*) médiée par les β -arrestines mais également identifié comme agoniste inverse de la voie de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) initiée par la protéine Gs (Azzi et al., 2003). La classification d'un ligand devrait donc systématiquement être faite en se référant à la voie de signalisation étudiée.

1.2.3 Coopérativité et allostérie

L'autre faiblesse des modèles à deux états est qu'ils ne prennent en compte ni la formation de dimères et oligomères de RCPGs, possédant des propriétés propres, ni l'existence de ligands allostériques, capables de moduler l'état d'activation du récepteur par un agoniste orthostérique.

La dimérisation et l'oligomérisation correspondent à l'association de deux ou plusieurs récepteurs, identiques ou non. Constitutifs ou furtifs, ces phénomènes sont présentés comme une des explications possibles à la diversité de fonctions des RCPGs, capables d'impacter l'interaction avec les ligands, la signalisation, l'internalisation et l'adressage (Terrillon & Bouvier, 2004). Pour certains récepteurs, comme le récepteur GABA_B, l'hétérodimère GABA_{B1}-GABA_{B2} correspond à l'entité fonctionnelle minimale et est donc absolument requis (Kaupmann et al., 1998; Kniazeff & Pin, 2012). Dans ce couple, GABA_{B1} contient le site de liaison au récepteur et GABA_{B2}

permet le couplage aux protéines G.

L'allostérie est un phénomène biologique qui décrit la possibilité de moduler les interactions d'un site de liaison donné depuis un site spatialement distinct appelé *site allostérique* (Christopoulos & Kenakin, 2002; Bridges & Lindsley 2008; Lane et al., 2013; Wootten et al., 2013; Congreve et al., 2017). Un ligand allostérique qui potentialise la réponse du récepteur médiée par un agoniste est appelé *modulateur allostérique positif* (PAM) (Figure 1.5 B) tandis qu'un ligand allostérique qui diminue, voire inhibe, son activité est appelé *modulateur allostérique négatif* (NAM) (Figure 1.5 C). Ils peuvent exercer leur action en modulant l'affinité de liaison du ligand orthostérique et/ou en faisant varier l'efficacité de la réponse. Les PAM sont également capables de générer du biais dans la signalisation en activant différenciellement une ou plusieurs voies en comparaison au ligand endogène (Burford et al., 2011; Wild et al., 2014). *A contrario*, un ligand allostérique qui n'affecte pas l'activité du récepteur est appelé *modulateur allostérique silencieux* (SAM) (Figure 1.5 D). Il existe également des ligands allostériques, appelés *agonistes allostériques*, capables d'induire directement une réponse, depuis le site allostérique, en l'absence d'agoniste orthostérique. Plus récemment, les ligands bitopiques ont été décrits comme étant des molécules hybrides possédant à la fois un pharmacophore dans le site orthostérique et un pharmacophore dans le site allostérique (Kamal & Jockers, 2009; Fronik et al., 2017). Certaines molécules, initialement qualifiées de modulateurs allostériques dans la littérature, ont d'ailleurs été reclassées en ligands bitopiques depuis (Gentry et al., 2015). L'allostérie ne concerne pas uniquement la modulation de l'interaction d'un ligand par un autre, elle peut aussi concerner la modulation de l'interaction d'un ligand par une protéine. C'est le cas des protéines G qui, lorsqu'elles sont couplées aux RCPGs, augmentent leur affinité pour l'agoniste endogène. La dimérisation et l'oligomérisation des RCPGs peut également être un cas de modulation allostérique. Ainsi, les récepteurs de l'adénosine A_{2A} activés diminuent l'affinité des récepteurs de la dopamine D_2 pour leur ligand naturel lorsque ceux-ci sont organisés en oligomères (Vallano et al., 2011).

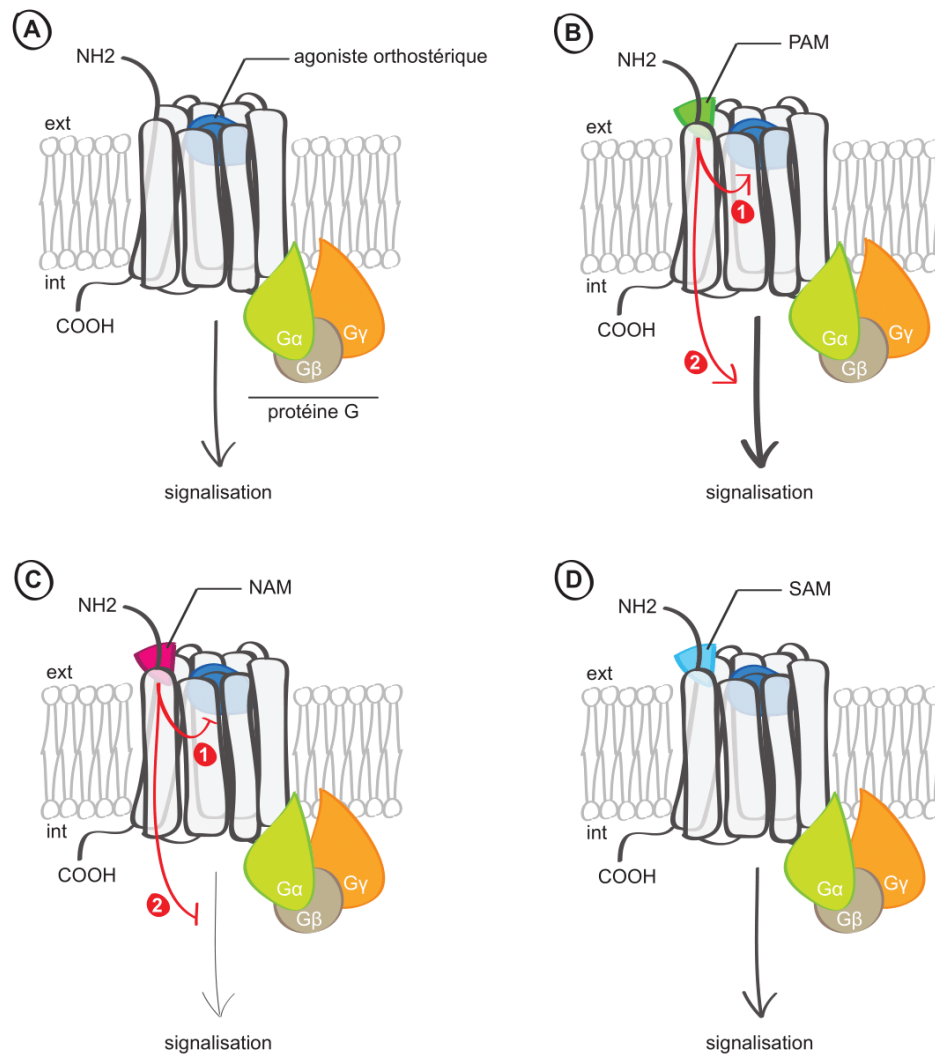


FIGURE 1.5 – **Modulation allostérique.** (A) La liaison de l'agoniste endogène seul, dans le site orthostérique de son récepteur, initie une cascade de signalisation grâce au couplage d'un partenaire protéique intracellulaire, ici une protéine G ($G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$). Le signal induit sert de référence. La liaison d'un modulateur allostérique, sur un site distinct du site orthostérique, modifie l'affinité de liaison du ligand orthostérique (1) et/ou fait varier l'efficacité de la réponse (2). (B) La liaison d'un modulateur allostérique positif (PAM) potentialise la réponse du récepteur tandis que (C) la liaison d'un modulateur allostérique négatif (NAM) diminue voire inhibe la réponse du récepteur. (D) Certains ligands allostériques n'affectent pas l'activité du récepteur et sont appelés modulateur allostérique silencieux (SAM).

1.3 Les challenges techniques de la préparation d'échantillons et leurs solutions

1.3.1 Production de protéines

Les faibles taux d'expression des RCPGs non-visuels dans leurs tissus d'origine sont incompatibles avec la réalisation d'analyses biochimiques et biophysiques qui requièrent de grandes quantités de matériel protéique. Pour obtenir les milligrammes nécessaires, la surexpression de protéines recombinantes est un préalable indispensable. Des systèmes d'expression ont été développés et optimisés, et permettent d'obtenir des rendements de production élevés (Banères & Mouillac, 2012). Ces développements sont notamment disponibles chez les levures *Pichia Pastoris* (Hartmann et al., 2016) et les cellules d'insectes *Spodoptera frugiperda* (Massotte, 2003; Trometer & Falson, 2010). Ces deux hôtes ont été utilisés pour la production des échantillons utiles aux travaux de thèse dont fait l'objet ce manuscrit et les protocoles utilisés sont rapportés au chapitre 5.

1.3.2 Solubilisation et stabilisation

Une fois que les conditions optimales d'expression et de production ont été déterminées, les RCPGs d'intérêts peuvent être surexprimés à la membrane plasmique des cellules hôtes choisies². Avant de pouvoir être purifiés et étudiés, les RCPGs doivent être extraits de cet environnement membranaire. Cette étape est généralement accomplie à l'aide de détergents qui vont d'abord s'insérer dans les membranes et les perturber avant de solubiliser progressivement les lipides, les protéines et toutes les autres molécules hydrophobes qui les composent. La rupture des contacts structurants entre les protéines et les lipides de la membrane, ainsi que le manque de pression latérale rencontré à l'intérieur des micelles de détergents, rendent les RCPGs très instables et peuvent entraîner leur dénaturation.

Plusieurs stratégies existent pour garantir un bon maintien des RCPGs en solution et peuvent être divisées en deux catégories : celles qui perfectionnent les milieux de solubilisation et celles qui corrigent l'instabilité protéique (Ghosh et al., 2015). L'optimisation des structures micellaires peut être assurée par l'ajout de cholestérol hemisuccinate (CHS), un analogue du cholestérol

2. Les productions en corps d'inclusion et en système acellulaire ne sont pas considérées ici.

naturellement présent dans les membranes des cellules de mammifères (Thompson et al., 2011 ; Mus-Veteau et al., 2014) ; ou sur le développement de nouveaux surfactants (Zhang et al., 2011 ; Mus-Veteau et al., 2014), comme les tripodes amphiphiles (Yu et al., 2000 ; McQuade 2000), les dérivés du maltose-neopentyl glycol ou les calixarènes (Matar-Merheb 2011). Il s'agit d'un champ de recherche très actif en raison de leur (quasi) indispensabilité pour la solubilisation des RCPGs³. En revanche, l'utilisation de détergents n'est pas obligatoire pour la poursuite des analyses, y compris en cristallographie. La cristallisation peut se faire en phase cubique lipidique (Caffrey & Cherezov, 2009). Pour les autres types de caractérisation des RCPGs en solution, la stabilisation peut passer par un changement d'environnement et l'incorporation des récepteurs dans des structures appelées bicelles, nanodiscs ou encore amphipols (Figure 1.6).

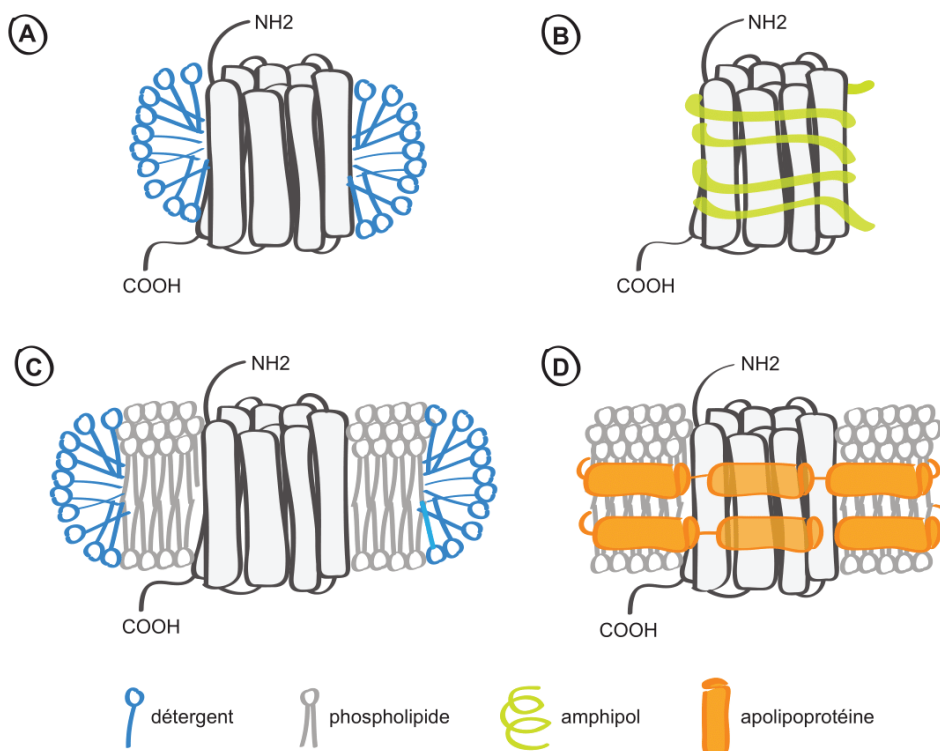


FIGURE 1.6 – Différents environnements de solubilisation. (A) Micelle de détergent. (B) Complexe protéine-polymère. (C) Bicelles. (D) Nanodisques. Liste non exhaustive.

La seconde catégorie de stratégies vise à annihiler la flexibilité des RCPGs qui, bien que physiologiquement cruciale, est une source de mouvements entraînant la déstructuration des récepteurs purifiés et une source d'hétérogénéité qui complexifie la formation de cristaux pour la

3. D'autres systèmes et protocoles se développent pour contourner leur utilisation (Swainsbury et al., 2017).

cristallographie (Lebon & Tate, 2012). La thermostabilisation est une des méthodes pionnières, employée pour restreindre la flexibilité des RCPGs en les bloquant dans une conformation particulière grâce à la mutagenèse (Heydenreich et al., 2015). Son utilisation s'est largement démocratisée avec la commercialisation de structures de RCPGs thermostabilisés par la société Heptares, propriétaire de la technologie StaR[®]. Cette méthode de stabilisation des états conformationnels a des conséquences sur la dynamique du récepteur dans son entièreté, mais d'autres techniques, n'impactant que les sections protéiques solubles les plus dynamiques, ont également été développées. La troncature des extrémités N-terminale et/ou C-terminale est ainsi couramment employée. La boucle intracellulaire n°3 est également très souvent éliminée et remplacée par des petites protéines solubles comme du lysozyme de phage T4 ou de l'apocytochrome B562 RIL. Une fusion qui présente également l'avantage, pour la cristallographie, de faciliter les contacts protéiques et ainsi assurer la cohésion de l'empilement cristallin. Sinon, il est aussi possible d'utiliser des fragments d'anticorps pour stabiliser la boucle intracellulaire n°3 et faciliter la cristallisation, ce fut le cas pour la première structure du récepteur β_2 (Rasmussen et al., 2007), mais leur faible disponibilité rend leur utilisation rare.

Ces stratégies d'ingénierie ont permis d'accomplir des progrès considérables dans le domaine de la caractérisation structurale et l'impact positif de ces approches justifie leur omniprésence dans ces études. Mais, mise à part le cas des fragments d'anticorps, elles consistent toutes à modifier la séquence protéique et peuvent avoir des conséquences préjudiciables, notamment sur la pharmacologie des RCPGs. Il a été démontré que ces modifications perturbent la dynamique des récepteurs et limitent leur répertoire de conformations. Ainsi, les mutations, réalisées sur des récepteurs stabilisés par la présence d'un antagoniste, réduisent considérablement leur affinité pour les agonistes, car elles influencent l'équilibre entre les états inactif et actif en favorisant l'état inactif et inversement pour les mutations réalisées sur des récepteurs stabilisés par la présence d'un agoniste (Serrano-Vega et al., 2008 ; Magnani et al., 2008 ; Shibata et al., 2009 ; Doré et al., 2011 ; Lebon et al., 2011 ; Vaidehi et al., 2016). Une autre étude, comparant les conformations adoptées par des récepteurs β_2 adrénergique, fusionnés ou non avec du lysozyme de phage T4, a également démontré que la présence du lysozyme déplaçait l'équilibre conformationnel local vers l'état actif indépendamment du type de ligand orthostérique ajouté (Eddy et al., 2016). Ces conséquences apportent un biais dans la recherche de nouveaux médicaments et c'est pour cela

qu'elles doivent être évitées lorsque cela est possible.

1.4 Recherche et développement de composés pharmaceutiques ciblant les récepteurs couplés aux protéines G

Les RCPGs représentent la thématique de recherche la plus largement soutenue par les plus grands groupes pharmaceutiques et le monde académique. Avec les kinases, les protéases, les récepteurs nucléaires et les canaux ioniques, les RCPGs sont l'une des cibles thérapeutiques humaines les plus exploitées par la médecine moderne (Sriram & Insel, 2017; Santos et al., 2017). Sur la totalité des médicaments approuvés par la FDA (*food and drug administration*), 475 d'entre eux exercent leur action via un RCPG (soit 34%) (Hauser et al., 2017). Ils sont prescrits pour le traitement de maladies historiquement connues comme l'hypertension, les allergies, l'analgésie, la schizophrénie ou la dépression, mais avec plus de 300 composés en cours d'essais cliniques, ils pourraient également permettre de traiter de nouvelles maladies telles que la maladie d'Alzheimer et l'obésité (gpcrdb.org). Pour autant, l'engouement suscité par les RCPGs n'est pas sur le point d'arriver à son terme. Sur l'ensemble des RCPGs cliniquement intéressants, seuls 27% sont des cibles établies (Shimada et al., 2018). Ces récepteurs, très majoritairement de classe A (94%), sont chacun la cible d'en moyenne 10,3 médicaments (Congreve et al., 2011; Hauser et al., 2017). À titre d'exemple, les récepteurs aminérgiques sont à eux seuls la cible de 314 médicaments. Même si approximativement 20% des composés en cours d'essais cliniques ciblent potentiellement 67 nouveaux récepteurs, les données actuelles démontrent ostensiblement qu'il reste un énorme potentiel pour ces protéines et pour l'élaboration de futurs traitements contre des maladies avec des besoins médicaux urgents et peu de cibles actuelles viables comme les maladies d'Alzheimer, Parkinson ou encore le cancer (gpcrdb.org).

À ce jour, la très grande majorité des médicaments ciblant les RCPGs sont des ligands orthostériques (Leach et al., 2007), mais la reconnaissance de la régulation allostérique a ouvert une nouvelle voie dans la conception de molécules actives. Les modulateurs allostériques ont plusieurs avantages par rapport aux ligands traditionnels, et notamment trois particulièrement appréciés en thérapeutique (Sebag & Pantel, 2012). Premièrement, ils permettent une plus grande sélectivité résultant d'une pression de conservation moins importante pour ces sites par

rapport aux sites orthostériques des sous-types de récepteurs d'une même famille qui doivent lier le même ligand endogène (Granier & Kobilka, 2012) . Deuxièmement, ils ont un effet saturable, ce qui permet d'échapper aux risques de surdosage (sur-activation, sur-inhibition, effets toxiques). Et, troisièmement, ils respectent le rythme spatio-temporel naturel du ligand naturel (Figure 1.7). Contrairement aux agonistes orthostériques, les PAM n'ont aucune activité en l'absence de l'agoniste orthostérique endogène. La puissance du signal médié par le ligand naturel est donc améliorée mais la régulation physiologique normale reste inchangée. Cette caractéristique s'avère particulièrement intéressante dans le cas des neurotransmetteurs dont la nature pulsatile et limitée-dans-le-temps du signal assure un bon fonctionnement. Elle peut également permettre de se libérer d'une désensibilisation rapide, en partie responsable de l'accroissement de la tolérance aux médicaments. En plus de respecter la temporalité de l'action, les PAM respectent également sa localisation spatiale puisqu'ils n'agissent que dans les tissus, voire même les cellules, où le ligand endogène agit lui-même. Ce n'est pas le cas d'un agoniste orthostérique qui active les récepteurs de tous les tissus du corps humain, et parfois les autres sous-types de récepteurs, menant à des effets secondaires indésirables. Cette caractéristique est également valable pour les NAM (Burford et al., 2011 ; Sebag & Pantel, 2012).

L'expansion du nombre de structures cristallographiques de RCPGs, notamment en complexe avec des modulateurs allostériques, a ouvert de nouvelles perspectives pour la recherche de ces ligands particuliers qui peut désormais s'appuyer sur des approches plus rationalisées regroupées sous l'appellation SBDD (*structure-based drug design*) (Congreve et al., 2017). Cependant, comme le démontre le peu de médicaments allostériques disponibles sur le marché, il est beaucoup plus difficile d'identifier des ligands se liant hors du site naturel que des ligands orthostériques compétitifs. Ainsi, malgré un intérêt croissant évident, seulement deux modulateurs allostériques de RCPGs ont été approuvés par la FDA (Figure 1.8) (Milligan & Smith, 2007).

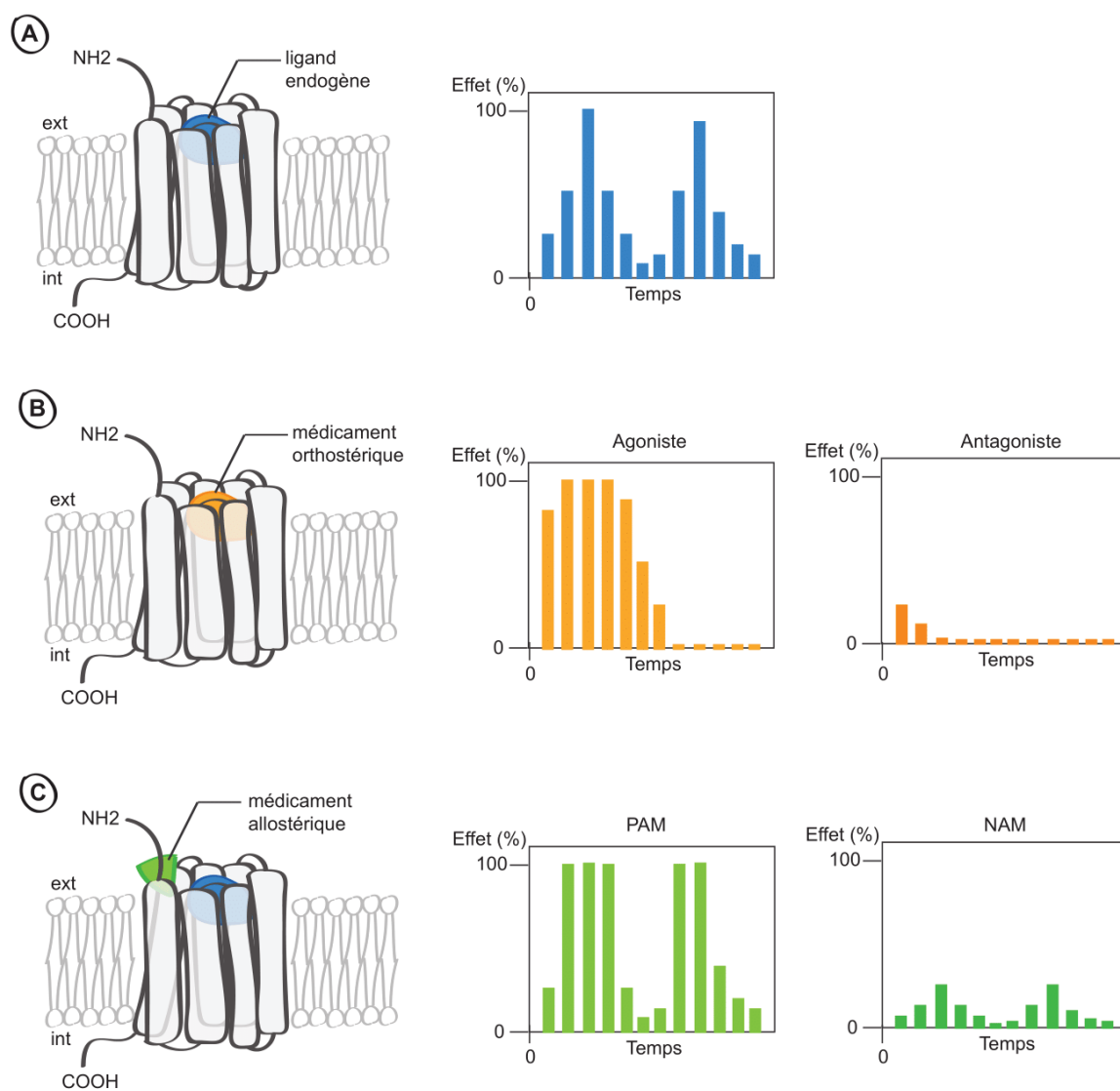


FIGURE 1.7 – Effet de médicaments orthostériques et allostériques sur la signalisation des RCPGs. Représentation de l'activité d'un RCPG au cours du temps, en réponse à la liaison (A) du ligand endogène, (B) d'un médicament orthostérique et (C) d'un médicament allostérique. Les médicaments orthostériques ont un mode d'action compétitif et leur effet se superpose à celui du ligand endogène. Un effet soutenu peut à terme entraîner une désensibilisation du récepteur et une diminution du signal. Les médicaments allostériques préservent le profil d'activation physiologique tout en le modulant positivement ou négativement. Figure adaptée de (Sebag & Pantel 2012).

Le cinacalcet est un PAM du récepteur détecteur de calcium CaS, approuvé en 2004⁴. Il est utilisé dans le traitement de l'hyperparathyroïdie (Quarles, 2005). Le maraviroc est un NAM du récepteur à chimiokines CCR5, approuvé en 2007⁵. Il est utilisé pour prévenir l'entrée du VIH dans les cellules (Dorr et al., 2005, Mansfield et al., 2009).

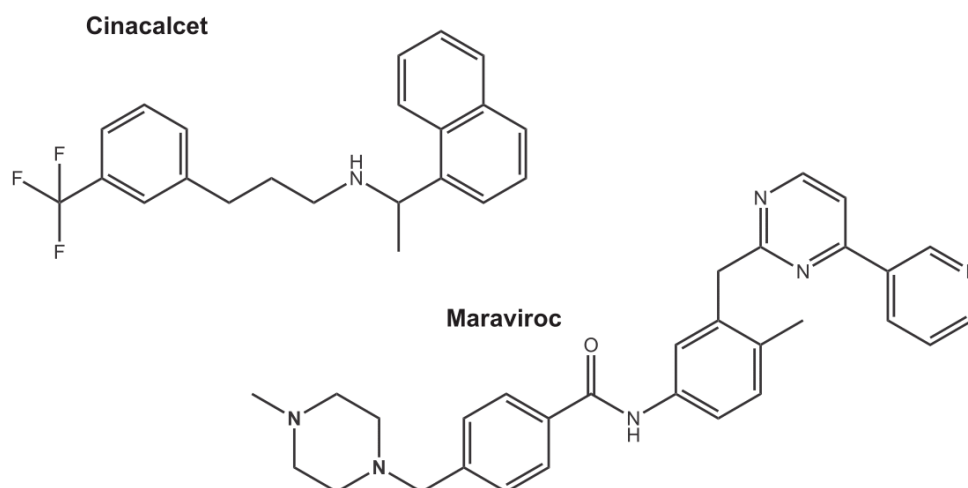


FIGURE 1.8 – Structures de médicaments allostériques ciblant des RCPGs.

La conception de molécules bioactives basée sur la méthode des fragments, qui sera exposée dans le chapitre 3, est une stratégie non-biaisée de recherche de nouveaux ligands, notamment susceptible d'impulser l'identification de composés interagissant avec les RCPGs dans des sites de liaison alternatifs (Ludlow et al., 2015).

4. Commercialisé par Amgen sous le nom de SensiparTM en Amérique du Nord et MimparaTM en Europe

5. Commercialisé par Pfizer sous le nom de SelzentryTM aux Etats-Unis et CelsentriTM dans le reste du monde

Chapitre 2

La résonance magnétique nucléaire : un puissant outil d'analyse des interactions impliquant les récepteurs couplés aux protéines G

La spectroscopie RMN est une technique robuste, fiable et polyvalente, qui a incontestablement fait ses preuves en tant qu'outil d'analyse des interactions moléculaires, notamment des interactions protéine-petite molécule. Les expériences utilisées dans ce contexte sont communément divisées en deux catégories : les expériences basées sur le suivi de l'évolution des signaux RMN du ligand, dites *ligand-observed*, et celles basées sur la détection des changements des signaux RMN de la protéine, appelées *protein-observed*, entre leurs formes libre et liée (Cala et al., 2014; Aguirre et al., 2015). Dans ce chapitre, l'intérêt est porté aux travaux qui examinent les interactions impliquant les RCPGs. L'inventaire des études publiées montre que les expériences *ligand-observed* sont particulièrement adaptées à l'identification et à la caractérisation des petites molécules et peptides se liant aux RCPGs, qu'ils soient solubilisés en micelles de détergents, stabilisés en nanodisques, enchâssés dans leurs membranes isolées ou en cellules entières. Quand aux changements conformationnels qui s'opèrent chez les récepteurs, suite à l'interaction, ils peuvent être analysés grâce aux expériences *protein-observed*, qui permettent ainsi à la RMN de

s'illustrer comme une méthode clé de l'exploration de la dynamique des RCPGs, en complétant les données issues des études de cristallographie des rayons X et de cryo-microscopie électronique.

Tout au long de ce manuscrit, le terme *cible* sera utilisé pour désigner une protéine et le terme *ligand* sera utilisé pour désigner une petite molécule.

2.1 La détection et la caractérisation des ligands

2.1.1 L'effet Overhauser nucléaire à la base du travail d'investigation

L'application d'un champ magnétique oscillant engendre l'apparition d'une aimantation macroscopique transversale, liée aux transitions énergétiques des spins nucléaires. Le phénomène de relaxation correspond à la perte de cohérence des moments magnétiques, dû à la précession libre de l'aimantation globale après l'excitation, et se traduit par le retour du système de spins à l'état d'équilibre thermique initial. Lorsqu'ils ne sont pas isolés, les spins sont soumis à un champ magnétique local, généré par le moment magnétique des spins voisins. Cette interaction entre deux dipôles magnétiques est appelée *couplage dipolaire*. Pour les démonstrations suivantes, un système à deux spins $1/2$ identiques¹, notés I et S, en interaction dipolaire, est considéré. L'énergie dipolaire E_d de ce système est donnée par :

$$E_d = \frac{\vec{\mu}_I \cdot \vec{\mu}_S}{r_{IS}^3} - 3 \frac{(\vec{\mu}_I \cdot \vec{r}_{IS})(\vec{\mu}_S \cdot \vec{r}_{IS})}{r_{IS}^5} = \frac{\mu^2}{r_{IS}^3} (3 \cos^2 \theta - 1)$$

Elle dépend d'un certain nombre de paramètres : (i) la distance r entre les moments magnétiques, (ii) les rapports gyromagnétiques γ des spins et (iii) l'angle θ définissant l'orientation du vecteur joignant les spins, relativement au champ magnétique B_0 . Le champ local se comporte en partie comme un champ radio-fréquence et dans une conjoncture favorable, qui sera décrite ultérieurement, il est capable de changer l'orientation des moments magnétiques individuels, menant ainsi à une modification de l'aimantation globale et à son retour à sa valeur d'équilibre.

Le champ local trouve son origine dans diverses interactions affectant les spins nucléaires mais le mécanisme dipolaire constitue le mécanisme de relaxation prédominant des noyaux de spins $1/2$. Le diagramme énergétique du système de spins établi comporte quatre niveaux d'énergie (Figure

1. $\gamma_I = \gamma_S = \gamma$

2.1). Les chemins de relaxation longitudinale possibles sont au nombre de six et correspondent à des transitions simple-quantum, zéro-quantum et double-quantum, entre les niveaux d'énergie. Chacune de ces transitions est associée à une constante de vitesse de relaxation, notée W_1^I ou W_1^S , W_0 et W_2 , respectivement.

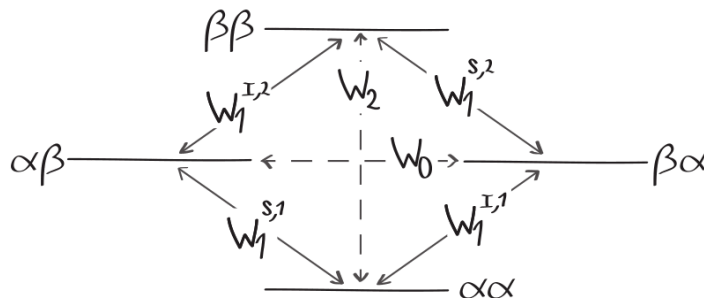


FIGURE 2.1 – **Diagramme énergétique et transitions induites par la relaxation dipolaire dans un système à deux spins.** Deux transitions simple-quantum sont associées au changement d'état du spin I et les vitesses qui leur sont associées sont notées $W_1^{I,1}$ et $W_1^{I,2}$. Deux transitions simple-quantum sont associées au changement d'état du spin S et les vitesses qui leur sont associées sont notées $W_1^{S,1}$ et $W_1^{S,2}$. Une transition zéro-quantum et une transition double-quantum sont associées à la relaxation croisée simultanée des spins I et S, et les vitesses qui leur sont associées sont notées W_0 et W_2 , respectivement. Les spins I et S sont couplés dipolairement, avec des déplacements chimiques différents, et placés en solution. Dans cette représentation, l'arrangement des niveaux d'énergies est celui d'un système de spins homonucléaires. Dans un système de spin hétéronucléaire, les niveaux $\alpha\beta$ et $\beta\alpha$ n'ont pas la même énergie mais les transitions induites par la relaxation restent les mêmes.

L'évolution temporelle de l'aimantation z du spin I, notée M_z^I , peut être décrite en utilisant les équations de Solomon :

$$\frac{dM_z^I}{dt} = -\rho_I(M_z^I - M_z^{I,eq}) - \sigma_{IS}(M_z^S - M_z^{S,eq})$$

M_z^S correspond à l'aimantation z du spin S, $M_z^{I,eq}$ et $M_z^{S,eq}$ représentent les aimantations z des spins I et S à l'équilibre. La relaxation longitudinale est donc caractérisée par une constante de vitesse d'autorelaxation ρ_I , et une constante de vitesse de relaxation croisée σ_{IS} , telles que :

$$\rho_I = W_1^{I,1} + W_1^{I,2} + W_2 + W_0$$

$$\sigma_{IS} = W_2 - W_0$$

La constante de vitesse de relaxation croisée couple les composantes longitudinales des aimantations

tations de I et S et ne dépend que du couplage dipolaire. Elle est proportionnelle à $1/r^6$, ce qui signifie qu'elle atteint donc rapidement une valeur nulle, avec la distance. Ainsi, il n'est possible d'observer les effets de relaxation croisée qu'entre des spins raisonnablement proches dans l'espace ($< 5\text{Å}$). Enfin, elle gouverne l'effet Overhauser nucléaire (NOE). Le facteur NOE, noté η , est donné par :

$$\eta = \frac{I_z - I_z^{\text{eq}}}{I_z^{\text{eq}}} = 1 + \frac{W_2 - W_0}{2W_1^{1,1} + W_2 + W_0} \cdot \frac{\gamma_I}{\gamma_S}$$

Un aspect primordial du processus de relaxation qui n'a pas encore été abordé est l'existence d'une dépendance entre la mobilité moléculaire, caractérisée par une constante de temps appelée *temps de corrélation*², notée τ_C , et le champ magnétique local. Pour que le champ local puisse provoquer des transitions entre les niveaux d'énergie, et donc avoir un impact sur la relaxation longitudinale, il faut que celui-ci oscille à une fréquence efficace, c'est-à-dire proche de la fréquence de Larmor ν_0 . La comparaison entre la fréquence de Larmor et le temps de corrélation est particulièrement importante dans la théorie de la relaxation. En utilisant la fonction de corrélation et la densité spectrale, qui ne seront pas développées ici, il est possible de montrer que la relaxation est la plus rapide lorsque $\omega_0\tau_C=1$, avec la vitesse angulaire $\omega_0=2\pi\nu_0$.

Toutes les constantes de vitesses de relaxation, parmi lesquelles σ , sont fonction de τ_C . De ce fait, le facteur NOE est lui aussi corrélé à la dynamique des molécules observées. Il convient de distinguer deux régimes de mouvements. Dans un régime de mouvements rapides (τ_C court, petites molécules), la relaxation dipolaire s'effectue majoritairement via la transition double-quanta. Si il n'y a pas d'autre mécanisme de relaxation, alors le facteur NOE peut atteindre la valeur de $\frac{\gamma_I}{2\gamma_S}$, à savoir être petit et positif. Dans un régime de mouvements lents (τ_C long, macromolécules), la relaxation dipolaire s'effectue majoritairement via la transition zéro quanta. En faisant la même approximation que précédemment, le facteur NOE peut atteindre la valeur de $\frac{-\gamma_I}{\gamma_S}$, à savoir être grand et négatif (Figure 2.2).

L'effet NOE est un outil particulièrement utile pour détecter la liaison d'un ligand sur sa cible. L'expérience de etNOESY (*exchange-transferred nuclear Overhauser spectroscopy*) permet de corréler entre eux des spins couplés dipolairement, en exploitant le processus de relaxation croisée homonucléaire³. Les échanges d'aimantation z s'opèrent au cours d'un délai appelé *temps*

2. Temps moyen que met la molécule pour parcourir un radian.

3. Les transferts d'aimantation peuvent également avoir lieu par échange chimique mais ce processus n'est pas détaillé dans ce manuscrit.

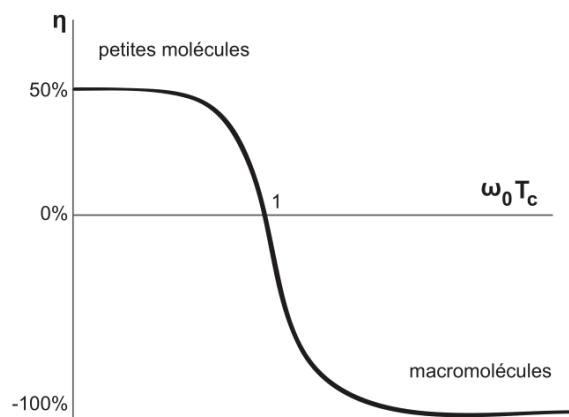


FIGURE 2.2 – Evolution du facteur NOE η en fonction de $\omega_0 \tau_C$. En fonction de la dynamique moléculaire, l'effet NOE (η) est positif, nul ou négatif. Paramètres : vitesse angulaire (ω_0), temps de corrélation (τ_C).

de mélange noté τ_m , à l'origine des pics de corrélation des spectres 2D ^1H - ^1H NOESY, qui traduisent la proximité spatiale des spins considérés ($<5\text{\AA}$) et le régime de mouvement des molécules étudiées. Les distances se déduisent des intensités des pics de corrélation NOE et sont utilisées pour la résolution structurale. La dynamique moléculaire se déduit de l'intensité et du signe des pics de de corrélation NOE et est utilisée pour détecter la complexation des petites molécules (Figure 2.3). Le paramètre qu'il convient de convenablement choisir en fonction de l'application souhaitée est τ_m , car ce délai influe sur l'intensité des pics NOE observés. Pour

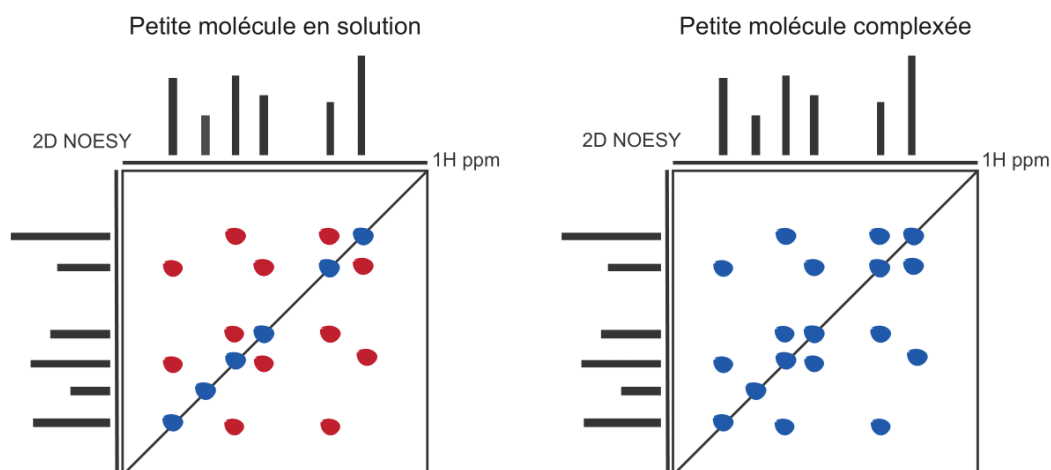


FIGURE 2.3 – Schématisation des spectres 2D NOESY d'une petite molécule libre et liée. Une petite molécule liée montre des pics transversaux de même signe que les pics transversaux tandis qu'une molécule libre montre des pics transversaux de signe opposé. Les pics de corrélation NOE sont soit positifs (rouge) soit négatifs (bleu).

des calculs de structure, τ_m varie entre 50 et 150 ms. Pour le criblage des chimiothèques de fragments, τ_m est classiquement fixé à 300 ms.

Les expériences basées sur l'exploitation de l'effet NOE, pour la détection et la caractérisation des interactions, sont décrites dans les sections suivantes. Dans chaque cas, les exemples d'applications de ces méthodes aux RCPGs et leurs ligands sont rapportés.

CHAPITRE 2. LA RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE : UN PUISSANT OUTIL D'ANALYSE DES INTERACTIONS IMPLIQUANT LES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G

RCPGs (classe)	Expériences RMN	Echantillons	Ligands
α_{1A} -AR (A)	STD Sat.frq. : -1 ppm	Détergents 5 μ M	Petites molécules : épinéphrine (500 μ M), A-61603 (500 μ M), prazosine (10 μ M)
α_{1B} -AR (A)	STD Sat.frq. : -1 ppm	Détergents 5 μ M	Petites molécules : épinéphrine (500 μ M), A-61603 (500 μ M), prazosine (10 μ M)
β_2 -AR (A)	STD Sat.frq. : 8.6 ppm HR-MAS spin. : 5 kHz	LCP 600 μ M	Lipide : cholestérol (2,5 mol%)
κ -OR (A)	NOESY Mix.time : 50 à 500 ms	Détergents 10 μ M	Peptide : dynorphine (1 mM)
AA ₂ R (A)	INPHARMA Mix.time : 300 ms	Nanodisques 4 μ M	Petites molécules : caféine (300 μ M), PQA (200 ou 300 μ M), SYN115 (200 μ M), ZM241358 (200 ou 300 μ M), XAC (50 μ M)
B2R (A)	2D DQSQ (ssNMR) MAS spin. : 10 kHz	Détergents 1.5 mg	Peptide marqué : bradykinine (25 μ g)
BLT2 (A)	NOESY Mix.time : 50 à 500 ms	Amphipols 16.7 μ M	Lipide : leukotriène B4 (140 μ M)
CB1 (A)	STDD Sat.frq. : -1.1 ppm	Cellules 5.10 ⁶ cells/mL	Lipide : haplosamate A (0.85 mg)
CB2 (A)	STDD Sat.frq. : -1.1 ppm	Cellules 5.10 ⁶ cells/mL	Lipide : haplosamate A (0.85 mg)
CCR5 (A)	TCS Sat.frq. : 6.5 ppm	Nanodisques 1 μ M	Peptide marqué : MIP-1 α (10 μ M)
CXCR4 (A)	STDD Sat.frq. : -0.5 ppm	Membranes 33% (v/v)	Petites molécules : TIQ-10 (1 mM), TIQ-15 (1 mM), AMS3100 (1 mM)
	STD Sat.frq. : -0.5 ppm	Cellules 40.10 ⁶ cells/mL	Peptides : dérivés de CXCL12 (500 μ M) Petites molécules : AMD3100 (20 μ M)
	WaterLOGSY	Cellules 40.10 ⁶ cells/mL	Peptides : dérivés de CXCL12 (500 μ M) Petite molécule : AMD3100 (20 μ M)
	NOESY Mix.time : 50 à 200 ms	Cellules 40.10 ⁶ cells/mL	Peptides : dérivés de CXCL12 (500 μ M)
	TCS Sat.frq. : 5 ppm	Détergents 10 μ M	Peptide marqué : SDF-1 α (100 μ M) Petite molécule : AMD3100 (1 mM)
GPR40 (A)	STD Sat.frq. : 0.6 ou -1 ppm	Membranes 10 to 25% (v/v)	Lipides : acide linoléique (580 μ M) Petites molécules : HTS touches (100-200 μ M)
	INPHARMA Mix.time : 100 à 600 ms	Membranes 10 to 25% (v/v)	Lipide : acide linoléique (580 μ M) Petites molécules : HTS touches (100-200 μ M)
NTS1 (A)	2D DQSQ (ssNMR) MAS spin. : 7 kHz	Vésicules lipidiques 3.8 mg	Peptide marqué : neurotensine (25 μ g)
PACAP (B)	NOESY Mix.time : 100 à 300 ms	Détergents 40 μ M	Peptides : PACAP21 (1.7 mM), PACAP27 (0.2 mM)
T1R2-T1R3 (C)	STD/STDD Sat.frq. : -1 ppm	Membranes 75 à 100 μ g	Peptide : brazzéine (3 à 5 mg), A16C17 (3 à 5 mg) Petites molécules : alitame (15 mM), cyclamate (56 mM)

TABLE 2.1 – **Expériences RMN pour la détection et la caractérisation de ligands de RCPGs.** Les récepteurs couplés aux protéine G (RCPGs) sont classés par ordre alphabétique. Les expériences RMN, les types d'échantillons de RCPGs et les ligands testés sont rapportés. Expériences RMN : *saturation transfer difference* (STD) ou double difference STD (STDD), *water ligand observed via gradient spectroscopy* (WaterLOGSY), *nuclear Overhauser effect spectroscopy* (NOESY), *interligand NOEs for pharmacophore mapping* (INPHARMA), *transferred cross-saturation* (TCS), double-quantum simple-quantum (DQSQ). Autres abréviations utilisées : fréquence de saturation (sat. frq.), temps de mélange (mix. time), *high resolution MAS spinning rates* (HR-MAS spin.), RMN à l'état solide (ssNMR).

2.1.2 Identification de ligands

Les expériences STD (*saturation transfert difference*) et WaterLOGSY (*water-ligand observed via gradient spectroscopy*) sont dans la lignée de la méthode NOESY, puisqu'elles reposent aussi sur un transfert d'aimantation, par relaxation croisée, entre des couples de spins voisins.

Dans la WaterLOGSY, le transfert implique l'intervention de molécules d'eau qui sont, soit libres en solution, soit complexées dans les poches de liaison protéiques (Dalvit et al., 2001). Les molécules d'eau présentent au niveau des sites d'interaction ont un τ_C comparable à celui des protéines qui les portent, et inassimilable au τ_C des molécules d'eau en solution. Les composés qui n'interagissent pas avec la cible ne sont en contact qu'avec les molécules d'eau libres, qui ont un τ_C apparent de petite molécule (Figure 2.2). En revanche, un ligand entre en contact à la fois avec les molécules d'eau libres et les molécules d'eau complexées, qui elles ont un τ_C apparent de macromolécule. Ainsi, les composés ligands et non-ligands pourront être discriminés sur la base de facteurs NOE de signe et d'intensité différents (Figure 2.4 A). L'expérience WaterLOGSY a été utilisée pour valider l'interaction entre des dérivés des chimiokines CXCL12 et le récepteur CXCR4 en cellules entières (Brancaccio et al., 2018).

Avec le STD, la relaxation croisée n'est pas transitoire, comme pour les expériences NOESY et WaterLOGSY, mais continue (Mayer & Meyer, 1999). Dans une première expérience, une série d'impulsions sélectives est utilisée pour saturer⁴ une région spectrale isolée de la protéine. La fréquence de saturation peut correspondre à une région de pics méthyles par exemple. Les groupements CH₃ contenus dans les macromolécules peuvent présenter des déplacements chimiques entre 0 et -1 ppm, alors que c'est rarement le cas des CH₃ des petites molécules. De cette façon, la région spectrale située entre 0 et -1 ppm peut être utilisée pour saturer les résonances de la protéine, sans affecter celles des composés. Le temps de saturation à appliquer a été largement étudié dans la littérature, notamment avec des expériences de build-up (Angulo et al., 2010). Il est typiquement de 2 secondes. L'aimantation se propage ensuite à l'ensemble de la protéine, jusqu'aux sites de liaison de ligands potentiels, qui se retrouvent à leur tour saturés lors de l'interaction (Figure 2.4 B). Dans une seconde expérience, la même série d'impulsions sélectives est utilisée pour saturer une région du spectre ne contenant aucun signal ¹H, à -20 ppm par exemple. Le spectre STD correspond à la différence des spectres enregistrés dans cha-

4. Egalisation des populations entre les états Zeeman

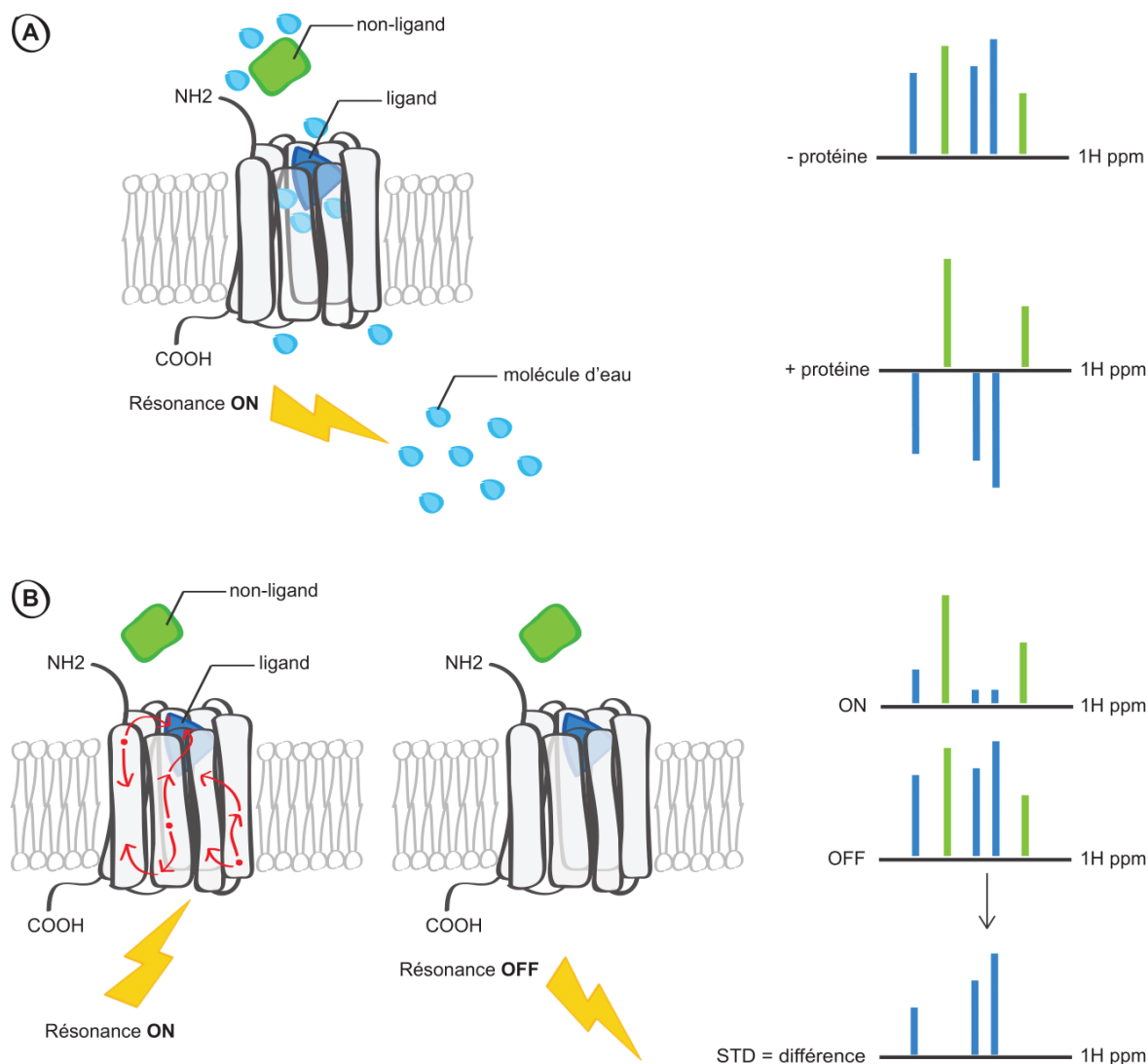


FIGURE 2.4 – Principe illustré des expériences WaterLOGSY et STD. (A) L'expérience WaterLOGSY est une expérience NOE entre les molécules d'eau et les composés à tester. En l'absence de protéine, toutes les molécules d'eau sont libres et tous les composés ont donc un τ_C apparent de petite molécule : tous les pics ^1H sont positifs. En présence de protéine, les ligands qui entrent en contact avec les molécules d'eau localisées dans le site de liaison ont un τ_C apparent de macromolécule : les pics ^1H des non-ligands restent positifs mais les pics ^1H des ligands deviennent négatifs. (B) Au cours de l'expérience STD, la protéine saturée transfère son aimantation aux composés qui se lient dans son site d'interaction. Les composés n'interagissant pas avec la cible ne sont pas saturés. Sur le spectre noté *on resonance*, les pics des composés non-ligands sont intacts, et les pics des composés ligands sont atténués à cause de la saturation. Le spectre *off resonance*, enregistré en l'absence de saturation de la protéine, et donc des ligands, contient les pics de tous les composés testés.

cune de ces expériences et ne contient que les pics ^1H des ligands. Cette technique peut être utilisée pour détecter, directement, la liaison de ligands de faibles affinités (K_d 1 mM - 0.1 μM)

ou, indirectement, celle de ligands de plus haute affinité, grâce à une expérience de compétition avec une molécule espion d'affinité détectable. Les limites de l'affinité détectable dépendent plus particulièrement du temps de résidence des composés dans la poche de liaison de la protéine, lié aux cinétiques d'association K_{on} et dissociation K_{off} . Plus le temps de résidence est grand, moins l'expérience STD est efficace. C'est pour cela qu'aucun signal STD n'est observé pour les ligands de forte affinité (Meyers & Peters, 2003). Typiquement, les échantillons destinés au STD contiennent un excès de petites molécules par rapport à la protéine, correspondant à un rapport molaire entre 100 et 10 000. L'expérience STD peut être menée dans un tampon contenant 5% de D_2O , quantité minimale requise pour la stabilisation du champ magnétique (*lock*), ou 100% de D_2O . L'avantage de l'eau deutérée est la minimisation de l'échange rapide des molécules d'eau entre l'interface protéine-ligand et la solution, et donc l'amélioration de l'effet STD (Lancelot et al., 2014).

Dans le cas des protéines membranaires, et donc des RCPGs, la difficulté réside dans la proportion non-négligeable d'interactions non-spécifiques qui se produisent entre les petites molécules testées et les éléments utilisés pour solubiliser et stabiliser les protéines. Des précautions doivent donc être prises pour éviter la détection de faux positifs. Chaque expérience STD menée sur un échantillon d'intérêt doit être reproduite sur un échantillon *contrôle*, pour lequel le site de liaison des récepteurs a été bloqué par un compétiteur afin de le rendre inaccessible, ou dans lequel le récepteur cible est tout simplement absent et où il ne reste que les éléments utiles à la solubilisation (Figure 2.5). La différence des spectres STD contrôle et expérimental donne un spectre double différence (STDD), largement utilisé dans les études de macrosystèmes complexes comme des cellules entières ou des préparations de membranes.

La première application de la méthode STD/STDD à un RCPG a été réalisée dans le but de valider l'interaction entre la protéine au goût sucré brazzéine et le récepteur du goût sucré T1R2-T1R3, dans des préparations de membranes (Assadi-Porter et al., 2008). Depuis, d'autres études STD ont été réalisées pour mettre en avant la liaison de ligands sur les récepteurs cannabinoïdes CB1 and CB2 en cellules entières (Pereira et al., 2009), le récepteur d'acides gras GPR40 en préparations de membranes (Bartoschek et al., 2010), le récepteur β_2 adrénergique en détergents (Gater et al., 2014), le récepteur de chimiokines CXCR4 en préparations de membranes (Cox et al., 2015) ou en cellules entières (Brancaccio 2018), et les récepteurs α_1A et α_1B adrénergiques

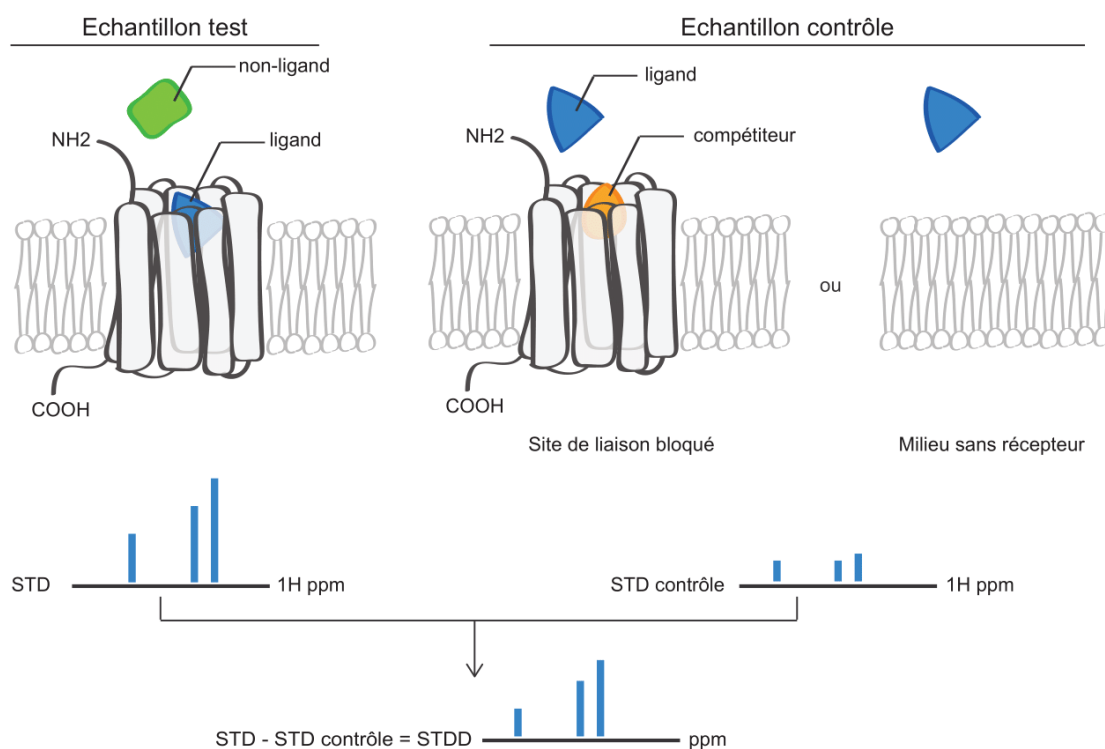


FIGURE 2.5 – **Application du STDD pour l'identification de ligands de RCPGs.** Un spectre STD ne contient que les signaux ^1H du ligand. Pour distinguer les signaux STD qui sont générés par l'interaction avec le récepteur de ceux qui sont générés par les interaction non-spécifiques, une expérience de contrôle doit être menée, en parallèle, sur un échantillon qui ne contient pas de récepteurs ou avec des récepteurs dont le site de liaison est inaccessible. La soustraction des spectres STD (STD et STD contrôle) fourni un spectre double différence (STDD) ne contenant que les signaux issus d'une interaction spécifique. La part d'interactions non-spécifiques peut également être estimée en comparant visuellement les spectres.

(Yong et al., 2018) en détergents (Table 2.1). L'expérience STD a donc été appliquée avec succès à des RCPGs solubilisés aussi bien en détergents, qu'en préparations de membranes et en cellules entières.

2.1.3 Caractérisation des site et mode de liaison des ligands

Des déclinaisons de l'expérience NOESY ont été imaginées pour accéder à une compréhension plus détaillée de l'interaction de ligands sur leur cible. Ces expériences sont intitulées ILOE (*interligand overhauser effect*) et INPHARMA (*interligand NOEs for pharmacophore mapping*) (London, 1999; Sanchez-Pedregal et al., 2005). Elles reposent sur un transfert d'aimantation entre les protons de deux ligands se liant soit de manière concomitante à des sites de liaison

adjacents, en formant un complexe ternaire (ILOE) ; soit de manière compétitive sur le même site de liaison, en formant deux complexes binaires successifs (INPHARMA). La liaison simultanée ou consécutive des deux composés est confirmée par l'observation de pics NOE interligands caractéristiques (Figure 2.6). Si la structure du complexe formé entre l'une des molécules utilisées pour ces expériences et la protéine est disponible, alors celle-ci peut servir de référence et

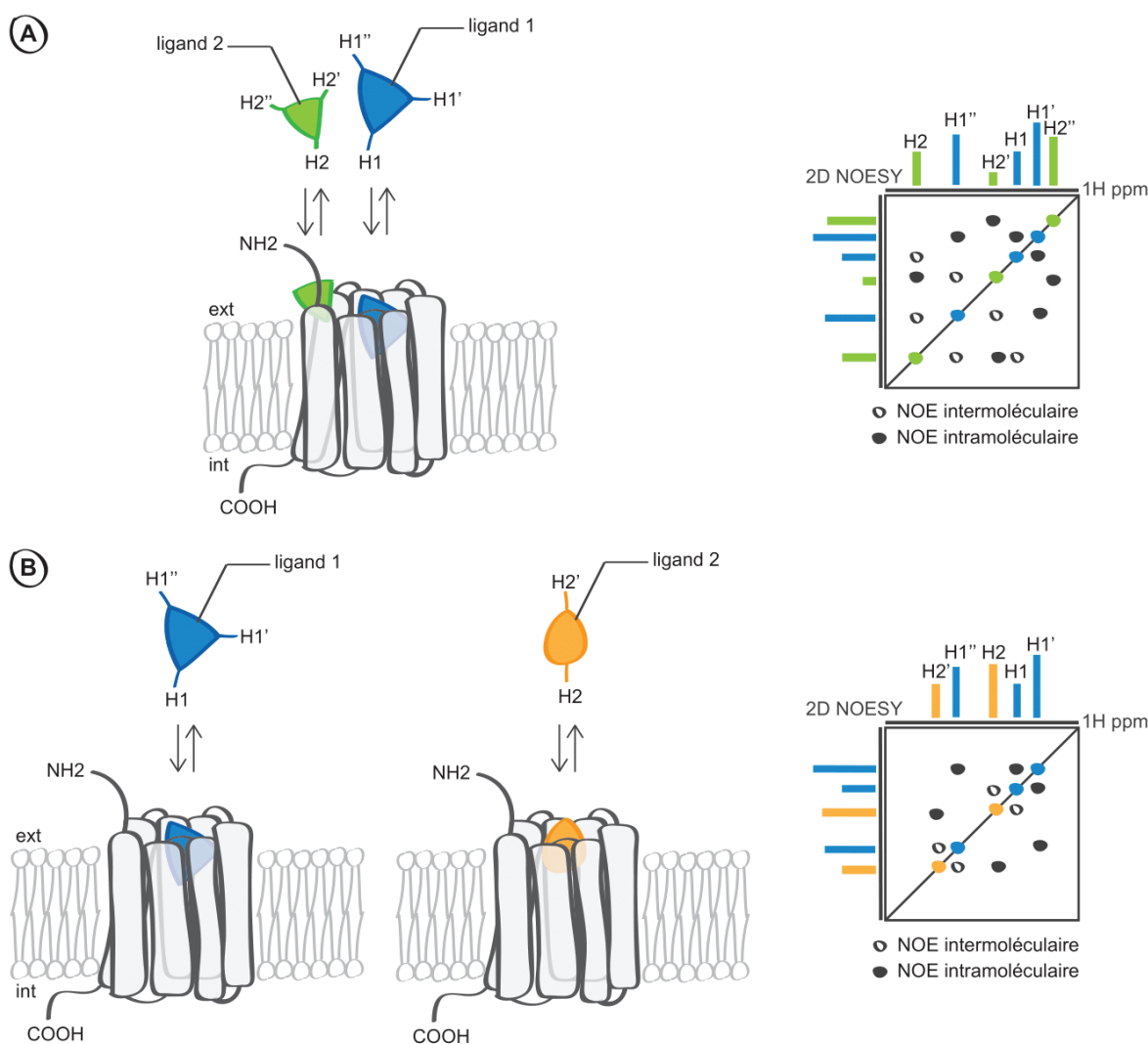


FIGURE 2.6 – Principe illustré des expériences ILOE et INPHARMA. Les expériences ILOE et INPHARMA détectent la liaison de deux ligands sur une même cible protéique. Les modes de liaison relatifs des molécules, peuvent être déduits de l'intensité des pics de corrélation NOE intermoléculaires. (A) L'expérience ILOE met en évidence les régions des molécules qui interagissent à proximité. Dans cet exemple, le proton H2' interagit avec avec le proton H1'' et le proton H2 interagit avec les protons H1'' et H1. (B) L'expérience INPHARMA met en évidence les régions des molécules qui sont en contact avec une même zone de la protéine. Dans cet exemple, les protons H1 et H1'' interagissent au même endroit que H2 et H2', respectivement.

permettre d'obtenir des informations précieuses sur la localisation et la caractérisation des site et mode de liaison du second ligand. La valeur du temps de mélange τ_m est fixée à 600 ms pour l'expérience ILOE. En revanche, elle n'a pas de valeur fixe pour l'expérience INPHARMA et semble dépendre du complexe protéine-ligand étudié (Orts et al., 2009 ; Krimm et al., 2012). Un τ_m très court, jusqu'à 50 ms, doit être suffisant, mais des études montrent que l'emploi d'un τ_m plus long, jusqu'à 300 ms, peut s'avérer nécessaire (Fredriksson et al., 2017).

Concernant les RCPGs, seul l'emploi de l'expérience INPHARMA a été rapporté dans la littérature. Celle-ci a été utilisée, pour la première fois, pour élucider le mode de liaison de ligands sur le récepteur d'acides gras GPR40, en préparations de membranes, et les informations obtenues ont permis de générer un model de liaison des ligands, basé sur l'alignement des pharmacophores (Bartoschek et al., 2010). Plus récemment, elle a été utilisée pour montrer que les composés ZM241358, PQA (3-pyrrolidin-1-ylquinoxalin-2-amine) et XAC (xanthine amine congener) lient de manière compétitive le récepteur A_{2A} de l'adénosine, solubilisé en nanodisques (Fredriksson et al., 2017) (Table **2.1**).

L'expérience STD est également capable de fournir des informations sur le mode de liaison des ligands sur leur récepteur. En effet, il existe une approche quantitative de l'expérience STD, appelée *group epitope mapping* (ou cartographie des épitopes), basée sur l'analyse des différences d'intensités STD relatives, transcrites dans les facteurs STD calculés pour chaque signal 1H (Mayer & Meyer, 2001). Plus un proton du ligand est proche de la protéine, plus son facteur STD sera grand (Figure **2.7**). C'est avec cette méthode qu'ont été déterminés les modes de liaisons préférentiels du ligand TIQ-10 (Cox 2015) et du dérivé de la chimiokine CXCL12 (Brancaccio et al., 2018), liés au récepteur CXCR4. Elle a également permis de révéler les déterminants moléculaires responsables de la sélectivité de A-61603 pour le récepteur $\alpha 1A$ adrénergique par rapport au récepteur $\alpha 1B$ adrénergique (Yong et al., 2018).

Il est important de noter que les temps de relaxation longitudinaux T_1 ont un fort impact sur les spectres STD. Des précautions doivent donc être prises lors de la comparaison des facteurs STD (Yan 2003). Par exemple, les protons aliphatiques ont un T_1 relativement plus court que les protons aromatiques. La valeur de T_1 est également sensible au choix du solvant (H_2O ou D_2O). Pour s'affranchir de ce biais, il est possible de tenir compte des valeurs de T_1 dans le

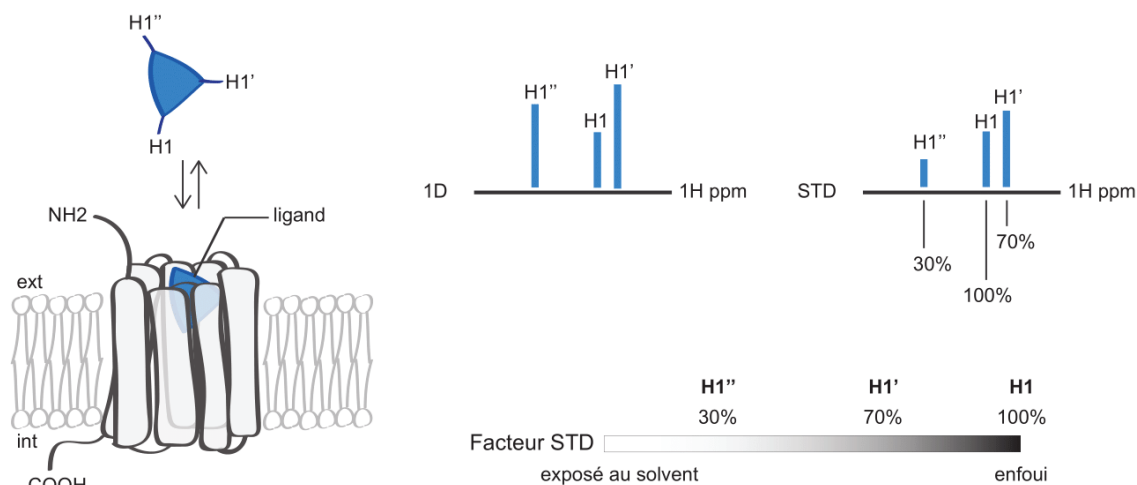


FIGURE 2.7 – **Elucidation du mode de liaison de ligands par cartographie des épitopes STD.** Les valeurs des facteurs STD sont calculées pour permettre l'élucidation du mode de liaison du ligand d'intérêt en discriminant les protons enfouis des protons exposés au solvant. Dans cet exemple, le proton H1 est le plus enfoui tandis que H1'' est le plus exposé au solvant.

calcul des facteurs STD, une stratégie viable pour l'examen approfondi de quelques ligands mais rapidement contraignante dans le contexte d'un criblage. Il est également possible d'utiliser des temps de saturation plus long, au delà de 3 secondes, avec pour conséquence évidente l'allongement des temps d'expérience. Enfin, l'enregistrement et la comparaison de spectres STD de ligands en présence de la protéine d'intérêt ou d'une protéine de référence, peut apporter la preuve d'un mode de liaison singulier (Figure 2.8) (Raingeval et al., 2019). La référence idéale doit donc être une protéine qui lie un grand nombre de composés sans mode de liaison privilégié, comme l'albumine sérique humaine (HSA).

Lorsque que le ligand est peptidique, il est possible d'identifier la région du peptide impliquée dans les interactions moléculaires avec son récepteur, en utilisant une méthode similaire au STD, appelée TCS (*transferred cross-saturation*). Dans une version du TCS, basée sur l'examen des méthyles, le peptide est deutéré et des protons sont sélectivement incorporés via des groupements ^{13}C d'acides aminés valines, leucine et isoleucine. Comme pour l'expérience STD, l'identification de la région d'interaction s'appuie sur le transfert de magnétisation entre les protons de la protéine sélectivement saturée et les protons, habilement incorporés, du ligand. En revanche, seul le spectre *on resonance* est enregistré. La réduction de résonances méthyles, dans le spectre ^1H - ^{13}C du peptide, pointe les résidus proche du récepteur. Cette technique a été utilisée pour

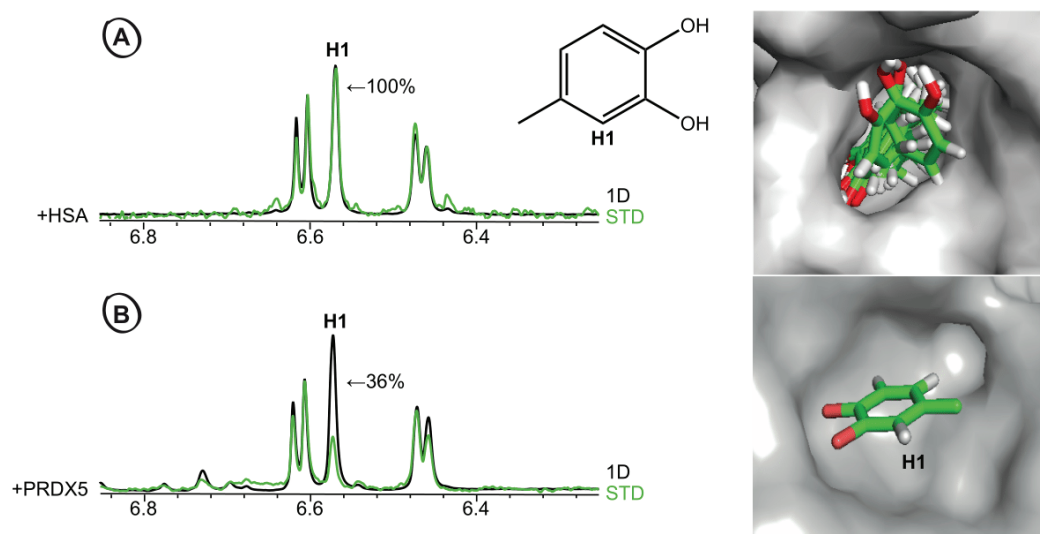


FIGURE 2.8 – **Mode de liaison privilégié du 4-méthylcatéchol sur PRDX5.** (A) Superposition des spectres 1D et STD du 4-méthylcatéchol lié à l'albumine sérique humaine (+HSA) ($K_d > 1$ mM). Le proton H1 du 4-méthylcatéchol possède un facteur STD de 100% traduisant une interaction sans mode de liaison privilégié. (B) Superposition des spectres 1D et STD du 4-méthylcatéchol lié à la protéine peroxyrédoxine 5 (+PRDX5) (K_d 330 μ M). Le proton H1 du 4-méthylcatéchol possède un facteur STD de 36% traduisant son exposition au solvant et un mode de liaison privilégié, en accord avec les données cristallographiques publiées dans la littérature. La structure du 4-méthylcatéchol en complexe avec PRDX5 a été résolue par (Aguirre 2014). Les modes de liaison potentiels du 4-méthylcatéchol sur la HSA ont été obtenus en utilisant le logiciel AutoDock4.2.3. Figure issue de (Raingeval et al., 2019).

cartographier l'interface de liaison des chimiokines SDF-1 α et MIP-1 α , en interaction avec le récepteur CXCR4 dans des détergents (Kofuku et al., 2009), et le récepteur CCR5 en bicouches lipidiques (Yoshiura et al., 2010), respectivement (Table 2.1). De plus amples investigations ont également été conduites pour élucider le processus de liaison de SDF-1 α sur le récepteur CXCR4, en présence de l'antagoniste sélectif AMD3100.

2.1.4 Elucidation structurale

L'expérience NOESY est un outil important dans le cadre de l'analyse structurale. Les intensités des pics de corrélation NOE peuvent s'interpréter en terme de contraintes conformationnelles de distances interprotoniques. Intégrées au champ de force d'un protocole de mécanique moléculaire, elles permettent d'assister la détermination de structures tridimensionnelles de molécules. Contrairement aux autres cas d'utilisation de l'effet NOE déjà décrits, il est primordial, pour la résolution structurale, que la diffusion de spin soit évitée. En relayant la relaxation

croisée au delà des interactions directes entre paires de spins, celle-ci peut fausser les calculs découlant de l'analyse de l'intensité des pics de corrélation. L'expérience NOESY a été employée pour élucider la structure de la molécule d'acide gras leukotriene B4 liée à son récepteur BLT₂, perdeutééré et solubilisé en amphipoles (Catoire et al., 2010) (Table 2.1). Il a été démontré que la liaison de LTB4 au récepteur BLT₂ conduit à des adaptations conformationnelles significatives, depuis une structure allongée jusqu'à une structure hautement contrainte, dont la forme lui a valu le nom de *conformation seahorse*. Il a aussi été montré que l'hormone PACAP subit des réarrangements conformationnels dans sa région N-terminale, lors de l'interaction avec son récepteur spécifique, solubilisé en détergents (Inooka et al., 2001) (Table 2.1). Enfin, un protocole de dynamique moléculaire restreint a été utilisé pour résoudre la structure du peptide dynorphine lié au récepteur κ -opioïde en détergent (O'Connor et al., 2015).

Une autre expérience de corrélation homonucléaire, ne reposant plus sur le couplage dipolaire entre spins mais sur le couplage scalaire, a également été utilisée dans le même but, et ses applications sur des ligands de RCPGs sont rapportées ici. Le jeu de contraintes expérimentales utilisé ne concerne plus des distances mais des angles de torsion des squelettes peptidiques, ϕ et ψ , qui dérivent des déplacements chimiques secondaires des atomes de carbone, C α et C β , des acides aminés. Les structures des neuropeptides neurotensine (NT) et bradykinine (BK), respectivement en complexe avec le récepteur NTS1 en vésicules lipidiques (Luca et al., 2003) et le récepteur B₂ (Lopez et al., 2008), ont été résolues avec cette méthode. L'assignement du squelette peptidique et des résonances des chaînes latérales a été accompli en utilisant l'expérience de corrélation 2D ¹³C-¹³C 2QF (*double quantum filtering*), sur NT uniformément marqué ¹³C et ¹⁵N, et BK sélectivement marqué ¹³C. Dans les deux cas, la comparaison de ces déplacements chimiques secondaires en présence ou en l'absence de récepteur a permis de mettre en avant l'existence de deux structures de squelette différentes.

2.2 La dynamique des récepteurs à l'étude

La résolution de structures tridimensionnelles de RCPGs, par cristallographie des rayons X, est à l'origine d'un gain incommensurable de connaissances sur les détails moléculaires de

RCPGs (classe)	Marquages	Expériences RMN	Echantillons
β_1 -AR (A)	Méthionines $^{13}\text{CH}_3$	2D ^1H - ^{13}C HMQC	Détergents
	Valines ^{15}N	2D ^1H - ^{15}N HSQC	Détergents 100 μM
β_2 -AR (A)	Cystéines ^{19}F	1D ^{19}F	Détergents
			Détergents 9-18 μM
	Méthionines $^{13}\text{CH}_3$	2D ^1H - ^{13}C HSQC	Détergents 100 μM
		2D ^1H - ^{13}C SOFAST-HMQC	Détergents 40 μM
	Méthionines $^{13}\text{CH}_3$, 100% ^2H	2D ^1H - ^{13}C HMQC	Nanodisques 20 μM
	Lysines ^{13}C	2D ^1H - ^{13}C HSQC	Détergents 50-200 μM
μ -OR (A)		STD-filtered ^1H - ^{13}C HMQC	
	Méthionines $^{13}\text{CH}_3$, 100% ^2H	2D ^1H - ^{13}C HMQC	Nanodisques
	Lysines ^{13}C	2D ^1H - ^{13}C HMQC	Détergents 20-40 μM
A _{2A} -AR (A)		1D ^{19}F	Détergents 50-200 μM
	Cystéines ^{19}F		Détergents 25-200 μM
		1D ^{19}F	Détergents
		2D ^{19}F - ^{19}F EXSY	
	Isoleucines $^{13}\text{CH}_3$, 100% ^2H	2D ^1H - ^{13}C HMQC	Détergents 5-100 μM
	100% ^{15}N , 70% ^2H	2D ^1H - ^{15}N TROSY	Détergents
BLT2 (A)	Isoleucines $^{13}\text{CH}_3$	2D ^1H - ^{13}C SOFAST-HMQC/TROSY	Nanodisques 10-100 μM

TABLE 2.2 – **Expériences RMN pour l'examen du processus d'activation de RCPGs lors de la liaison de ligands.** Les récepteurs couplés aux protéine G (RCPGs) sont classés par ordre alphabétique. Les expériences RMN, les types de marquage de RCPGs et les types d'échantillons utilisés sont rapportés. Expériences RMN : corrélation hétéronucléaire simple-quantum (HSQC), corrélation hétéronucléaire multiple-quantum (HMQC), *transverse relaxation optimized spectroscopy* (TROSY), *saturation transfer difference* (STD), *exchange spectroscopy* (EXSY).

l'interaction entre ces récepteurs, leur ligands et même une protéine G (Manglik & Kruse, 2017). La comparaison de plusieurs structures d'un même récepteur, obtenues dans les états actif et inactif, a été déterminante pour l'élucidation des changements conformationnels s'opérant lors de l'activation, mais elles restent des images rigides de deux états aux extrémités d'un paysage de conformations beaucoup plus riche. Au fil des années, la RMN s'est imposée comme un puissant outil d'investigation de la dynamique des RCPGs, en permettant de cartographier l'ensemble complexe des états conformationnels explorés par les récepteurs étudiés, et d'acquérir une compréhension plus approfondie des bases structurales de leur activation (Bostock et al., 2019).

2.2.1 Sélectivité conformationnelle

Du fait de sa signalisation diversifiée, et de son riche répertoire de ligands, le récepteur β_2 adrénergique constitue un excellent modèle pour l'étude des processus d'activation basés sur la liaison d'un ligand. Sa multiplicité conformationnelle a été révélée par l'examen de la dynamique de son coeur hydrophobe, sondé en utilisant des groupements $^{13}\text{CH}_3$ introduits en marquant

des méthionines particulièrement abondantes dans les hélices transmembranaires (Nygaard et al., 2013), et de son domaine cytoplasmique, étudié en utilisant des sondes ^{19}F introduites en marquant des cysteines exposées à la surface (Manglik et al., 2015). Les changements conformationnels, résultants de l'activation du récepteur lors de la liaison d'un agoniste, ont été observés grâce aux déplacements chimiques des résidus marqués, dans les spectres RMN 2D ^1H - ^{13}C HSQC (corrélation hétéronucléaire simple-quantum) et 1D ^{19}F (Figure 2.9).

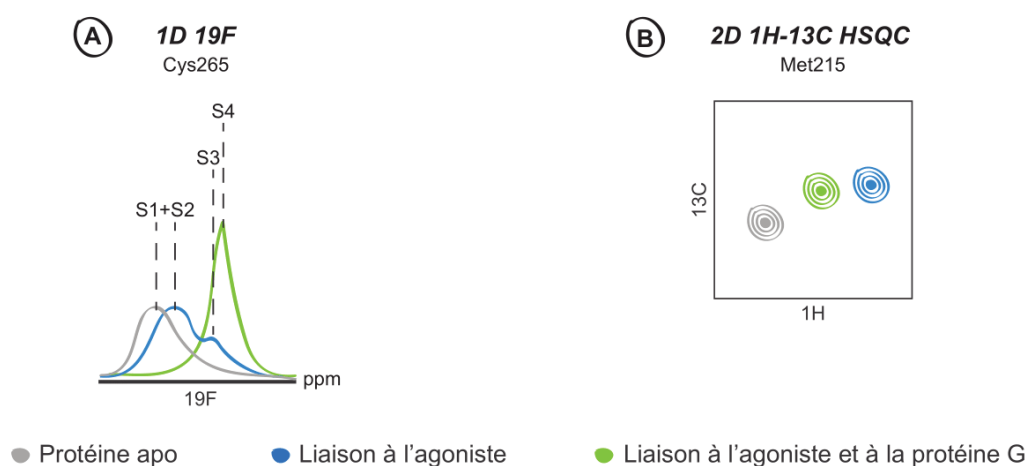


FIGURE 2.9 – **Expériences RMN pour l'étude de la dynamique du récepteur β_2 adr-énergique.** (A) Dans le spectre 1D ^{19}F de la cystéine 265 marquée (Cys265), chaque pic correspond à une état conformationnel spécifique du récepteur (Manglik et al., 2015). Quatre conformations distinctes ont été identifiées : S1, S2, S3, S4. S1 et S2 représentent deux états inactifs qui ne diffèrent que par la présence ou l'absence d'un verrou ionique, respectivement. S3 représente une conformation intermédiaire qui apparaît lors de la complexation du récepteur avec un agoniste. S4 représente une conformation active qui n'est observable qu'en présence d'une protéine G, ou substitut de protéine G. L'aire sous les pics est directement proportionnelle à la population de l'état correspondant. (B) Dans le spectre de corrélation 2D ^1H - ^{13}C HSQC, le pic de la méthionine marqué 215 (Met215), se déplace lors de la complexation du récepteur avec l'agoniste puis avec la protéine G (Nygaard et al., 2013). Chaque pic correspond à une conformation spécifique du récepteur : inactive, intermédiaire et active.

Ces études RMN ont démontré que le récepteur β_2 adrénergique, lorsqu'il est lié à un agoniste, évolue entre des conformations inactives, intermédiaires et actives. La forme apo est peuplée de deux conformations inactives, et la liaison d'un agoniste déplace l'équilibre vers une conformation capable d'interagir avec des protéines cytoplasmiques. Cependant, une interaction subséquente avec une protéine G, ou un substitut, est requise pour stabiliser complètement la conformation active. Ces résultats, observés en micelles de détergent, ont été corroborés par une autre étude réalisée en bicouches lipidiques (Kofuku et al., 2014) avec néanmoins des différences significatives

au niveau des taux de transitions et des populations des différents états structuraux. D'autres études RMN ont montré que les récepteurs μ -opioïde et β_1 adrénergique présentent le même panorama conformationnel que le récepteur β_2 adrénergique. De la même façon, la liaison d'une protéine G est requise pour la stabilisation totale de la conformation active. Ces résultats ont été obtenus en utilisant des sondes $^{13}\text{CH}_3$ -lysine pour le récepteur μ opioïde (Sounier et al., 2015), et des sondes ^{15}N -valine pour le récepteur β_1 adrénergique (Isogai et al., 2016), à travers l'analyse des spectres ^1H - ^{13}C HMQC (corrélation hétéronucléaire multiple-quanta) et ^1H - ^{15}N HSQC, respectivement. L'existence d'un couplage allostérique faible entre la poche orthostérique et le domaine d'interaction avec les partenaires intracellulaires, est donc proposée. Ce mode de régulation, également corroboré par une autre étude récente menée sur le récepteur $\text{A}_{2\text{A}}$ de l'adénosine, en utilisant les signaux de tryptophanes et de glycines marqués ^{15}N (Eddy et al., 2018a), pourrait bien être une caractéristique commune de l'activation des RCPGs.

Néanmoins, le processus d'activation des RCPGs reste complexe et n'a pas encore été totalement décodé. En utilisant une stratégie basée sur la détection du ^{19}F , il a été montré que deux états actifs sont susceptibles d'être déjà présents dans la forme apo du récepteur $\text{A}_{2\text{A}}$ de l'adénosine (Ye et al., 2016 ; Prosser et al., 2017). La liaison de ligands augmente alors la population d'un état spécifique à travers une sélection conformationnelle. Ainsi, l'addition d'un agoniste inverse augmente la population des états inactifs et un agoniste entier stabilise un état actif. Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus dans une récente étude utilisant également des sondes ^{19}F . Dans ce cas, aucun état actif du récepteur $\text{A}_{2\text{A}}$ de l'adénosine n'a été observé, ni dans sa forme apo, ni dans sa forme liée à l'antagoniste (Sušac et al., 2018). Des divergences ont également été rapportées au sujet d'une connection allostérique entre les surfaces exposées extracellulaires et intracellulaires. Elle a été observée pour le récepteur β_1 adrénergique (Isogai 2016), mais pas pour le récepteur $\text{A}_{2\text{A}}$ de l'adénosine (Eddy et al., 2018b), dans des études utilisant des valines marquées ^{15}N et des tryptophanes marqués ^{15}N , respectivement.

2.2.2 Sélectivité fonctionnelle

Le couplage allostérique entre les domaines transmembranaire et intracellulaire permet d'expliquer la capacité des RCPGs à réguler de multiples voies de réponses cellulaires via la signalisation biaisée. Les réarrangements conformationnels des récepteurs β_2 adrénergique et μ -opioïde

lors de la liaison de ligands biaisés ont été étudiés en suivant les déplacements chimiques de résidus ^{19}F -cystéines (Liu et al., 2012) et $^{13}\text{CH}_3$ -méthionines (Okude et al., 2015), respectivement.

Les variations de déplacements chimiques démontrent des spécificités de changements conformationnels, au niveau du domaine cytoplasmiques, associées aux voie de signalisation. Ainsi, la liaison aux protéines G est induite par des mouvements moléculaires au niveau de l'hélice VI, tandis que pour les β arrestines, ce sont les mouvements de l'hélice VII qui sont impliqués dans leur recrutement (Figure 1.1). L'exploration de la diversité conformationnelle du récepteur β_2 adrénergique, à l'aide de sonde $^{13}\text{CH}_3$ -méthionines, a également permis de montrer que la liaison d'un agoniste entier induit un panel de formes pré-activées qui vont, chacune, interagir préférentiellement avec différent partenaires intracellulaires (Solt et al., 2017). Ces cartographies des signaux RMN pourraient s'avérer être un outil formidable pour le design de ligands biaisés.

2.2.3 Modulation allostérique

La sélectivité fonctionnelle peut être obtenue avec des ligands orthostériques grâce à la signalisation biaisée, ou à travers la modulation de la fonction du récepteur grâce aux ligands allostériques. Comme cela a été exposé en section 1.4, les modulateurs allostériques possèdent de nombreux avantages qui justifient l'engouement de la recherche pour ces ligands particuliers, mais l'identification et la caractérisation de sites de liaison allostériques sur les RCPGs demeurent un défi majeur. Néanmoins, la RMN a déjà permis de mettre en avant certains mécanismes de régulation allostériques de molécules endogènes sur ces récepteurs. Une étude, réalisée avec des sondes ^{19}F , a révélé l'influence de la concentration en cation sur les populations du récepteur A_2 de l'adénosine (Ye et al., 2018) en démontrant que l'ion sodium Na^+ agit comme un modulateur allostérique négatif, et renforce ainsi un ensemble inactif de conformations. Dans une autre étude, réalisée en suivant les déplacements chimiques d'isoleucines marquées ^{13}C dans un spectre ^1H - ^{13}C HMQC, il a été montré qu'une forte concentration de sodium empêche les modifications conformationnelles induites par l'agoniste (Clark et al., 2017). À l'inverse, les cations divalents Ca^{2+} et Mg^{2+} agissent comme des modulateurs allostériques positifs, et déplacent l'équilibre vers les états actifs (Ye et al., 2018). Enfin, le suivi des déplacements chimiques d'isoleucines marquées ^{13}C dans un spectre ^1H - ^{13}C SOFAST-HMQC/TROSY (*transverse relaxation optimized spectroscopy*), a permis de mettre en avant le mécanisme de régulation allostérique

existant entre les lipides et les agonistes, en montrant que le cholestérol présent dans les membranes est capable de moduler le panorama conformationnel du récepteur BLT2 (Casiraghi et al., 2016). Une forte concentration d'analogue de cholestérol, le cholestérol hemisuccinate, augmente significativement la population de forme active du récepteur en complexe avec un agoniste.

La RMN en solution est une technique polyvalente qui a permis d'élargir le champ des connaissances disponibles sur la famille des RCPGs, à travers la détection et la caractérisation de ligands de ces récepteurs, mais également à travers l'investigation de leurs propriétés dynamiques et de leurs processus d'activation. En plus de cela, la RMN qui est reconnue comme méthode biophysique de choix pour la découverte de nouvelles molécules bioactives de cibles thérapeutiques solubles, surtout par la méthode des fragments, pourrait avoir également un impact très positif sur la recherche de médicaments ciblant les RCPGs.

Chapitre 3

Conception de molécules bioactives par la méthode des fragments : découverte et développement

La conception de molécules bioactives représente un défi qui se résume essentiellement à identifier des composés agissant sur des cibles biologiques responsables de dysfonctionnements et à les optimiser pour en faire des candidats médicaments qui seront évalués au cours de développements cliniques, en vue d'obtenir l'autorisation de mise sur le marché.

3.1 La genèse de la méthode des fragments

Le criblage haut débit, ou HTS (*high throughput screening*), est une méthode d'identification conjuguant génomique fonctionnelle et chimie combinatoire qui s'est beaucoup développée dans les années 90 avec l'émergence de pipelines automatisés (Ortholand, 2003). L'identification d'un nombre considérable de cibles thérapeutiques potentielles et la diversification accrue des chimiothèques, couplées au développement de la robotisation et la miniaturisation des tests, font naître l'espoir de voir grandir le nombre de nouveaux traitements médicamenteux. La sérendipité joue alors un rôle primordial dans la découverte pharmaceutique. Pourtant, si le criblage haut débit accroît considérablement les probabilités d'obtenir des composés *tête de série*, très peu d'entre eux ont réellement le potentiel d'intégrer les phases précliniques et cliniques. Ainsi,

malgré l'effort colossal des industries pharmaceutiques dans le domaine, le faible nombre de nouvelles entités chimiques arrivant sur le marché est décevant (Macarron, 2006). Les essais cliniques chargés de tester la spécificité, l'efficacité, la biodisponibilité, la durée d'action et la toxicité des touches identifiées et optimisées au cours du processus HTS se soldent majoritairement par des échecs. Apparaît alors un grand besoin de développer des stratégies permettant de générer des têtes de série de meilleure qualité, ayant de plus grandes chances de succès lors des développements cliniques. La compilation d'informations issues des bases de données de médicaments et de chimiothèques a permis de fournir de précieux renseignements sur les caractéristiques physico-chimiques des molécules qu'elles référencent (Vieth et al., 2004 ; Siegel & Vieth, 2007). Cette analyse globale débute en 1997, avec les travaux de Lipinski qui, en s'intéressant aux médicaments administrés par voie orale, accède à une compréhension détaillée des caractéristiques moléculaires en lien avec une perméation optimale. Il établit ainsi un ensemble de règles susceptibles de guider la chimie médicinale dans le but d'obtenir des composés qui auront de bonnes propriétés ADMET¹ et donc une bonne pharmacocinétique (Leach et al., 2006 ; Siegel & Vieth, 2007). Cet ensemble de règles est appelé *règles des 5* (RO5) (Figure 3.1).

Règles des cinq	Règles des trois
Poids moléculaire ≤ 500 Da	Poids moléculaire ≤ 300 Da
Nombre d'accepteurs de liaisons H ≤ 10	Nombre d'accepteurs de liaisons H ≤ 3
Nombre de donneurs de liaisons H ≤ 5	Nombre de donneurs de liaisons H ≤ 3
$\log P \leq 5$	$\log P \leq 3$
Nombre d'angles de rotation ≤ 5	Nombre d'angles de rotation ≤ 3
Surface polaire $\leq 140 \text{ \AA}^2$	Surface polaire $\leq 60 \text{ \AA}^2$

FIGURE 3.1 – **Règles des cinq de Lipinsky et règles des trois d'Astex.** Ces lois régissent différents paramètres : le poids moléculaire en dalton (Da), le nombre de donneurs et accepteurs de liaisons hydrogènes (H), le logarithme décimal du coefficient de partage octanol/eau ($\log P$), le nombre d'angles de rotation et la surface polaire des molécules, directement liée à la capacité de pénétration des cellules, en angstrom carré (\AA^2).

Des travaux subséquents font une autre observation : l'optimisation d'un tête de série en médicament entraîne l'augmentation significative de son poids moléculaire et de sa lipophilie, réduisant ainsi la potentialité de développement des composés finaux (Teague et al., 1999 ; Hann et al., 2001, Hann & Oprea, 2004 ; Rees et al., 2004). Le criblage de composés plus simples que les composés *drug-like* laisse donc plus de latitude aux étapes d'optimisation. C'est sur ce postulat

1. Absorption, distribution, métabolisme, élimination, toxicité

qu'est basée la conception de médicaments par la méthode des fragments, ou FBDD (*fragment-based drug design*) (Erlanson et al., 2004; Zartler & Shapiro, 2005). Les fragments peuvent être considérés comme les éléments constitutifs de médicaments déjà existants (Vieth et al., 2004; Vieth & Sutherland 2006; Siegel & Vieth, 2007). Il s'agit d'une catégorie particulière de petites molécules, plus simples, moins fonctionnalisées et plus solubles que les composés habituellement criblés, elle aussi régie par des lois, appelées *lois d'Astex* ou *règles des trois* (RO3) (Congreve et al., 2003), par analogie avec les RO5 de Lipinski (Figure 3.1). Le principe général de cette méthode, dont les étapes seront reprises en détails dans les sections ci-après, est illustré en figure 3.2.

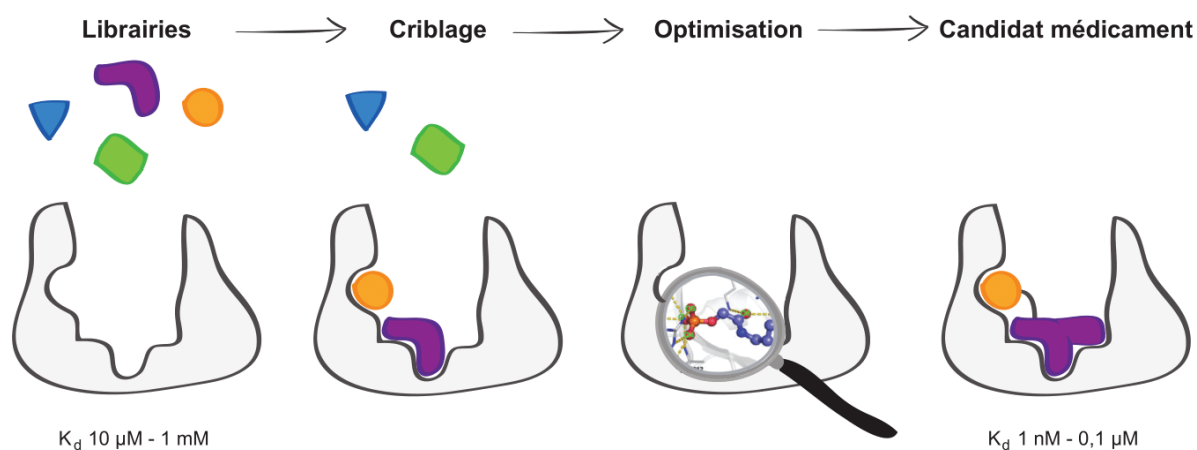


FIGURE 3.2 – **La méthode des fragments.** Les fragments sont des petites molécules qui ont une affinité (K_d) faible pour leur cible. Les bibliothèques de fragments sont criblées à l'aide d'essais biologiques ou de méthodes biophysiques afin de permettre l'identification de touches qui constitueront les briques de départ d'édifices moléculaires beaucoup plus complexes. C'est la biologie structurale (*structure-based drug design*) qui va permettre de faire évoluer le composé, soit en ajoutant des groupements fonctionnels aux fragments de base, soit en les liant les uns aux autres, jusqu'à obtenir un potentiel candidat médicament dont l'affinité sera augmentée.

3.2 Une voie avantageuse pour la conception de médicaments

3.2.1 Taux de touches

Le criblage haut débit a indubitablement permis d'augmenter les probabilités d'obtenir des têtes de série, puisqu'il permet de largement multiplier la quantité de composés testés. Là où les essais traditionnels en éprouvette permettaient de réaliser 2000 tests par an et par personne, le criblage haut débit permet d'en réaliser plus de cinquante millions (Schirlin et al., 2007). La

multiplication des tests engendre évidemment une augmentation de la probabilité de trouver des touches. Pourtant, la marge de progression reste importante. Les fragments présentent un avantage trivial : leur taille. Cela peut être aisément appréhendé grâce au modèle théorique élaboré par Hann *et al.*, qui prédit l'impact de la complexité des molécules criblées sur la probabilité de trouver une touche (Hann et al., 2001 ; Leach & Hann, 2011). Il permet de conceptualiser le fait que plus une molécule est simple, plus il y a de chances que celle-ci interagisse avec la cible. Grâce à leur petite taille, les fragments sont moins susceptibles d'être gênés par la présence de groupements chimiques, l'éventualité d'un encombrement stérique est faible et les fragments pénètrent plus facilement la poche de liaison de la cible. Les taux de touches, obtenus lors d'un criblage de fragments, sont 10 à 1000 fois supérieur à ceux obtenus lors de campagnes de criblage HTS conventionnelles (Schuffenhauer et al., 2005). Un fragment représente donc un point de départ aussi accessible que remarquable.

3.2.2 Efficacité de liaison

Plus une molécule est complexe, plus elle forme d'interactions dans le site de liaison, c'est pour cela que les molécules *drug-like* ont une meilleure affinité que les fragments pour leur cible. Mais en s'affranchissant de la taille des composés, il apparaît que les fragments ont des énergies de liaison par unité de masse moléculaire plus élevée que les molécules *drug-like*, ce qui signifie qu'une plus haute proportion de leurs atomes est directement impliquée dans l'interaction avec la cible. Les fragments interagissent plus faiblement mais plus efficacement avec leur cible (Figure 3.3) (Kuntz et al., 1999 ; Bembenek et al., 2009).

L'estimation de l'efficacité de liaison LE, permettant de relier l'affinité d'une molécule à son nombre d'atomes lourds, se fait par :

$$LE = \frac{\Delta G}{HA}$$

$$\Delta G = -RT \ln(K_d)$$

Avec ΔG l'énergie libre de liaison d'un ligand sur une cible donnée, HA son nombre d'atomes lourds, R la constante des gaz parfaits, T la température absolue et K_d son affinité (Hopkins et al., 2004). Plus la valeur LE est élevée, plus la liaison est efficace. Ce terme peut donc être utilisé pour prioriser les touches obtenues après un criblage, en éliminant le biais de sélection



FIGURE 3.3 – **Appréhension des concepts d’affinité et efficacité de liaison.** L’affinité d’une molécule *drug-like* (orange) pour sa cible, est meilleure que les affinités individuelles des fragments (bleu), car les possibilités d’interactions sont plus nombreuses. En revanche, elles ne sont pas optimales. En utilisant les fragments, il devient possible d’identifier les motifs chimiques les plus adaptés à chaque endroit du site de liaison. Figure adaptée de (Mason, 2018).

lié aux valeurs d’affinités, mais également pour guider les étapes d’optimisation (Carr et al., 2005 ; Schultes et al., 2010). Un médicament respectant les RO5, c’est-à-dire ayant un poids moléculaire inférieur à 500 dalton et une affinité inférieure à la dizaine de nanomolaires, aura une LE supérieure à $0,3 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{HA}^{-1}$ (Boyd 2010, Schultes 2010). Débuter avec un fragment ayant une efficacité de liaison élevée facilite donc le processus d’optimisation, alors qu’il sera difficile, voire impossible, de guider une portion significative des composés HTS vers la zone des médicaments se conformant aux RO5 (Figure 3.4). Ainsi, le point de départ idéal doit avoir une affinité pour sa cible inférieure ou égale à $2200 \mu\text{M}$, pour atteindre la zone de LE élevée. Pour aboutir à un médicament qui aura de bonnes propriétés pharmaceutiques, il sera donc plus payant de cribler des petites molécules avec peu de fonctionnalités et les optimiser progressivement avec des groupements chimiques qui apporteront tous une valeur ajoutée à l’interaction, et auront un bon impact sur la LE, plutôt que de débuter avec des composés plus larges, qui auront une meilleure affinité de départ mais qui seront moins malléables.

3.2.3 Couverture de l’espace chimique

L’espace chimique est défini par le nombre théorique de molécules obtenues en tenant compte de toutes les possibilités de combinaisons d’atomes et de fonctionnalités disponibles. L’espace chimique *drug-like* a été estimé par de nombreux groupes et même si les chiffres divergent ², tous s’accordent à dire que ce dernier est beaucoup plus large que celui qui a déjà été synthétisé,

2. La valeur de 10^{60} semble être généralement retenue (Bohacek et al.,1996).

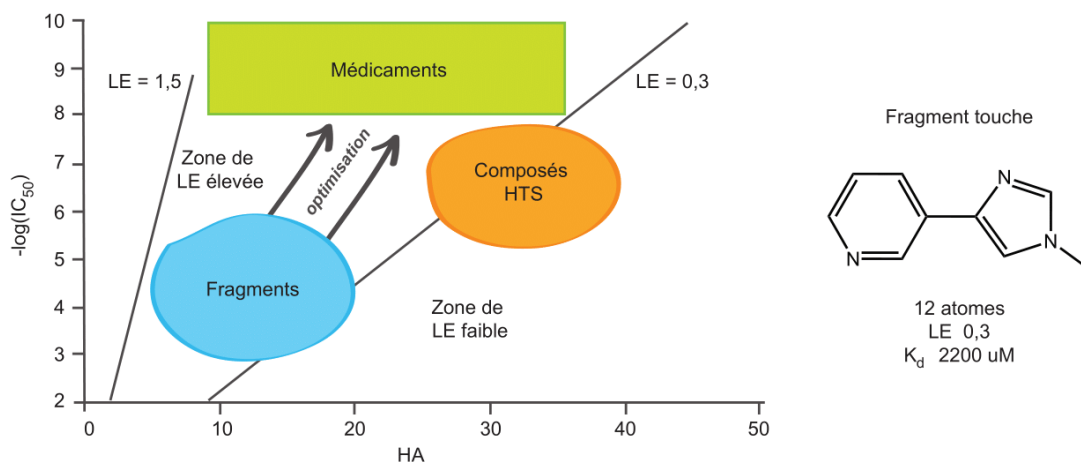


FIGURE 3.4 – **Evolution de l'efficacité de liaison en fonction de l'affinité et de la complexité moléculaire.** La valeur d'efficacité de liaison (LE) minimale devant être atteinte par un médicament pour respecter les RO5 est de 0,3 kcal.mol⁻¹.HA⁻¹. La valeur maximale théorique est de 1,5 kcal.mol⁻¹.HA⁻¹. Le rectangle vert définit l'espace chimique des médicaments se conformant aux RO5. Les flèches schématisent le développement optimal des paramètres d'affinité (-log(IC₅₀)) et de taille (atomes lourds, HA), permettant de conserver une bonne LE. Un exemple de fragment touche constituant un bon point de départ est rapporté. Figure adaptée de (Carr et al., 2005 ; Siegal et al., 2007).

environ 10⁸ molécules, ou celui qu'il serait hypothétiquement possible de synthétiser, entre 10²⁰ et 10²⁴ molécules (Hann & Oprea, 2004). L'espace chimique des fragments a, quant à lui, été estimé à environ 10⁷ molécules (Fink et al., 2005). La divergence entre le nombre de composés présents dans une librairie et le nombre de possibles étant minimisée par la taille des molécules de la librairie, le faible poids moléculaire des fragments va encore une fois se révéler être un véritable atout. Il est intuitif que même une petite collection d'environ 10³ fragments permettra une meilleure exploration de l'espace chimique qu'une large librairie HTS contenant en moyenne, entre 10⁵ et 10⁷ molécules *drug-like* (Macarron, 2006). Et même si les industries pharmaceutiques parviennent à augmenter ce chiffre, les chimiothèques traditionnelles ne représenteront toujours qu'une infime partie des possibles. Le criblage de fragments augmente les probabilités que l'ensemble des composés testés coïncide avec l'ensemble restreint des composés se liant à la cible, ce qui participe également à l'augmentation du taux de touches évoqué précédemment. Le criblage de n molécules fragments est équivalent à celui de $\frac{n \times (n+1)}{2}$ molécules *drug-like*³. Cribler une librairie de 1000 fragments équivaut donc à cribler une librairie traditionnelle de 500 000

3. En considérant qu'un fragment est la moitié d'une molécule *drug-like*.

molécules *drug-like* (Figure 3.5).

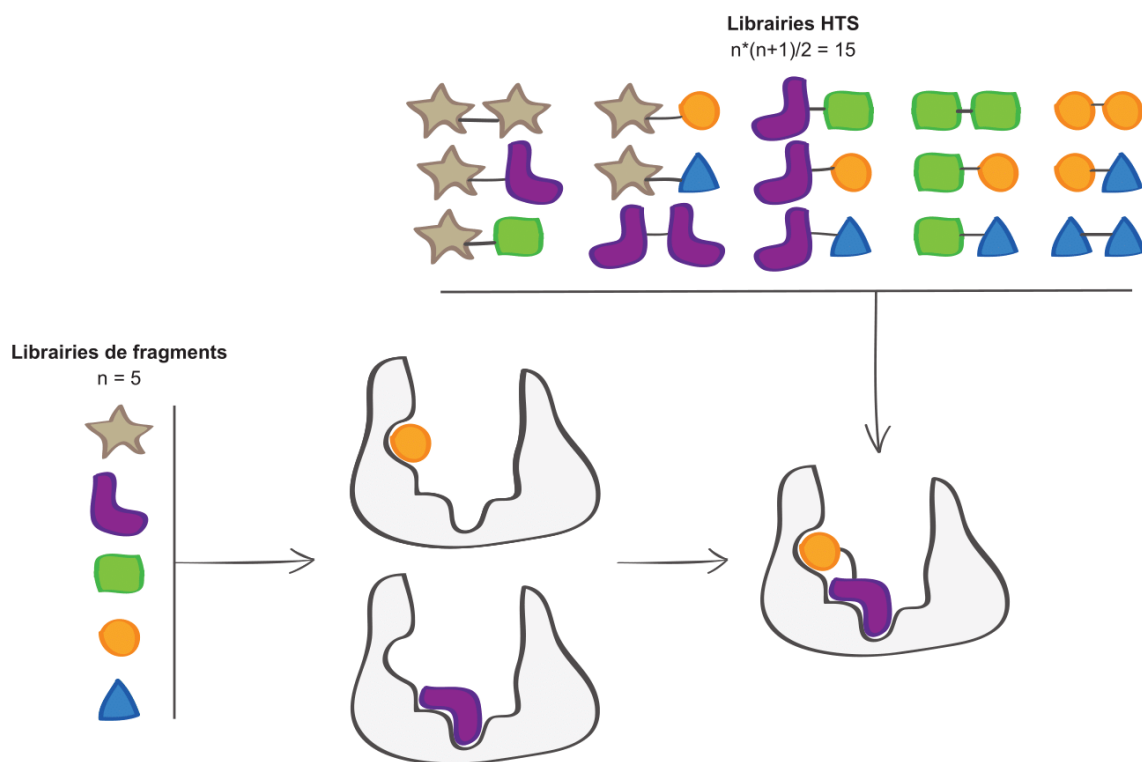


FIGURE 3.5 – **Comparaison de librairies de fragments et HTS.** Schématisation d'un criblage sur une protéine possédant une poche de liaison avec deux cavités. Avec une librairie de $n=5$ fragments, il est possible de créer 15 combinaisons HTS différentes. Ce chiffre peut s'élever à 25 si, par exemple, *étoile-triangle* n'est pas considéré comme équivalent à *triangle-étoile*. Le criblage de fragments permet donc d'obtenir plus facilement et rapidement la bonne combinaison. Figure adaptée de (Leach et al., 2006).

Par conséquent, les larges dissemblances entre les fragments et les médicaments constituent leur point fort : (i) le criblage devient plus accessible, il n'est plus nécessaire d'investir dans de grandes librairies de composés et dans de l'équipement de robotique, (ii) il est possible, même avec peu de fragments, d'obtenir facilement des points de départ avec lesquels travailler, et (iii) cribler peu de composés permet également de se tourner vers des techniques ayant des débits plus faibles mais avec un haut potentiel informatif, comme la RMN ou la cristallographie des rayons X.

RCPG (classe)	Méthode	Echantillon	Fragments	Touches	Réfs
$\alpha_2\text{CAR}$ (A)	Essais biologiques	Cellules	3071	10%	Szóllósi 2015
A_3AR (A)	Essais biologiques	Cellules	248	15%	Stoddart 2012
H_4R (A)	Essais biologiques	Membranes	1010	5%	Verheij 2011
mGlu_5R StaR [®] (C)	Essais biologiques	Membranes	3600	5%	Christopher 2015
$\beta_1\text{AR}$ StaR [®] (A)	SPR	Détergent	650	2%	Christopher 2013
$\beta_2\text{AR}$ (A)	SPR	Détergent	656	12%	Aristotelous 2013
$\text{A}_{2\text{A}}\text{AR}$ StaR [®] (A)	SPR	Détergent	-	-	Congreve 2011
CCR5 (A)	SPR	Détergent	200	2,5%	Navratilova 2015
$\beta_1\text{AR}$ StaR [®] (A)	RMN (TINS)	Détergent	579	14%	Congreve 2011
$\text{A}_{2\text{A}}\text{AR}$ StaR [®] (A)	RMN (TINS)	Détergent	531	18%	Chen 2012

TABLE 3.1 – Méthodes de criblage pour la découverte de nouveaux ligands de RCPGs par la méthode des fragments. Les méthodes de criblage, le nom de récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), les types d'échantillons, la taille des bibliothèques de fragments testées et les taux de touches sont rapportés. Méthodes : résonance plasmonique de surface (SPR), résonance magnétique nucléaire (RMN) par *target immobilized NMR screening* (TINS). Certains récepteurs ont été utilisés sous forme thermostabilisée (StaR[®]). Toutes les expériences de SPR et RMN ont été réalisées sur des récepteurs immobilisés.

3.3 À la recherche de points de départ

Dans cette section seront rapportées les techniques de criblage de fragments ayant été utilisées dans la littérature pour la découverte de ligands de RCPGs. Comme pour les autres protéines, le processus de recherche repose traditionnellement sur la conduite de tests basés sur la mesure de réponses biologiques, ou sur le suivi de l'interaction d'un ligand de référence, couplés au criblage haut débit de larges bibliothèques de molécules *drug-like* (Houston et al., 2008). Comme cela a été précédemment évoqué en section 1.4, cette approche a, évidemment, délivré avec succès un grand nombre de composés qui ont fait leur chemin jusqu'au marché pharmaceutique. Cependant, la majorité d'entre eux n'agit que sur une partie restreinte des RCPGs et la sélectivité entre les sous-types de récepteurs reste un grand défi, sans doute lié au fait que 70% des médicaments ciblant les RCPGs sont des analogues dérivés des ligands endogènes (Mason, 2012). La découverte de têtes de série par la méthode des fragments représente une alternative prometteuse, qui peut permettre d'identifier plus facilement de nouveaux motifs chimiques (Table 3.1).

3.3.1 Essais biologiques

Les tests biochimiques ou cellulaires représentent les procédés de criblage typiquement employés en HTS. Ils consistent à identifier des ligands par mise en contact avec la cible. Les

stratégies de détection de l'interaction, ou de la réponse biologique qui en résulte, sont basées sur la fluorescence, la luminescence ou la radioactivité. L'utilisation de l'une ou l'autre de ces techniques va notamment dépendre du système biologique choisi, qui peut être la cible seule, une cascade de biomolécules incluant la cible ou un système cellulaire entier (Janzen, 2014). Les essais disponibles pour les RCPGs sont nombreux et continuent d'être développés (Zhang & Xie, 2012), basés sur la mesure directe de la liaison d'un ligand marqué (Tränkle et al., 1999), du recrutement d'une protéine G (Harrison & Traynor, 2003) ou de la β arrestine (Hamdan et al., 2005) et de la détection de messagers des voies de signalisation (Eglen & Reisine, 2008; Williams, 2004; Vedel et al., 2015; Liu et al., 2008).

Les essais biologiques présentent l'avantage de ne nécessiter que de faibles quantités de protéines, ce qui est hautement salubre lorsque la cible est une protéine membranaire, difficile à produire comme les RCPGs. Ceux-ci ont donc été ajustés pour pouvoir être transposables à la détection de fragments, ce qui nécessite de contrebalancer les faibles affinités d'interaction par l'augmentation de la concentration des composés testés, typiquement de l'ordre du millimolaire (Leach et al., 2006). Malgré la large palette de tests disponibles, le nombre de travaux publiés utilisant ces méthodes pour le criblage de fragments de RCPG est limité. Seuls les tests décrits dans ces publications sont rapportés ici.

Tests de liaison

La détection d'interaction ligand-récepteur la plus conventionnellement utilisée est basée sur le dosage d'un ligand de référence marqué L^* , sur des préparations de membranes ou des cellules entières, contenant la cible d'intérêt R , en présence d'un ligand d'intérêt L (Figure 3.6) (de Jong et al., 2005).



FIGURE 3.6 – **Expérience de déplacement d'un ligand de référence marqué.** Suivi de l'interaction d'un ligand de référence marqué L^* avec le récepteur d'intérêt R , en l'absence (A) ou en présence (B) du composé L à tester.

En premier lieu, la méthode de déplacement permet d'accéder à la constante de dissociation K_d du ligand L^* , gouvernée par la loi d'action de masse, ainsi qu'à la densité du récepteur B_{max}

dans les échantillons utilisés :

$$K_d = \frac{K_{\text{off}}}{K_{\text{on}}} = \frac{[L^*][R]}{[RL^*]} \quad \text{et} \quad [RL^*] = \frac{[L^*] \times B_{\text{max}}}{[L^*] + K_d}$$

Les paramètres K_{on} et K_{off} correspondent aux cinétiques d'association et dissociation, respectivement. L'introduction d'un nouveau ligand L, déplace une certaine quantité de ligand marqué L^* , qui dépend à la fois de la concentration et de l'affinité de L. En utilisant une gamme de concentrations de L, il est possible de déterminer son IC_{50} , correspondant à la concentration pour laquelle 50% de L^* ont été déplacés. Ce paramètre est relié à la constante de dissociation K_i de L, par l'équation de Cheng-Prusoff :

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L^*]}{K_d}}$$

Cette technique de criblage permet d'identifier des agonistes et antagonistes en une seule étape. En revanche, elle ne permet pas de les distinguer puisqu'elle n'implique pas de suivre des voies de signalisation en aval de l'interaction et ne permet donc pas de prédire l'activité des ligands.

Elle a été employée avec succès pour la réalisation d'un criblage de fragments sur les récepteurs histaminique H_4 (Verheij et al., 2011) et métabotrope $mGlu_5$ du glutamate StaR[®] 4 (Christopher et al., 2015) (Table 3.1). Ce qui est particulièrement intéressant dans le cas du récepteur $mGlu_5$, est que le ligand marqué utilisé est un modulateur allostérique négatif, une stratégie qui a ainsi permis d'identifier de nouveaux NAM. Dans ces deux études, les échantillons utilisés sont des préparations de membranes, et le ligand déplacé est un ligand radioactif. Dans une autre étude, un criblage de fragments a été réalisé sur le récepteur A_3 de l'adénosine (Stoddart et al., 2012) (Table 3.1). Dans ce cas, l'échantillon utilisé est cellulaire et le ligand déplacé est un ligand fluorescent.

Tests fonctionnels

En plus des tests de liaison, qui permettent de mettre en évidence une interaction spécifique entre une cible et une molécule testée, il existe des tests fonctionnels qui, eux, permettent de

4. L'utilisation d'une construction thermostabilisée permet à la protéine de résister au haut pourcentage de DMSO résultant des fortes concentration en ligands

mettre en exergue une activité biologique. Ils entrent dans la catégorie *criblage phénotypique*. La nature des phénotypes observables est variée. Il s'agit, par exemple, de suivre l'expression de gènes rapporteurs, la production de messagers secondaires, la réplication de virus ou la survie cellulaire (Baker, 2017). Ce type de criblage ne nécessite pas de connaître la cible biologique responsable du phénotype observé.

Une seule application de criblage phénotypique de fragments aux RCPGs a été publiée dans la littérature, sur le récepteur α_{2C} adrénergique (Szóllósi et al., 2015) (Table 3.1). Dans ce cas, le test fonctionnel est basé sur la mesure directe des variations de calcium Ca^{2+} cytoplasmique sur des cellules entières. Le dosage de ce messager secondaire de la voie d'activation des protéines G par ce récepteur est réalisé via une mesure globale de la fluorescence.

La mise en place de ces essais est un processus long et fastidieux. Une grande compréhension de la fonction de la cible et des mécanismes biologiques associés est primordiale afin d'évaluer quel sera le meilleur rapporteur de l'interaction, car le produit d'une réaction ne doit pas être généré par d'autres mécanismes que celui d'intérêt (Inglese et al., 2007).

Quand les essais biologiques fonctionnent bien, ils s'avèrent être une méthode de criblage rapide, quantitative et sans limitation de débit. Mais dans la majorité des cas, ils manquent de sensibilité pour détecter la liaison de faible affinité des fragments. L'augmentation de la concentration du ligand peut interférer avec les tests par des mécanismes non désirés ou provoquer une certaine toxicité dans le cadre de tests cellulaires. Des phénomènes d'agrégation du ligand ou de précipitation et dénaturation de la protéine peuvent également survenir lorsque la concentration du ligand est trop élevée. Cela pose le problème de la pertinence des tests réalisés, à l'origine de nombreux faux positifs (Gribbon & Sewing, 2003). Il apparaît alors comme fondamental de compléter les résultats en utilisant d'autres approches qui vont fournir des informations précieuses sur les interactions, permettant de discriminer les touches entre elles, de les prioriser, et ainsi de rationaliser la recherche et le développement de nouveaux médicaments. Ainsi, d'autres techniques biophysiques telles que la cristallographie des rayons X, la résonance plasmonique de surface, la résonance magnétique nucléaire et d'autres, sont devenues incontournables sur les plateformes de criblage des compagnies pharmaceutiques et des laboratoires académiques (Siegal et al., 2007; Renaud et al., 2016).

3.3.2 Résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface (SPR) est une technique optique de détection de l'interaction très répandue, qui ne nécessite aucun marquage. La cible protéique est immobilisée sur un capteur, généralement une plaque en verre recouverte d'or, couplé à un système de microfluidique permettant un flux continu de tampon, dans lequel sont solubilisés les composés à tester. La fixation d'un ligand, sur le récepteur d'intérêt, provoque une variation de l'indice de réfraction du tampon, à la surface du capteur, qui se traduit par un décalage de l'angle de résonance, mesurable en temps réel et proportionnel à la quantité de complexes formés (Figure 3.7) (Ciulli, 2013; Shepherd et al., 2014; Aristotelous et al., 2015). La SPR permet d'accéder aux cinétiques d'association K_{on} et dissociation K_{off} , et par extension à la constante de dissociation K_d du ligand.

De nombreuses études SPR ont été réalisées sur les RCPGs, pour la caractérisation d'interaction avec des ligands connus. En revanche, seuls quelques cas de criblages de fragments ont été réalisés sur les récepteurs thermostabilisés StaR[®] A_{2A} de l'adénosine (Congreve et al., 2011) et β_1 adrénergique (Christopher et al., 2013), et sur les récepteurs natifs CCR₅ à chimiokine (Navratilova et al., 2011) et β_2 adrénergique (Aristotelous et al., 2013). Afin d'évaluer la part d'interactions non-spécifiques des fragments avec l'environnement de solubilisation ou le support solide, et ainsi éviter les faux positifs, des expériences contrôles sont généralement conduites en parallèle des expériences de criblage classiques, sur des récepteurs dont le site de liaison a été bloqué avec un ligand connu de haute affinité (Navratilova et al., 2011; Aristotelous et al., 2013). Une autre stratégie a été utilisée dans le cas du récepteur β_1 , où le criblage contrôle a été réalisé sur le récepteur A_{2A}. Seuls les fragments se liant spécifiquement au récepteur β_1 ont été validés comme touches.

3.3.3 Résonance magnétique nucléaire

Le panel d'expériences RMN permettant d'étudier les interactions protéine-ligand est très diversifié, et certaines expériences, comme l'expérience STD, sont des méthodes bien établies pour le criblage de fragments sur des cibles thérapeutiques solubles (Cala & Krimm, 2015). En revanche, cette stratégie n'a pas encore été appliquée au criblage de fragments sur les RCPGs. Seule la technologie TINS (*target immobilized NMR screening*) a été employée à cet effet dans

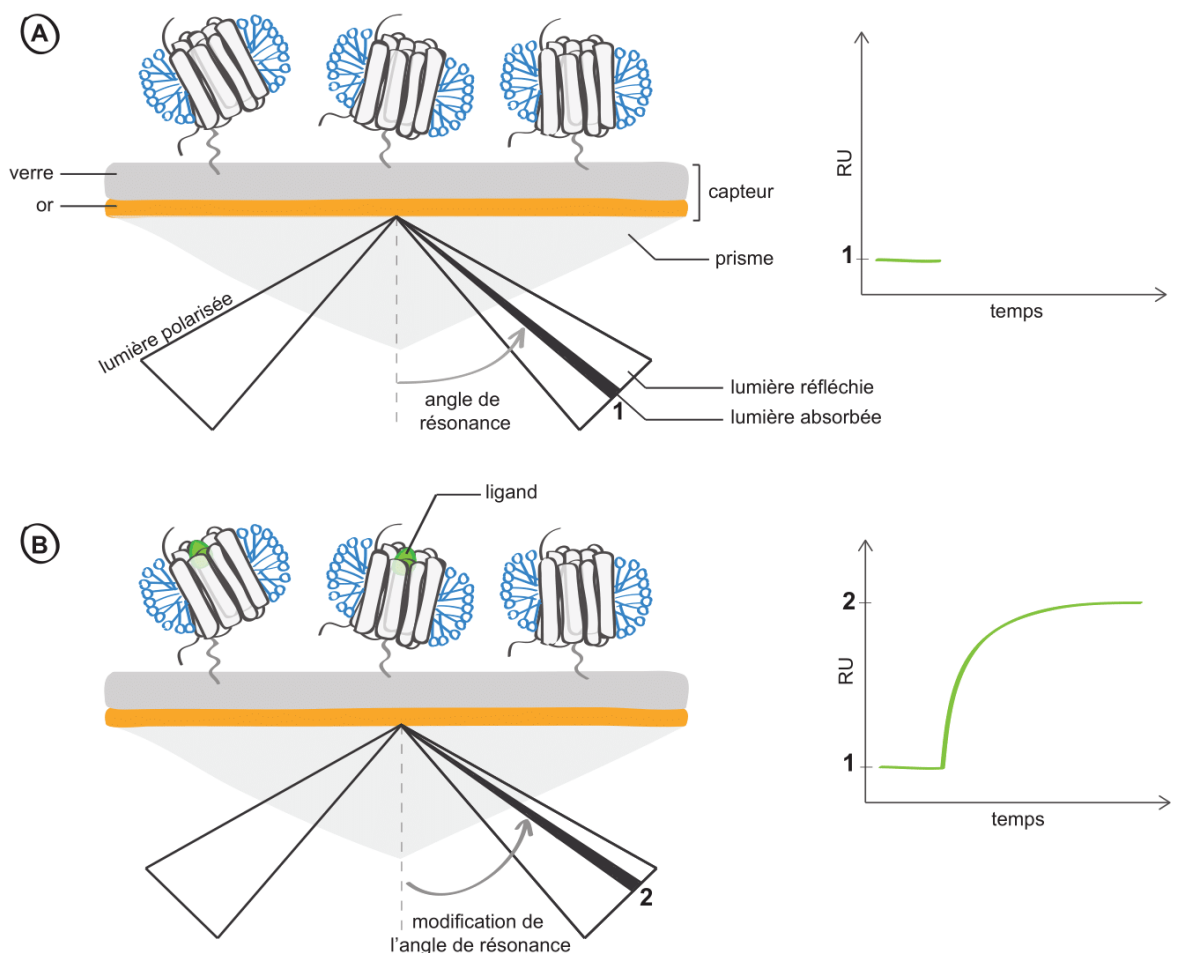


FIGURE 3.7 – Principe illustré de l'expérience SPR. (A) Une lumière polarisée est envoyée, à travers un prisme, sur le capteur sur lequel est immobilisée la cible protéique. Le faisceau réfléchi présente une baisse d'intensité à un angle précis, appelé angle de résonance. (B) Lorsqu'un ligand se lie au récepteur, la valeur de cet angle est modifiée et est enregistrée sous forme d'unités de résonance (RU). Le signal SPR correspond à la variation de RU en fonction de temps. Figure adaptée de (Ciulli, 2013).

les études publiées (Congreve et al., 2011 ; Chen et al., 2012).

TINS a été développé pour permettre le criblage de bibliothèques entières sur des cibles protéiques disponibles qu'en très faibles quantités, comme les protéines membranaires. La stratégie employée est similaire à celle de la SPR, puisqu'elle consiste également à immobiliser la protéine d'intérêt sur un support solide, dans ce cas des billes d'agarose, puis à la mettre en présence des composés à tester. Une sonde particulière est donc utilisée pour injecter les fragments dans une double cellule placée dans l'aimant. Chaque cellule contient une préparation de protéines solubilisées en micelles de détergent, correspondant soit au RCPG d'intérêt, soit à une protéine

de contrôle (Figure 3.8). La protéine de contrôle est elle aussi criblée afin d'évaluer la part d'interactions non-spécifiques des petites molécules avec l'environnement de solubilisation ou le support solide. Comme cela a été exposé en section 2.1.1, la relaxation des molécules est forte-

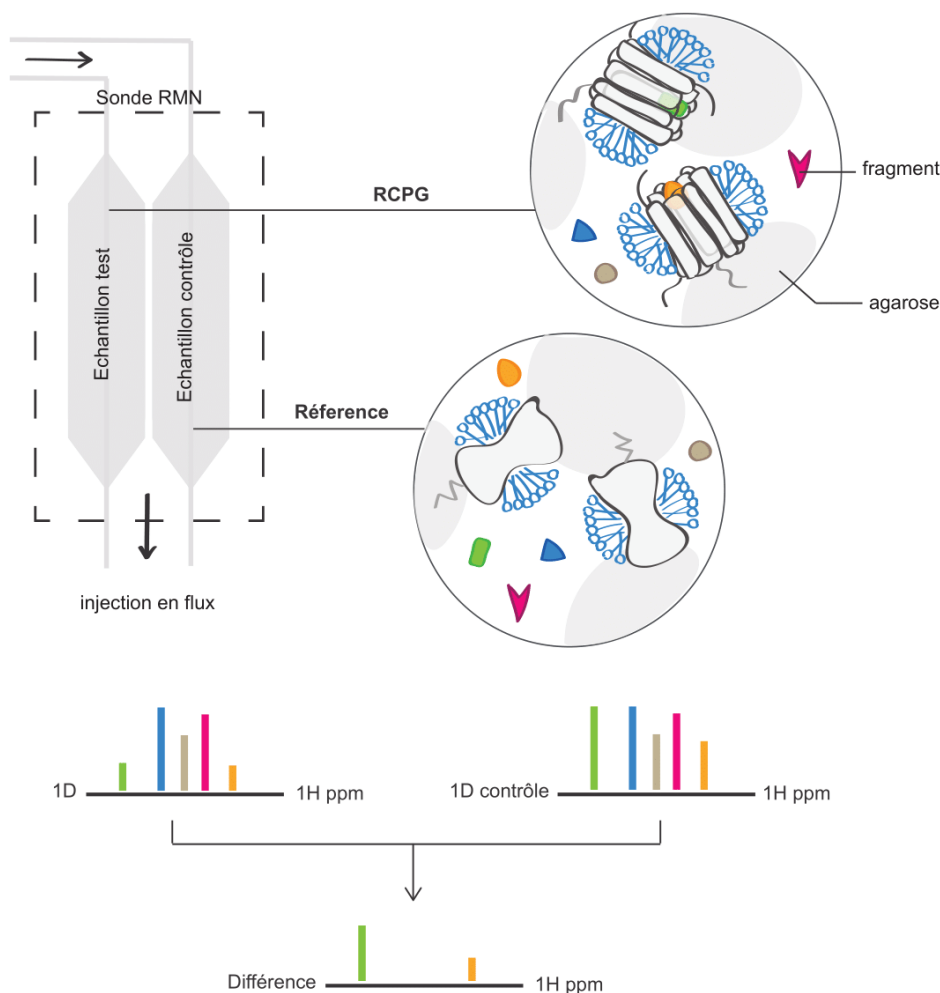


FIGURE 3.8 – **Principe illustré de l'expérience TINS.** Des mélanges de fragments sont injectés en parallèle dans une double cellule placée dans une sonde RMN particulière. Une des cellules contient le récepteur couplé aux protéines G (RCPG) d'intérêt, tandis que l'autre contient une protéine de référence. Les deux protéines sont solubilisées dans des micelles de détergent et immobilisées sur des billes d'agarose. La liaison de fragments est détectée par les variations de spectre RMN 1D ^1H . La différence des spectres 1D enregistrés pour la cible et la référence fournit un spectre ne contenant que les signaux ^1H des ligands.

ment reliée à leur taille apparente, et peut être exploitée pour détecter leur interaction avec la cible. Dans le cas de TINS, l'identification de ligand est basée sur l'augmentation de la vitesse de relaxation transversale au moment de la complexation, qui se traduit par un élargissement des pics RMN 1D ^1H et une diminution du signal (séquence Carr-Purcell-Meiboom-Gill). La

différence des spectres 1D ^1H enregistrés sur le RCPG d'intérêt et la protéine contrôle révèle les signaux des ligands (Figure **3.8**).

La méthode TINS a été appliquée avec succès pour le criblage de fragments sur les récepteurs β_1 adrénergique (Congreve et al., 2011) et A_{2A} de l'adénosine (Chen et al., 2012) (Table **3.1**). Dans ces deux études, certains ligands ont pu être identifiés comme modulateurs allostériques, une caractérisation qui s'est faite soit par le biais d'expériences de compétition TINS pour le récepteur β_1 , soit par déplacement d'un ligand radioactif au cours de tests de liaison traditionnels pour le récepteur A_{2A} .

L'application du criblage de fragments aux RCPGs reste un véritable challenge lié, notamment, aux difficultés de production et de stabilisation de ces récepteurs particuliers. Cependant, comme pour les protéines solubles, le FBDD devrait avoir un impact très positif sur la génération de nouveaux ligands de RCPGs (Visegrady & Keseru 2013; Johnson et al., 2017; Johnson et al., 2018, Mortenson et al., 2019), qui représenteront non seulement des nouvelles opportunités pour le développement de thérapies mais aussi de formidables sondes chimiques indispensables à la compréhension détaillée des fonctions et mécanismes d'activation, en particulier biaisés et allostériques.

3.4 Des fragments aux médicaments

Les fragments identifiés comme touches lors des criblages ne sont que des points de départ dans la conception de molécules bioactives. Leur affinité et leur efficacité doivent être améliorées au cours du processus d'optimisation, qui peut être accompli en employant différentes stratégies (Kumar et al., 2012; Lamoree & Hubbard, 2017). La première, appelée *fragment growing*, consiste à ajouter progressivement des fonctions chimiques au fragment de base afin de multiplier les interactions favorables au sein de la poche d'interaction de la cible. La seconde, appelée *fragment linking*, consiste à relier deux fragments interagissant dans des sites de liaisons adjacents (Ichihara et al., 2011). En théorie, cette approche est la plus attractive car elle possède un réel potentiel synergique qui doit permettre d'obtenir, avec peu d'efforts, une molécule d'affinité et d'efficacité décuplées. La troisième approche, appelée *fragment merging*, consiste à fusionner les

parties de deux fragments dont les sites d'interactions sur la cible se chevauchent. Elle est beaucoup moins employée que les deux précédentes. Quelque soit la stratégie choisie, la disponibilité de données structurales complètes, renseignant sur la localisation et le mode de liaison de la tête de série sur sa cible au cours des étapes d'optimisation, est plus qu'un atout pour l'élaboration de candidats médicaments puissants (Hadjuk & Greer, 2007 ; Murray & Blundell, 2010).

Depuis la première illustration de l'utilisation du FBDD pour la conception de ligands, il y a plus de deux décennies (Shuker & Hadjuk, 1996), celui-ci connaît un succès indéniable (Erlanson et al., 2016), et aujourd'hui ce sont plus d'une trentaine de composés actuellement en essais cliniques et deux médicaments acceptés (Lamoree & Hubbard, 2017) (Figure 3.9). Le premier de ces médicaments accepté par la FDA en 2011, est le vemurafenib⁵. Dirigé contre une forme mutée de la protéine BRAF, il permet de traiter les mélanomes de stade avancé. Le fragment touche de départ a été découvert à la suite d'essais biologiques et a été optimisé par l'approche *growing* (Tsai 2008, Bollag 2012). Le deuxième médicament est le venetoclax⁶, accepté par la FDA en 2016. Il est dirigé contre la protéine BCL-2 et permet de traiter les leucémies lymphoïdes. Dans ce cas, deux fragments touches ont été découverts par RMN et ont été liés entre-eux par l'approche *linking* (Petros et al., 2006 ; Souers et al., 2013 ; Roberts et al., 2016). Comme l'illustre la figure 3.9, dans certains cas les fragments initiaux sont entièrement conservés dans la structure de la molécule bioactive finale, mais il arrive également que ceux-ci ne servent qu'à initier la conception du médicament et ne soit plus distinguables.

5. Commercialisé par Roche sous le nom de ZelborafTM

6. Commercialisé par Abbvie sous le nom de VenclyxtoTM

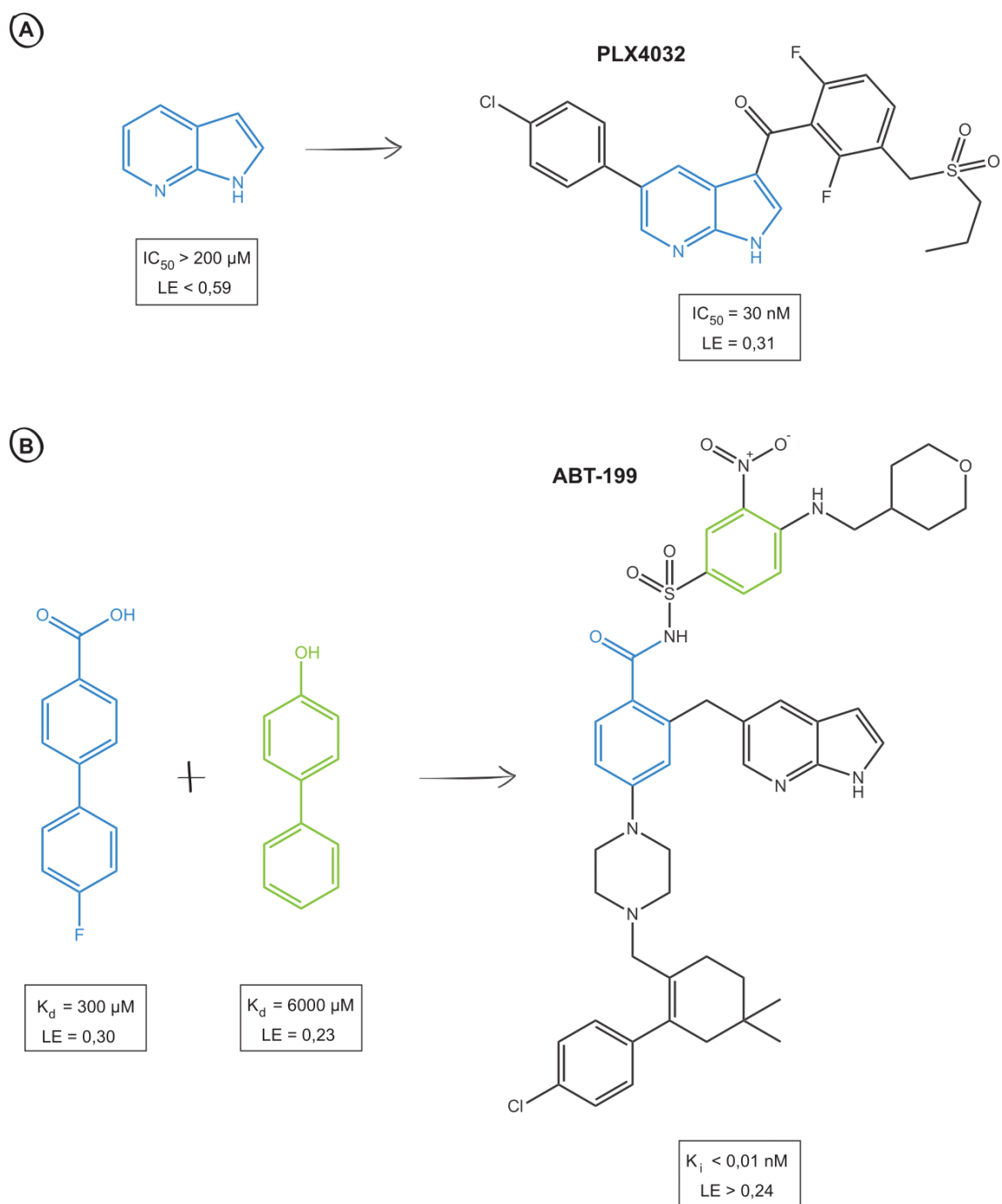


FIGURE 3.9 – Des fragments aux médicaments vemurafenib et venetoclax. Structures des médicaments vemurafenib (PLX4032) (A) et venetoclax (ABT-199) (B), obtenus à partir des fragments rapportés. Paramètres : efficacité de liaison (LE), concentration inhibitrice médiane (IC_{50}), constante de dissociation (K_d), constante d'inhibition (K_i), tirés de (Lamoree & Hubbard, 2017).

Chapitre 4

Description du projet de thèse

4.1 Le récepteur A_{2A} de l'adénosine comme modèle

Le nucléoside purique adénosine est un métabolite ubiquitaire impliqué dans les voies clés du métabolisme énergétique cellulaire. L'adénosine est constitutivement présente dans les cellules à des concentrations qui sont de l'ordre du nanomolaire mais qui peuvent atteindre le micromolaire en condition de stress, une augmentation qui a pour objectif de prévenir les lésions tissulaires. L'adénosine est également un neuromodulateur, un des plus importants du corps humain, affectant directement l'activité neurale dans les systèmes nerveux central et périphérique. L'action physiologique de l'adénosine est médiée par les récepteurs purinergiques P1, appartenant à la superfamille des RCPGs. Quatre sous-types de récepteurs à l'adénosine (AR) ont été identifiés : A_1AR , $A_{2A}AR$, $A_{2B}AR$ et A_3AR (Fredholm et al., 2001). Ils se distinguent entre-eux par leur localisation, les voies de signalisation qu'ils déclenchent, leurs partenaires d'interaction, les processus de régulation qui les contrôlent et leurs fonctions (Sachdeva & Gupta, 2013). $A_{2A}AR$ est le RCPG d'intérêt de cette thèse. Intensivement étudié, le nombre de structures (Manglik et al., 2017) et le large répertoire de ligands connus et caractérisés disponibles, font d' $A_{2A}AR$ un excellent modèle pour l'optimisation des expériences de *drug discovery* par RMN. $A_{2A}AR$ n'en reste pas moins pertinent du point de vue pharmaceutique en raison de l'énorme potentiel qu'il reste à exploiter et les possibilités de valorisation des résultats obtenus sont non-nulles.

4.1.1 Localisation et rôles physiopathologiques

Les récepteurs A_{2A} de l'adénosine sont présents dans de très nombreux tissus de mammifères, mais ils sont particulièrement abondants dans la rate, le thymus, les cellules du système immunitaire¹, les plaquettes sanguines et le système nerveux central, plus précisément le striatum². Ils sont également exprimés, à un moindre degré, dans les poumons, l'endothélium vasculaire, le cœur et les autres régions du cerveau (Fredholm et al., 2002).

A_{2A} AR se couple à la protéine G_s , au niveau des tissus périphériques (Fredholm et al., 2000), ou à la protéine G_{olf} , au niveau du cerveau (Corvol et al., 2001), et régule les niveaux d'AMP cyclique (AMPc) en stimulant l'activité de l'adénylate cyclase (Fredholm 2011). La localisation d' A_{2A} AR, ses partenaires d'interaction et la machinerie cellulaire à disposition, sont directement impliqués dans la multiplicité des voies de signalisation liées au récepteur, et donc de ses différents rôles physiologiques et physiopathologiques (de Lera Ruiz et al., 2014). A_{2A} AR est directement impliqué dans certains troubles neurologiques, désordres psychiatriques, maladies inflammatoires, accidents ischémiques et en oncologie (Trincavelli et al., 2010; Eltzschig et al., 2012). La co-localisation d' A_{2A} AR avec d'autres RCPGs, auxquels il s'associe pour former des hétérodimères, complexifie et diversifie encore son mode d'action. Il joue notamment un rôle important dans la régulation des systèmes dopaminergique et glutamatergique, par l'intermédiaire de son interaction avec les récepteurs D_2 de la dopamine (D_2R) et métabotrope $mGlu_5$ du glutamate. Ainsi, il se retrouve indirectement impliqué dans des pathologies associées à leur dysfonctionnement, comme la schizophrénie, l'hyperactivité et la maladie de Parkinson.

4.1.2 Développements cliniques

C'est la découverte de l'effet inhibiteur d' A_{2A} AR sur la production de cytokines pro inflammatoires, qui en fait, pour la première fois, une cible d'intérêt pharmaceutique. L'activation d' A_{2A} AR module la réponse des neutrophiles, macrophages et lymphocytes T, responsables de l'inflammation et réduit ainsi les dégâts infligés aux tissus (Haskó et al., 2008; Morello et al., 2009). Le développement d'agonistes pourrait alors permettre de traiter des maladies allergiques et inflammatoires pulmonaires, comme l'asthme, la rhinite allergique et la bronchopneumopathie

1. Lymphocytes, monocytes, neutrophiles, éosinophiles et cellules NK "natural killer"

2. Noyau caudé, putamen, noyau accumbens et tubercules olfactifs

chronique obstructive. Cependant, les essais cliniques, conduits sur les candidats médicaments développés dans ces buts, restent infructueux à ce jour (Jazayeri et al., 2017). Les agonistes d'A_{2A}AR sont également répertoriés comme vasodilatateurs coronariens. Leur utilisation dans la conduite de tests de stimulation pharmacologique, permettant la réalisation de scintigraphies myocardiques, a été explorée. Un médicament, le Regadenoson, a finalement obtenu une autorisation de mise sur le marché, délivrée par la FDA en 2008.

C'est ensuite dans le traitement de maladies du système nerveux central que va se révéler le potentiel d'A_{2A}AR. En effet, A_{2A}AR et D₂R ont des effets moteurs opposés. L'activation de D₂R augmente les capacités motrices tandis que l'activation d'A_{2A}AR réduit cet effet en diminuant l'affinité de la dopamine pour son récepteur. Dans ce cas, c'est la recherche d'antagonistes qui pourrait permettre de développer des médicaments non-dopaminergiques, utilisables dans la lutte contre la maladie de Parkinson. Ce type de médicaments est de plus en plus convoité car il potentialise les effets des médicaments dopaminergiques déjà existants, ce qui permet de réduire les doses prescrites et donc de diminuer les effets secondaires indésirables liés à leur utilisation prolongée (Freitas & Fox, 2016). Parmi les candidats médicaments testés, seul l'istradefylline parvient à obtenir l'approbation de mise sur le marché au Japon et est prescrit comme traitement d'appoint, en combinaison avec un autre médicament dirigé contre D₂R, le lévodopa (L-DOPA) (Hauser, 2009). En revanche, il est refusé par la FDA en 2008, en raison de l'absence de résultats probants en terme d'efficacité thérapeutique. Pour les autres composés, le rôle émergent du système immunitaire dans le développement des cancers met en exergue de nouvelles applications curatives pour les antagonistes d'A_{2A}AR, pour lesquelles certains pourraient se révéler être intéressants (Jazayeri et al., 2017).

A_{2A}AR possède un extraordinaire potentiel thérapeutique. Comme en témoignent les nombreux composés développés, articles publiés et brevets déposés. Mais la mise sur le marché de médicaments sélectivement dirigés contre ce récepteur, est loin d'être à la hauteur du potentiel. Comme cela a été évoqué antérieurement, l'adénosine et ses récepteurs sont largement distribués chez les mammifères, et donc dans le corps humain. Ils sont à l'origine d'une signalisation très étendue, responsable d'une multitude de fonctions physiologiques et physiopathologiques. La complexité de cette signalisation est en partie responsable du challenge que constitue la recherche

de médicaments ciblant $A_{2A}AR$ car elle concourt à l'apparition d'effets secondaires invalidants, responsable de l'échec des candidats médicaments au cours des essais cliniques (Chen et al., 2013).

Une autre partie de la réponse pourrait se trouver dans la structure des composés testés. L'approche la plus utilisée pour la conception d'agonistes des ARs consiste à apporter des modifications au ligand naturel des quatre sous-types de récepteurs, c'est-à-dire l'adénosine. Ainsi, tous les composés développés conservent et partagent le même motif de base (adénosine, NECA, CGS21680) (Figure 4.1). Dans les cas des antagonistes, c'est le motif xanthique qui a intensément été utilisé comme point de départ. Il s'agit du motif de base de la caféine et de la théophylline, deux antagonistes non sélectifs des ARs. S'ils ne dérivent pas du ligand naturel et ne possèdent pas de partie osidique, ils sont, en revanche, constitués d'une structure mono-, bi- ou tricyclique, utilisée pour mimer la partie adénine de l'adénosine (caféine, théophylline, CSC) (Figure 4.1). Cependant, leur faible solubilité et leur instabilité ont encouragé l'utilisation de motifs non-xanthiques mais la présence de mono-, bi- ou tricycles subsiste (CGS15943, SCH58261, ZM) (Figure 4.1). Au total, une quinzaine de molécules constitue un répertoire de ligands dits historiques, et la recherche de médicaments ciblant $A_{2A}AR$ se résume essentiellement à les utiliser comme base et à les optimiser pour la conception de nouveaux agents thérapeutiques.

La méthode des fragments pourrait solutionner les problèmes d'effets secondaires, auxquels sont également étroitement liés les problèmes de sélectivité, en permettant l'exploration de nouvelles pistes et l'identification de nouveaux motifs chimiques. La recherche et le développement de ligands biaisés ou allostériques doivent également être ardemment envisagés.

Tous les développements pharmaceutiques réalisés pour $A_{2A}AR$, des têtes de série jusqu'aux candidats médicaments, pour différentes pathologies, par différents groupes pharmaceutiques, sont rigoureusement répertoriés dans plusieurs excellentes revues : Chen 2013, de Lera Ruiz 2014, Jazayeri 2016.

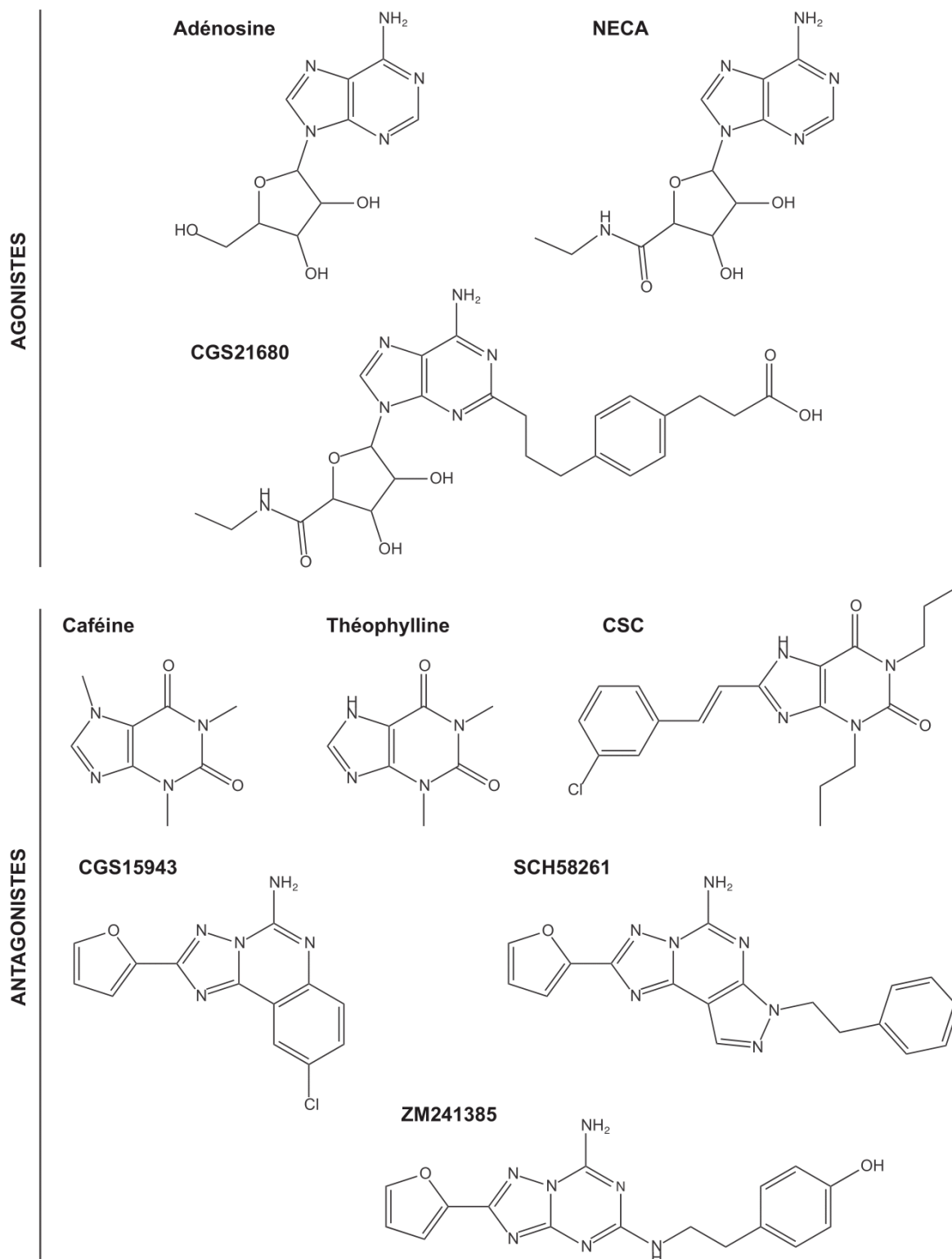


FIGURE 4.1 – Ligands connus du récepteur A2A de l'adénosine.

4.2 Mise au point et application du criblage de fragments par RMN

Comme cela a été rapporté en section 3.3.3, la technologie TINS est la seule méthode RMN ayant été employée pour faire du criblage de fragments sur des RCPGs solubilisés en micelles de détergent et immobilisés sur un support (Congreve et al., 2011 ; Chen et al., 2012). L'expérience STD, bien établie pour le criblage de fragments sur des cibles thérapeutiques solubles (Cala & Krimm, 2015), n'a été utilisée que dans quelques cas d'étude des interactions avec des petites molécules (Table 2.1). Cette technique possède pourtant de nombreux avantages par rapport au TINS : (i) elle ne nécessite pas d'étape d'accrochage qui peut potentiellement perturber la structure protéique et empêcher la liaison des composés testés, (ii) elle permet d'obtenir une information structurale cruciale en discriminant les protons exposés au solvant des protons enfouis d'une petite molécule complexée avec la protéine, et (iii) elle permet de travailler à des concentrations protéique de l'ordre du micromolaire, ce qui reste, à ce jour, faible pour la technique RMN, mais élevée en comparaison avec d'autres techniques comme la SPR et la WAC (*weak affinity chromatography*). L'expérience NOESY est une autre des méthodes RMN pouvant être utilisée pour réaliser un criblage. Bien que plus gourmande en quantité de protéine, cette expérience est également hautement informative et peut être utilisée pour valider l'interaction des touches dans le site d'intérêt et élucider leur mode de liaison, à condition de connaître un ligand de référence.

L'objectif de la thèse est de tester la faisabilité du criblage de fragments en employant différentes expériences RMN STD et NOESY, basées sur l'observation des signaux des petites molécules (voir section 2.1), en utilisant le récepteur A_{2A} de l'adénosine comme modèle. L'échantillon le plus simple pour la mise en place inédite d'un criblage par STD sur un RCPG correspond à un échantillon protéique purifié et préparé en micelles de détergent. La première étape consiste à valider la liaison, sur les spectres RMN, de ligands connus de type agoniste et antagoniste, confirmant dans le même temps que la préparation en micelles est compatible avec une flexibilité conformationnelle. Ensuite, une première preuve de concept est réalisée sur une centaine de fragments. L'objectif ultime étant l'identification de poches et ligands allostériques, le criblage d'une

librairie complète de fragment est réalisé en bloquant l'accès au site de liaison orthostérique avec l'antagoniste ANR-94 (K_d 46 nM) (Figure 4.2). Les micelles de détergent constituent un bon

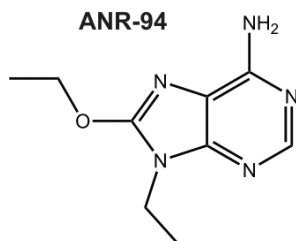


FIGURE 4.2 – Structure de l'antagoniste ANR-94.

premier système d'étude mais très éloigné de l'environnement natif des protéines membranaires. Des tests subséquents sont donc réalisés sur des préparations de membranes. Ce nouveau système d'étude permet de simplifier la préparation des échantillons. Les résultats de ces différentes expériences sont analysés, les avantages et les artefacts discutés, afin de proposer des pistes de développement futurs.

Au cours de cette thèse, un projet à également été mené sur l'utilisation de l'expérience WaterLOGSY afin de montrer que celle-ci pouvait être utilisée pour obtenir de l'information structurale, au même titre que le STD. Les résultats et analyses récoltés sur cinq protéines solubles modèles sont publiés (Raingeval et al., 2019).

Deuxième partie

Matériels et méthodes

Chapitre 5

Production et purification de protéine

Dans le cadre de ces travaux de thèse, A_{2A}AR a été produite en cellules d'insectes par Sébastien Igonet au sein de l'entreprise lyonnaise Calixar, et chez la levure par Renaud Wagner, Lucie Hartmann et Sarah M. Bouteben sur la plateforme académique strasbourgeoise IMPReSs. J'ai été formée sur l'expression et la purification d'A_{2A}AR dans ces deux hôtes, chez Calixar lors de mon stage de cycle master, et sur la plateforme IMPReSs au cours de ma thèse. Les protocoles élaborés par ces partenaires et détaillés dans la littérature sont succinctement rapportés ici (Hartmann et al., 2016 ; Igonet, Raingeval et al., 2018).

5.1 Préparation d'échantillons en cellules d'insectes *Spodoptera frugiperda*

Pour l'expression de la protéine humaine A_{2A}AR de type sauvage¹ en cellules d'insecte Sf9², le gène ADORA2A correspondant est cloné dans un plasmide de transfert pOET1. Le gène d'intérêt est associé, en position N-ter, à la séquence signal hémagglutinine, une étiquette streptavidine et une étiquette polyhistidine. La production de stocks de baculovirus recombinants est réalisée en suivant le protocole du fournisseur (système flashback ULTRATM, Oxford Expression Technologies).

1. Non mutée, non tronquée

2. Lignée de cellules ovariennes provenant du lépidoptère *Spodoptera frugiperda*

La culture de cellules Sf9 est réalisée à l'aide d'un bioréacteur ReadyToProcess Wave25 (GE Healthcare), en suivant les recommandations du fabricant. Les cellules Sf9 sont infectées, avec un stock de baculovirus recombinants à une densité de $1,5 \cdot 10^6$ cellules/ml et une multiplicité d'infection de 1^3 . La culture est poursuivie pendant 64 heures, à 28°C , sous agitation. Après ce délai, les cellules sont récoltées par centrifugation à 2000 g, pendant 10 minutes, à 4°C .

Les culots cellulaires obtenus sont resuspendus dans du tampon 50 mM Hepes pH 7.4 et 200 mM NaCl, complété par l'ajout d'un cocktail d'inhibiteurs de protéase 1X (SIGMAFAST™ EDTA-Free, Merk) noté PIC 1X. La lyse cellulaire mécanique est effectuée grâce à un système de broyage BeadBeater® (Biospec) et des billes de verres. Le lysat obtenu est centrifugé à 500 g, pendant 15 minutes, à 4°C , puis le surnageant est soumis à un cycle d'ultracentrifugation réalisé à 100 000 g, pendant 1 heure, à 4°C .

Les culots membranaires sont resuspendus dans du tampon 50 mM Hepes pH 7,4, 200 mM NaCl, PIC 1X, à une concentration finale de 5 mg/ml. Les membranes sont incubées avec un mélange de détergents composé de 0.155% de calixarène-R10 (10 fois la CMC) combiné avec 0.5% de DDM (57 fois la CMC) et 0.06% de CHS. La solubilisation est conduite sous agitation, pendant 2 heures, à 4°C . Après cela, les échantillons sont centrifugés à 100000 g, pendant 45 minutes, à 4°C . La fraction solubilisée est chargée sur une colonne d'affinité aux ions cobalt, puis la protéine A2AAR purifiée est concentrée et chargée sur une colonne Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare), associée à un système chromatographique AKTA Pure (GE Healthcare).

5.2 Préparation d'échantillons en levures *Pichia Pastoris*

Pour l'expression de la protéine humaine A_{2A}AR de type sauvage en levures *Pichia Pastoris*, le gène ADORA2A correspondant est cloné dans un vecteur d'expression pPIC9K, associé à une étiquette FLAG et une étiquette polyhistidine en position N-ter. Le vecteur est linéarisé en utilisant l'enzyme de restriction *PmeI* et utilisé pour transformer des levures de souche SMD1163 par électroporation, en utilisant les paramètres suivants : 1500 V, 25 μF et 400 Ω . La sélection des clones recombinants His⁺ est réalisée en milieu minimum, suivie de l'identification des clones ayant intégré des multicopies du gène d'intérêt sur des boîtes de milieu YPD en présence d'une gamme de concentration en antibiotique généticine.

3. Ratio d'agents infectieux/cellules

La préculture des levures recombinantes est réalisée dans du milieu BMMY et incubé sur la nuit, à 30°C, sous agitation. Les cellules sont ensuite reprises dans du tampon frais à une DO₆₀₀ de 1 (densité optique à 600 nm), et de nouveau incubées à 30°C, sous agitation. Quand la DO₆₀₀ atteint approximativement la valeur de 5, les cellules sont culottées par centrifugation (4000 g, pendant 5 minutes, à température ambiante), avant d'être resuspendues dans du tampon BMMY. La culture est poursuivie pendant 18 à 24 heures, à 30°C, sous agitation. Après ce délai, les cellules sont récoltées par centrifugation (4000 g, pendant 5 minutes, à 4°C).

Les culots cellulaires obtenus sont resuspendus dans du tampon TNGE. La lyse cellulaire mécanique est effectuée grâce à un système de broyage FastPrep 24 (MP Biomedicals) et des billes de verres. Le lysat obtenu est centrifugé à 4000 g, pendant 5 à 10 minutes, à 4°C, puis le supernageant est soumis à un cycle d'ultracentrifugation à 100 000 g, pendant 30 minutes, à 4°C. Les culots membranaires sont resuspendus dans du tampon TNG.

La composition des tampons sus-nommés est rapportée dans le tableau suivant :

YPD	1% d'extrait de levure (w/v), 2% de peptone(w/v), 2% de dextrose (w/v) et 2% agar (w/v)
YEP	10 g d'extrait de levure et 20 g de peptone dissous dans 700 ml d'eau distillée
BMMY	700 ml de tampon YEP, 100 mL de base levure-azote à 13,4% (w/v), 100 mL de méthanol 5% (v/v) et 100 mL de tampon phosphate à 1 mM à pH 6
TNGE	50 mM Tris pH 7,4, 0,5 M NaCl, 10% glycerol, complété extemporanément avec 1 mM d'antiprotéases PMSF et 1 mM d'EDTA
TNG	50 mM Tris pH 7,4, 0,5 M NaCl, 10% glycerol, complété extemporanément avec 1 mM d'antiprotéases PMSF

Chapitre 6

Les expériences de résonance magnétique nucléaire

6.1 Instrumentation

Les expériences RMN ont été réalisées avec un spectromètre 600 MHz Inova Agilent, équipé d'une cryosonde HCN 5 mm et d'un passeur d'échantillons (50 positions), sur un spectromètre 600 MHz Bruker Avance III, équipé d'une cryosonde TCI 5 mm et d'un passeur d'échantillons SampleJet réfrigéré à 6°C (480 positions), et d'un spectromètre 1 GHz Bruker Avance III, équipé d'une cryosonde TCI 5 mm. Le pilotage des appareils Bruker s'est fait avec le logiciel TopSpin, et celui de l'appareil Agilent s'est fait avec le logiciel VnmrJ. Les spectres présentés ont tous été transformés avec les logiciels TopSpin et MestReNova.

6.2 Echantillons

6.2.1 A_{2A}AR solubilisé en micelles de détergent

Investigation de la liaison de ligands connus et démonstration de la faisabilité d'un criblage de fragments

Les échantillons sont préparés avec 2 μM d'A_{2A}AR dans un tampon 50 mM Hepes à pH 7,5, 200 mM NaCl, 0,05% DDM/0,005% CHS et 10% D₂O (v/v). Les expériences de contrôle menées en l'absence de protéine sont enregistrées dans un tampon 50 mM Hepes à pH 7,5, 200

mM NaCl, 0,05% DDM/0,005% CHS, 0,02% CALX-R10/0,002% CHS et 10% D₂O (v/v). Les expériences sont réalisées avec des tubes 5 mm. Les ligands adénosine et caféine sont solubilisés en solution stock à 110 mM dans du DMSO-d₆ 100% et utilisés à une concentration finale de 600 μ M, dans un volume final de 550 μ L. Les compétiteurs ZM241385 et CGS21680 sont solubilisés en solution stock à 30 mM dans du DMSO-d₆ 100% et utilisés à une concentration finale de 360 μ M, dans un volume final de 550 μ L. Le criblage est réalisé en mélange de 5 ou 10 fragments. Tous les fragments sont solubilisés en solution stock à 110 mM dans du DMSO-d₆ 100% et utilisés à une concentration finale de 600 μ M, dans un volume final de 550 μ L. Le pourcentage de DMSO n'excède pas 6% dans les échantillons.

Criblage d'une librairie complète de fragments en présence d'un compétiteur orthostérique

Les échantillons sont préparés avec 1 μ M d'A_{2A}AR dans un tampon composé de 50 mM PBS à pH 7.5, 200 mM NaCl and 0,05% DDM/0,005% CHS et 10% D₂O (v/v). Les expériences RMN menées en l'absence de protéine ont été enregistrées avec le même tampon. Les expériences sont réalisées avec des tubes 3 mm. Le criblage est réalisé en mélange de dix fragments, et en présence du compétiteur ANR-94. Tous les fragments sont solubilisés en solution stock à 110 mM dans du DMSO-d₆ 100% et utilisés à une concentration finale de 600 μ M, dans un volume final de 180 μ L. Le pourcentage de DMSO n'excède pas 6% dans les échantillons. Le compétiteur est solubilisé en solution stock à 50 mM dans du DMSO-d₆ 100% et utilisés à une concentration finale de 600 μ M. Le pourcentage de DMSO n'excède pas 7% dans les échantillons.

6.2.2 A_{2A}AR enchâssé dans des préparations de membranes

La préparation d'échantillons de membranes pour l'investigation des interactions protéine-ligand par RMN est réalisée en suivant un protocole publié (Venkitakrishnan et al., 2012). Les membranes ont été préparées dans un tampon 50 mM Tris pH 7,4, 0,5 M NaCl, 10% glycerol, qui doit être échangé avec du tampon 50 mM PBS, 150 mM NaCl, 100% D₂O. Pour cela, les membranes sont centrifugées à 15 000g, pendant 30 minutes (4°C), puis resuspendues dans le tampon souhaité. Cette étape est répétée quatre fois. Les échantillons sont classiquement préparés avec 75 μ g de protéines totales dosées par les partenaires à l'aide d'un dosage réalisé en

utilisant la méthode BCA (acide bicinchonique). Les expériences sont réalisées avec des tubes 3 mm. Les ligands adénosine et caféine sont solubilisés en solution stock à 110 mM dans du DMSO-d6 100% et utilisés à une concentration finale de 1 mM, dans un volume final de 200 μ L. Les fragments testés en mélange de dix sont solubilisés en solution stock à 110 mM dans du DMSO-d6 100% et utilisés à une concentration finale de 1 mM, dans un volume final de 200 μ L. Le pourcentage de DMSO n'excède pas 9% dans les échantillons. Les fragments testés en mélange de vingt sont solubilisés en solution stock à 220 mM dans du DMSO-d6 100% et utilisés à une concentration finale de 1 mM, dans un volume final de 200 μ L. Le pourcentage de DMSO n'excède pas 9% dans les échantillons.

6.3 Expériences

6.3.1 L'expérience STD

Les expériences STD (Mayer & Meyer 1999) ont été réalisées sur A_{2A}AR en micelles de détergent et en préparations de membranes. Les spectres ont été enregistrés à 20°C. Le temps de saturation du STD est de 2 secondes, ce qui correspond à une durée classiquement utilisée dans la littérature, et également testée et utilisée sur différentes protéines au sein même de l'équipe. Le second paramètre à déterminer est la fréquence de saturation à utiliser au cours des expériences *on resonance*. Le défi est de trouver un compromis entre l'efficacité et la robustesse de l'expérience. Lorsque la fréquence de saturation se rapproche des résonances où se trouvent la grande majorité des déplacements chimiques de la protéine (entre 0,7 et 0,9 ppm), l'expérience STD est plus efficace et peut être enregistrée avec un nombre de scans moins important, ce qui diminue considérablement la durée totale de temps expérimental pour un criblage. En contrepartie, si les résonances de composés testés sont proches de la fréquence de saturation choisie, ces derniers peuvent être directement impactés, sans nécessiter la formation d'un complexe avec la protéine, ce qui aboutira à l'identification de ces composés comme ligands, même s'ils ne le sont pas. La fréquence de saturation doit donc être déterminée en fonction de la protéine d'intérêt et des molécules criblées. Dans le cas classique d'un criblage de fragments sur une cible soluble, la fréquence de saturation, s'échelonne entre 0,3 et 0 ppm. Dans le cas des protéines membranaires, il faut également tenir compte des déplacements chimiques des molécules utilisées

pour la solubilisation. Des tests STD réalisés sur des ligands connus d'A2A ont permis d'établir qu'une fréquence de saturation de -1 ppm fournissait des données robustes avec des différences significatives entre les STD mesurées avec et sans protéine.

6.3.2 L'expérience NOESY

Spectromètre Bruker 600 MHz

Les spectres 2D 1H-1H NOESY ont été enregistrés à 20° et 25°C. Les paramètres utilisés sont les suivants : 16 scans, 2048 points complexes dans la dimension F2 et 448 points complexes dans la dimension F1. Les temps de mélanges τ_m 300 et 600 ms ont été utilisés. Le délai d1 est fixé à 2 secondes.

Spectromètre Bruker 1 GHz

Les spectres 2D 1H-1H NOESY ont été enregistrés à 25°C. Les paramètres utilisés sont les suivants : 8 scans, 2048 points complexes dans la dimension F2 et 512 points complexes dans la dimension F1. Les temps de mélanges τ_m 300 et 600 ms ont été utilisés. Le délai d1 est fixé à 2 secondes.

Troisième partie

Résultats et discussion

Chapitre 7

Criblage de fragments sur A_{2A}AR solubilisé en micelles de détergent : preuve de concept et application

Ces travaux de thèse ont été réalisés sur une protéine A_{2A}AR native et pleine taille. Les résultats présentés dans ce chapitre ont été obtenus sur des récepteurs solubilisés en micelles de détergent, préparés au sein de la société Calixar. Celle-ci est propriétaire d'une technologie brevetée, basée sur la conception de surfactants calixaréniques (Matar-Merheb et al., 2011), une alternative native à l'emploi de méthodes de stabilisation invasives, qui change le dogme selon lequel les RCPGs sont des protéines instables qui ne peuvent pas être étudiées en solution, sans avoir été génétiquement modifiées. L'analyse de profils d'élution obtenus en chromatographie d'exclusion de taille (SEC), montre que ces préparations d'A_{2A}AR sont stables, à température ambiante, pendant au moins 7 jours (Igonet, Raingeval et al., 2018). La valeur de la température de fusion¹, déterminée lors de tests de thermostabilité, est d'environ 55°C. Cela représente une augmentation significative par rapport à la valeur obtenue pour une préparation classique d'A_{2A}AR (40°C) (Ashok 2015) et seulement une différence mineure avec la valeur obtenue pour une préparation mutée et tronquée d'A_{2A}AR StaR2² (-4°C) (Igonet, Raingeval et al., 2018). Enfin, la fonctionnalité d'A_{2A}AR a été testée au cours d'expériences de déplacement d'un ligand

1. Température à laquelle la moitié des récepteur est dénaturée

2. Construction thermostabilisée développée et commercialisée par la société Heptares

radioactif, qui ont démontré l'absence de contrainte conformationnelle, puisque que des agonistes et des antagonistes ont été capables de lier le récepteur (Igonet, Raingeval et al., 2018).

7.1 Investigation de la liaison de ligands connus

7.1.1 Liaison d'antagonistes

L'interaction entre l'antagoniste caféine et A_{2A}AR a été testée en utilisant l'expérience STD. La figure **7.1 A** rapporte les spectres 1D et STD de la caféine, enregistrés sur des échantillons contenant le récepteur d'intérêt. La présence, sur le spectre STD, du signal RMN du proton porté par le cycle imidazole confirme la liaison de la caféine sur A_{2A}AR.

Comme cela a été évoqué en section 2.1.2, les ligands testés sont également susceptibles d'interagir avec les composés utilisés pour la solubilisation des récepteurs. Afin de s'assurer de la spécificité de l'interaction observée entre A_{2A}AR et ses ligands, un spectre STD *contrôle* doit donc systématiquement être enregistré sur un échantillon ne contenant que des micelles de détergent vides. Dans ce cas, le tampon de référence est composé de N-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM) et cholestérol hémisuccinate, aux mêmes concentrations que celles utilisées pour solubiliser A_{2A}AR, ainsi que de détergent calixarénique. Si le détergent calixarénique n'intervient plus dans la composition du tampon de solubilisation d'A_{2A}AR après l'étape d'extraction, celui-ci pourrait ne pas être totalement éliminé lors des étapes de purification, et rester au contact du récepteur (résultats non montrés). La quantité de détergent calixarénique encore présent dans les échantillons d'A_{2A}AR ne pouvant pas être correctement estimée, une concentration relativement élevée est arbitrairement choisie afin d'assurer l'évaluation de sa capacité à engendrer des interactions non-spécifiques. L'amplification de l'effet d'interaction non-spécifiques entre le détergent calixarénique et les ligands d'A_{2A}AR ne nécessite pas de remise en question tant que le contrôle négatif reste négatif. Sur la figure **7.1 B**, le signal STD de la caféine, en l'absence d'A_{2A}AR, a considérablement diminué, voire disparu. La liaison non-spécifique de la caféine sur les micelles de détergent est donc négligeable, ce qui démontre la spécificité de l'interaction observée en présence d'A_{2A}AR.

Une autre façon de tester la spécificité d'une interaction est de réaliser une expérience de compétition, en utilisant un ligand de référence ayant une haute affinité pour la protéine d'intérêt.

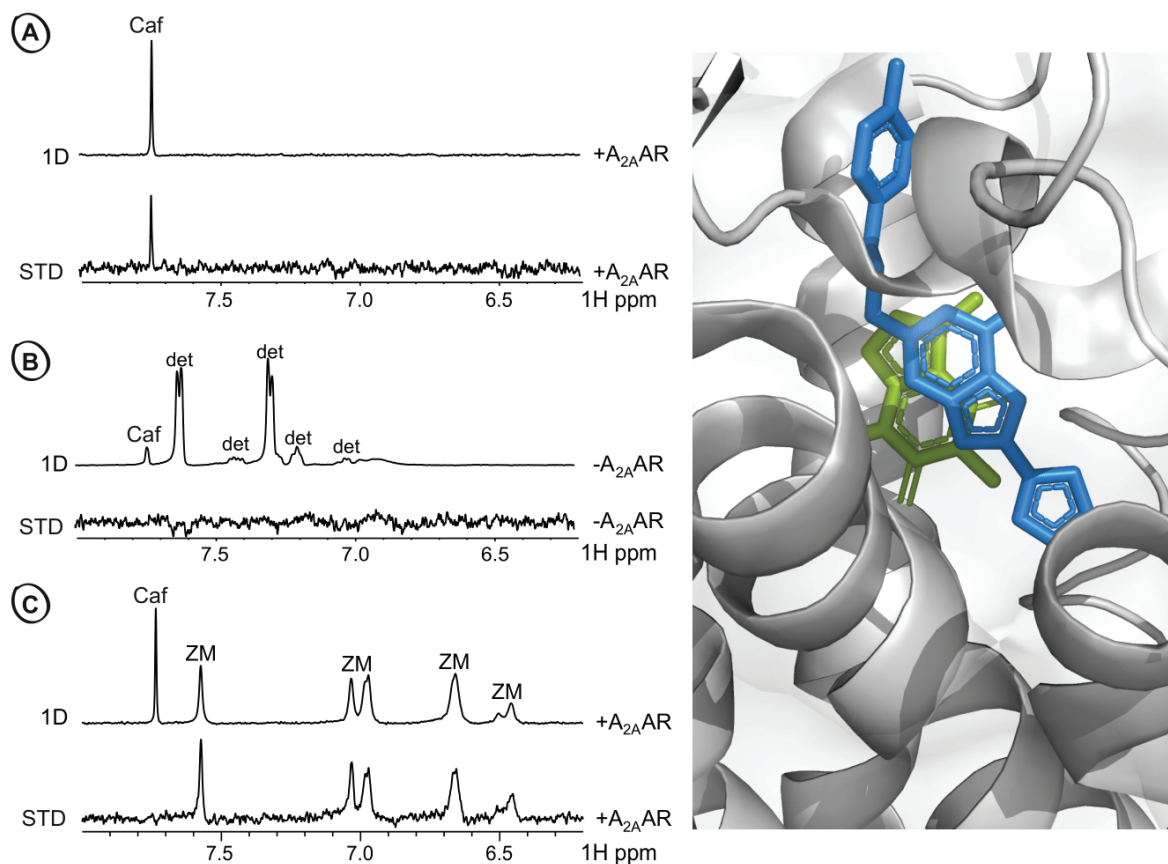


FIGURE 7.1 – Validation de la liaison d’antagonistes sur A_{2A}AR en micelles par STD. (A) Spectres 1D et STD de l’antagoniste caféine (Caf) lié au récepteur A_{2A} de l’adénosine (+A_{2A}AR). (B) Spectres 1D et STD de l’antagoniste caféine en l’absence du récepteur (-A_{2A}AR). Ces expériences ont été réalisées en présence de fortes concentrations de détergent calixarénique (det). (C) Spectres 1D et STD des antagonistes caféine et ZM241385 (ZM) en compétition pour le récepteur (+A_{2A}AR). Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 600 MHz. Les structures de la caféine (vert) et ZM241385 (bleu), en complexe avec A_{2A}AR, ont été résolues par (Doré et al., 2011) et (Jaakola et al., 2008), respectivement.

Cette expérience a été réalisée en utilisant l’antagoniste ZM241385 comme compétiteur. Comme attendu, le signal STD de la caféine disparaît lors de l’ajout de ZM241385, ce qui valide encore la spécificité de la liaison observée entre la caféine et A_{2A}AR (Figure 7.1 C). Ce résultat peut également être interprété du point de vue structural, et utilisé pour affirmer que la localisation du site de liaison de la caféine coïncide avec celui de ZM241385, des données en accord avec les structures cristallographiques rapportées dans la littérature (Figure 7.1) (Dore et al., 2011 ; Jaakola et al., 2008 ; Liu et al., 2012).

7.1.2 Liaison d'agonistes

La flexibilité des RCPGs n'étant pas contrainte par la thermostabilisation dans des préparations natives, ceux-ci sont *a priori* capables d'interagir à la fois avec des ligands antagonistes et des ligands agonistes. Les figures 7.2 A et 7.2 B rapportent les spectres 1D et STD de

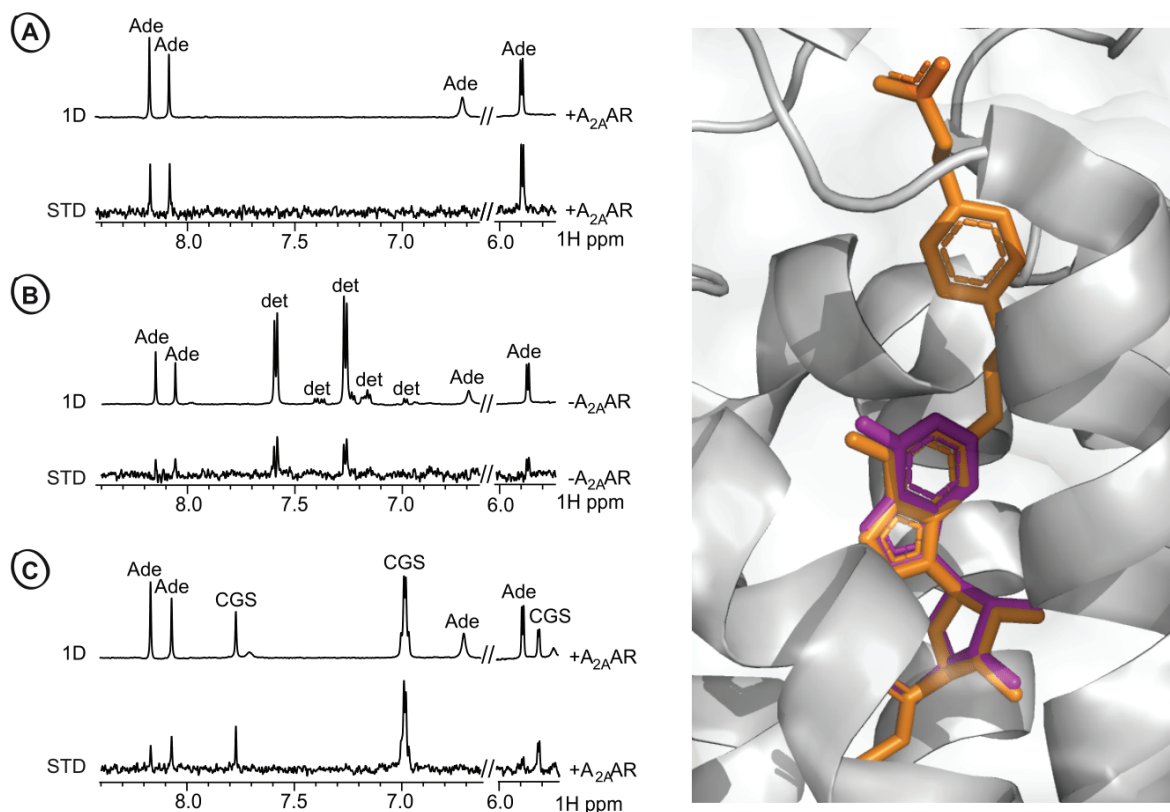


FIGURE 7.2 – Validation de la liaison d'agonistes sur A_{2A} AR en micelles par STD. (A) Spectres 1D et STD de l'agoniste adénosine (Ade) lié au récepteur A_{2A} de l'adénosine (+ A_{2A} AR). (B) Spectres 1D et STD de l'agoniste adénosine en l'absence du récepteur (- A_{2A} AR), et en présence de fortes concentrations de détergent calixarénique (det). (C) Spectres 1D et STD des agonistes adénosine et CGS21680 (CGS) en compétition pour le récepteur (+ A_{2A} AR). Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre Agilent 600 MHz. Les structures de l'adénosine (violet) et CGS21680 (orange), en complexe avec A_{2A} AR, ont été résolues par (Lebon et al., 2011) et (Lebon et al., 2015), respectivement.

l'adénosine, en présence ou en l'absence d' A_{2A} AR, respectivement. Comme dans le cas précédent, les signaux STD de l'adénosine sont significativement plus forts dans l'expérience réalisée en présence du récepteur, que dans l'expérience de référence. Ainsi, il y a bien une interaction spécifique entre l'agoniste adénosine et A_{2A} AR. Ces échantillons pourront être utilisés pour détecter simultanément la liaison de petites molécules antagonistes et agonistes, un résultat qui

confirme les données obtenues lors des tests de déplacements de ligand radioactif, rapportées au début du chapitre.

Une expérience de compétition a ensuite été réalisée, en utilisant l'agoniste CGS21680 (Figure 7.2 C). Les intensités des signaux STD de l'adénosine diminuent en sa présence, traduisant bien la compétition entre ces deux ligands, pour le même site de liaison, comme cela a été rapporté dans la littérature (Figure 7.2) (Lebon et al., 2011, 2015). Cependant, il est intéressant de noter que la diminution des signaux STD de l'adénosine n'est pas totale et que l'intensité des signaux résiduels est non-négligeable devant l'intensité des signaux résultant de l'interaction non-spécifique avec le détergent. Ainsi, l'adénosine continue d'interagir de façon spécifique avec A_{2A}AR, en présence de CGS21680.

7.1.3 Cartographie des épitopes STD

Un fait particulièrement remarquable dans l'expérience de compétition entre l'adénosine et CGS21680 est que la diminution des intensités STD n'est pas la même pour tous les pics ¹H. Le profil des intensités STD de l'adénosine, liée à A_{2A}AR, n'est pas le même en l'absence ou en présence du compétiteur (Figure 7.3). C'est particulièrement vrai pour le signal STD du proton porté par le carbone anomérique du ribose à 5,9 ppm, qui est considérablement plus faible lorsque CGS21680 se lie à A_{2A}AR. La diminution d'intensité traduit une diminution de la saturation reçue par ce proton lors de la complexation. La partie ribose de l'adénosine, enfouie dans A_{2A}AR lorsqu'elle se lie seule au récepteur, se retrouve exposée au solvant en présence de CGS21680 (Figure 7.4) (Lebon et al., 2011). Ces observations corroborent des données de dynamique moléculaire obtenues en étudiant le chemin emprunté par l'adénosine depuis la matrice jusqu'à son site de liaison au coeur du domaine transmembranaire (Sabbadin et al., 2014, 2015). Ces travaux mettent en exergue la présence d'un site de liaison transitoire, aussi appelé *site de liaison métastable* ou *site d'entrée du ligand* (Fronik et al., 2017) et répertorié comme site allostérique potentiel de l'adénosine sur A_{2A}AR (Congreve et al., 2017). La détermination du mode de liaison de l'adénosine dans ce site particulier, localisé au sommet du site de liaison orthostérique, est rapporté en figure 7.4. Celui-ci est en accord avec les données RMN, puisque le ribose est orienté vers l'entrée de la poche d'interaction, et donc exposé au solvant.

Ces résultats montrent que la force de l'expérience STD réside dans sa capacité à fournir des

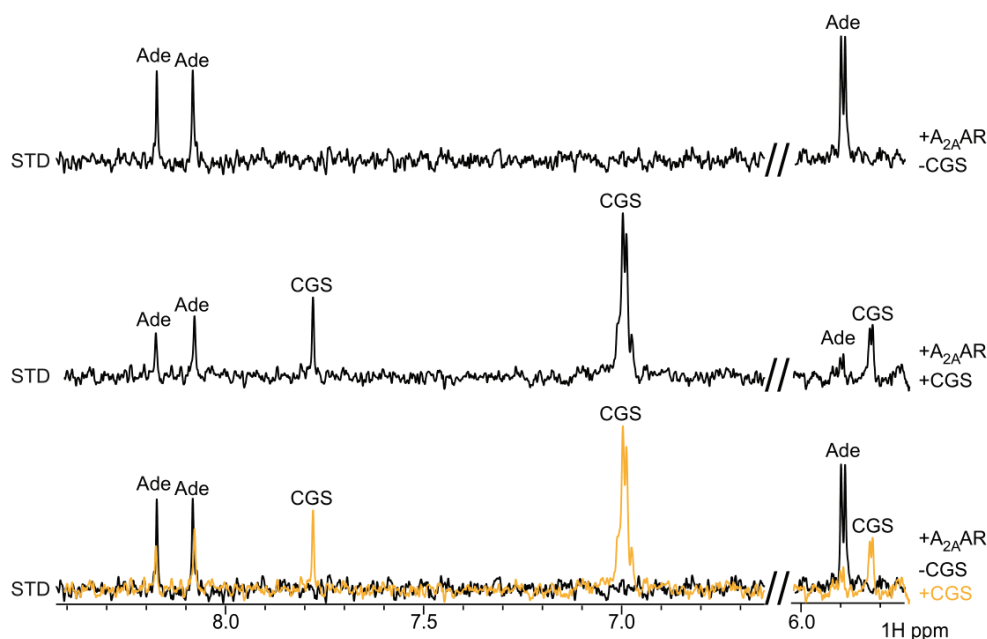


FIGURE 7.3 – **Cartographie des épitopes STD de l’adénosine sur A_{2A}AR.** Superposition des spectres STD de l’adénosine liée au récepteur A_{2A} de l’adénosine (+A_{2A}AR), en présence (orange) ou en l’absence (noir) de CGS21680 (CGS). Des variations d’intensités sont détectable, en particulier pour le proton porté par le carbone anomérique du ribose à 5,9 ppm. Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre Agilent 600 MHz.

informations structurales sur des ligands liés au récepteur, en présence ou absence d’autres composés ; des informations qui pourraient être très précieuses pour la découverte de modulateurs allostériques. C’est pour cela qu’il est surprenant de ne pas observer d’effet *epitope mapping* dans le cas de l’antagoniste ZM241385 (Figure 7.1 C), alors que d’après les structures cristallographiques du complexe qu’il forme avec A_{2A}AR (Jaakola 2008, Doré 2011, Liu 2012), son groupement phenol est exposé au solvant. Il est raisonnable de conjecturer que le signal STD observé provient, en proportion non-négligeable, de l’interaction non-spécifique de ZM241385 avec les micelles de détergent. Une hypothèse en accord, par ailleurs, avec la détection inattendue d’un signal STD pour ce ligand de très haute affinité (K_d 1,6 nM), et confirmée par des expériences STD et NOESY réalisées sur ZM241385 seul (Figure 7.5). Le groupe de Griesinger a fait la même observation en étudiant la liaison de ce ligand sur des nanodisques (Fredriksson et al., 2017). L’observation d’un effet *epitope mapping* requiert que le ligand ait un mode de liaison privilégié. Ainsi, il sera difficilement détectable si une grande proportion d’interaction non-spécifique s’additionne à l’interaction du ligand dans le site naturel.

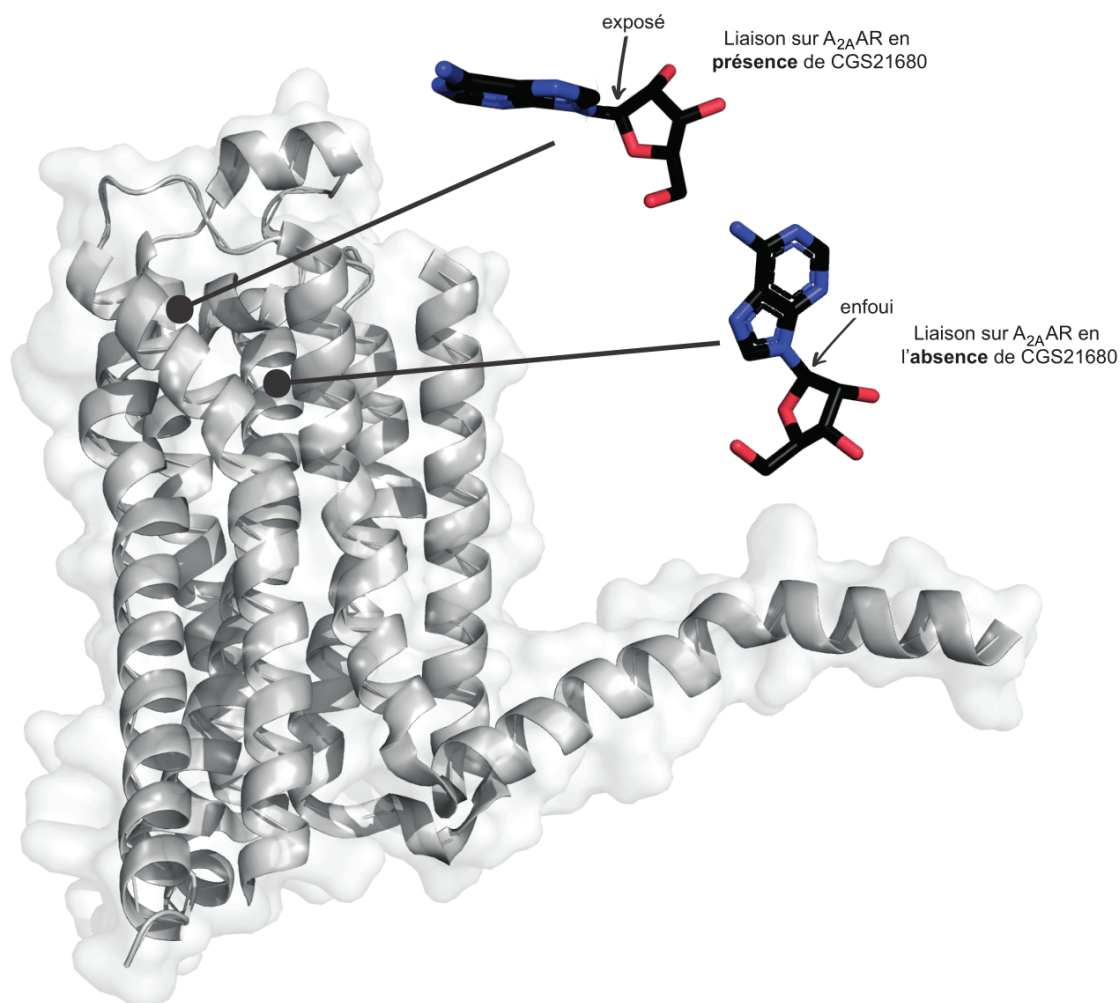


FIGURE 7.4 – Elucidation du mode de liaison de l'adénosine sur A_{2A} AR par STD, assistée par le dynamique moléculaire. L'expérience STD révèle une modification de l'exposition au solvant du ribose de l'adénosine liée au récepteur A_{2A} de l'adénosine (A_{2A} AR), en présence ou en l'absence de CGS21680. La position du proton porté par le carbone anomérique du ribose est indiqué avec une flèche. La structure rapportée de l'adénosine avec le proton du ribose enfoui correspond à la structure cristallographique de l'agoniste en complexe avec A_{2A} AR, résolue par (Lebon et al., 2011). La structure proposée pour l'adénosine avec le proton du ribose exposé est inspirée de l'étude de dynamique moléculaire réalisée par (Sabbadin et al., 2015).

7.2 A la recherche de nouveaux ligands

Les expériences réalisées avec les agonistes et antagonistes connus d' A_{2A} AR suggèrent qu'il est tout à fait envisageable de réaliser un criblage de fragments par RMN, en utilisant l'expérience STD, sur des préparations du récepteur d'intérêt en micelles de détergent.

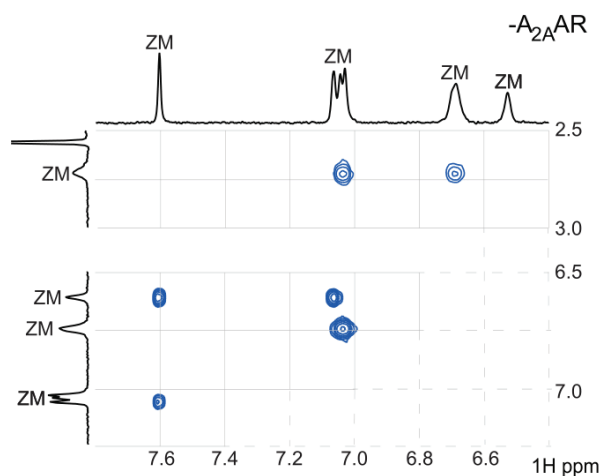


FIGURE 7.5 – Visualisation de l’interaction non-spécifique entre ZM241385 et les micelles de détergent par NOESY. Spectre NOESY de l’antagoniste ZM241385 (ZM) enregistrés en l’absence du récepteur A_{2A} de l’adénosine (-A_{2A}AR), sur des micelles de détergent vides. Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 600 MHz, avec un τ_m de 300 ms.

7.2.1 Preuve de concept

Le criblage d’une centaine de fragments a été initié contre A_{2A}AR, par STD. Les molécules ont été testées en mélange de cinq ou dix, comme cela est généralement accompli pour les protéines solubles. L’analyse des spectres a permis de catégoriser les fragments comme ligands forts, ligands faibles et non-ligands, en fonction de l’intensité des signaux STD observés. Pour cela, il est d’abord nécessaire d’évaluer la part d’interactions non-spécifiques entre les fragments et les micelles de détergent, à partir des spectres STD de référence enregistrés en l’absence de protéine (détails en section 7.2.2). Lorsque la liaison spécifique des fragments sur le récepteur est avérée et la proportion de non-spécifique maîtrisée, l’intensité des pics STD correspondant à un nombre équivalent de protons est comparée entre les molécules. L’intensité maximale obtenue pour un ¹H est mesurée (I_{\max}). Les intensités STD comprises entre I_{\max} et $\frac{I_{\max}}{3}$ correspondent à des ligands considérés comme forts, tandis que les molécules présentant des intensités STD inférieure à $\frac{I_{\max}}{3}$ correspondent à des ligands considérés comme faible. La figure 7.6 rapporte les spectres 1D et STD de trois des mélanges testés. Dans ces mélanges, les ligands forts sont F157, F433, F451, F462, F468 et F469, les ligands faibles sont F359, F364, F384 et F450, et les non-ligands sont F40, F43, F141, F244 et F393 (Figure 7.7).

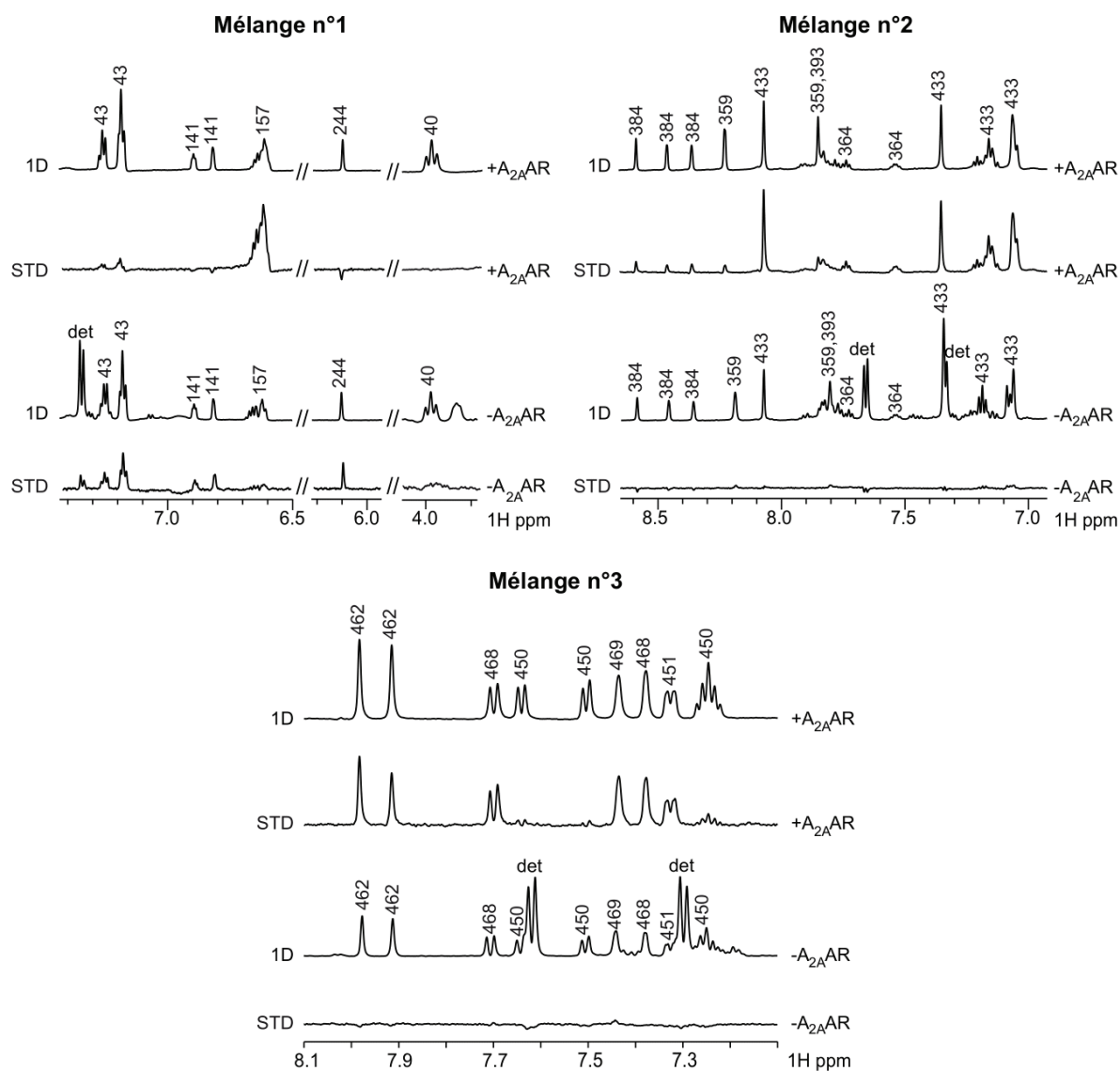
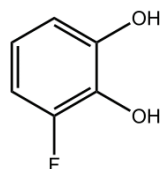


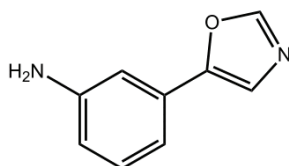
FIGURE 7.6 – Initiation du criblage de fragment sur A_{2A}AR par STD. Spectres 1D et STD de quinze fragments testés en mélanges de cinq (n°1, 2 et 3), en présence du récepteur A_{2A} de l'adénosine (+A_{2A}AR) ou en l'absence du récepteur (-A_{2A}AR) et en présence de fortes concentrations de détergent calixarénique (det). Les fragments pour lesquels un signal STD est observable, en présence de protéine, sont identifiés comme touches. L'absence de signal STD, en l'absence de protéine, montre que ces interactions sont spécifiques. Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 600 MHz.

Ligands STD forts

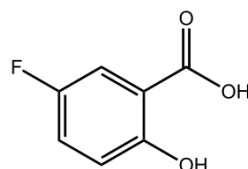
F157



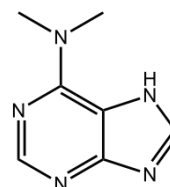
F433



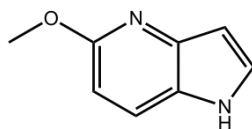
F451



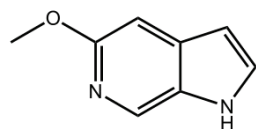
F462



F468

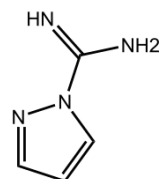


F469

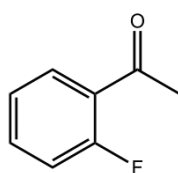


Ligands STD faibles

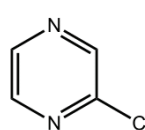
F359



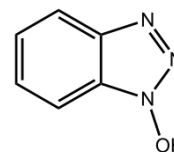
F364



F384

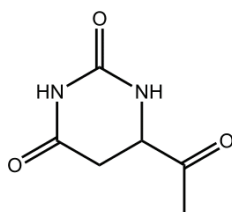


F450

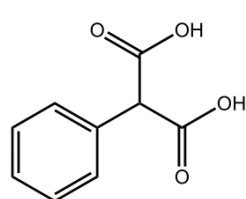


Non-ligands STD

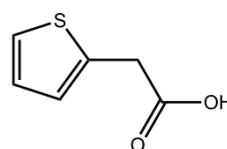
F40



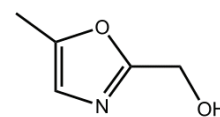
F43



F141



F244



F393

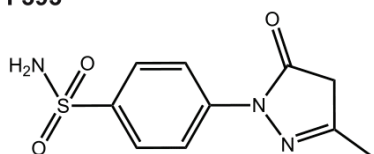


FIGURE 7.7 – Structures et catégorisation d'un échantillon de fragments criblés sur A_{2A}AR en micelles par STD.

L'activité des dix fragments touchés identifiés dans les mélanges n°1, 2 et 3, a été testée par Erika Cecon et Ralf Jockers de l'institut Cochin, sur la voie de synthèse de l'AMPc en utilisant une lignée de cellules HEK293³, exprimant A_{2A}AR de façon stable, selon un protocole décrit dans la littérature (Igonet, Raingeval et al., 2018). En premier lieu, les fragments ont été testés pour leur potentiel effet agoniste et donc leur capacité à induire la production d'AMPc (Figure 7.8 A). La stimulation de la lignée cellulaire, avec une gamme croissante de concentrations en fragments, n'a eu aucun effet sur la production du rapporteur. Ensuite, les fragments ont été testés pour leur effet antagoniste, c'est-à-dire leur capacité à inhiber la réponse induite par un agoniste (Figure 7.8 B). Les tests sont réalisés en pré-incubant la lignée cellulaire avec les fragments, suivi de l'addition de l'agoniste CGS21680. A 10 mM, les fragments F157, F433, F450, F451, F468 et F469 se comportent comme des antagonistes entiers. Un effet validé par la génération de courbes dose-réponse (Figure 7.8 C). En revanche, bien qu'ils aient été identifiés comme des ligands d'A_{2A}AR lors des premières expériences de criblage, les fragments F359, F364, F384 et F462 ne montrent aucune activité biologique. Le composé F462, pourtant catégorisé comme ligand STD fort, est demeuré inactif, même à des concentrations allant jusqu'à 30 mM (Igonet, Raingeval et al., 2018). Un résultat d'autant plus inattendu que sa structure est très similaire à celle de l'adénine composant l'adénosine. De nouveaux tests STD conduits avec le fragment seul, confirment les résultats obtenus en mélange (Figure 7.9 A), et des tests STD réalisés en présence l'agoniste CGS21680, démontrent que les deux composés lient le site orthostérique de manière compétitive (Figure 7.9 B).

L'interprétation combinée des données issues des expériences RMN et des tests d'activités biologiques n'est pas si basique. Il est entendu que la faible affinité des fragments requière l'emploi de méthodes d'analyses orthogonales, pour la validation des touches identifiées lors d'un criblage primaire (Mashalidis et al., 2013), et il n'est pas surprenant d'observer des points de divergences entre les résultats obtenus par les deux techniques. Cependant, la conduite de tests d'activité sur une seule voie de signalisation, en suivant la production d'un rapporteur induite par un seul agoniste de référence, ne permet pas de tirer de conclusion définitive. Comme cela a été rappelé en section 1.2.2, il est désormais largement admis que la classification de ligands, en fonction de leur propriétés pharmacologiques, est entièrement dépendante du système d'étude choisi (Azzi et

3. Lignées de cellules embryonnaires rénales humaines

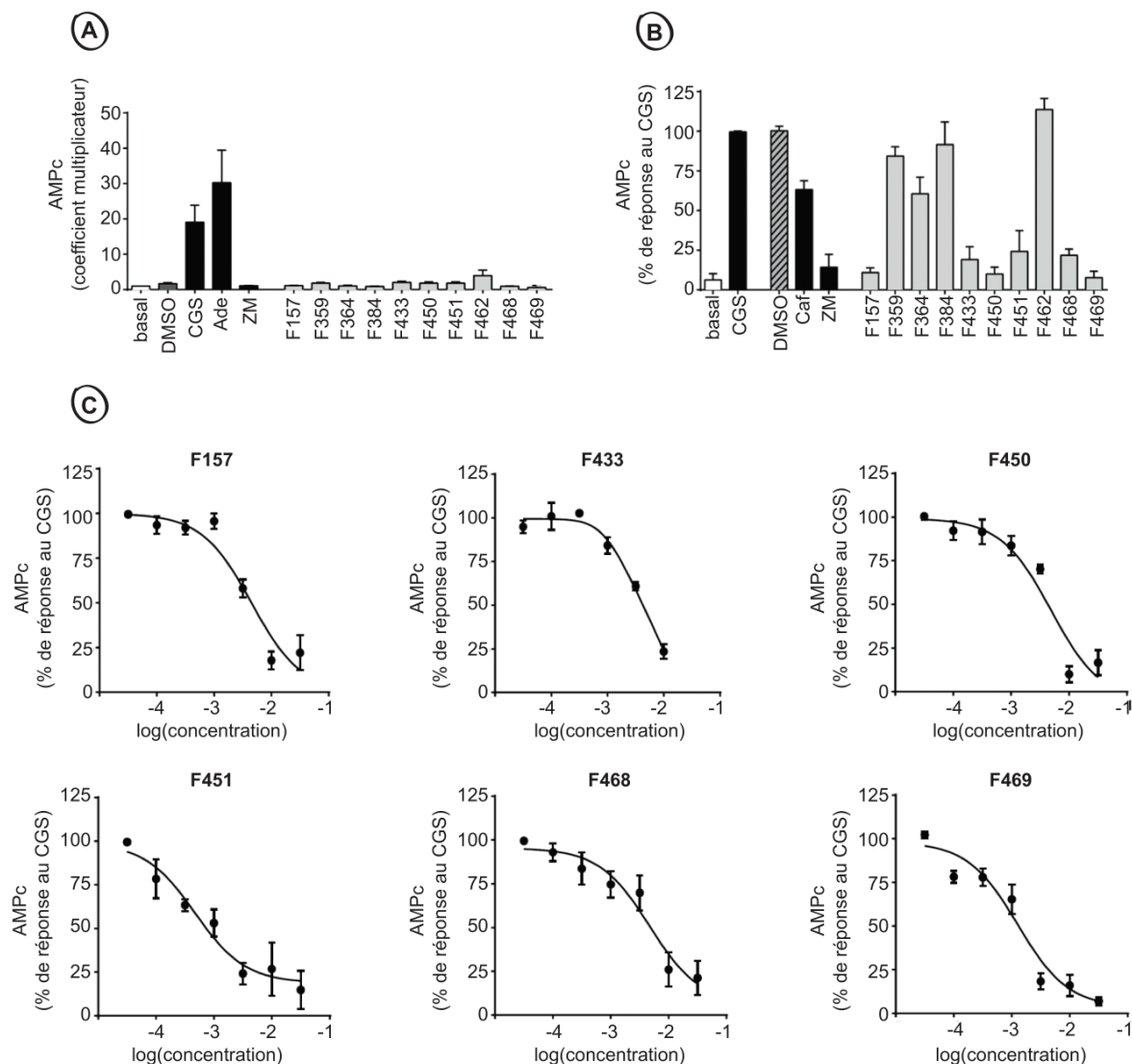


FIGURE 7.8 – Validation fonctionnelle des fragments touchés d'A_{2A}AR sur la voie de signalisation de l'AMPC. (A) Analyse de l'effet agoniste des fragments sur la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (10 mM, 30 minutes). La réponse agoniste est exprimée comme un coefficient multiplicateur de la réponse basale. (B) Analyse de l'effet antagoniste des fragments (10 mM, pré-incubation 15 minutes) sur la production d'AMPC par le CGS21680 (1 μM, 30 minutes). La réponse antagoniste est exprimée comme un pourcentage d'inhibition, avec la réponse induite par le CGS normalisée à 100%. (C) Courbes dose-réponse réalisées avec les fragments manifestant une activité antagoniste. La dose est exprimée comme le logarithme de la concentration en fragment testé (log(concentration)). Contrôles : DMSO seul à 1%, agoniste CGS21680 à 1 μM (CGS), agoniste adénosine à 1 μM (Ade), antagoniste caféine à 1 μM (Caf), antagoniste ZM241385 à 10 mM (ZM). Les données rapportées sont exprimées comme la moyenne de 3 à 6 expériences répétées indépendamment, ± l'erreur type.

al., 2003; Kenakin, 2007). Ainsi, il ne peut pas être exclu qu'en changeant de test fonctionnel le fragment F462 montre une activité agoniste ou antagoniste. Néanmoins, l'identification de

six nouveaux fragments d'A_{2A}AR ayant une activité antagoniste sur la voie de production de l'AMPc de ce récepteur, confirme la valeur d'une coopération entre la RMN et la biologie.

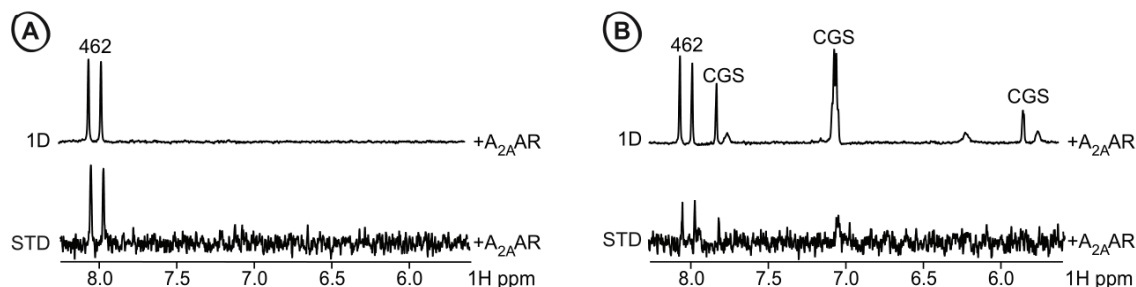


FIGURE 7.9 – Validation de l'interaction du fragment F462 dans le site orthostérique d'A_{2A}AR par STD. (A) Spectres 1D et STD du fragment F462 seul, en présence du récepteur A_{2A} de l'adénosine (+A_{2A}AR). (B) Expérience de compétition entre le fragment F462 et l'agoniste CGS21680 (CGS), en présence du récepteur. Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 600 MHz.

7.2.2 Criblage d'une librairie complète de fragments en présence d'ANR-94

Outre l'objectif de mettre en place une méthodologie de criblage de fragments sur des RCPGs, l'autre grand défi de ces travaux de thèse est la découverte de ligands allostériques. La stratégie, pour parvenir à ce résultat, est de réaliser le criblage sur un récepteur dont le site orthostérique est inaccessible aux fragments testés. Ainsi, il est vraisemblable que les touches identifiées interagissent dans un site distinct du site de liaison du ligand naturel. Pour se faire, le criblage est réalisé en présence d'un ligand orthostérique qui possède une forte affinité pour la protéine. Dans ce cas, le choix s'est porté sur l'antagoniste ANR-94 (Figure 4.2). Le choix du ligand n'est pas anodin. En fonction de sa nature, agoniste ou antagoniste, celui-ci va induire et stabiliser une conformation particulière du récepteur, active ou inactive, respectivement. Il y a donc un biais d'identification, comme pour les récepteurs thermostabilisés évoqués en section 1.3.2. La réalisation du criblage en présence d'un agoniste orthostérique pourrait mener à d'autres résultats.

Ce sont donc 640 fragments qui ont été criblés, en mélange de dix, sur A_{2A}AR, en présence du compétiteur orthostérique ANR-94. L'analyse préliminaire des résultats permet d'identifier 182 fragments ligands, soit un taux de touches de 28% (Figure 7.10). En raison du nombre élevé de composés à confirmer (182), et afin de réduire au maximum la consommation d'échantillons

de protéine, les étapes subséquentes de validation de l'interaction sont réalisées sur des couples de fragments, un protocole utilisé en routine dans l'équipe et qui a fait ses preuves sur des cibles solubles. L'antagoniste ANR-94 est également présent dans les échantillons à cette étape. Au cours de ce criblage secondaire, 16% des touches précédemment identifiées sont finalement rejetées (Figure 7.11). Ainsi, le taux de touche s'élève désormais à 21%.

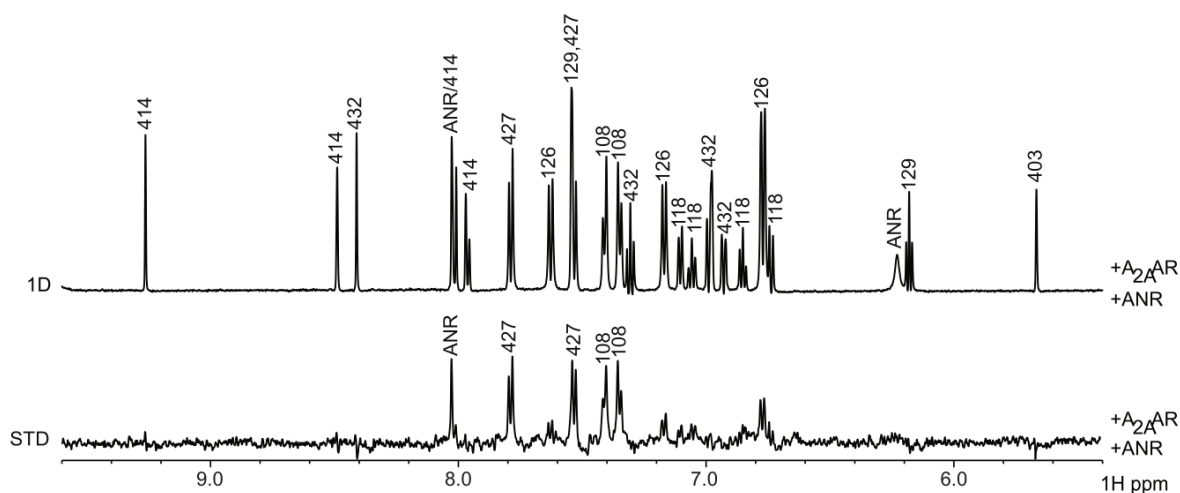


FIGURE 7.10 – Criblage d'une librairie de fragments sur A_{2A} AR en micelles de détergent par STD. Spectres 1D et STD de mélanges constitués de dix fragments, testés en présence du récepteur A_{2A} de l'adénosine (+ A_{2A} AR), et de l'antagoniste ANR-94 (+ANR). Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 600 MHz.

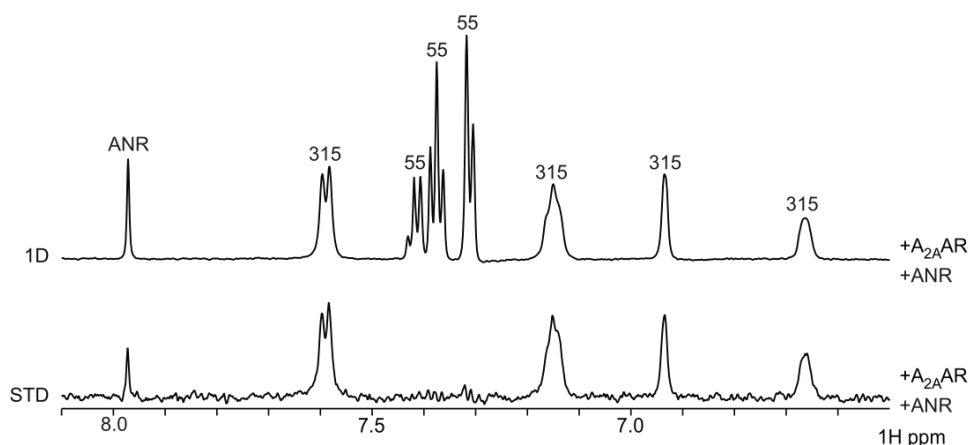


FIGURE 7.11 – Vérification des touches identifiées lors du criblage. Spectres 1D et STD des fragments F55 et F315 en présence du récepteur A_{2A} de l'adénosine (+ A_{2A} AR), et de l'antagoniste ANR-94 (+ANR). Dans cet exemple, F55 est rejeté tandis que F315 est validé. Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 600 MHz.

La dernière étape consiste à vérifier que l'interaction observée est bien une interaction spécifique entre les composés et A_{2A}AR. Pour cela, des spectres STD des 139 fragments restant sont enregistrés en présence et en l'absence du récepteur (Figure 7.12). La liaison des fragments seuls sur A_{2A}AR a été confirmée pour tous. En ce qui concerne l'interaction non-spécifique, plusieurs cas de figure sont rencontrés. Dans le premier cas, le plus simple, les pics du fragment d'intérêt n'apparaissent pas sur le spectre STD de référence, celui-ci ne se lie donc pas aux micelles de détergent (Figure 7.12 A). Dans le deuxième cas, les pics du fragment d'intérêt sont visibles sur le spectre STD de référence, traduisant une part d'interactions non-spécifiques qui doit être évaluée afin de déterminer si le fragment est réellement ligand (Figures 7.12 B et C). Pour que l'évènement d'interaction non-spécifique soit considéré comme négligeable devant la somme

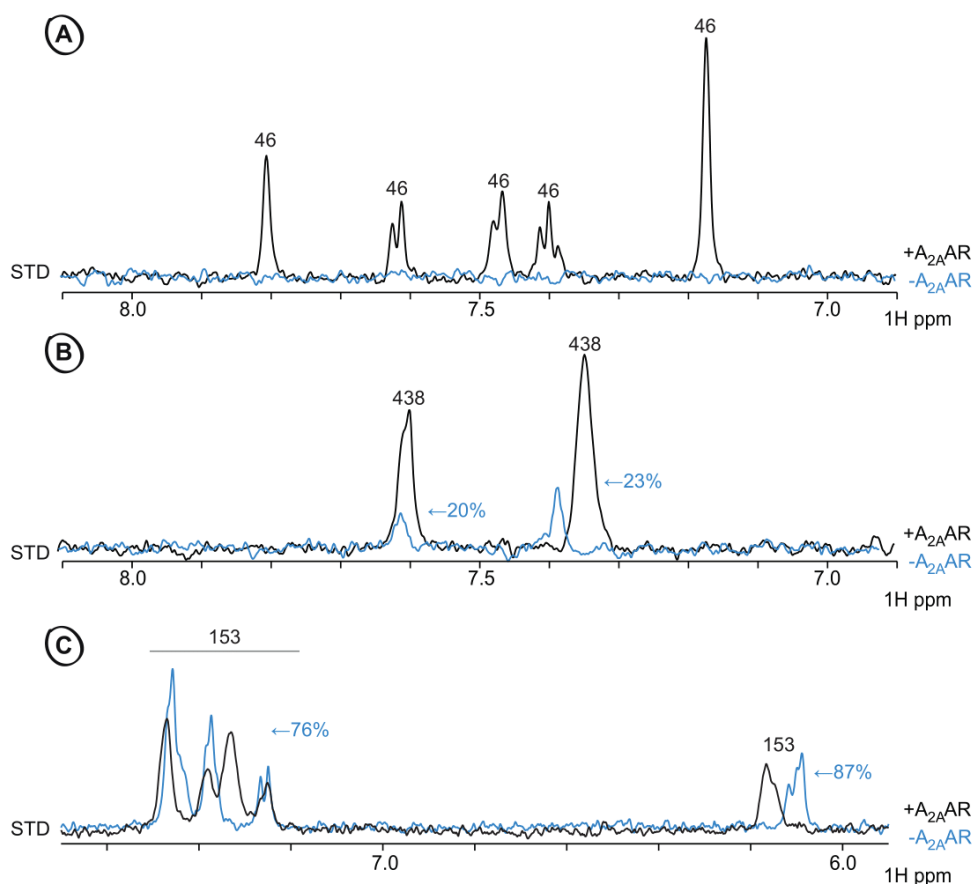


FIGURE 7.12 – Estimation de la part d'interaction non-spécifique des touches avec les micelles de détergent. Spectres STD des touches confirmées F46 (A), F438 (B) et F153 (C), enregistrés en présence (+, noir) ou en l'absence (-, bleu) du récepteur A_{2A} de l'adénosine (A_{2A}AR). Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 600 MHz. La proportion d'interaction non-spécifique comprise dans le signal STD du total des interactions a été calculée en intégrant les pics à l'aide du logiciel MestReNova et est indiquée en pourcentage.

des interactions, une différence de 30% a été considérée comme valeur seuil. Après cette ultime étape d'investigation, seuls cinq fragments sont rejetés, le taux de touches reste égal à 21%.

7.2.3 Evaluation de l'influence d'ANR-94 sur la liaison des fragments

Après les étapes de criblage et de validation des composés deux à deux, réalisées en présence de l'antagoniste ANR-94, les spectres STD des 139 touches sont enregistrés en absence du compétiteur orthostérique. Comme dans le cas de l'adénosine et du compétiteur CGS21680, l'idée à cette étape est d'évaluer l'impact d'ANR-94 sur la liaison des fragments. Dans 91% des cas, les spectres STD enregistrés en absence ou en présence d'ANR-94 sont très similaires, ce qui semble indiquer que la liaison de la grande majorité des fragments n'est étonnamment pas perturbée par la liaison d'un antagoniste de haute affinité (Figure 7.13 A). La similitude des spectre en l'absence et en présence de l'ANR peut s'interpréter de différentes manières. L'hypothèse la plus simple est que les touches identifiées interagissent bien dans un site de liaison distinct du site de liaison orthostérique et uniquement dans ce site, mais elle est hautement improbable. La seconde

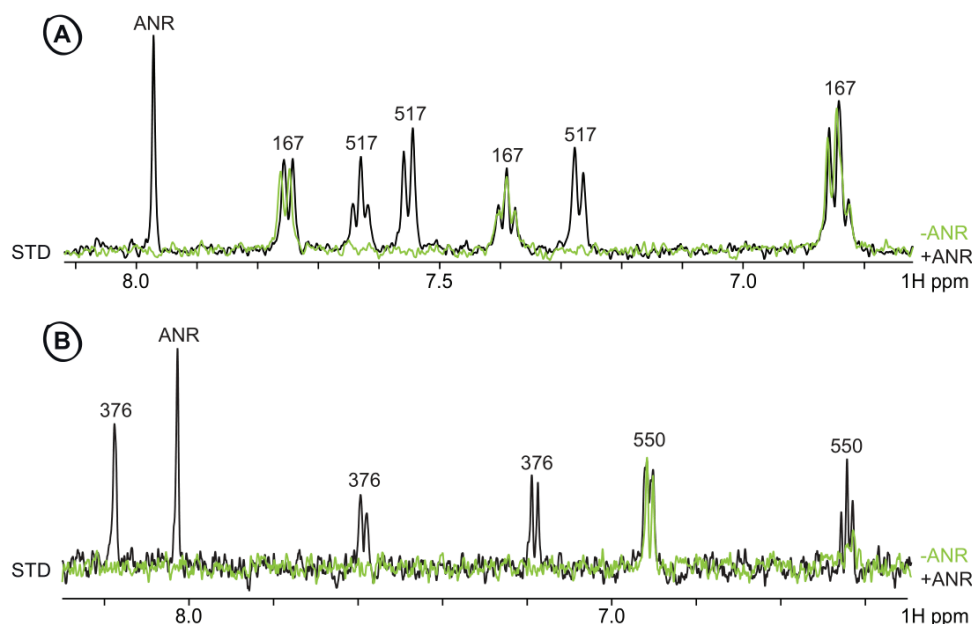


FIGURE 7.13 – Investigation de l'impact du compétiteur orthostérique ANR-94 sur la liaison des touches. (A) Superposition des spectres STD du fragment F167 lié au récepteur A_{2A} de l'adénosine, enregistrés au cours du criblage secondaire en présence de F517 et ANR-94 (+ANR) ou lors de l'étape de validation des touches seules (-ANR). (B) Superposition des spectres STD du fragment F550 lié au récepteur A_{2A} de l'adénosine, enregistrés au cours du criblage secondaire en présence de F376 et ANR-94 (+ANR) ou lors de l'étape de validation des touches seules (-ANR). Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 600 MHz.

hypothèse est que, comme pour l'adénosine, les fragments vont dans un site de liaison allostérique en présence de l'ANR-94, et dans le site allostérique et le site orthostérique en l'absence d'ANR-94. Dans le cas de l'adénosine, un changement important de l'effet *epitope mapping* mettait clairement en évidence un changement de site en présence d'un compétiteur (Figure 7.3). Dans le cas des fragments les interactions sont plus faibles et présentent parfois une multitude de modes de liaison ne permettant pas d'observer un *epitope mapping*. Il est donc plus difficile de démontrer un changement de site de liaison dans le cas des fragments.

Néanmoins, dans 9% des cas, des différences ont quand même pu être observées entre les spectres STD enregistrés en absence ou en présence d'ANR-94 (Figure 7.13 B). Ainsi, à l'issue de ce travail de criblage de fragments réalisé en présence d'un compétiteur orthostérique, douze fragments ont pu être identifiés comme touches allostériques d'A_{2A}AR (Figure 7.14). Un résultat qui démontre que l'expérience de RMN-STD est bien une méthode permettant d'identifier de tels ligands.

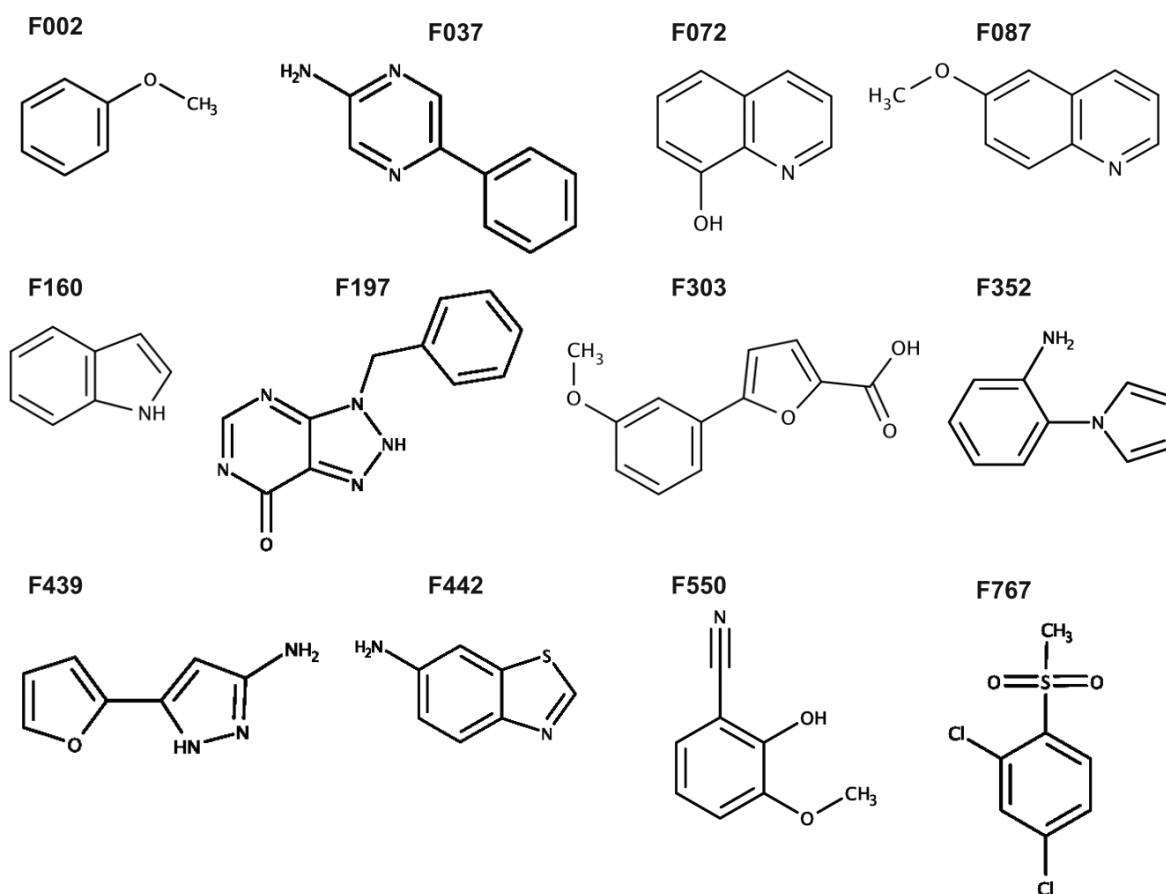


FIGURE 7.14 – Structures des fragments allostériques liants A_{2A}AR.

Chapitre 8

Vers le criblage de fragments sur $A_{2A}AR$ en préparations de membranes

Les membranes représentent un environnement plus natif que les micelles de détergents. Le protocole de préparation des ces échantillons est également plus simple puisqu'il est possible de s'affranchir des étapes de solubilisation et de purification, qui diminuent à la fois la stabilité et le rendement. Les résultats présentés dans ce chapitre sont des résultats préliminaires, obtenus sur des récepteurs enchâssés dans des préparations de membranes de levures, préparés sur la plateforme de production IMPReSs. L'objectif du dernier trimestre de thèse a été de proposer des pistes de réflexion sur la possibilité d'identifier des ligands de type fragments en utilisant un tel échantillon, au cours d'un criblage par RMN.

8.1 L'impossible STD

Comme cela a été rapporté en section 2.1.2, l'expérience STD peut être théoriquement appliquée à de nombreux systèmes, qu'ils soient micellaires, membranaires ou cellulaires. Les échantillons membranaires représentent le meilleur compromis entre nativité et complexité. Ils constituent des échantillons moins complexes que les cellules entières, permettant ainsi d'obtenir des spectres avec de meilleurs rapports signal sur bruit, mais également de contrôler la concentra-

tion en protéine et donc de se placer dans les meilleures conditions pour le STD (Assadi-Porter et al., 2008). Dans le cas particulier d'A_{2A}AR, aucune étude d'interaction sur des échantillons membranaires par STD/STDD n'a été rapportée dans la littérature (Table 2.1). Seuls des travaux utilisant la méthode INPHARMA ont été publiés, sur le récepteur solubilisé en nanodisques (Fredriksson et al., 2017). Les nanodisques constituent une reproduction artificielle des membranes cellulaires, qui permettent d'étudier une protéine purifiée dans un environnement proche du natif. Cependant, ils ne permettent plus de s'affranchir des étapes de solubilisation et purification, et au contraire, nécessitent d'ajouter des étapes de préparation en aval, qui peuvent entraîner davantage de pertes de matériel, expliquant que leur utilisation ne soit pas très répandue (Table 2.1). Les expériences 2D NOESY réalisées par le groupe de Griesinger ont permis de montrer, avec succès, que les composés ZM241358, PQA et XAC se lient dans le site orthostérique d'A_{2A}AR (Fredriksson 2017). Mais ce qui est particulièrement intéressant dans cette publication, c'est le report des tentatives infructueuses d'investigation des interactions par STD, mises à mal par une trop grande proportion d'interactions non-spécifiques. Ainsi, il apparaît clairement que l'examen des complexes RCPG-ligand par STD n'est pas triviale et que l'environnement de solubilisation, et vraisemblablement le type de récepteur et de ligands, font de chaque cas un cas spécifique, et qu'il est très difficile d'établir des méthodes routinières et universelles.

Au cours de ce travail de thèse, des expériences STD ont été menées sur des préparations de membranes surexprimant A_{2A}AR. Comme pour les échantillons micellaires, le premier objectif est la démonstration de faisabilité de ces expériences, conduites avec des ligands connus du récepteur. Comme pour Fredriksson *et al.*, les premiers résultats obtenus ne sont pas concluants. Le signal STD enregistré sur les membranes surexprimant la protéine est très similaire, voire identique, à celui obtenu sur les membranes de contrôle (Figure 8.1). Dans ces échantillons, la part d'interaction non-spécifique est très élevée et ne permet pas de détecter la liaison spécifique des ligands sur A_{2A}AR. Cette première tentative a été menée en suivant un protocole déjà établi et publié (Venkitakrishnan et al., 2012). La concentration des composés dans ces essais est élevée (1 mM) et pourrait accroître les événements d'interaction non-spécifique. Différents rapports de concentrations protéine-ligand¹ ont été testés mais les spectres STD enregistrés ont invariablement conservé le même profil que ceux obtenus en première intention.

1. La concentration en protéines totales a été testée de 20 à 450 μg , et la concentration en ligands a été testée à 100, 500 et 1000 μM .

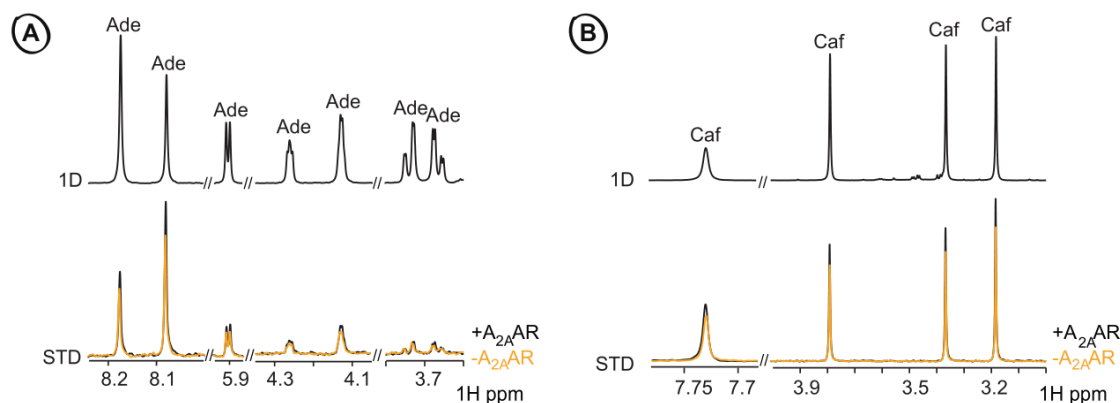


FIGURE 8.1 – **Investigation de la liaison d’un agoniste et d’un antagoniste connus sur $A_{2A}AR$ en membranes par STD.** Spectres 1D et STD enregistrés pour l’agoniste adénosine (Ade) (A), et l’antagoniste caféine (Caf) (B). Les spectres STD des composés, obtenus en l’absence (-, orange) ou en présence (+, noir) du récepteur A_{2A} de l’adénosine ($A_{2A}AR$), sont superposés. Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 600 MHz.

Les échantillons membranaires de levure utilisés présentent la particularité de n’être pas seulement composés d’une bicouche lipidique mais également d’une paroi rigide et épaisse, principalement constituée de polysides. Des membranes de protoplastes, correspondant aux levures débarrassées de leur paroi, ont alors été préparées sur la plateforme IMPReSs (Hartmann et al., 2017), avec l’espoir de diminuer les probabilités d’interactions non-spécifiques. Cependant, là encore, aucune amélioration notable n’a été observée. Si les levures n’expriment naturellement pas de RCPG comparable à $A_{2A}AR$, elles possèdent des RCPGs sensibles aux motifs osidiques, qui pourraient vraisemblablement être capables d’interagir avec l’adénosine, et ses dérivés. De plus, l’adénosine est le ligand de plusieurs protéines, incluant des transporteurs. La spécificité pour $A_{2A}AR$ n’est peut être pas totale et il pourrait être envisagé que cela suffise à grandement réduire les différences entre les réponses STD enregistrées sur les échantillons d’intérêt et de référence, et ce malgré la surexpression. La pertinence du contrôle utilisé au cours des tests doit également être questionnée. Les levures à partir desquelles sont préparées les membranes de références ne subissent pas les mêmes étapes que les levures destinées à la production d’ $A_{2A}AR$. Le stress de la surexpression déclenche une machinerie cellulaire particulière qui modifie le métabolisme des levures. Les levures de contrôle et les levures de surexpression ont vraisemblablement des protéomes différents. Il n’est pas assuré que l’une ou l’autre de ces pistes, ou leur effet combiné, soient effectivement responsable de l’échec des tests STD conduits.

8.2 Application de l'expérience NOESY

8.2.1 Investigation de la liaison de ligands connus

Devant l'impossibilité de mener une étude d'interaction, et donc un criblage de fragments, sur des préparations de membranes en utilisant l'expérience STD, la solution est de se tourner vers l'emploi des expériences de corrélation 2D NOESY, comme proposé par le groupe de Griesinger (Fredriksson et al., 2017). Des premières analyses sont conduites avec les antagonistes d'A_{2A}AR, caféine et ZM241358. Sur le spectre NOESY de référence, la présence de pics transversaux de même signe que les pics diagonaux traduit la liaison non-spécifique, attendue, des composés avec les membranes de contrôle (Figure 8.2 A). Néanmoins, la comparaison de ce spectre avec le spectre NOESY enregistré sur l'échantillon de membranes surexprimant A_{2A}AR met en exergue des différences notables et significatives (Figure 8.2 B). Les pics NOE intraligands sont plus intenses et plus nombreux, et des pics NOE interligands apparaissent. La concentration en protéines totales étant identique entre les deux échantillons, les différences quantitatives observées peuvent être attribuées à de l'interaction spécifique entre les antagonistes et A_{2A}AR.

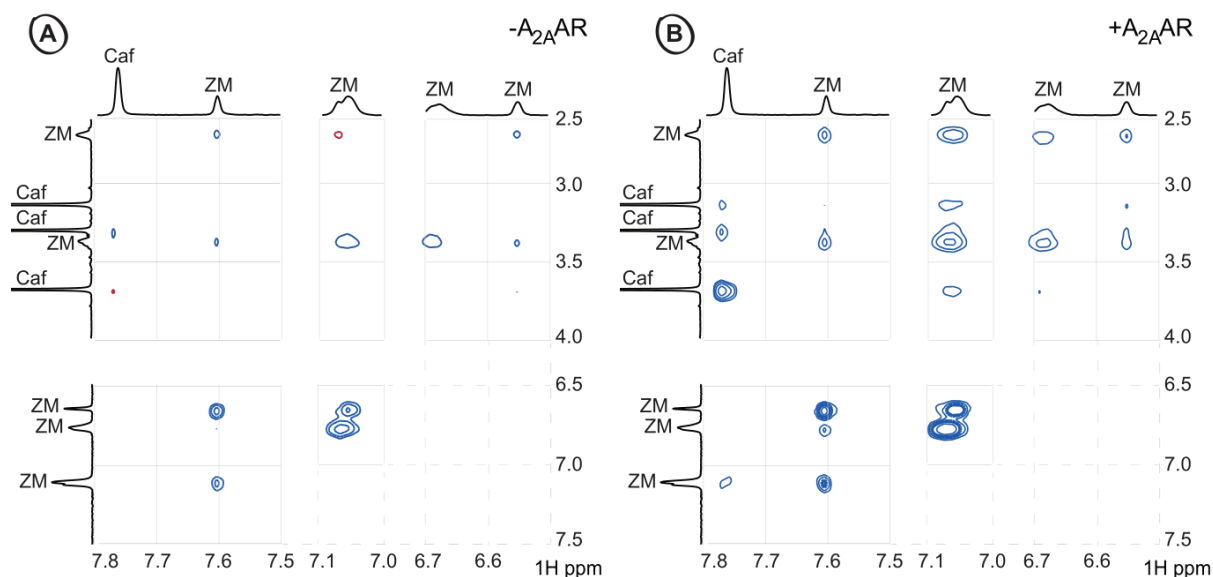


FIGURE 8.2 – Validation de la liaison d'antagonistes sur A_{2A}AR en membranes par NOESY. (A) Spectre de corrélation 2D NOESY des antagonistes caféine (Caf) et ZM241385 (ZM), sur des préparations de membranes ne surexprimant pas le récepteur A_{2A} de l'adénosine (-A_{2A}AR). (B) Spectre de corrélation 2D NOESY des antagonistes caféine et ZM241385, sur des préparations de membranes surexprimant le récepteur (+A_{2A}AR). Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 600 MHz, avec un τ_m de 300 ms.

8.2.2 Le criblage de fragments sur membranes au banc d'essai

L'objectif de ces travaux de thèse demeurant la démonstration de la faisabilité d'un criblage de fragments sur les RCPGs, de nouveaux tests sont réalisés dans ce but. Quatre fragments caractérisés lors de l'étude précédemment menée en micelles de détergents ont été sélectionnés pour constituer un premier mélange à tester. Les fragments choisis sont les ligands F462, F468, F469 et le non-ligand F141. Des spectres NOESY sont enregistrés en présence et en l'absence d'A_{2A}AR (Figure 8.3). Les critères de validation de la liaison des fragments sur le récepteur permettant la discrimination entre les ligands et les non-ligands d'un mélange de fragments par NOESY doivent être établis. Comme pour l'expérience STD, la stratégie peut être de comparer les spectres obtenus dans les deux conditions expérimentales et de ne retenir que les fragments pour lesquels des différences sont observables. L'intégration des pics NOE permet de comparer les intensités de chacun des pics de corrélation obtenus avec et sans protéine. Les différences observées pour les fragments F462, F468 et F469 permettent de confirmer l'interaction spécifique entre ces fragments et le récepteur. Ces différences sont relativement moins manifestes que dans le cas précédent mais cela est sans doute lié à la faible affinité intrinsèque de ces petites molécules. Dans le cas de F141, il n'y a pas ou très peu de différences à observer puisque le fragment ne montre qu'un jeu incomplet de pics NOE intraligands d'intensité très faible, et aucun pic NOE interligand, quelque soient les conditions expérimentales.

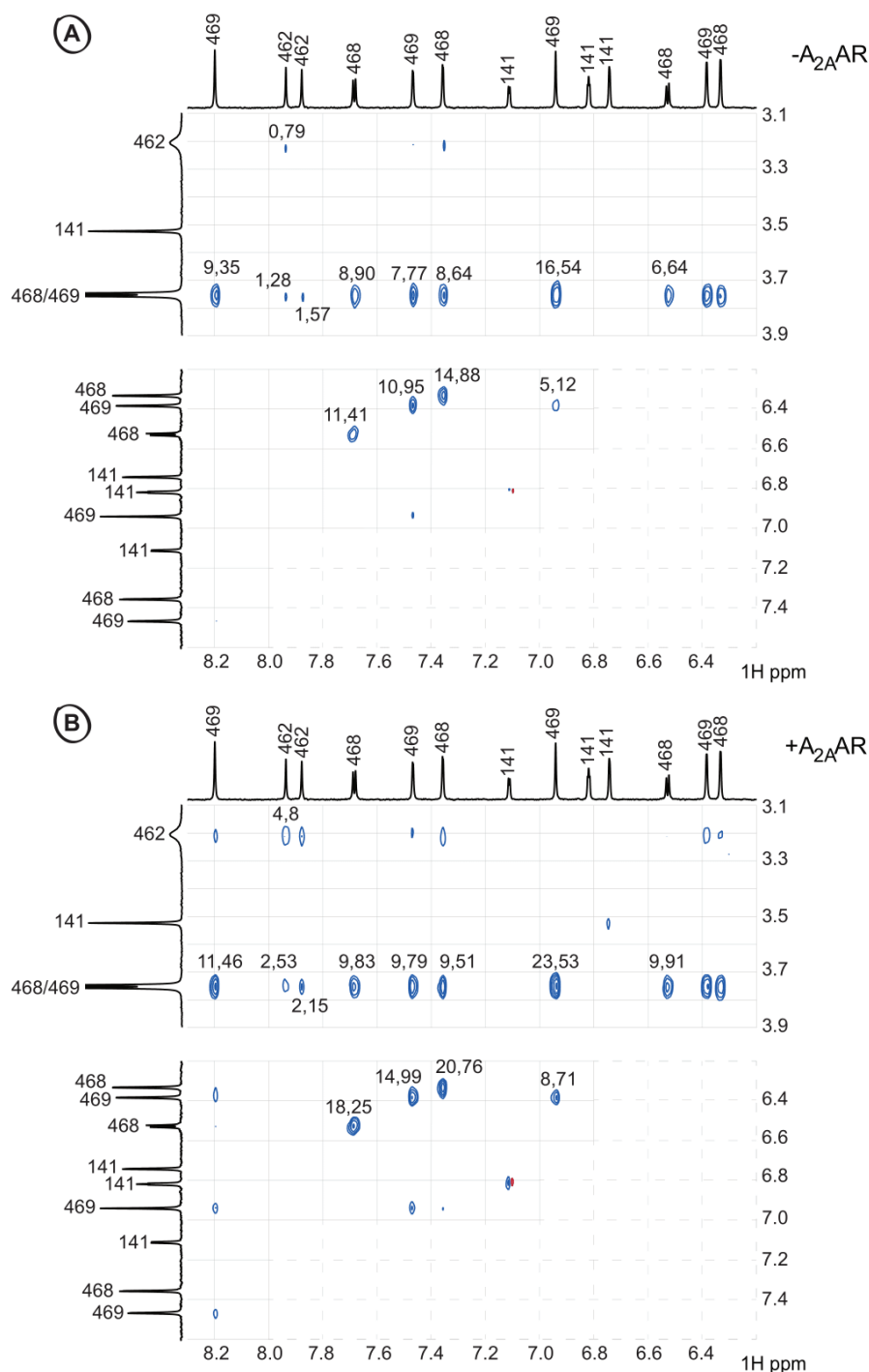


FIGURE 8.3 – Tests préliminaires d’investigation de l’interaction de fragments sur A_{2A}AR en membranes par NOESY. (A) Spectre de corrélation 2D NOESY des fragments F141, F462, F468 et F469, sur des préparations de membranes ne surexprimant pas le récepteur A_{2A} de l’adénosine (-A_{2A}AR). (B) Spectre de corrélation 2D NOESY des mêmes fragments sur des préparations de membranes surexprimant le récepteur (+A_{2A}AR). Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 1 GHz, avec un τ_m de 600 ms. Les valeurs absolues des intégrales rapportées sur le spectre ont été calculées à l’aide du logiciel MestReNova.

Un second mélange constitué de dix fragments est sélectionné pour être testé par NOESY sur A_{2A}AR en membranes. Ce mélange est un des mélanges criblés sur le récepteur en micelles de détergent, en présence de l'antagoniste orthostérique ANR-94 (Figure 8.4). Les fragments F410 et F429 font parti des touches sélectionnées au terme des étapes de criblage et de validation décrites en section 7.2.2. La comparaison des spectres NOESY du mélange, enregistrés en présence ou en l'absence de A_{2A}AR, montre des différences suggérant que les pics de corrélation NOE observés dérivent dans une proportion non-négligeable d'une interaction spécifique des fragments concernés avec le récepteur (Figure 8.5). L'analyse approfondie du spectre enregistré en présence de protéine montre que les fragments F400, F410 et F429 se démarquent par l'intensité de leurs pics NOE intraligands. Les fragments F398, F406, F424 et F428 ne sont pas retenus en raison de l'absence totale de pics de corrélation. Les fragments F405, F409 et F416 sont également rejetés en raison de la présence de pics intraligands zéro-quantum artéfactuels.

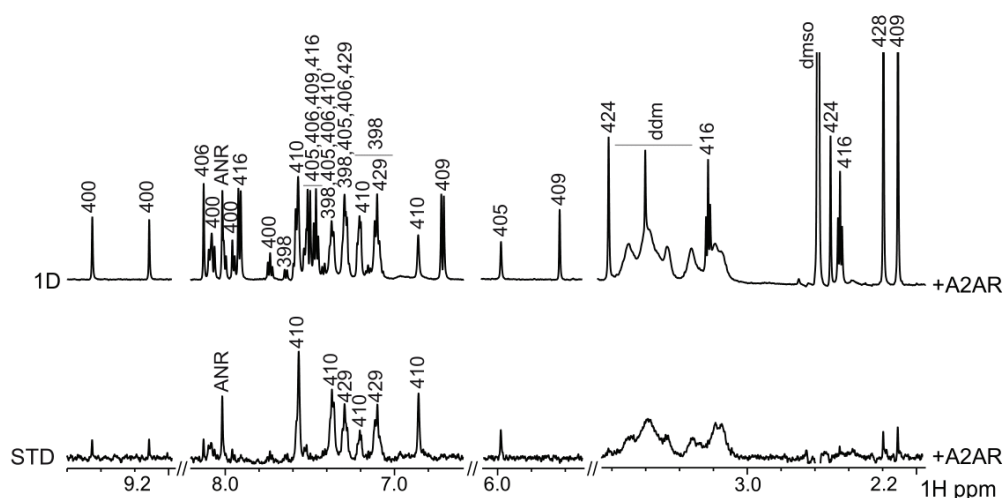


FIGURE 8.4 – Criblage d'un mélange de dix fragments sur A_{2A}AR en micelles de détergent par STD. Spectres 1D et STD des fragments F398, F400, F405, F406, F409, F410, F416, F424, F428 et F229, en présence du récepteur A_{2A} de l'adénosine (+A_{2A}AR), et de l'antagoniste ANR-94 (ANR) (+ANR94). Les pics du détergent N-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM) utilisé dans le tampon de solubilisation sont visibles sur le spectre. Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 600 MHz. Les fragments F410 et F409 ont été catégorisés comme ligands forts et retenus pour les étapes de validation qu'ils ont passé avec succès. Devant le grand nombre de touches identifiées lors du criblage, les fragments catégorisés comme faibles d'après la méthode d'analyse détaillée en section 7.2.1 sont temporairement rejetés. C'est le cas des fragments F400 et F405.

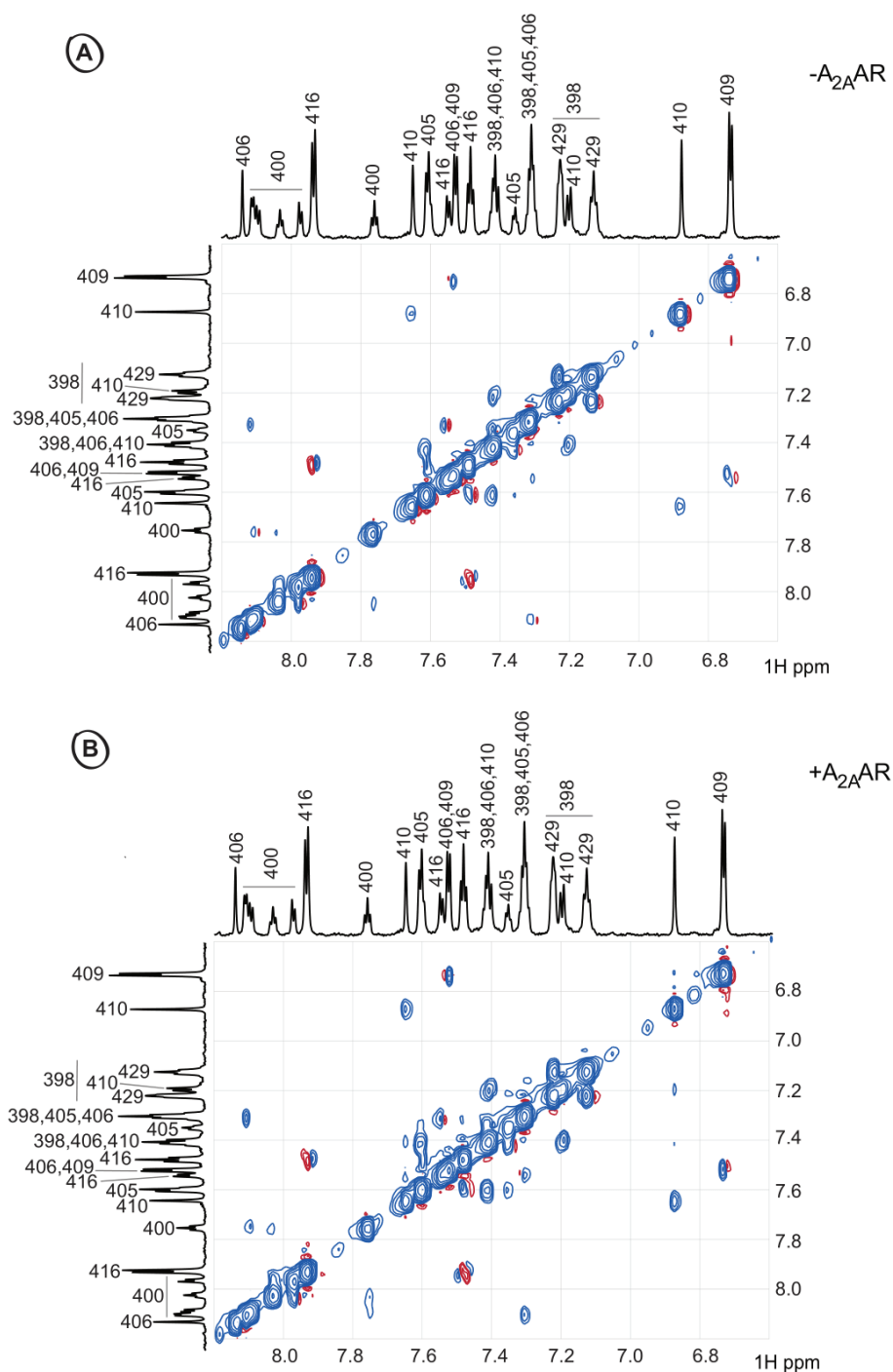


FIGURE 8.5 – Criblage d'un mélange de dix fragments sur $A_{2A}AR$ en membranes par NOESY. Spectres de corrélation 2D NOESY des fragments F398, F400, F405, F406, F409, F410, F416, F424, F428 et F229, en l'absence (A), ou en présence (B), du récepteur A_{2A} de l'adénosine ($A_{2A}AR$). Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 1 GHz, avec un τ_m de 600 ms.

Si l'enregistrement de spectres de référence reste une nécessité pour la validation de l'interaction spécifique des fragments avec A_{2A}AR, il semble, jusqu'à présent, que les non-ligands puissent être éliminés à partir d'une seule expérience NOESY. Il n'est également pas anodin de constater que, bien que les conditions du criblage STD en micelles et celle de l'analyse NOESY en membranes ne soient pas identiques, du fait notamment de la présence ou de l'absence de l'antagoniste ANR-94, les résultats obtenus sont très similaires dans les deux cas.

8.2.3 Analyse de mélange de fragments en présence de la caféine

Une autre stratégie peut consister à mener le criblage en présence d'un ligand connu d'A_{2A}AR, comme la caféine, et de ne retenir que les fragments qui montrent des pics NOE interligands avec celle-ci. En effet, ces pics de corrélation permettraient vraisemblablement d'identifier les fragments qui se lient dans le site orthostérique (pics INPHARMA) ou à proximité (pics ILOE) et qui sont donc impliqués dans un complexe d'interaction spécifique avec le récepteur. Cependant, en se restreignant à ce critère de discrimination, il est possible que des fragments allostériques particulièrement intéressants, se liant bien de manière spécifique à A_{2A}AR mais dans un site distant de celui de la caféine, soient éliminés.

L'interaction des fragments F410 et F429 avec le récepteur est à présent testée en présence de l'antagoniste caféine (Figure 8.6). Des pics NOE sont observés entre les résonances de la caféine et les résonances des deux composés testés. Ceci suggère que l'identification de pics interligands avec un ligand connu peut, en effet, être une stratégie de criblage valable.

Un nouveau mélange de dix fragments a été sélectionné pour être testé par NOESY sur A_{2A}AR en membranes, en présence de l'antagoniste caféine. La figure 8.7 rapporte des spectres 1D et STD enregistrés lors du criblage réalisé sur récepteur solubilisé en micelles de détergent, en présence d'ANR-94. Dans ce mélange, les fragments F63, F64, F66 et F90 ont été identifiés comme touches d'A_{2A}AR. L'analyse du spectre NOESY enregistré sur un échantillon de membranes surexprimant le récepteur est réalisée en collectant des informations sur l'absence ou la présence de pics NOE intraligands, interligands, et sur leur nature (Figure 8.8). Les fragments F53, F54, F57, F84 et F88 se démarquent des autres par l'absence totale, ou le très faible nombre, de pics de corrélations les impliquant. Aucun pic NOE n'est observable pour F54 et les pics NOE

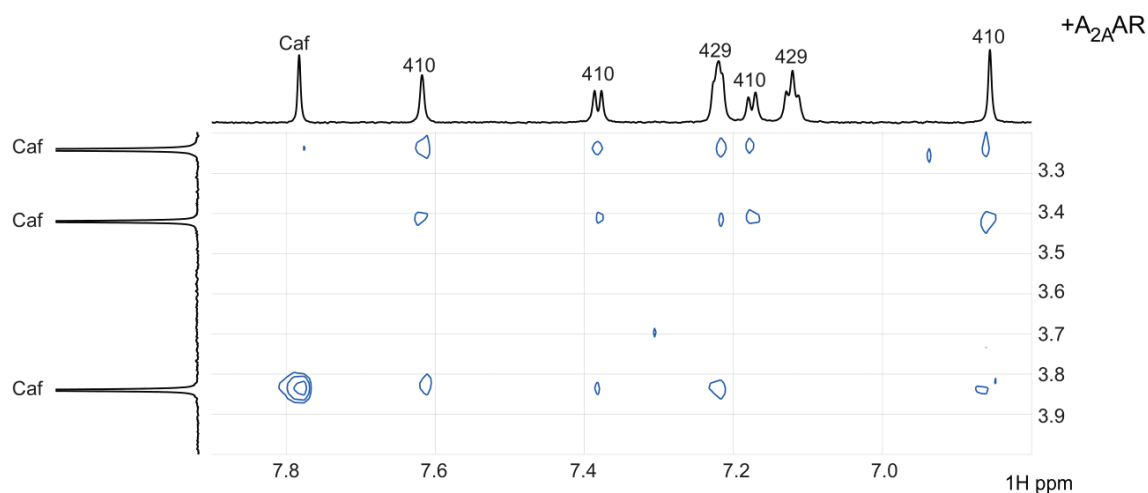


FIGURE 8.6 – Validation des fragments touchés F410 et F429 en présence de l'antagoniste caféine par NOESY. Spectre de corrélation 2D NOESY des fragments F410 et F429, sur des préparations de membranes surexprimant le récepteur A_{2A} de l'adénosine (+ A_{2A} AR), en présence de l'antagoniste caféine (Caf). Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 1 GHz, avec un τ_m de 600 ms.

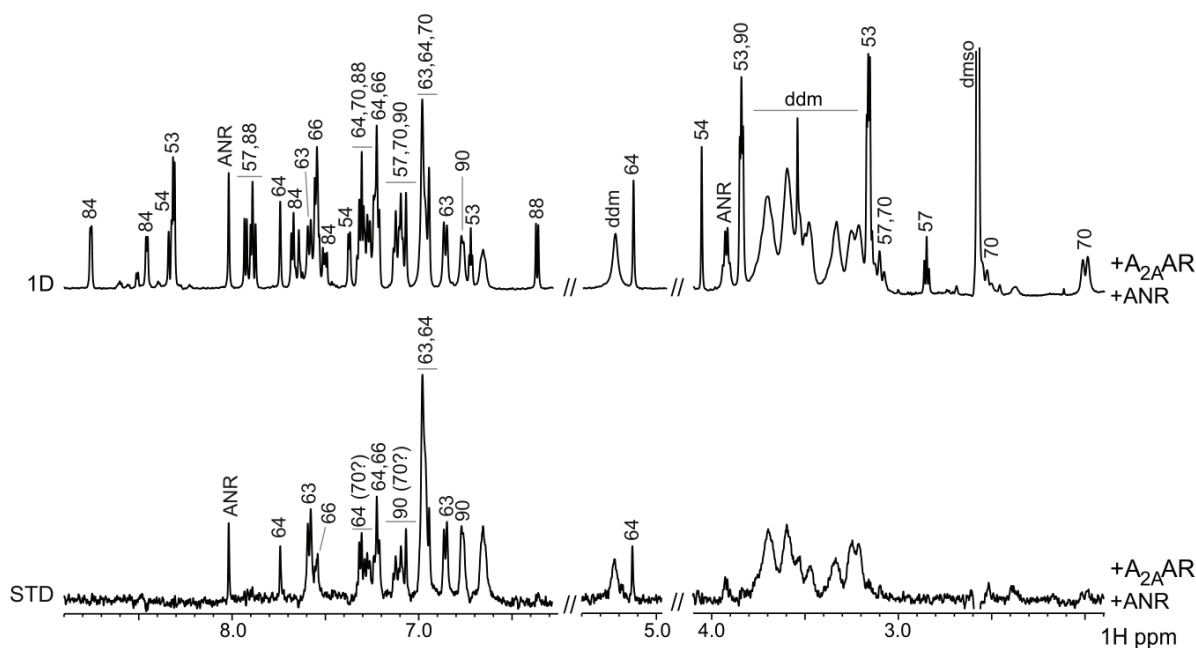


FIGURE 8.7 – Criblage d'un mélange de dix fragments sur A_{2A} AR en micelles de détergent par STD. Spectres 1D et STD des fragments F53, F54, F57, F63, F64, F66, F70, F84, F88, et F90 en présence du récepteur A_{2A} de l'adénosine (+ A_{2A} AR), et de l'antagoniste ANR-94 (ANR) (+ANR94). Les pics du détergent N-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM) utilisé dans le tampon de solubilisation sont visibles sur le spectre. Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 600 MHz.

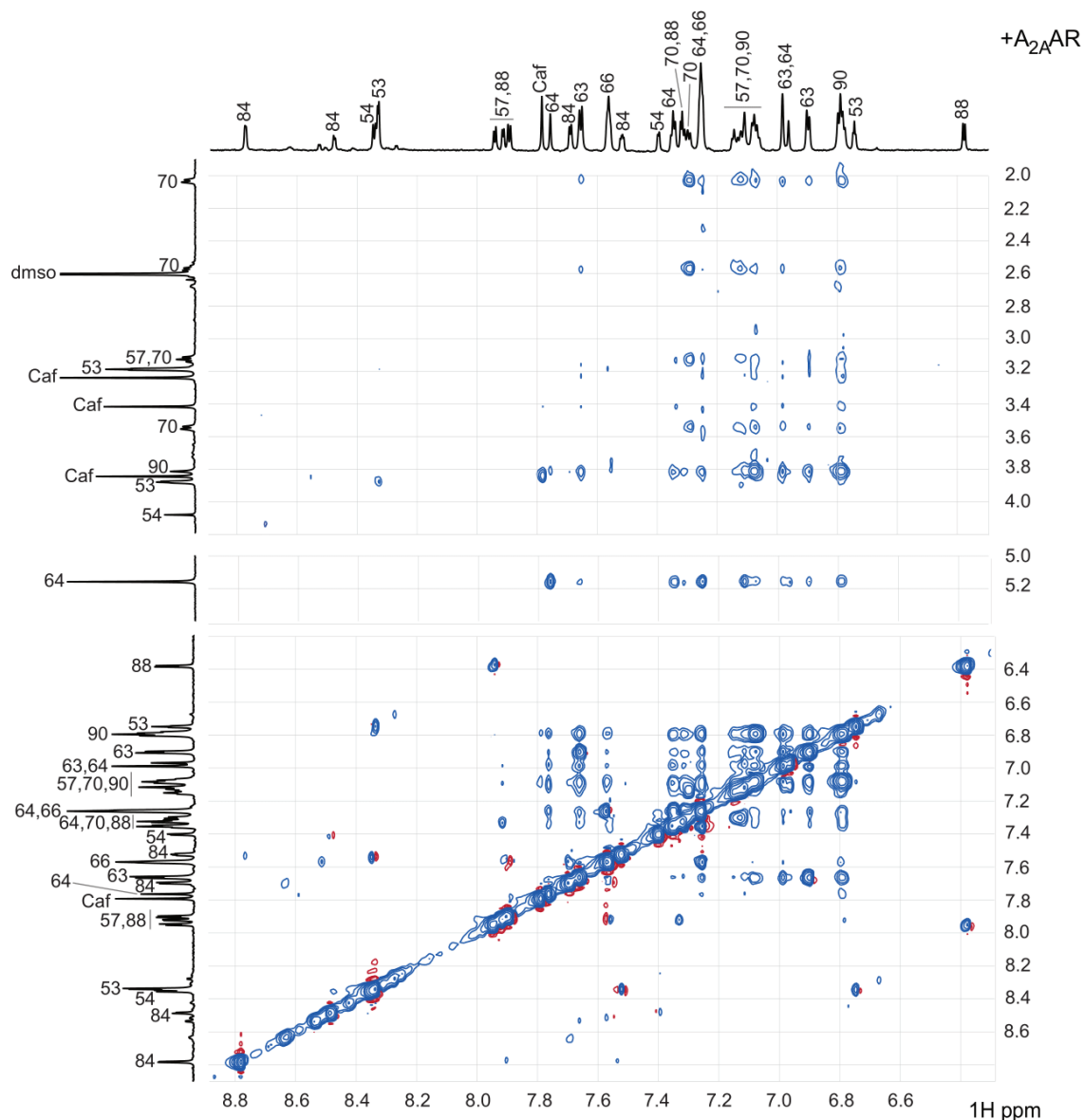


FIGURE 8.8 – Criblage d’un mélange de dix fragments sur A_{2A}AR en membranes par NOESY. Spectre de corrélation 2D NOESY des dix fragments F53, F54, F57, F63, F64, F66, F70, F84, F88, et F90, sur des préparations de membranes surexprimant le récepteur A_{2A} de l’adénosine (+A_{2A}AR), en présence de l’antagoniste caféine (Caf). Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 1 GHz, avec un τ_m de 600 ms.

intraligands de F88 sont des pics zéro-quantum artéfactuels. Si F53, F57 et F84 montrent bien des pics NOE intraligands, ceux-ci sont soit extrêmement faibles par rapport aux autres pics de corrélation visibles, soit le jeu de pics NOE intraligands attendu n’est pas complet. De plus, F53 et F57 ne montrent aucun pic de corrélation avec les autres composés du mélange. Le fragment F84 semble avoir des pics NOE interligands mais seulement avec F66. En ce qui concerne

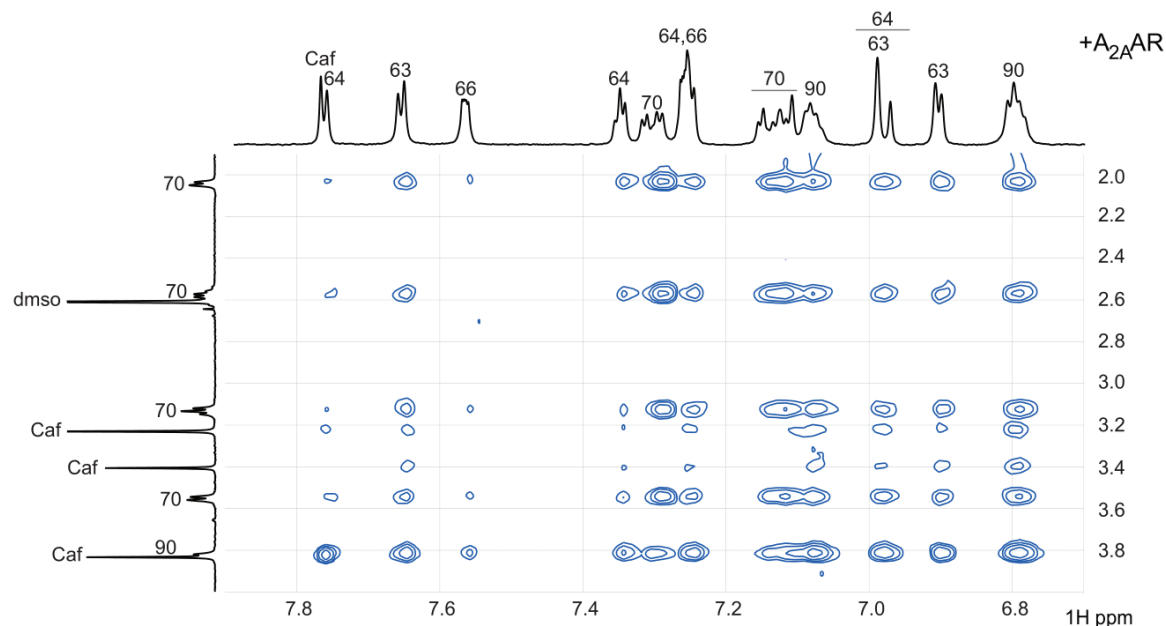


FIGURE 8.9 – Validation des fragments touches F63, F64, G66, F70 et F90 en présence d'A_{2A}AR par NOESY. Spectre de corrélation 2D NOESY des fragments F63, F64, F66, F70, et F90, sur des préparations de membranes surexprimant le récepteur A_{2A} de l'adénosine (+A_{2A}AR), en présence de l'antagoniste caféine (Caf). Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 1 GHz, avec un τ_m de 600 ms.

les fragments F63, F64, F66, F70 et F90, ceux-ci montrent à la fois des pics NOE intraligands convainquants et des pics NOE interligands entre eux. Certains montrent également des pics interligands avec la caféine.

De nouveaux spectres NOESY sont enregistrés, en présence des fragments F63, F64, F66, F70 et F90 seulement, toujours avec l'antagoniste caféine (Figure 8.9). Comme cela a déjà été observé avec le spectre du mélange complet, F63, F64, F66, F70 et F90 montrent tous des pics NOE interligands les uns avec les autres, mais pas avec la même intensité. Le fragment F66 est celui qui interagit le moins avec les autres composés. Il ne montre également pas de pics de corrélation avec la caféine, tout comme F70, bien qu'il montre des pics NOE interligands forts avec les autres composés. En ce qui concerne F63, F64 et F90, il y a bien des pics NOE interligands avec la caféine mais avec des variations dans l'intensité qui est relativement forte pour F90 et faible pour F64. En l'absence d'A_{2A}AR, les pics NOE intraligands et interligands sont moins intenses et moins nombreux, traduisant leur interaction spécifique avec le récepteur. A ce stade de l'analyse, les fragments F63, F64 et F90 pourraient être retenus comme les touches les plus prometteuses. En ce qui concerne l'exclusion du fragment F70 de la catégorie *touches*

d'A_{2A}AR en micelles, celle-ci est basée sur l'absence de ses signaux aliphatiques sur le spectre STD (Figure 8.7). Et ce malgré le fait que ses pics aromatiques soient fortement soupçonnés d'apparaître. Ainsi, encore une fois, bien que les conditions du criblage STD en micelles et celles de l'analyse NOESY en membrane, ne soient pas strictement identiques, les résultats obtenus sont très similaires.

Quatrième partie

Conclusions et perspectives

L'objectif principal de ces travaux de thèse consistait à évaluer la pertinence de l'utilisation d'expériences de RMN liquide, de type STD et NOESY, pour la réalisation d'un criblage de fragments sur des cibles protéiques membranaires particulières, les RCPGs. Le récepteur A_{2A} de l'adénosine a été utilisé comme modèle.

Dans un premier temps, des expériences menées en système micellaire ont permis de démontrer la faisabilité de la détection de l'interaction spécifique de ligands connus, de types agonistes et antagonistes, par STD. L'intérêt majeur de cette expérience réside dans sa capacité à fournir des données structurales sur l'orientation d'un ligand en complexe avec sa cible, un atout qui a pu être exploité dans le cas de l'agoniste adénosine, en permettant de démontrer expérimentalement l'existence d'un deuxième site de liaison sur $A_{2A}AR$. L'expérience STD permet donc d'apporter une information avantageuse supplémentaire en comparaison avec l'expérience de RMN TINS développée par la société néerlandaise Zobio, jusqu'alors seule méthode RMN employée pour le criblage de fragments sur RCPGs dans la littérature. Ensuite, des tests initiaux de criblage ont été réalisés sur une centaine de fragments et ont permis de distinguer des touches actives sur la voie de production de l'AMPc. L'identification de ces touches doit systématiquement inclure l'enregistrement d'expériences STD contrôles réalisées en absence du récepteur et permettant d'évaluer la part d'interactions non-spécifiques. De ce fait, les expériences de criblage sur des protéines membranaires sont plus longues et plus délicates que sur les protéines solubles. Ces travaux de thèse ont donc été fructueux dans l'atteinte de leur objectif principal, à savoir la réalisation du premier criblage de fragments sur un RCPG en utilisant l'expérience de RMN STD. L'enjeu majeur demeurerait cependant la découverte de ligands allostériques. C'est avec cette intention qu'un criblage de 640 fragments a été réalisé sur $A_{2A}AR$ solubilisé en micelles de détergent, en présence du compétiteur orthostérique ANR-94. Après l'analyse et la validation des interactions, 134 fragments ont été retenus, correspondant à un taux de touches de 21%. Ce pourcentage de ligands est élevé et inattendu si l'on considère que le site orthostérique de la protéine est théoriquement inaccessible. Des expériences RMN menées dans le but d'étudier l'influence d'ANR-94 sur la liaison des touches répertoriées ont permis d'identifier douze fragments se liant bien dans des sites différents de celui du compétiteur. Ces données hautement attendus sont le résultat d'une analyse poussée des profils STD, comparant les effets *epitope mapping* en présence et en l'absence d'ANR-94. Pour compléter cette étude, l'enregistrement de

spectres NOESY entre ANR-94 et des fragments interagissant spécifiquement avec A_{2A}AR doit être envisagée pour permettre de déterminer où se situe le site d'interaction des touches (discrimination de pics ILOE ou INPHARMA). Il sera également primordial pour la poursuite de ce projet d'essayer de bloquer l'accès au site de liaison orthostérique avec d'autres compétiteurs, des ligands plus grands susceptibles d'occuper plus largement l'espace de liaison disponible au niveau des domaines transmembranaires. La comparaison des résultats obtenus avec les différents ligands orthostériques devrait permettre de mieux appréhender la palette des interactions possibles, voire de la cartographier. Néanmoins, la recherche de ligands allostériques reste un véritable défi, notamment à cause du très petit nombre de sondes chimiques adaptées disponibles. Certains sites de liaison allostériques de RCPG ne se situent pas sur le chemin emprunté par les ligands orthostérique connu mais au niveau du domaine cytoplasmique ou à l'extérieur des hélices transmembranaires (Congreve et al., 2017).

L'autre aspect de cette thèse est la mise en place d'expériences de criblage sur A_{2A}AR enchâssé dans des préparations de membranes. Ce type d'échantillon présente plusieurs avantages, un environnement plus natif évidemment, des protocoles simplifiés, mais aussi une consommation réduite de quantités de RCPGs. Si l'expérience STD a déjà été appliquée avec succès à l'étude des interactions entre des RCPGs et leur ligands, elle n'a pas fait ses preuves dans le cas particulier du récepteur A_{2A} de l'adénosine. Pour ces travaux de thèse, comme pour le groupe de Griesinger, l'importante part d'interactions non-spécifiques masque l'événement d'interaction spécifique, y compris pour des ligands connus d'A_{2A}AR qui ont une bonne affinité pour leur cible. La solution a donc été de se tourner vers l'utilisation de l'expérience NOESY. Dans ces nouvelles expériences, la liaison spécifique de ligands connus et de fragments a pu être observée. L'analyse de mélanges déjà criblés en micelles ont mené à des résultats très similaires. La caféine est également utilisée afin de valider l'interaction spécifique des fragments. Sur le petit échantillonnage présenté, il est possible de dire que dans la majorité des cas, les fragments touchent interagissent avec la caféine et semble donc se lier dans son site ou à proximité. Il sera nécessaire de réaliser un criblage complet sur membrane afin d'étudier la corrélation entre la présence de pics interligands fragment-caféine et l'intensité des STD, par exemple.

Références

Aguirre, C., Cala, O., and Krimm, I. (2015). Overview of Probing Protein-Ligand Interactions Using NMR. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 81, 17.18.1-24.

Angulo, J., Enríquez-Navas, P.M., and Nieto, P.M. (2010). Ligand-receptor binding affinities from saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy : the binding isotherm of STD initial growth rates. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* 16, 7803–7812.

Aristotelous, T., Ahn, S., Shukla, A.K., Gawron, S., Sassano, M.F., Kahsai, A.W., Wingler, L.M., Zhu, X., Tripathi-Shukla, P., Huang, X.-P., et al. (2013). Discovery of β 2 Adrenergic Receptor Ligands Using Biosensor Fragment Screening of Tagged Wild-Type Receptor. *ACS Med. Chem. Lett.* 4, 1005–1010.

Aristotelous, T., Hopkins, A.L., and Navratilova, I. (2015). Surface plasmon resonance analysis of seven-transmembrane receptors. *Methods Enzymol.* 556, 499–525.

Assadi-Porter, F.M., Tonelli, M., Maillet, E., Hallenga, K., Benard, O., Max, M., and Markley, J.L. (2008). Direct NMR Detection of the Binding of Functional Ligands to the Human Sweet Receptor, a Heterodimeric Family 3 GPCR. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 7212–7213.

Azzi, M., Charest, P.G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M., and Pineyro, G. (2003). -Arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 11406–11411.

Baker, M. (2017). Fragment-based phenotypic screening is a hit. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 225–226. Banères, J.-L., and Mouillac, B. (2012). Manipulation des récepteurs couplés aux protéines G - Expression, purification et stabilisation in vitro. *médecine/sciences* 28, 837–844.

Bartoschek, S., Klabunde, T., Defossa, E., Dietrich, V., Stengelin, S., Griesinger, C., Carlo-magno, T., Focken, I., and Wendt, K.U. (2010). Drug Design for G-Protein-Coupled Receptors by a Ligand-Based NMR Method. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 1426–1429.

Bembenek, S.D., Tounge, B.A., and Reynolds, C.H. (2009). Ligand efficiency and fragment-based drug discovery. *Drug Discov. Today* 14, 278–283.

Bockaert, J. (2012). Les récepteurs couplés aux protéines G - Prix Nobel de chimie 2012 Robert J. Lefkowitz et Brian Kobilka. *médecine/sciences* 28, 1133–1137.

Bohacek, R.S., McMartin, C., and Guida, W.C. (1996). The art and practice of structure-based drug design : a molecular modeling perspective. *Med. Res. Rev.* 16, 3–50.

Bollag, G., Tsai, J., Zhang, J., Zhang, C., Ibrahim, P., Nolop, K., and Hirth, P. (2012). Vemurafenib : the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 873–886.

Bostock, M.J., Solt, A.S., and Nietlispach, D. (2019). The role of NMR spectroscopy in mapping the conformational landscape of GPCRs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 57, 145–156.

Brancaccio, D., Diana, D., Di Maro, S., Di Leva, F.S., Tomassi, S., Fattorusso, R., Russo, L., Scala, S., Trotta, A.M., Portella, L., et al. (2018). Ligand-Based NMR Study of C-X-C Chemokine Receptor Type 4 (CXCR4)–Ligand Interactions on Living Cancer Cells. *J. Med. Chem.* 61, 2910–2923.

Bridges, T.M., and Lindsley, C.W. (2008). G-protein-coupled receptors : from classical modes of modulation to allosteric mechanisms. *ACS Chem. Biol.* 3, 530–541.

Burford, N.T., Watson, J., Bertekap, R., and Alt, A. (2011). Strategies for the identification of allosteric modulators of G-protein-coupled receptors. *Biochem. Pharmacol.* 81, 691–702.

Caffrey, M., and Cherezov, V. (2009). Crystallizing membrane proteins using lipidic mesophases. *Nat. Protoc.* 4, 706–731.

Cala, O., and Krimm, I. (2015). Ligand-Orientation Based Fragment Selection in STD NMR Screening. *J. Med. Chem.* 58, 8739–8742.

Cala, O., Guillièrè, F., and Krimm, I. (2014). NMR-based analysis of protein–ligand interactions. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 943–956.

Carr, R.A.E., Congreve, M., Murray, C.W., and Rees, D.C. (2005). Fragment-based lead discovery : leads by design. *Drug Discov. Today* 10, 987–992.

Casiraghi, M., Damian, M., Lescop, E., Point, E., Moncoq, K., Morellet, N., Levy, D., Marie, J., Guittet, E., Banères, J.-L., et al. (2016). Functional Modulation of a G Protein-Coupled Receptor Conformational Landscape in a Lipid Bilayer. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 11170–11175.

Catoire, L.J., Damian, M., Giusti, F., Martin, A., Heijenoort, C. van, Popot, J.-L., Guittet, É., and Banères, J.-L. (2010). Structure of a GPCR Ligand in Its Receptor-Bound State : Leukotriene B4 Adopts a Highly Constrained Conformation When Associated to Human BLT2. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 9049–9057.

Chen, D., Errey, J.C., Heitman, L.H., Marshall, F.H., IJzerman, A.P., and Siegal, G. (2012). Fragment Screening of GPCRs Using Biophysical Methods : Identification of Ligands of the Adenosine A 2A Receptor with Novel Biological Activity. *ACS Chem. Biol.* 7, 2064–2073.

Chen, J.-F., Eltzschig, H.K., and Fredholm, B.B. (2013). Adenosine receptors as drug targets — what are the challenges? *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 265–286.

Chidiac, P., Hebert, T.E., Valiquette, M., Dennis, M., and Bouvier, M. (1994). Inverse ago-

nist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol. Pharmacol.* 45, 490–499.

Christopher, J.A., Brown, J., Doré, A.S., Errey, J.C., Koglin, M., Marshall, F.H., Myszk, D.G., Rich, R.L., Tate, C.G., Tehan, B., et al. (2013). Biophysical Fragment Screening of the β_1 -Adrenergic Receptor : Identification of High Affinity Arylpiperazine Leads Using Structure-Based Drug Design. *J. Med. Chem.* 56, 3446–3455.

Christopher, J.A., Aves, S.J., Bennett, K.A., Doré, A.S., Errey, J.C., Jazayeri, A., Marshall, F.H., Okrasa, K., Serrano-Vega, M.J., Tehan, B.G., et al. (2015). Fragment and Structure-Based Drug Discovery for a Class C GPCR : Discovery of the mGlu 5 Negative Allosteric Modulator HTL14242 (3-Chloro-5-[6-(5-fluoropyridin-2-yl)pyrimidin-4-yl]benzotrile). *J. Med. Chem.* 58, 6653–6664.

Christopoulos, A., and Kenakin, T. (2002). G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol. Rev.* 54, 323–374.

Chung, S., Funakoshi, T., and Civelli, O. (2008). Orphan GPCR research. *Br. J. Pharmacol.* 153 Suppl 1, S339-346. Ciulli, A. (2013). Biophysical screening for the discovery of small-molecule ligands. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1008, 357–388.

Clark, L.D., Dikiy, I., Chapman, K., Rödström, K.E., Aramini, J., LeVine, M.V., Khelashvili, G., Rasmussen, S.G., Gardner, K.H., and Rosenbaum, D.M. (2017). Ligand modulation of sidechain dynamics in a wild-type human GPCR. *ELife* 6.

Congreve, M., Carr, R., Murray, C., and Jhoti, H. (2003). A “rule of three” for fragment-based lead discovery ? *Drug Discov. Today* 8, 876–877.

Congreve, M., Langmead, C.J., Mason, J.S., and Marshall, F.H. (2011). Progress in Structure Based Drug Design for G Protein-Coupled Receptors. *J. Med. Chem.* 54, 4283–4311.

Congreve, M., Oswald, C., and Marshall, F.H. (2017). Applying Structure-Based Drug Design Approaches to Allosteric Modulators of GPCRs. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 837–847.

Corvol, J.C., Studler, J.M., Schonn, J.S., Girault, J.A., and Hervé, D. (2001). Galpha(olf) is necessary for coupling D1 and A2a receptors to adenylyl cyclase in the striatum. *J. Neurochem.* 76, 1585–1588.

Cox, B.D., Mehta, A.K., DiRaddo, J.O., Liotta, D.C., Wilson, L.J., and Snyder, J.P. (2015). Structural analysis of CXCR4 – Antagonist interactions using saturation-transfer double-difference NMR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 466, 28–32.

Dalvit, C., Fogliatto, G., Stewart, A., Veronesi, M., and Stockman, B. (2001). WaterLOGSY as a method for primary NMR screening : Practical aspects and range of applicability. *J. Biomol. NMR* 21, 349–359.

De Lean, A., Stadel, J.M., and Lefkowitz, R.J. (1980). A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 255, 7108–7117.

Doré, A.S., Robertson, N., Errey, J.C., Ng, I., Hollenstein, K., Tehan, B., Hurrell, E., Bennett, K., Congreve, M., Magnani, F., et al. (2011). Structure of the Adenosine A2A Receptor in Complex with ZM241385 and the Xanthines XAC and Caffeine. *Structure* 19, 1283–1293.

Dorr, P., Westby, M., Dobbs, S., Griffin, P., Irvine, B., Macartney, M., Mori, J., Rickett, G., Smith-Burchnell, C., Napier, C., et al. (2005). Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4721–4732.

Eddy, M.T., Didenko, T., Stevens, R.C., and Wüthrich, K. (2016). β 2 -Adrenergic Recep-

tor Conformational Response to Fusion Protein in the Third Intracellular Loop. *Structure* 24, 2190–2197.

Eddy, M.T., Lee, M.-Y., Gao, Z.-G., White, K.L., Didenko, T., Horst, R., Audet, M., Stanczak, P., McClary, K.M., Han, G.W., et al. (2018a). Allosteric Coupling of Drug Binding and Intracellular Signaling in the A2A Adenosine Receptor. *Cell* 172, 68-80.e12.

Eddy, M.T., Gao, Z.-G., Mannes, P., Patel, N., Jacobson, K.A., Katritch, V., Stevens, R.C., and Wüthrich, K. (2018b). Extrinsic Tryptophans as NMR Probes of Allosteric Coupling in Membrane Proteins : Application to the A 2A Adenosine Receptor. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 8228–8235.

Eglen, R.M., and Reisine, T. (2008). Photoproteins : important new tools in drug discovery. *Assay Drug Dev. Technol.* 6, 659–671.

Eltzschig, H.K., Sitkovsky, M.V., and Robson, S.C. (2012). Purinergic signaling during inflammation. *N. Engl. J. Med.* 367, 2322–2333.

Erlanson, D.A., Fesik, S.W., Hubbard, R.E., Jahnke, W., and Jhoti, H. (2016). Twenty years on : the impact of fragments on drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15, 605–619.

Fink, T., Bruggesser, H., and Reymond, J.-L. (2005). Virtual exploration of the small-molecule chemical universe below 160 Daltons. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 44, 1504–1508.

Fredholm, B.B., Arslan, G., Halldner, L., Kull, B., Schulte, G., and Wasserman, W. (2000). Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 362, 364–374.

Fredholm, B.B., Arslan, G., Halldner, L., Kull, B., Schulte, G., Ådén, U., and Svenningsson, P. (2001). Adenosine receptor signaling in vitro and in vivo. *Drug Dev. Res.* 52, 274–282.

Fredholm, B.B., IJzerman, A.P., Jacobson, K.A., Linden, J., and Müller, C.E. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors—an update. *Pharmacol. Rev.* 63, 1–34.

Fredriksson, K., Lottmann, P., Hinz, S., Onila, I., Shymanets, A., Harteneck, C., Mller, C.E., Griesinger, C., and Exner, T.E. (2017). Nanodiscs for INPHARMA NMR Characterization of GPCRs : Ligand Binding to the Human A2A Adenosine Receptor. *Angew Chem Int Ed* 5.

Freitas, M.E., and Fox, S.H. (2016). Nondopaminergic treatments for Parkinson’s disease : current and future prospects. *Neurodegener. Dis. Manag.* 6, 249–268.

Fronik, P., Gaiser, B.I., and Sejer Pedersen, D. (2017). Bitopic Ligands and Metastable Binding Sites : Opportunities for G Protein-Coupled Receptor (GPCR) Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* 60, 4126–4134.

Gater, D.L., Saurel, O., Iordanov, I., Liu, W., Cherezov, V., and Milon, A. (2014). Two Classes of Cholesterol Binding Sites for the β 2 AR Revealed by Thermostability and NMR. *Biophys. J.* 107, 2305–2312.

Gentry, P.R., Sexton, P.M., and Christopoulos, A. (2015). Novel Allosteric Modulators of G Protein-coupled Receptors. *J. Biol. Chem.* 290, 19478–19488.

Gether, U., and Kobilka, B.K. (1998). G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J. Biol. Chem.* 273, 17979–17982.

Ghosh, E., Kumari, P., Jaiman, D., and Shukla, A.K. (2015). Methodological advances : the unsung heroes of the GPCR structural revolution. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 69–81.

Gilchrist, A. (2010). *GPCR Molecular Pharmacology and Drug Targeting : Shifting Para-*

digns and New Directions (John Wiley & Sons).

Granier, S., and Kobilka, B. (2012). A new era of GPCR structural and chemical biology. *Nat. Chem. Biol.* 8, 670–673.

Gribbon, P., and Sewing, A. (2003). Fluorescence readouts in HTS : no gain without pain ? *Drug Discov. Today* 8, 1035–1043.

Hajduk, P.J., and Greer, J. (2007). A decade of fragment-based drug design : strategic advances and lessons learned. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 211–219.

Hamdan, F.F., Audet, M., Garneau, P., Pelletier, J., and Bouvier, M. (2005). High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *J. Biomol. Screen.* 10, 463–475.

Hann, M.M., and Oprea, T.I. (2004). Pursuing the leadlikeness concept in pharmaceutical research. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 255–263.

Hann, M.M., Leach, A.R., and Harper, G. (2001). Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 41, 856–864.

Harrison, C., and Traynor, J.R. (2003). The [³⁵S]GTPgammaS binding assay : approaches and applications in pharmacology. *Life Sci.* 74, 489–508.

Hartmann, L., Kugler, V., and Wagner, R. (2016). Expression of Eukaryotic Membrane Proteins in *Pichia pastoris*. In *Heterologous Expression of Membrane Proteins, I*. Mus-Veteau, ed. (New York, NY : Springer New York), pp. 143–162.

Hartmann, L., Metzger, E., Ottelard, N., and Wagner, R. (2017). Direct Extraction and Purification of Recombinant Membrane Proteins from *Pichia pastoris* Protoplasts. In *Membrane*

Protein Structure and Function Characterization, J.-J. Lacapere, ed. (New York, NY : Springer New York), pp. 45–56.

Haskó, G., Linden, J., Cronstein, B., and Pacher, P. (2008). Adenosine receptors : therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 759–770.

Hauser, R.A. (2009). Levodopa : past, present, and future. *Eur. Neurol.* 62, 1–8.

Hauser, A.S., Attwood, M.M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H.B., and Gloriam, D.E. (2017). Trends in GPCR drug discovery : new agents, targets and indications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 829–842.

Heng, B.C., Aubel, D., and Fussenegger, M. (2013). An overview of the diverse roles of G-protein coupled receptors (GPCRs) in the pathophysiology of various human diseases. *Biotechnol. Adv.* 31, 1676–1694.

Heydenreich, F.M., Vuckovic, Z., Matkovic, M., and Veprintsev, D.B. (2015). Stabilization of G protein-coupled receptors by point mutations. *Front. Pharmacol.* 6.

Hibert, M.F., Hoflack, J., Trumppkallmeyer, S., and Bruinvels, A. (1993). Modèles tridimensionnels des récepteurs couplés aux protéines G. *MS Médecine Sci. Rev. Pap.* ISSN 0767-0974 1993 Vol 9 N° 1 P31-40.

Hopkins, A.L., Groom, C.R., and Alex, A. (2004). Ligand efficiency : a useful metric for lead selection. *Drug Discov. Today* 9, 430–431.

Houston, J.G., Banks, M.N., Binnie, A., Brenner, S., O’Connell, J., and Petrillo, E.W. (2008). Case study : impact of technology investment on lead discovery at Bristol–Myers Squibb, 1998–2006. *Drug Discov. Today* 13, 44–51.

Ichihara, O., Barker, J., Law, R.J., and Whittaker, M. (2011). Compound Design by Fragment-Linking. *Mol. Inform.* 30, 298–306.

Igonet, S., Raingeval, C., Cecon, E., Pučić-Baković, M., Lauc, G., Cala, O., Baranowski, M., Perez, J., Jockers, R., Krimm, I., et al. (2018). Enabling STD-NMR fragment screening using stabilized native GPCR : A case study of adenosine receptor. *Sci. Rep.* 8.

Inglese, J., Johnson, R.L., Simeonov, A., Xia, M., Zheng, W., Austin, C.P., and Auld, D.S. (2007). High-throughput screening assays for the identification of chemical probes. *Nat. Chem. Biol.* 3, 466–479.

Inooka, H., Ohtaki, T., Kitahara, O., Ikegami, T., Endo, S., Kitada, C., Ogi, K., Onda, H., Fujino, M., and Shirakawa, M. (2001). Conformation of a peptide a ligand bound to its G-protein coupled receptor. *Nat. Struct. Biol.* 8, 5.

Isogai, S., Deupi, X., Opitz, C., Heydenreich, F.M., Tsai, C.-J., Brueckner, F., Schertler, G.F.X., Veprintsev, D.B., and Grzesiek, S. (2016). Backbone NMR reveals allosteric signal transduction networks in the β 1-adrenergic receptor. *Nature* 530, 237–241.

Jaakola, V.-P., Griffith, M.T., Hanson, M.A., Cherezov, V., Chien, E.Y.T., Lane, J.R., Ijzerman, A.P., and Stevens, R.C. (2008). The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* 322, 1211–1217.

Janzen, W.P. (2014). Screening technologies for small molecule discovery : the state of the art. *Chem. Biol.* 21, 1162–1170.

Jazayeri, A., Andrews, S.P., and Marshall, F.H. (2017). Structurally Enabled Discovery of Adenosine A 2A Receptor Antagonists. *Chem. Rev.* 117, 21–37.

Jean-Charles, P.-Y., Kaur, S., and Shenoy, S.K. (2017). G Protein–Coupled Receptor Signa-

ling Through β -Arrestin-Dependent Mechanisms : J. Cardiovasc. Pharmacol. 70, 142–158.

Johnson, C.N., Erlanson, D.A., Murray, C.W., and Rees, D.C. (2017). Fragment-to-Lead Medicinal Chemistry Publications in 2015. J. Med. Chem. 60, 89–99.

Johnson, C.N., Erlanson, D.A., Jahnke, W., Mortenson, P.N., and Rees, D.C. (2018). Fragment-to-Lead Medicinal Chemistry Publications in 2016. J. Med. Chem. 61, 1774–1784.

de Jong, L.A.A., Uges, D.R.A., Franke, J.P., and Bischoff, R. (2005). Receptor-ligand binding assays : technologies and applications. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci. 829, 1–25.

Kamal, M., and Jockers, R. (2009). Bitopic ligands : all-in-one orthosteric and allosteric. F1000 Biol. Rep. 1. Katritch, V., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2013). Structure-Function of the G Protein-Coupled Receptor Superfamily. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 53, 531–556.

Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., et al. (1998). GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. Nature 396, 683–687.

Kenakin, T. (2007). Functional selectivity through protean and biased agonism : who steers the ship ? Mol. Pharmacol. 72, 1393–1401.

Kofuku, Y., Yoshiura, C., Ueda, T., Terasawa, H., Hirai, T., Tominaga, S., Hirose, M., Maeda, Y., Takahashi, H., Terashima, Y., et al. (2009). Structural Basis of the Interaction between Chemokine Stromal Cell-derived Factor-1/CXCL12 and Its G-protein-coupled Receptor CXCR4. J. Biol. Chem. 284, 35240–35250.

Kofuku, Y., Ueda, T., Okude, J., Shiraishi, Y., Kondo, K., Mizumura, T., Suzuki, S., and Shimada, I. (2014). Functional Dynamics of Deuterated β_2 -Adrenergic Receptor in Lipid Bi-

layers Revealed by NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 13376–13379.

Kolakowski, L.F. (1994). GCRDb : a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2, 1–7. Krimm, I., Lancelin, J.-M., and Praly, J.-P. (2012). Binding Evaluation of Fragment-Based Scaffolds for Probing Allosteric Enzymes. *J. Med. Chem.* 55, 1287–1295.

Kumar, A., Voet, A., and Zhang, K.Y.J. (2012). Fragment Based Drug Design : From Experimental to Computational Approaches. *Curr. Med. Chem.* 19, 5128–5147.

Kumari, T., Pant, B., and Pardasani, K.R. (2009). A model for the evaluation of domain based classification of GPCR. *Bioinformatics* 4, 138–142.

Kuntz, I.D., Chen, K., Sharp, K.A., and Kollman, P.A. (1999). The maximal affinity of ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 9997–10002.

Lagerström, M.C., and Schiöth, H.B. (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 339–357.

Lamichhane, R., Liu, J.J., Pljevaljcic, G., White, K.L., van der Schans, E., Katritch, V., Stevens, R.C., Wüthrich, K., and Millar, D.P. (2015). Single-molecule view of basal activity and activation mechanisms of the G protein-coupled receptor β 2AR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 14254–14259.

Lamoree, B., and Hubbard, R.E. (2017). Current perspectives in fragment-based lead discovery (FBLD). *Essays Biochem.* 61, 453–464.

Lancelot, N., Piotto, M., Theret, I., Lesur, B., and Hennig, P. (2014). Applications of NMR screening techniques to the pharmaceutical target Checkpoint kinase 1. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 93, 125–135.

Lane, J.R., Abdul-Ridha, A., and Canals, M. (2013). Regulation of G Protein-Coupled Receptors by Allosteric Ligands. *ACS Chem. Neurosci.* 4, 527–534.

Leach, A.R., and Hann, M.M. (2011). Molecular complexity and fragment-based drug discovery : ten years on. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 489–496.

Leach, A.R., Hann, M.M., Burrows, J.N., and Griffen, E.J. (2006). Fragment screening : an introduction. *Mol. Biosyst.* 2, 430–446.

Leach, K., Sexton, P.M., and Christopoulos, A. (2007). Allosteric GPCR modulators : taking advantage of permissive receptor pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 382–389.

Lebon, G., and Tate, C.G. (2012). Les récepteurs couplés aux protéines G dans la lumière. *médecine/sciences* 28, 876–882.

Lebon, G., Bennett, K., Jazayeri, A., and Tate, C.G. (2011). Thermostabilisation of an agonist-bound conformation of the human adenosine A(2A) receptor. *J. Mol. Biol.* 409, 298–310.

Lebon, G., Edwards, P.C., Leslie, A.G.W., and Tate, C.G. (2015). Molecular Determinants of CGS21680 Binding to the Human Adenosine A2A Receptor. *Mol. Pharmacol.* 87, 907–915.

Leff, P. (1995). The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 89–97.

de Lera Ruiz, M., Lim, Y.-H., and Zheng, J. (2014). Adenosine A 2A Receptor as a Drug Discovery Target. *J. Med. Chem.* 57, 3623–3650.

Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., and Feeney, P.J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23, 3–25.

Liu, J.J., Horst, R., Katritch, V., Stevens, R.C., and Wuthrich, K. (2012). Biased Signaling Pathways in 2-Adrenergic Receptor Characterized by 19F-NMR. *Science* 335, 1106–1110.

Liu, K., Titus, S., Southall, N., Zhu, P., Inglese, J., Austin, C.P., and Zheng, W. (2008). Comparison on Functional Assays for Gq-Coupled GPCRs by Measuring Inositol Monophosphate-1 and Intracellular Calcium in 1536-Well Plate Format. *Curr. Chem. Genomics* 1, 70–78.

London, R.E. (1999). Theoretical Analysis of the Inter-Ligand Overhauser Effect : A New Approach for Mapping Structural Relationships of Macromolecular Ligands. *J. Magn. Reson.* 141, 301–311.

Lopez, J.J., Shukla, A.K., Reinhart, C., Schwalbe, H., Michel, H., and Glaubitz, C. (2008). The Structure of the Neuropeptide Bradykinin Bound to the Human G-Protein Coupled Receptor Bradykinin B2 as Determined by Solid-State NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 1668–1671.

Luca, S., White, J.F., Sohal, A.K., Filippov, D.V., van Boom, J.H., Grisshammer, R., and Baldus, M. (2003). The conformation of neurotensin bound to its G protein-coupled receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 10706–10711.

Ludlow, R.F., Verdonk, M.L., Saini, H.K., Tickle, I.J., and Jhoti, H. (2015). Detection of secondary binding sites in proteins using fragment screening. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 15910–15915.

Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J. Cell Sci.* 115, 455–465.

Macarron, R. (2006). Critical review of the role of HTS in drug discovery. *Drug Discov. Today* 11, 277–279.

Magnani, F., Shibata, Y., Serrano-Vega, M.J., and Tate, C.G. (2008). Co-evolving stability and conformational homogeneity of the human adenosine A2a receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10744–10749.

Manglik, A., and Kobilka, B. (2014). The role of protein dynamics in GPCR function : insights from the β 2AR and rhodopsin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 27, 136–143.

Manglik, A., and Kruse, A.C. (2017). Structural Basis for G Protein-Coupled Receptor Activation. *Biochemistry* 56, 5628–5634.

Manglik, A., Kim, T.H., Masureel, M., Altenbach, C., Yang, Z., Hilger, D., Lerch, M.T., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Hubbell, W.L., et al. (2015). Structural Insights into the Dynamic Process of β 2 -Adrenergic Receptor Signaling. *Cell* 161, 1101–1111.

Mansfield, R., Able, S., Griffin, P., Irvine, B., James, I., Macartney, M., Miller, K., Mills, J., Napier, C., Navratilova, I., et al. (2009). CCR5 pharmacology methodologies and associated applications. *Methods Enzymol.* 460, 17–55. Mashalidis, E.H., Śledź, P., Lang, S., and Abell, C. (2013). A three-stage biophysical screening cascade for fragment-based drug discovery. *Nat. Protoc.* 8, 2309–2324.

Mason, L.E. (2018). *Advances in Fragment-based Drug Discovery.*

Massotte, D. (2003). G protein-coupled receptor overexpression with the baculovirus–insect cell system : a tool for structural and functional studies. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bio-membr.* 1610, 77–89.

Matar-Merheb, R., Rhimi, M., Leydier, A., Huché, F., Galián, C., Desuzinges-Mandon, E., Ficheux, D., Flot, D., Aghajari, N., Kahn, R., et al. (2011). Structuring Detergents for Extracting and Stabilizing Functional Membrane Proteins. *PLOS ONE* 6, e18036.

Mayer, M., and Meyer, B. (1999). Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 1784–1788.

Mayer, M., and Meyer, B. (2001). Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 6108–6117.

McQuade, D.T., Quinn, M.A., Yu, S.M., Polans, A.S., Krebs, M.P., and Gellman, S.H. (2000). Rigid Amphiphiles for Membrane Protein Manipulation. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 758–761.

Meyer, B., and Peters, T. (2003). NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 42, 864–890.

Milligan, G., and Smith, N.J. (2007). Allosteric modulation of heterodimeric G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 615–620.

Morello, S., Sorrentino, R., and Pinto, A. (2009). Adenosine A2a receptor agonists as regulators of inflammation : pharmacology and therapeutic opportunities. *J. Recept. Ligand Channel Res.* Volume 2, 11–17.

Mortenson, P.N., Erlanson, D.A., de Esch, I.J.P., Jahnke, W., and Johnson, C.N. (2019). Fragment-to-Lead Medicinal Chemistry Publications in 2017. *J. Med. Chem.* 62, 3857–3872.

Murray, C.W., and Blundell, T.L. (2010). Structural biology in fragment-based drug design. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 497–507.

Mus-Veteau, I., Demange, P., and Zito, F. (2014). Membrane Protein Production for Structural Analysis. In *Membrane Proteins Production for Structural Analysis*, I. Mus-Veteau, ed. (New York, NY : Springer New York), pp. 1–44. Navratilova, I., Besnard, J., and Hopkins, A.L. (2011). Screening for GPCR Ligands Using Surface Plasmon Resonance. *ACS Med. Chem. Lett.*

2, 549–554.

O'Connor, C., White, K.L., Doncescu, N., Didenko, T., Roth, B.L., Czaplicki, G., Stevens, R.C., Wüthrich, K., and Milon, A. (2015). NMR structure and dynamics of the agonist dynorphin peptide bound to the human kappa opioid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 11852–11857.

Okude, J., Ueda, T., Kofuku, Y., Sato, M., Nobuyama, N., Kondo, K., Shiraishi, Y., Mizumura, T., Onishi, K., Natsume, M., et al. (2015). Identification of a Conformational Equilibrium That Determines the Efficacy and Functional Selectivity of the μ -Opioid Receptor. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 15771–15776.

Ortholand, J. (2003). Combinatorial chemistry in the discovery of new medicines : 10 years of progress. *Actual. Chim.* 103–107.

Orts, J., Griesinger, C., and Carlomagno, T. (2009). The INPHARMA technique for pharmacophore mapping : A theoretical guide to the method. *J. Magn. Reson. San Diego Calif* 1997 200, 64–73.

Overington, J.P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A.L. (2006). How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 993–996.

Park, P.S.-H. (2012). Ensemble of G protein-coupled receptor active states. *Curr. Med. Chem.* 19, 1146–1154.

Pereira, A., Pfeifer, T.A., Grigliatti, T.A., and Andersen, R.J. (2009). Functional Cell-Based Screening and Saturation Transfer Double-Difference NMR Have Identified Haplosamate A as a Cannabinoid Receptor Agonist. *ACS Chem. Biol.* 4, 139–144.

Petros, A.M., Dinges, J., Augeri, D.J., Baumeister, S.A., Betebenner, D.A., Bures, M.G., Elmore, S.W., Hajduk, P.J., Joseph, M.K., Landis, S.K., et al. (2006). Discovery of a Potent

Inhibitor of the Antiapoptotic Protein Bcl-x L from NMR and Parallel Synthesis. *J. Med. Chem.* 49, 656–663.

Pierce, K.L., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J. (2002). Seven-transmembrane receptors : Signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 639–650.

Prosser, R.S., Ye, L., Pandey, A., and Oraziotti, A. (2017). Activation processes in ligand-activated G protein-coupled receptors : A case study of the adenosine A_{2A} receptor. *BioEssays* 39, 1700072.

Quarles, L.D. (2005). Cinacalcet HCl : A novel treatment for secondary hyperparathyroidism in stage 5 chronic kidney disease. *Kidney Int.* 68, S24–S28.

Raingeval, C., Cala, O., Brion, B., Le Borgne, M., Hubbard, R.E., and Krimm, I. (2019). 1D NMR WaterLOGSY as an efficient method for fragment-based lead discovery. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 34, 1218–1225.

Rajagopal, S., Rajagopal, K., and Lefkowitz, R.J. (2010). Teaching old receptors new tricks : biasing seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 373–386.

Rasmussen, S.G.F., Choi, H.-J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R.P., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., et al. (2007). Crystal structure of the human beta₂ adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383–387.

Rees, D.C., Miles Congreve, Murray, C.W., and Carr, R. (2004). Fragment-based lead discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 660–672.

Renaud, J.-P., Chung, C.-W., Danielson, U.H., Egner, U., Hennig, M., Hubbard, R.E., and Nar, H. (2016). Biophysics in drug discovery : impact, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15, 679–698.

Roberts, A.W., Davids, M.S., Pagel, J.M., Kahl, B.S., Puvvada, S.D., Gerecitano, J.F., Kipps, T.J., Anderson, M.A., Brown, J.R., Gressick, L., et al. (2016). Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 374, 311–322.

Sabbadin, D., Ciancetta, A., and Moro, S. (2014). Bridging molecular docking to membrane molecular dynamics to investigate GPCR-ligand recognition : the human A₂A adenosine receptor as a key study. *J. Chem. Inf. Model.* 54, 169–183.

Sabbadin, D., Ciancetta, A., Deganutti, G., Cuzzolin, A., and Moro, S. (2015). Exploring the recognition pathway at the human A₂A adenosine receptor of the endogenous agonist adenosine using supervised molecular dynamics simulations. *MedChemComm* 6, 1081–1085.

Sachdeva, S., and Gupta, M. (2013). Adenosine and its receptors as therapeutic targets : An overview. *Saudi Pharm. J.* 21, 245–253.

Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T., and Lefkowitz, R.J. (1993). A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J. Biol. Chem.* 268, 4625–4636.

Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A.P., Donadi, R.S., Bologa, C.G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T.I., et al. (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 19–34. Schiöth, H.B., and Fredriksson, R. (2005). The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 94–101.

Schuffenhauer, A., Ruedisser, S., Marzinzik, A.L., Jahnke, W., Blommers, M., Selzer, P., and Jacoby, E. (2005). Library design for fragment based screening. *Curr. Top. Med. Chem.* 5, 751–762.

Schultes, S., de Graaf, C., Haaksma, E.E.J., de Esch, I.J.P., Leurs, R., and Krämer, O. (2010). Ligand efficiency as a guide in fragment hit selection and optimization. *Drug Discov. Today Technol.* 7, e157–e162.

Sebag, J.A., and Pantel, J. (2012). Ciblage thérapeutique des récepteurs couplés aux protéines G - La voie allostérique. *médecine/sciences* 28, 845–851.

Serrano-Vega, M.J., Magnani, F., Shibata, Y., and Tate, C.G. (2008). Conformational thermostabilization of the beta1-adrenergic receptor in a detergent-resistant form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 877–882.

Shepherd, C.A., Hopkins, A.L., and Navratilova, I. (2014). Fragment screening by SPR and advanced application to GPCRs. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 116, 113–123.

Shibata, Y., White, J.F., Serrano-Vega, M.J., Magnani, F., Aloia, A.L., Grisshammer, R., and Tate, C.G. (2009). Thermostabilization of the Neurotensin Receptor NTS1. *J. Mol. Biol.* 390, 262–277.

Shimada, I., Ueda, T., Kofuku, Y., Eddy, M.T., and Wüthrich, K. (2018). GPCR drug discovery : integrating solution NMR data with crystal and cryo-EM structures. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18, 59–82.

Shuker, S.B., and Hajduk, P.J. (1996). Discovering high-affinity ligands for proteins : SAR by NMR. *Science* 274, 1531. Siegal, G., Ab, E., and Schultz, J. (2007). Integration of fragment screening and library design. *Drug Discov. Today* 12, 1032–1039.

Siegel, M.G., and Vieth, M. (2007). Drugs in other drugs : a new look at drugs as fragments. *Drug Discov. Today* 12, 71–79.

Solt, A.S., Bostock, M.J., Shrestha, B., Kumar, P., Warne, T., Tate, C.G., and Nietlispach,

D. (2017). Insight into partial agonism by observing multiple equilibria for ligand-bound and Gs-mimetic nanobody-bound β 1-adrenergic receptor. *Nat. Commun.* 8.

Souers, A.J., Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., Fairbrother, W.J., et al. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* 19, 202–208.

Sounier, R., Mas, C., Steyaert, J., Laeremans, T., Manglik, A., Huang, W., Kobilka, B.K., Déméné, H., and Granier, S. (2015). Propagation of conformational changes during μ -opioid receptor activation. *Nature* 524, 375–378. Sriram, K., and Insel, P.A. (2018). G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs : How Many Targets and How Many Drugs? *Mol. Pharmacol.* 93, 251–258.

Stoddart, L.A., Vernall, A.J., Denman, J.L., Briddon, S.J., Kellam, B., and Hill, S.J. (2012). Fragment Screening at Adenosine-A3 Receptors in Living Cells Using a Fluorescence-Based Binding Assay. *Chem. Biol.* 19, 1105–1115. Sušac, L., Eddy, M.T., Didenko, T., Stevens, R.C., and Wüthrich, K. (2018). A 2A adenosine receptor functional states characterized by 19 F-NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 12733–12738.

Swainsbury, D.J.K., Scheidelaar, S., Foster, N., van Grondelle, R., Killian, J.A., and Jones, M.R. (2017). The effectiveness of styrene-maleic acid (SMA) copolymers for solubilisation of integral membrane proteins from SMA-accessible and SMA-resistant membranes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1859, 2133–2143.

Szóllósi, E., Bobok, A., Kiss, L., Vass, M., Kurkó, D., Kolok, S., Visegrády, A., and Keserű, G.M. (2015). Cell-based and virtual fragment screening for adrenergic α 2C receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 3991–3999.

Teague, null, Davis, null, Leeson, null, and Oprea, null (1999). The Design of Leadlike Combinatorial Libraries. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 38, 3743–3748.

Terrillon, S., and Bouvier, M. (2004). Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* 5, 30–34.

Thompson, A.A., Liu, J.J., Chun, E., Wacker, D., Wu, H., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2011). GPCR stabilization using the bicelle-like architecture of mixed sterol-detergent micelles. *Methods San Diego Calif* 55, 310–317.

Tränkle, C., Weyand, O., Schröter, A., and Mohr, K. (1999). Using a radioalloster to test predictions of the cooperativity model for gallamine binding to the allosteric site of muscarinic acetylcholine M(2) receptors. *Mol. Pharmacol.* 56, 962–965.

Trometer, C., and Falson, P. (2010). Mammalian membrane protein expression in baculovirus-infected insect cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 601, 105–117.

Tsai, J., Lee, J.T., Wang, W., Zhang, J., Cho, H., Mamo, S., Bremer, R., Gillette, S., Kong, J., Haass, N.K., et al. (2008). Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3041–3046.

Vaidehi, N., Grisshammer, R., and Tate, C.G. (2016). How Can Mutations Thermostabilize G-Protein-Coupled Receptors? *Trends Pharmacol. Sci.* 37, 37–46.

Vallano, A., Fernandez-Duenas, V., Pedros, C., Arnau, J.M., and Ciruela, F. (2011). An update on adenosine A2A receptors as drug target in Parkinson's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 10, 659–669.

Vedel, L., Bräuner-Osborne, H., and Mathiesen, J.M. (2015). A cAMP Biosensor-Based High-Throughput Screening Assay for Identification of Gs-Coupled GPCR Ligands and Phosphodiesterase Inhibitors. *J. Biomol. Screen.* 20, 849–857.

Venkitakrishnan, R.P., Benard, O., Max, M., Markley, J.L., and Assadi-Porter, F.M. (2012). Use of NMR Saturation Transfer Difference Spectroscopy to Study Ligand Binding to Membrane Proteins. In *Membrane Protein Structure and Dynamics*, N. Vaidehi, and J. Klein-Seetharaman, eds. (Totowa, NJ : Humana Press), pp. 47–63.

Verheij, M.H.P., de Graaf, C., de Kloe, G.E., Nijmeijer, S., Vischer, H.F., Smits, R.A., Zuiderveld, O.P., Hulscher, S., Silvestri, L., Thompson, A.J., et al. (2011). Fragment library screening reveals remarkable similarities between the G protein-coupled receptor histamine H4 and the ion channel serotonin 5-HT3A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 5460–5464.

Vieth, M., and Sutherland, J.J. (2006). Dependence of Molecular Properties on Proteomic Family for Marketed Oral Drugs. *J. Med. Chem.* 49, 3451–3453.

Vieth, M., Siegel, M.G., Higgs, R.E., Watson, I.A., Robertson, D.H., Savin, K.A., Durst, G.L., and Hipskind, P.A. (2004). Characteristic Physical Properties and Structural Fragments of Marketed Oral Drugs. *J. Med. Chem.* 47, 224–232. Visegrády, A., and Keserű, G.M. (2013). Fragment-based lead discovery on G-protein-coupled receptors. *Expert Opin. Drug Discov.* 8, 811–820.

Wacker, D., Stevens, R.C., and Roth, B.L. (2017). How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell* 170, 414–427.

Wild, C., Cunningham, K.A., and Zhou, J. (2014). Allosteric Modulation of G Protein-Coupled Receptors : An Emerging Approach of Drug Discovery. *Austin J. Pharmacol. Ther.* 2.

Williams, C. (2004). cAMP detection methods in HTS : selecting the best from the rest. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 125–135.

Wootten, D., Christopoulos, A., and Sexton, P.M. (2013). Emerging paradigms in GPCR allostery : implications for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 630–644.

Ye, L., Van Eps, N., Zimmer, M., Ernst, O.P., and Scott Prosser, R. (2016). Activation of the A2A adenosine G-protein-coupled receptor by conformational selection. *Nature* 533, 265–268.

Ye, L., Neale, C., Sljoka, A., Lyda, B., Pichugin, D., Tsuchimura, N., Larda, S.T., Pomès, R., García, A.E., Ernst, O.P., et al. (2018). Mechanistic insights into allosteric regulation of the A2A adenosine G protein-coupled receptor by physiological cations. *Nat. Commun.* 9.

Yong, K.J., Vaid, T.M., Shilling, P.J., Wu, F.-J., Williams, L.M., Deluigi, M., Plückthun, A., Bathgate, R.A.D., Gooley, P.R., and Scott, D.J. (2018). Determinants of Ligand Subtype-Selectivity at α 1A -Adrenoceptor Revealed Using Saturation Transfer Difference (STD) NMR. *ACS Chem. Biol.* 13, 1090–1102.

Yoshiura, C., Kofuku, Y., Ueda, T., Mase, Y., Yokogawa, M., Osawa, M., Terashima, Y., Matsushima, K., and Shimada, I. (2010). NMR Analyses of the Interaction between CCR5 and Its Ligand Using Functional Reconstitution of CCR5 in Lipid Bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 6768–6777.

Yu, S.M., McQuade, D.T., Quinn, M.A., Hackenberger, C.P., Krebs, M.P., Polans, A.S., and Gellman, S.H. (2000). An improved tripod amphiphile for membrane protein solubilization. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 9, 2518–2527. Zartler, E.R., and Shapiro, M.J. (2005). Fragonomics : fragment-based drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9, 366–370.

Zhang, R., and Xie, X. (2012). Tools for GPCR drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* 33, 372–384. Zhang, Q., Tao, H., and Hong, W.-X. (2011). New amphiphiles for membrane protein structural biology. *Methods* 55, 318–323.