

Identification et caractérisation de modulateurs allostériques de protéines membranaires par chromatographie d'affinité ultra-miniaturisée.

Mots Clés : Santé – Chromatographie d'affinité- Interactions moléculaires – allostérie- approche analytique pluridisciplinaire

Contexte :

Les protéines membranaires constituent l'une des trois principales classes de protéines et représentent environ 30% du protéome. Elles assurent des fonctions extrêmement variées et représentent des cibles thérapeutiques à fort potentiel. La conception de nouveaux candidats médicaments ciblant ces protéines représente un véritable défi en raison de plusieurs difficultés inhérentes à cette classe de protéines. La première difficulté est liée aux difficultés de production de ces protéines et à leur très faible stabilité en dehors de leur membrane d'origine. La seconde est liée à l'existence, pour une même protéine, de multiples voies de signalisation : les ligands orthostériques (composés ciblant le site principal d'interaction) classiquement identifiés se révèlent souvent inutiles en thérapeutique compte tenu de leur manque de sélectivité et/ou de spécificité d'action (activation simultanée de plusieurs voies de signalisation).

Ce constat montre la nécessité de **concevoir des ligands dits « alternatifs » comme les ligands allostériques** (ligands dont le site de fixation est différent du site de fixation du substrat et qui modulent son activité) **ou les ligands bitopiques** ciblant simultanément le site orthostérique et le site allostérique. Ces nouveaux ligands présentent une sélectivité accrue et sont capables d'activer sélectivement certaines voies de signalisation spécifiques. Néanmoins, la conception de tels ligands est souvent difficile car les méthodes classiques reposent généralement sur un criblage d'activité de ligands sur système cellulaire, non applicable à l'identification de tels ligands de faible affinité dans des phases précoces de développement.

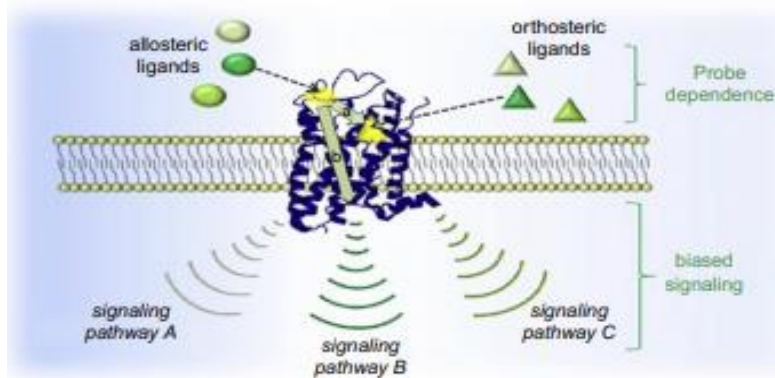


Figure 1: schematic GPCR signal transduction- Allosteric modulators can modulate binding affinity (Path b), and/or efficacy (Path b) of orthosteric ligands in a positive (PAM), negative (NAM) or simply occupy the site inducing no downstream activity (SAM). The modulation is often reciprocally affected by the specific orthosteric ligand (probe dependence) and can potentially alter receptor activation of specific signalling pathways (biased signalling)

Si certaines méthodes biophysiques (RMN, SPR) ont fait leur preuve dans le domaine de l'identification de ligands ciblant le site allostérique de protéines solubles, des méthodes compatibles avec l'étude des protéines membranaires restent à développer. De telles méthodes doivent permettre de **travailler sur des protéines entières natives** (non mutées, non tronquées) dont la **liberté conformationnelle** doit être conservée car le mode d'action des ligands allostériques implique des changements conformationnels. Ces méthodes doivent permettre, en outre, une **réduction drastique des quantités de protéine consommées** compte tenu des difficultés de production de ces protéines membranaires dans des environnements biomimétiques.

Projet de thèse :

L'équipe Techsep a développé une nouvelle **technologie ultra-miniaturisée de chromatographie de faible affinité** (nano-WAC) permettant d'identifier des ligands de faible affinité ciblant des protéines membranaires. Cette approche repose sur l'élaboration de colonnes chromatographiques d'affinité au format capillaire, sur lesquelles la protéine cible est immobilisée le biais d'une membrane biomimétique. Cette nouvelle technologie peut être utilisée pour identifier et analyser ces interactions allostériques. De par son extrême miniaturisation et la possibilité de réutiliser les récepteurs membranaires immobilisés, cette technique permet une réduction considérable des quantités de récepteur nécessaires.

L'objectif de ce projet est de (i) **définir les meilleures stratégies de mise en évidence d'allostérie en WAC** (types d'expériences permettant de mettre en évidence et de quantifier l'effet coopératif positif ou négatif de ces ligands sur les ligands orthostériques, (ii) **choisir le meilleur type de membrane biomimétique** (nanodiscs, prtéoliposomes ou SMALPs) garantissant la liberté conformationnelle de ces récepteurs dynamiques (ii) et de (iii) **démontrer le potentiel de cette nouvelle approche** pour l'identification de ligands allostériques de protéines membranaires.

La preuve de concept de cette nouvelle approche sera établie sur un GPCR modèle (récepteur couplé aux protéines G) -A2A- représentant la plus grande classe de récepteurs membranaires, puis le concept sera étendu à un autre récepteur à haut potentiel thérapeutique, la GHSR, impliquée dans de nombreux désordres métaboliques obésité, cachexie.

Collaboration : Ce travail sera réalisé en collaboration avec d'autres équipes spécialisées dans l'expression de protéines membranaires (Impress Strasbourg) et de pharmacologie cellulaire (IBMM Montpellier).

Equipe Technique Séparative de l'[Institut des Sciences analytiques de Lyon](http://www.isa-lyon1.fr) (ISA - Lyon 1)

Directeur de thèse : [Claire Demesmay@univ-lyon1.fr](mailto:Claire.Demesmay@univ-lyon1.fr)

Identification and characterization of allosteric modulators of membrane proteins by ultra-miniaturized affinity chromatography.

Key words: health – affinity chromatography- molecular interactions – allostery- analytical multidisciplinary approach

Context:

Membrane proteins are one of the three main classes of proteins and make up about 30% of the proteome. They perform extremely various functions and represent high potential therapeutic targets. The design of new drug candidates targeting these proteins represents a real challenge due to several difficulties inherent to this class of proteins.

The first issue is related to the difficulties in producing these proteins and to their very low stability outside their original membrane (cellular membrane). The second issue is related to the existence, for the same protein, of multiple signaling pathways. Orthosteric ligands (compounds targeting the main site of interaction) often prove to be useless in therapy given their lack of selectivity and / or specificity of action (simultaneous activation of several signaling pathways). This emphasizes the **need to design so-called “alternative” ligands such as allosteric ligands** (ligands whose binding site is different from the binding site of the substrate and which can provide robust modulation effects that span from the positive to the negative) or **bitopic ligands** simultaneously targeting the orthosteric site and the allosteric one. These new ligands exhibit increased selectivity and are able to selectively activate specific signaling pathways or modulate existing ones.

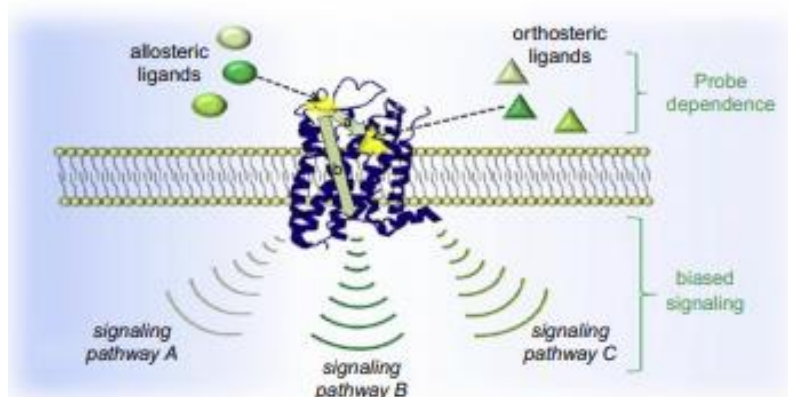


Figure 1: schematic GPCR signal transduction- Allosteric modulators can modulate binding affinity (Path a), and/or efficacy (Path b) of orthosteric ligands in a positive (PAM), negative (NAM) or simply occupy the site inducing no downstream activity (SAM). The modulation is often reciprocally affected by the specific orthosteric ligand (probe dependence) and can potentially alter receptor activation of specific signalling pathways (biased signalling)

However, the design of such ligands is often difficult because conventional methods used for ligand identification generally rely on activity screening of ligands on the cellular system and are not applicable to the identification of such low affinity allosteric ligands in early stages of development. While several biophysical methods (NMR, SPR) have proved their potential for the identification of ligands targeting the allosteric site of soluble proteins, methods compatible with the study of membrane proteins remain to be developed. Such methods should allow working on **native proteins** (wild type protein : not mutated, not truncated) whose **conformational freedom** must be preserved because the mode of action of allosteric ligands involves conformational changes. These methods should also allow a **drastic reduction of the protein consumption**, given the difficulties in producing these membrane proteins in biomimetic environments.

Project

The Techsep team has developed a new, ultra-miniaturized Low Affinity Chromatography (nano-WAC) technology to identify low affinity ligands targeting membrane proteins. This approach is based on the development of capillary-format affinity chromatography columns, on which the target protein is immobilized through a **biomimetic membrane**.

The objective of this project is to (i) **define the best strategies for the identification of allosteric ligands in WAC** (designing of experiments to highlight and quantify the positive or negative cooperative effect of these ligands on orthosteric ligands), (ii) **choose the best type of biomimetic membrane** (nanodiscs, proteoliposomes or SMALPs) guaranteeing the conformational freedom of these dynamic receptors and (iii) **demonstrate the potential of this new approach** for the identification of allosteric ligands of membrane proteins.

The proof of concept of this new approach will be established on a model GPCR (receptor coupled to G proteins) -A2A- representing the largest class of membrane receptors. Then, the concept will be extended to another receptor with high therapeutic potential, GHSR, involved in many metabolic disorders obesity, cachexia ..).

Collaboration

This work will be carried out in collaboration with other teams specializing in the expression of membrane proteins (Impress Strasbourg) and cell pharmacology (IBMM Montpellier).

Separative methods from [Institut des Sciences analytiques de Lyon \(ISA - Lyon 1\)](http://www.isa-lyon1.fr)

Thesis director : Claire Demesmay : demesmay@univ-lyon1.fr