



Développement d'une nouvelle approche de criblage et de caractérisation d'interactions ligand-protéine membranaire par chromatographie de faible affinité miniaturisée

Lucile Lecas

► To cite this version:

Lucile Lecas. Développement d'une nouvelle approche de criblage et de caractérisation d'interactions ligand-protéine membranaire par chromatographie de faible affinité miniaturisée. Chimie analytique. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1279 . tel-02500773

HAL Id: tel-02500773

<https://theses.hal.science/tel-02500773>

Submitted on 6 Mar 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.

N°d'ordre NNT :
2019LYSE1279



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 206
Chimie de Lyon

Spécialité de doctorat : Chimie
Discipline : Chimie Analytique

Soutenue publiquement le 13/12/2019, par :
Lucile Lecas

**Développement d'une nouvelle approche de
criblage et de caractérisation d'interactions
ligand-protéine membranaire par
chromatographie de faible affinité miniaturisée**

Devant le jury composé de :

Mme PICHON, Valérie	Rapporteure
Professeure des Universités, ESPCI Paris	
M. PEYRIN, Éric	Rapporteur
Professeur des Universités, Université Grenoble Alpes	
Mme PERRIN, Catherine	Examinateuse
Professeure des Universités, Université de Montpellier	
M. LEMOINE, Jérôme	Examinateur
Professeur des Universités, Université Claude Bernard Lyon 1	
Mme DEMESMAY, Claire	Directrice de thèse
Professeure des Universités, Université Claude Bernard Lyon 1	
M. DUGAS, Vincent	Co-directeur de thèse
Maître de Conférences, Université Claude Bernard Lyon 1	
Mme KRIMM, Isabelle	Invitée
Chargeée de Recherche CNRS, Lyon	
M. WAGNER, Renaud	Invité
Ingénieur de Recherche CNRS, Strasbourg	

DIRECTEURS DE COMPOSANTES ET LABORATOIRE D'ACCUEIL

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Fabrice VALLEE
Directeur Général des Services	M. Damien VERHAEGHE

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon-Est – Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
UFR d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département de Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
UFR – Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR STAPS	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieur de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : M. Bernard BIGOT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurances ESPE	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
	Administrateur provisoire : M. Pierre CHAREYRON

LABORATOIRE D'ACCUEIL

Institut des Sciences Analytiques UMR5280 5 rue de la Doua 69100 Villeurbanne	Directeur : M. Christophe MORELL
---	----------------------------------

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Mme Valérie Pichon et M. Éric Peyrin pour avoir accepté de rapporter ce travail, ainsi que Mme Catherine Perrin, M. Jérôme Lemoine, Mme Isabelle Krimm et M. Renaud Wagner pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je voudrais remercier particulièrement ma directrice de thèse, Mme Claire Demesmay, pour toutes ses connaissances, sa disponibilité et toute l'énergie et le dynamisme qu'elle a apporté à ce projet. Plus personnellement, je la remercie pour sa confiance et son soutien qui ont beaucoup comptés dans les moments parfois difficiles de la recherche.

Merci également à M. Vincent Dugas, son implication et ses idées ont largement contribués à la réussite de ce projet. Merci également pour ses conseils, sa bonne humeur et son optimisme dont nous avons parfois manqué.

Je remercie toutes les personnes qui ont participé à ce projet : les stagiaires, Léa, Aurélien, et une mention particulière pour Émeline, merci pour ton investissement et ta persévérance à toute épreuve. Mmes Isabelle Krimm, Béatrice Brion et Claire Raingeval pour leurs précieux conseils et l'aide qu'elles nous ont apportée. Merci également à M. Renaud Wagner et son équipe pour leur contribution, indispensable à la réussite de ce projet.

Je souhaiterais ensuite remercier chaleureusement mes collègues et amis : Maria, qui m'a guidée dès mon arrivée, merci pour ta gentillesse, tes conseils et ta joie de vivre au quotidien ; Huian, merci pour ton soutien et pour ta curiosité qui a souvent amenée des anecdotes très drôles. Coraline, Lucie, et plus généralement toute l'équipe TechSép, Jérôme, Agnès, Fabienne, merci pour votre accueil et pour les bons moments passés ensemble.

Je remercie particulièrement Mme Florence Guillère pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses conseils aussi bien pour mon projet de thèse que pour l'enseignement.

Un grand merci à toutes les personnes avec qui j'ai partagé d'agréables moments pendant ces trois ans, Marie, Laura, Léa, Julien, Xavier, Quentin, Fériel, Sarah, Claire et tous ceux avec qui j'ai pu échanger ici.

Merci également à mes collègues à CPE : Sébastien, Claire, Michèle, Sandrine, Anne et particulièrement Richard pour toutes ses anecdotes qui ont égayées les heures de TP.

Mes plus chaleureux remerciements sont destinés à mes proches qui m'ont soutenu pendant ces trois ans. Mes parents, merci de m'avoir permis d'arriver jusque-là, mes frères et sœurs et particulièrement Julie, merci d'avoir toujours cru en moi. Les lyonnaises, Flore-Ève, Lyse, Coralie, merci pour votre amitié et pour m'avoir changé les idées quand j'en avais besoin. Merci à tous, votre soutien inconditionnel et votre amour m'ont été essentiels.

Enfin, je souhaiterais conclure ces remerciements par une pensée toute particulière pour Thibaut que j'aime tant, merci d'avoir su m'écouter, me comprendre et me soutenir en toutes circonstances.

TABLE DES MATIÈRES

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	6
PRINCIPAUX ACRONYMES	8
INTRODUCTION	11
CHAPITRE I : DU DRUG DISCOVERY AU CRIBLAGE DE FRAGMENTS	15
1. LE DRUG DISCOVERY UN PROCESSUS LONG ET COMPLEXE.....	15
1.1. Identification de la cible	16
1.2. Recherche, validation et sélection de « hits ».....	16
1.3. De « hit » à « lead » et optimisation	17
2. LES DIFFÉRENTES APPROCHES EN DRUG DISCOVERY	17
2.1. CADD : Computer-Assisted Drug Discovery.....	17
2.2. High Throughput Screening HTS.....	19
2.3. Fragment-Based Drug Discovery FBDD	21
3. LE PROCESSUS DE FBDD : DU FRAGMENT AU CANDIDAT MÉDICAMENT	23
3.1. Élaboration et optimisation de la bibliothèque de fragments à cribler	24
3.2. Les étapes de criblage	25
3.3. Validation des hits et évolution en leads	26
3.4. Futur et améliorations pour le FBDD.....	28
4. TECHNIQUES BIOPHYSIQUES UTILISÉES POUR LE CRIBLAGE DE FRAGMENTS EN FBDD	28
4.1. Cristallographie par rayons X	29
4.2. RMN en mode « protein-observed ».....	30
4.3. RMN en mode « ligand-observed ».....	31
4.4. Résonance des Plasmons de Surface (SPR)	33
4.5. Isothermal Titration Calorimetry (ITC)	34
4.6. Thermal Shift Assay TSA (DSF).....	35
4.7. Microscale Thermophoresis (MST).....	36
5. LA CHROMATOGRAPHIE DE FAIBLE AFFINITÉ COMME NOUVEL OUTIL DE CRIBLAGE.....	39
5.1. Pourquoi la chromatographie de faible affinité ?	39
5.2. Les objectifs	40
CHAPITRE II : LA CHROMATOGRAPHIE DE FAIBLE AFFINITÉ	45
1. DE LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ À LA CHROMATOGRAPHIE DE FAIBLE AFFINITÉ	45
2. ANALYSE ZONALE	47
2.1. De la théorie...	47

2.2. ...aux applications de l'analyse zonale.....	48
2.3. Considérations pratiques	55
3. ANALYSE FRONTALE	57
3.1. Quelques points de théorie.....	58
3.2. De la théorie à la pratique : applications de l'analyse frontale.....	63
3.3. Considérations pratiques	68
4. LA CHROMATOGRAPHIE DE FAIBLE AFFINITÉ : UN OUTIL DE CHOIX POUR LE DRUG DISCOVERY ...	69
CHAPITRE III : DÉVELOPPEMENT DE COLONNES D'AFFINITÉ MINIATURISÉES	77
1. LES DIFFÉRENTS TYPES DE COLONNES D'AFFINITÉ	77
1.1. Géométrie.....	77
1.2. Support chromatographique.....	78
1.3. Immobilisation des biomolécules.....	78
2. STRATÉGIE, OPTIMISATION ET RÉSULTATS	81
2.1. Stratégie et design des colonnes d'affinité	81
2.2. Optimisation.....	83
2.3. Résultats	83
<i>Monolith weak affinity chromatography for µg-protein-ligand interaction study</i>	<i>85</i>
<i>Monolith weak affinity chromatography for µg-protein-ligand interaction study – Supplementary material</i>	<i>107</i>
3. OUVERTURE AUX PROTÉINES MEMBRANAIRES.....	110
CHAPITRE IV : LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ POUR L'ÉTUDE DES PROTÉINES MEMBRANAIRES...113	
1. LES PROTÉINES MEMBRANAIRES, UN CHALLENGE ATTRACTIF.....	113
2. L'ÉTAT DE L'ART.....	114
<i>Affinity Chromatography: a powerful tool in drug discovery for investigating ligand/membrane protein interactions.....</i>	<i>116</i>
3. OBJECTIFS ET CHOIX STRATÉGIQUES.....	147
4. LES RÉSULTATS	147
<i>Ultra-miniaturized weak affinity chromatography for ligand identification of nanodiscs-solubilized G-protein coupled receptors</i>	<i>149</i>
<i>Ultra-miniaturized weak affinity chromatography for ligand identification of nanodiscs-solubilized G-protein coupled receptors – Supplementary material</i>	<i>169</i>
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	180
ANNEXE 1 : ÉTUDE DE L'OXYDATION DES DIOLS EN ALDÉHYDES SUR MONOLITH ORGANIQUE GMA-CO-EDMA	187
ANNEXE 2 : BIOTINYULATION DE LA HSA	193
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	202

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

- **Monolith weak affinity chromatography for µg-protein-ligand interaction study**
L. Lecas, J. Randon, A. Berthod, V. Dugas, C. Demesmay,
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 166 (2019) 164–173.
doi: 10.1016/j.jpba.2019.01.012.
- **Ultra-miniaturized weak affinity chromatography for ligand identification of nanodiscs-solubilized G-protein coupled receptors**
L. Lecas, L. Hartman, L. Caro, S. Mohamed-Bouteben, C. Raingeval, I. Krimm, R. Wagner,
V. Dugas, C. Demesmay
Analytical Chemistry. Soumise
- **Affinity Chromatography: a powerful tool in drug discovery for investigating ligand/membrane protein interactions**
L. Lecas, V. Dugas, C. Demesmay
À soumettre

COMMUNICATIONS ORALES

- **Club jeune AFSEP, Montpellier, 14/11/2017**
Chromatographie de Faible Affinité miniaturisée pour le criblage de fragments en drug discovery
- **Journée de l'École Doctorale de Chimie, Lyon, 24/04/2018**
Miniaturized weak affinity chromatography for fragments screening in drug discovery
- **DA-PBA2018: 11th International Symposium on Drug Analysis and 29th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Leuven (Belgique), 11/09/2018**
Nano-Weak Affinity Chromatography for µg-protein-ligand interaction study
- **Journée des doctorants ISA, 31/01/2019**
Nano-Weak Affinity Chromatography: a relevant method for Fragment-Based Drug Discovery
- **13^{ème} Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les Couplages de l'AFSEP (SEP2019), Paris, 28/03/2019**
Chromatographie de faible affinité miniaturisée : un outil de choix pour le drug discovery
- **26th International Symposium on Electroseparation and Liquid Phase Separation Techniques (ITP2019), Toulouse, 03/09/2019**
Ultra-miniaturized weak affinity chromatography for protein-ligand interaction study: application to membrane proteins, targets of high pharmaceutical interest

POSTERS

- **12^{ème} Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les Couplages de l'AFSEP (SEP2017), Paris, 29-31/03/2017**

Miniaturisation de la Chromatographie de Faible Affinité : Application au criblage de fragments en drug discovery

- **Journée des doctorants ISA, 26/10/2017**

Miniaturisation de la Chromatographie de Faible Affinité : Application au criblage de fragments en drug discovery

- **26th International Symposium on Electroseparation and Liquid Phase Separation Techniques (ITP2019), Toulouse, 01-04/09/2019**

Nano Weak Affinity Chromatography-Mass Spectrometry for µg protein ligand interaction study

PRINCIPAUX ACRONYMES

ACRONYME	SIGNIFICATION	
	ANGLAIS	FRANÇAIS
INTRODUCTION		
FBDD	Fragment-based drug discovery	Développement de médicaments basés sur des fragments
HSA	Human serum albumin	Albumine de sérum humain
CHAPITRE I		
PD	Pharmacodynamics	Pharmacodynamique
PK	Pharmacokinetics	Pharmacocinétique
ADMET	Absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity	Administration, distribution, métabolisme, élimination, toxicité
ARN		Acide ribonucléique
GPCR	G-protein-coupled receptor	Récepteur couplé aux protéines G
LE	Ligand efficiency	Efficacité de liaison
SAR	Structure-activity relationship	Relations structure-activité
CADD	Computer-assisted drug discovery	Développement de médicaments assisté par ordinateur
HTS	High throughput screening	Criblage haut débit
VHTS	Virtual high throughput screening	Criblage haut débit virtuel
QSAR	Quantitative structure-activity relationship	Relations structure-activité quantitative
VIH		Virus de l'immunodéficience humaine
RMN		Résonance magnétique nucléaire
FDA	Food and drug administration	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
HAC	Heavy atom count	Nombre d'atomes lourds
ALARM	A La assay to detect reactive molecules	
PAINS	Pan-assay interference compounds	
ITC	Isothermal titration calorimetry	Titrage calorimétrique isotherme
MST	Microscale thermophoresis	Thermophorèse à échelle microscopique
SPR	Surface plasmon resonance	Résonance des plasmons de surface
TSA	Thermal shift assay	Test de dénaturation thermique
DSF	Differential scanning fluorimetry	Fluorimétrie différentielle à balayage
CE	Capillary electrophoresis	Électrophorèse capillaire

DRX	Diffraction des rayons X	
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation	
STD	Saturation transfer difference	
WATER-LOGSY	Water-ligand observed via gradient spectroscopy	
NOE	Nuclear Overhauser effect	Effet Overhauser nucléaire
CHAPITRE II		
HPLC	High performance liquid chromatography	Chromatographie en phase liquide à haute performance
QSSR	Quantitative structure-retention relationship	Relation quantitative structure-rétention
S/N	Signal to noise ratio	Rapport signal sur bruit
BSA	Bovine serum albumin	Albumine de sérum bovin
EIC	Extracted-ion chromatogram	Chromatogramme d'ions extraits
DMSO	Dimethyl sulfoxide	
CHAPITRE III		
GMA	Glycidyl methacrylate	
EDMA	Ethylene dimethacrylate	
CDI	1,1'-carbonyldiimidazole	
DSC	N,N'-disuccinimidyl carbonate	
OT	Open tubular	Tube ouvert
NHS	N-hydroxysuccinimide	
I.D.	Internal diameter	Diamètre interne
PLOT	Porous layer open tubular	
GPTMS	Glycidoxypropyltrimethoxsilane	
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane	
CHAPITRE IV		
CMC	Cell membrane chromatography	Chromatographie sur membrane cellulaire
CMAC	Cell membrane affinity chromatography	Chromatographie d'affinité sur membrane cellulaire
MSP	Membrane scaffold protein	
CONCLUSION		
TOF	Time of flight	Temps de vol
TCM	Traditional Chinese medicine	Médecine traditionnelle chinoise
µTAS	Micro total analytical system	

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Historiquement, le développement de nouveaux composés à visée thérapeutique se faisait par l'identification de l'ingrédient actif dans des remèdes traditionnels ou par le biais de découvertes fortuites, comme pour le cas de la pénicilline. Par la suite, le développement de médicaments s'est fait davantage par le criblage de bibliothèques de molécules synthétiques, de produits ou extraits naturels sur des cellules ou organismes entiers afin d'identifier des composés qui présenteraient un effet thérapeutique désirable : c'est ce que l'on appelle la pharmacologie classique ou « forward pharmacology ». Enfin, plus récemment et grâce notamment au séquençage du génome humain, le criblage est réalisé sur des cibles biologiques isolées et préalablement identifiées comme impliquées dans un processus lié à une pathologie : c'est ce que l'on appelle la pharmacologie inversée ou « reverse pharmacology ». Les molécules ayant de l'affinité pour cette cible seront ensuite testées sur des cellules et organismes vivants pour évaluer leur efficacité (Figure i-1).

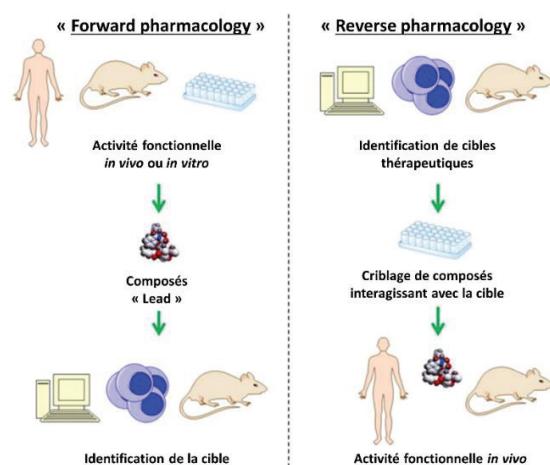


Figure i-1. Déroulement des deux approches en pharmacologie : à gauche la « forward pharmacology » qui consiste à identifier des composés ayant une activité fonctionnelle sur des cellules ou organismes entiers puis d'identifier la cible touchée par la suite. A droite, la « reverse pharmacology » où l'on identifie d'abord la cible qui sera utilisée pour le criblage et les molécules ayant de l'affinité pour cette cible seront ensuite testées sur des organismes. (adaptée de [1])

Ce projet s'inscrit dans la démarche de la pharmacologie inversée, où l'objectif est de cribler des composés sur une cible identifiée. Plus précisément, parmi les différentes approches de criblage possibles, nous nous sommes intéressés au FBDD (Fragment Based Drug Discovery) qui consiste à cribler de petites molécules organiques, appelées fragments, qui n'ont le plus souvent qu'une faible affinité pour la cible compte tenu de leur taille. Ensuite, il s'agit de combiner les touches appelées « hits » et/ou de les faire évoluer afin d'obtenir un candidat médicamenteux de forte affinité et spécificité pour la cible étudiée. L'étape de criblage

représente alors un réel challenge car il est nécessaire de disposer de méthodes rapides et fiables capables de détecter de faibles affinités.

L'objectif de ce projet est donc de développer une méthode compétitive et complémentaire aux techniques existantes afin de cibler un maximum de composés en consommant un minimum de protéine cible. Pour répondre à cet objectif, nous avons décidé de travailler sur la chromatographie de faible affinité : l'immobilisation de la protéine sur la colonne (qui permet la stabilisation de la protéine et la réutilisation de la colonne) et la possibilité de cibler rapidement un mélange de composés sont les principaux atouts de cette technique. Dans l'objectif d'étudier des protéines délicates à produire et à purifier comme les protéines membranaires, il est nécessaire de minimiser encore davantage la quantité de protéine cible nécessaire au criblage : nous avons donc choisi de réaliser le développement de la chromatographie de faible affinité à échelle miniaturisée.

Ce manuscrit commence par la définition du contexte de ce projet, avec une présentation générale du processus de drug discovery et de ses étapes. Les approches computationnelles et le criblage haut débit sont rapidement décrits avant de se focaliser sur le Fragment-Based Drug Discovery (FBDD) pour permettre de bien saisir les atouts mais aussi les difficultés associées à cette stratégie de développement pharmaceutique. L'accent est alors principalement mis sur l'étape de criblage avec la présentation des principales méthodes biophysiques utilisées et la description pour chacune, de ce qui est observé et des informations que l'on peut en tirer. Un tableau comparatif de ces méthodes de criblage nous a ensuite aidé à préciser les besoins essentiels pour des techniques complémentaires et nous a donc permis de définir le cahier des charges de ce projet et d'en fixer clairement les objectifs.

Le second chapitre est destiné à présenter la chromatographie de faible affinité. Contrairement à la chromatographie d'affinité classique qui fait appel à des interactions fortes dans le but de purifier des composés, il s'agit ici d'étudier des interactions de plus faible affinité entre une protéine et des ligands à travers l'établissement d'un équilibre dynamique. Les deux modes d'élution (à savoir l'analyse zonale et l'analyse frontale) sont ensuite détaillés dans ce chapitre : les aspects théoriques dans un premier temps suivis de leurs applications principales illustrées par des exemples de la littérature et enfin quelques considérations pratiques à prendre en compte lors du développement de cette technique. Cette partie nous a permis de comparer la chromatographie de faible affinité aux autres techniques biophysiques et de mettre en avant ses atouts pour le criblage de fragments en FBDD.

La troisième partie porte sur le développement de la chromatographie de faible affinité et plus précisément sur l'élaboration des colonnes d'affinité qui sont au cœur de la technique. Afin d'élaborer la stratégie à adopter, les différents types de colonnes (géométries, phases stationnaires) et les voies de biofonctionnalisation que l'on peut retrouver dans la littérature ont été étudiés. Compte tenu des objectifs

et du savoir-faire de l'équipe, l'approche retenue a pu être clairement définie : travail à l'échelle capillaire en vue de la réduction de la consommation de protéine, choix de supports monolithiques en combinaison avec trois voies de greffage différentes. Les résultats obtenus sur protéine modèle (HSA, human serum albumin) sont présentés sous forme de publication intitulée « *Monolith weak affinity chromatography for µg-protein-ligand interaction study* ». La fin de cet article présente l'application de la technique sur une seconde protéine soluble d'intérêt pharmaceutique.

Enfin, le quatrième et dernier chapitre est consacré à l'étude des interactions ligand/protéines membranaires par chromatographie de faible affinité. Ici aussi, une étude bibliographique a permis de mieux comprendre la complexité de ces cibles spécifiques et de préciser les conditions dans lesquelles celle-ci peuvent être étudiées et le type d'information auquel il est possible d'accéder. Cette étude est présentée dans la revue intitulée « *Affinity Chromatography: a powerful tool in drug discovery for investigating ligand/membrane protein interactions* ». À l'issue de cette étude, le récepteur A_{2A} de l'adénosine (AA_{2AR}) stabilisé dans une membrane biomimétique de type nanodisque a été choisi comme modèle d'étude. Ces travaux sont présentés dans l'article « *Ultra-miniaturized weak affinity chromatography for ligand identification of nanodiscs-solubilized G-protein coupled receptors* ».

CHAPITRE I :

DU DRUG DISCOVERY AU

CRIBLAGE DE FRAGMENTS

CHAPITRE I : DU DRUG DISCOVERY AU CRIBLAGE DE FRAGMENTS

1. LE DRUG DISCOVERY UN PROCESSUS LONG ET COMPLEXE

Le développement de médicaments est un processus extrêmement long (jusqu'à 15 ans), complexe et coûteux (plus d'un milliard de dollars). Un programme de drug discovery est mis en place parce qu'une maladie ou un état clinique ne dispose pas de traitement efficace. C'est donc ce besoin clinique non satisfait qui est le plus souvent la source d'un nouveau projet.

La première étape consiste à réaliser une étude pour comprendre que l'activation ou l'inhibition d'une protéine ou d'un processus biologique aura un effet thérapeutique sur un état pathologique. Il s'agit donc ici d'identifier la cible thérapeutique d'intérêt. Ensuite, une fois la cible validée, vient l'étape du « lead discovery », où l'objectif est de trouver une molécule interagissant avec la cible, de l'améliorer pour ensuite pouvoir la tester en préclinique. L'enjeu principal de la phase préclinique est de déterminer les doses à administrer ainsi que la toxicologie, cela à travers des études pharmacodynamiques (les effets du composé sur l'organisme, noté PD), pharmacocinétiques (les effets de l'organisme sur le composé, noté PK) et ADMET (absorption, distribution, métabolisme, excréition et toxicologie). Si les résultats sont concluants sur des modèles animaux, le candidat médicament peut alors entrer en phase clinique et être testé sur l'humain [1,2]. Avec un succès dans les phases cliniques d'environ seulement 5% [3], il est primordial d'optimiser toutes les étapes du processus. La Figure I-1 reprend ces différentes étapes, en précisant leur durée moyenne et le nombre de composés impliqués.

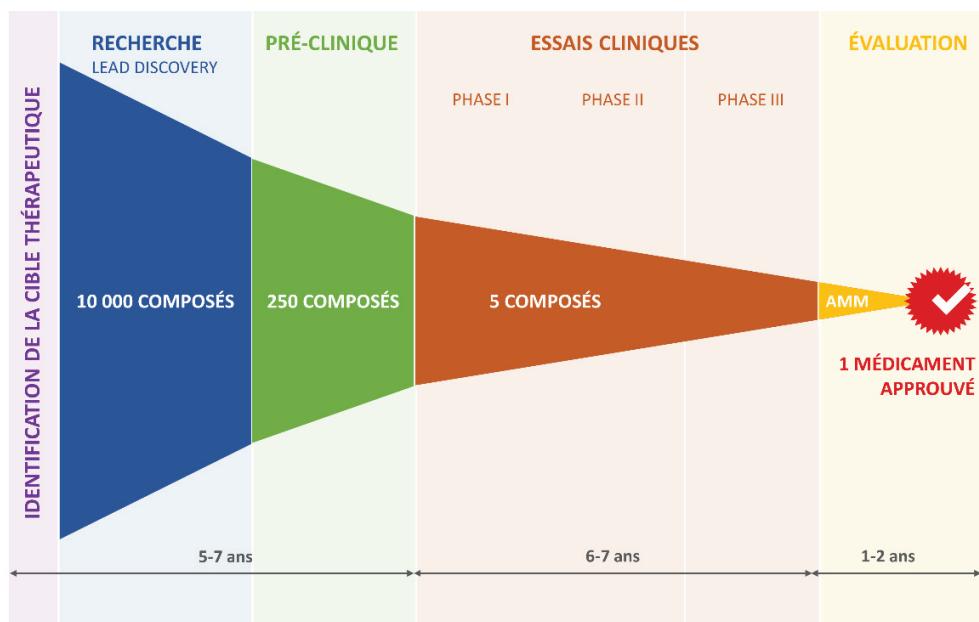


Figure I-1. Processus de développement d'un nouveau médicament, de l'identification de la cible à l'autorisation de mise sur le marché, avec les durées approximatives et le nombre de composés impliqués.

1.1. Identification de la cible

Une cible thérapeutique peut correspondre à une variété d'entités biologiques comme des protéines, des gènes ou encore de l'ARN. Pour choisir une cible, il faut s'assurer qu'elle soit « druggable », c'est-à-dire qu'elle possède une poche (souvent profonde et étroite) où le principe actif du médicament développé pourra se lier de façon spécifique avec une forte affinité et que cela induira une réponse biologique mesurable *in vitro* et *in vivo*. La recherche de principe actif est donc souvent orientée dès le départ en fonction de la cible choisie : on sait par exemple que certaines classes de protéines comme les GPCR (G-protein-coupled receptor) sont plus sensibles aux petites molécules tandis que les interactions protéine-protéine sont plus efficacement bloquées par des molécules de taille plus importante comme les anticorps. L'exploitation des données biomédicales disponibles permet d'améliorer le processus d'identification de cibles thérapeutiques. En effet, l'utilisation de la bio-informatique facilite non-seulement l'identification mais aussi la sélection et la priorisation de cibles potentielles. Une fois identifiée, la cible doit être validée en étant intégralement étudiée (essais *in vitro*, modèles animaux, ...), l'idéal étant de confirmer son intérêt par plusieurs analyses différentes.

1.2. Recherche, validation et sélection de « hits »

Différentes méthodes de criblage sont ensuite mises en place pour identifier des molécules appelées « hits » qui interagissent avec la cible thérapeutique. Quand un certain nombre de hits a été identifié, il s'agit ensuite de décider quels composés sont les plus intéressants pour poursuivre le développement. Les composés indésirables sont retirés (ceux qui ont tendance à se lier à tout) et les hits sont étudiés avec des

méthodes computationnelles (modélisation informatique) permettant de sélectionner uniquement les plus prometteurs, principalement en termes d'activité et d'efficacité de liaison (« ligand efficiency » ou LE, voir paragraphe 3. pour plus de détails). Il est également intéressant de réaliser des courbes dose/réponse et de ne conserver que les composés qui se lient réversiblement à la cible car ils seront plus facilement éliminés par l'organisme après l'arrêt du médicament. Un second type d'essai est ensuite souvent mis en place pour confirmer les hits restants. Les méthodes comme l'approche SAR (structure-activity relationship) permettent de regrouper les hits selon la structure probablement responsable de l'activité puis des premiers tests *in vitro* sont réalisés pour avoir des données physicochimiques, ADME et PK.

1.3. De « hit » à « lead » et optimisation

L'objectif ensuite est d'améliorer les hits sélectionnés afin d'obtenir des composés avec de meilleures propriétés (activité, sélectivité, PK). Des études SAR poussées sont réalisées sur les composés et les aspects solubilité et perméabilité sont également pris en compte pour avoir un bon candidat médicament. Les composés satisfaisant les critères de sélection sont ensuite testés sur des modèles *in vivo* pour des tests de stabilité, PK et PD avant de pouvoir être envoyés en phase clinique.

Pour résumer, le processus de drug discovery consiste à choisir une cible, identifier des composés qui s'y lient, sélectionner les plus intéressants et les optimiser pour obtenir le principe actif d'un médicament. Il est donc primordial dès le début du processus de disposer d'outils fiables, rapides et peu coûteux pour cribler au maximum l'espace chimique et ainsi identifier les molécules de départ les plus prometteuses pour le développement d'un nouveau médicament. Pour cette première étape, différents outils sont actuellement utilisés en recherche pharmaceutique. Les approches computationnelles appelées **CADD** (computer-assisted drug discovery) secondent le plus souvent les deux autres approches de criblage : le **HTS** ou criblage haut débit (high throughput screening) et le criblage à partir de petites molécules **FBDD** (fragment-based drug discovery).

2. LES DIFFÉRENTES APPROCHES EN DRUG DISCOVERY

2.1. CADD : Computer-Assisted Drug Discovery

Avec l'augmentation exponentielle du nombre de cibles pour les nouveaux médicaments, les approches computationnelles sont de plus en plus appliquées pour accélérer et assister le processus de drug discovery. Il existe différentes méthodes de calcul pour créer des modèles mathématiques, cribler des bibliothèques de composés, imaginer de nouveaux composés ou améliorer les propriétés de ceux déjà identifiés, certaines basées sur les ligands, d'autres sur la structure de la cible ou les deux.

Premièrement, il existe ce qu'on appelle le **vHTS** (virtual High Throughput Screening) qui permet d'étudier les affinités d'une cible avec une bibliothèque de composés à travers une fonction qui prédit le meilleur ajustement électrostatique entre les deux. Cette méthode est complémentaire avec le HTS et a montré qu'elle permet, par exemple, de diminuer le nombre de faux positifs dans une campagne de criblage [4].

Il est également possible de modéliser plus précisément le **pharmacophore**, c'est-à-dire la partie du principe actif responsable de son activité biologique. Ainsi, on réalise une description géométrique des fonctionnalités chimiques requises pour qu'un ligand interagisse avec un récepteur. Initialement appliquée à la découverte de nouvelles molécules, cette méthode peut également servir à l'optimisation des molécules leads [5,6].

En se focalisant sur les ligands, il existe l'approche **QSAR** (quantitative structure-activity relationship), qui a pour but de corréler structure chimique et activité en utilisant une approche statistique. Les modèles QSAR sont donc utilisés en drug discovery pour prévoir l'activité de molécules non-testées. Avec l'avancée de cette méthode, les applications se diversifient et la toxicologie peut à présent être étudiée via ces modèles [7].

A l'inverse, en se basant sur la structure de la cible thérapeutique, il est possible de faire du **docking** qui consiste à prédire la structure du complexe ligand-récepteur à l'aide de calculs. Cette approche peut être utilisée pour modéliser l'interaction entre une petite molécule et une protéine au niveau atomique. Elle permet de caractériser le comportement de petites molécules au sein du site d'interaction des cibles ainsi que d'élucider certains processus biochimiques [8]. Enfin, l'approche **de novo** (Figure I-2) utilise également la structure 3D de la cible cette fois pour designer de nouvelles molécules thérapeutiques. Il est donc nécessaire de bien connaître la cible ainsi que son/ses site(s) d'interaction. Il est également fréquent de faire appel à cette méthode pour optimiser une molécule lead [9].

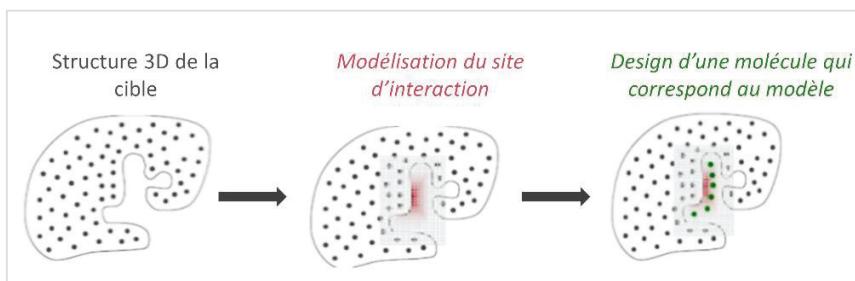


Figure I-2. Schéma de l'approche de novo (tirée de [10]). A partir de la structure 3D de la cible et plus précisément du site d'interaction, des molécules peuvent être élaborées pour correspondre au maximum au modèle.

Ces différents modèles computationnels permettent donc de pré-orienter, de corroborer les résultats ou encore d'améliorer les hits identifiés par les méthodes de criblage HTS ou FBDD.

2.2. High Throughput Screening HTS

Le HTS est un processus industriel qui consiste à tester un grand nombre de molécules sur une cible biologique dans l'objectif d'identifier des molécules qui interagissent avec cette cible. Le concept de criblage haut débit (HTS) est apparu au milieu des années 80 et n'a cessé d'évoluer depuis, se trouvant aujourd'hui au cœur du drug discovery [11].

Avant l'apparition du HTS, le drug discovery se basait sur des composés actifs connus et des modifications étaient apportées par les chimistes pour faire évoluer ces molécules. Les composés étaient ensuite testés sur des cellules entières, des préparations de tissus ou encore sur des modèles animaux. Ce n'est qu'à partir de 1990 que les premières recherches basées sur la structure (structure-based) sont apparues avec les projets sur le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) [12]. En effet, les années 90 ont été révolutionnaires dans l'industrie pharmaceutique. Les avancées en biologie moléculaire ont ouvert la porte à une multitude de nouvelles cibles thérapeutiques et les développements ont dû être de plus en plus rapides tout en diminuant leurs coûts et en augmentant la qualité des candidats médicaments : c'est dans cette dynamique que le HTS a connu son essor le plus marquant.

Le challenge pour les essais de HTS est de mettre en place des méthodes de criblage haut débit, robustes et reproductibles. On recherche ici des molécules possédant déjà une affinité relativement forte pour la cible, ce qui donne accès à des essais basés soit sur l'étude fonctionnelle de la cible soit sur l'affinité cible-ligand. Un grand nombre de tests sont alors envisageables comme l'étude de la croissance cellulaire, de l'activité enzymatique ou de la liaison de ligands, avec différents modes de détection : absorbance, fluorescence, radioactivité,... [11] Les essais sont pour la plupart des « mix and measure », pour faciliter l'automatisation, essentielle en HTS comme illustré sur la Figure I-3.

PRÉPARATION D'ÉCHANTILLON → INCUBATION ET LECTURE DES PLAQUES → ANALYSE DE DONNÉES



Figure I-3. Résumé des étapes du procédé HTS : les essais sont réalisés en microplaques, chaque puit contenant la protéine cible, un composé de la bibliothèque et les réactifs nécessaires à l'essai. Après incubation, un lecteur de plaques permet directement d'identifier les composés ayant interagi avec la protéine.

Il existe l'approche réductionniste où le criblage est réalisé avec une cible isolée et déterminée mais il est également possible de faire un criblage directement en milieu cellulaire, ce qui assure un environnement physiologique pour la cible et potentiellement l'identification de différents mécanismes [13]. Le choix de l'une ou l'autre des approches HTS est beaucoup discuté [14,15] mais elles ont en réalité chacune leurs avantages et inconvénients : lorsque la cible est bien connue et qu'un mécanisme particulier est recherché l'approche réductionniste semble plus intéressante. A l'inverse, si l'objectif est d'identifier des composés avec un nouveau mode d'action ou d'étudier une protéine complexe, alors l'approche en milieu cellulaire peut être plus adaptée.

Basées sur la publication de Lipinski et al. [16] en 1997 avec le concept de la « règle des cinq » (moins de 5 donneurs de liaisons hydrogène et moins de 10 accepteurs, masse molaire inférieure à 500 g.mol⁻¹ et un logP (coefficient de partage octanol/eau) inférieur à 5), les bibliothèques de composés n'ont cessé de s'agrandir et les principales entreprises pharmaceutiques possèdent aujourd'hui des bibliothèques comportant plus de 2 millions de composés.

Quand un essai est validé et que la bibliothèque de composés est optimisée, la campagne de criblage peut commencer. Un essai pilote est souvent réalisé sur quelques milliers de composés avant de cribler la bibliothèque complète. Au cours du temps, le HTS a prouvé son efficacité. En effet, Macarron et al. [17] rapportent que les campagnes HTS affichent un taux de réussite de 48 à 84 % dans l'identification de composés pour démarrer un programme d'optimisation et que 36 à 38 % mènent à la sélection d'un candidat. Si l'on évalue le nombre de médicaments dérivés d'un point de départ identifié par HTS, on arrive à un taux « screen to drug » de 33 %. Cependant, avec l'évolution et la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques, les bibliothèques de composés doivent sans cesse évoluer et inclure de nouvelles espèces

comme par exemple des peptides ou des anticorps, intéressants pour bloquer les interactions protéine-protéine.

Le HTS était la voie la plus répandue dans les années 2000 pour la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques en criblant des bibliothèques contenant plusieurs millions de composés. Mais les chercheurs ont petit à petit réalisé l'immensité de l'espace chimique (une estimation porte à 10^{63} le nombre de potentielles molécules médicaments ou « drug-like molecules») et donc la difficulté à couvrir cet espace [18] d'où l'intérêt de disposer d'autres approches de criblage.

2.3. Fragment-Based Drug Discovery FBDD

A l'inverse du HTS, le FBDD consiste à cibler de petites molécules appelées fragments (contenant souvent moins de 20 atomes lourds) qui permettent de couvrir plus efficacement l'espace chimique. Ces fragments suivent la « règle des trois » [19], par analogie à la règle des cinq de Lipinski. Selon ces critères, une molécule fragment est définie comme une molécule organique de masse moléculaire inférieure à 300 g.mol⁻¹, avec un coefficient de partage octanol/eau (logP) inférieur à 3 et un nombre de donneurs ainsi que d'accepteurs de liaisons hydrogène inférieur à 3. Les bibliothèques de fragments sont composées uniquement de quelques milliers de molécules, soit environ 1000 fois moins que celles utilisées en HTS. En raison de leur simplicité, les fragments n'ont, le plus souvent, qu'une faible affinité pour la cible (avec une constante de dissociation K_d du complexe cible-fragment allant du μM à la dizaine de mM) et constituent un point de départ pour le développement de molécules d'intérêt thérapeutique. La société Abbott a été la première à démontrer la pertinence de cette approche : en utilisant la RMN (résonance magnétique nucléaire) pour détecter les interactions, ils ont identifié deux ligands de faible affinité pour leur cible (environ 20 μM et 17 mM) puis en les combinant ils ont abouti à une molécule de forte affinité avec un K_d de 15 nM [20] (Figure I-4).

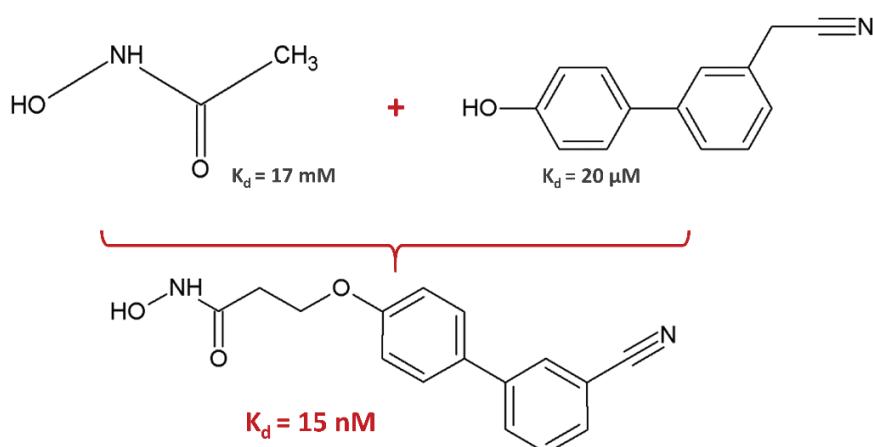


Figure I-4. Exemple de développement par FBDD : la figure présente les structures des deux fragments de départ ayant de faibles affinités pour la cible et de la combinaison des deux aboutissant à une molécule de forte affinité.

Plusieurs dizaines de molécules issues du FBDD ont été envoyées en phase clinique [18], deux étant déjà commercialisées: le Vemurafenib développé par Plexxikon a été approuvé par la FDA (Food and Drug administration) en 2011 puis le Venetoclax (AbbVie, Genentech) a reçu son autorisation de mise sur le marché en 2016.

En couvrant davantage l'espace chimique grâce à de simples et petites molécules, le FBDD a réussi parfois là où le HTS a échoué, notamment concernant les inhibiteurs d'interactions protéine-protéine. Au départ, le FBDD était considéré comme une alternative au HTS mais récemment ces deux approches apparaissent plutôt complémentaires. Certains grands groupes utilisent un mélange des deux comme par exemple Boehringer Ingelheim qui a remplacé par un fragment polaire une partie de sa molécule lead issue du HTS afin d'améliorer ses propriétés physico-chimiques et sa pharmacocinétique [18].

La Figure I-5 illustre bien la différence et donc le potentiel du FBDD comparé au HTS: de petites molécules auront souvent davantage de chances de correspondre précisément au site d'interaction et malgré leur faible affinité il peut se révéler plus commode de les combiner et de les faire évoluer en une molécule plus affine plutôt que de chercher à identifier directement une molécule plus complexe, parmi des milliards de possibilités, qui aurait déjà une forte affinité pour la cible thérapeutique.

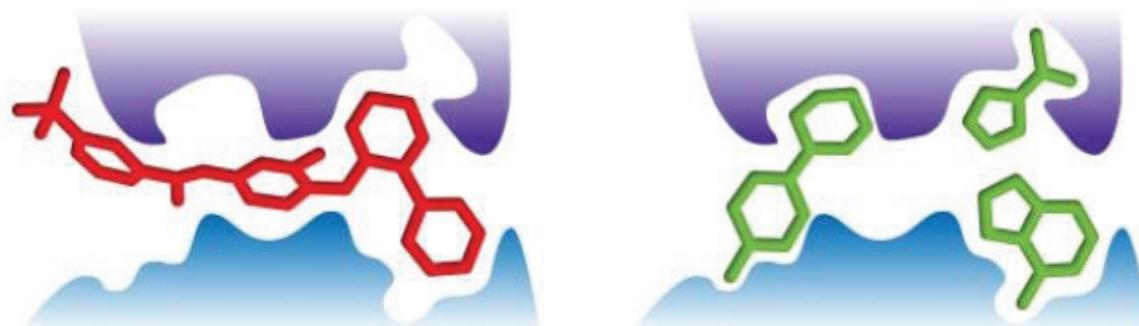


Figure I-5. Comparaison de l'interaction d'une molécule HTS (à gauche) et de fragments (à droite) avec une protéine cible (tirée de [21]). La molécule issue du HTS est de taille plus importante et semble interagir en plusieurs points ce qui induit une affinité relativement élevée pour la cible. Cependant, les fragments coïncident davantage avec les sites d'interaction et la combinaison de plusieurs fragments permet d'aboutir à une molécule de forte affinité et spécificité pour la cible thérapeutique.

Au niveau de la thermodynamique de liaison, il a été rapporté dans la littérature que les fragments se lient en général avec une enthalpie favorable (c'est-à-dire en provoquant une diminution de l'enthalpie d'interaction). De plus, dans le cas de petites molécules, plus l'enthalpie est favorable, plus l'affinité a de chances d'être élevée, ce qui n'est pas toujours vérifié pour les ligands plus gros où la plupart du temps, les efforts pour améliorer l'enthalpie de liaison se font au détriment de l'affinité [22]. C'est donc sur cette approche FBDD que nous allons nous focaliser par la suite.

3. LE PROCESSUS DE FBDD : DU FRAGMENT AU CANDIDAT MÉDICAMENT

Le concept du FBDD a commencé dans les années 90 et les Laboratoires Abbott démontrent pour la première fois en 1996 la détection, le classement et la progressions de ligands de faible affinité par SAR RMN [23]. L'idée de développer des médicaments à partir de petites molécules s'appuie sur deux concepts importants :

- Hann et al. [24] affirment en 2001 que la probabilité qu'un ligand corresponde à un site récepteur augmente considérablement avec une diminution de sa taille,
- Hopkins et al. détaillent en 2004 la notion de « ligand efficiency » ou « LE » [25] qui consiste à normaliser l'affinité par la taille de la molécule pour évaluer la qualité de la liaison:

$$LE = \frac{-\Delta G^\circ}{HAC} = \frac{-RT\ln K_d}{HAC}$$

Avec ΔG° (kcal.mol⁻¹) l'énergie libre standard de liaison, R la constante des gaz parfaits, T la température absolue (K), K_d la constante de dissociation (M) et HAC représente le nombre d'atomes lourds (atomes autres que l'hydrogène) [26]. Grâce à cette formule, on peut donc noter que pour une affinité égale (K_d identique), l'efficacité de la liaison sera d'autant plus importante que la molécule sera petite. Le Tableau I-1 illustre cette relation (nombre d'atomes lourds, K_d et LE). Les cases bleues représentent les tailles retrouvées le plus souvent pour les fragments. On peut alors remarquer que deux fragments avec une affinité respectivement de 1 mM et 100 µM, sont en fait équivalents en termes de LE du fait de la différence du nombre d'atomes lourds (valeurs en jaune).

Tableau I-1. Exemples de valeurs de LE pour différentes affinités et tailles de molécules (les cases bleues représentant les tailles les plus courantes pour les fragments ; adapté de [27])

LE (kcal/mol/HA)	K _d							
	LE	10 mM	1 mM	100 µM	10 µM	1 µM	100 nM	10 nM
0,20	14	20	27	34	41	48	55	
0,30	9	14	18	23	27	32	36	
0,40	7	10	14	17	20	24	27	
0,50	5	8	11	14	16	19	22	
0,60	5	7	9	11	14	16	18	
				HAC				

Le processus du Fragment Based Drug Discovery peut être décomposé en différentes étapes (Figure I-6) :

- 1- Le choix de la cible et l'élaboration de la bibliothèque de fragments à cribler
- 2- Le criblage expérimental des fragments de la bibliothèque
- 3- La validation des hits obtenus et leur évolution en composés plus affins (leads)

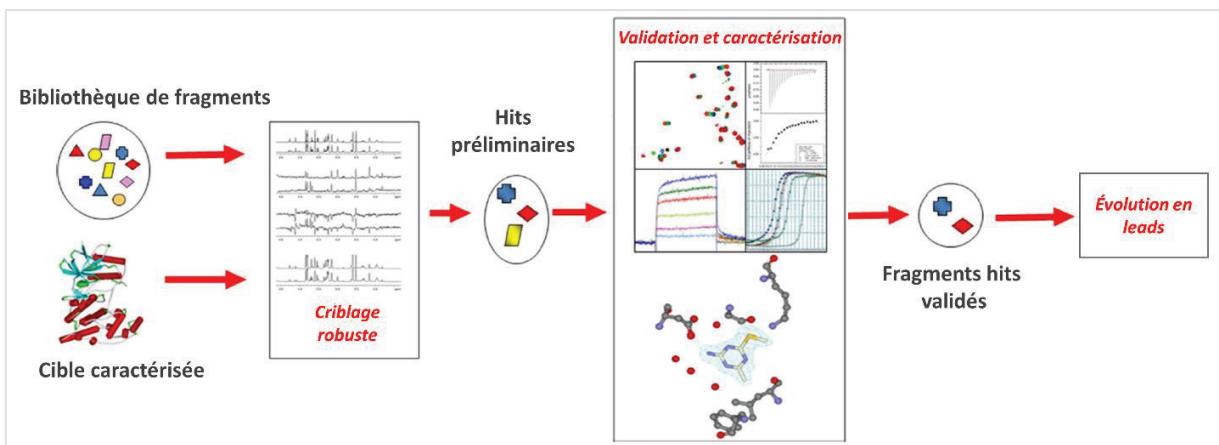


Figure I-6. Processus classique d'une campagne FBDD (adaptée de [27]). La cible thérapeutique et la bibliothèque de fragments représentent le point de départ du processus FBDD. Différentes méthodes de criblage permettent ensuite d'identifier des hits préliminaires. Des analyses plus poussées vont permettre de valider ces hits et de ne conserver que les plus prometteurs pour la suite du développement.

3.1. Élaboration et optimisation de la bibliothèque de fragments à cibler

Comme mentionné précédemment, les fragments qui composent les bibliothèques suivent en général la règle des trois ($< 300 \text{ g.mol}^{-1}$, $\log P < 3$ et donneurs/accepteurs de liaisons hydrogène < 3). Leur taille (paramètre le plus discuté car c'est celui qui différencie principalement cette approche des autres) peut également être définie en termes de nombre d'atomes lourds, généralement inférieur à 20. Plus récemment la tendance est de travailler avec des composés encore plus petits, avec un nombre d'atomes lourds maximal de 17, ce qui a tendance à limiter aussi l'hydrophobilité et donc à favoriser la solubilité en milieu aqueux. En effet, d'autres critères sont aussi à prendre en compte dans le choix des fragments, tels que leur stabilité et leur solubilité en milieu aqueux.

Il est possible d'ajouter des molécules qui dévient légèrement de ces règles mais avec des groupements connus pour se lier aux protéines (les acides carboxyliques ou les biphenyles par exemple). Au contraire, une des choses les plus importantes est d'exclure de la bibliothèque certains composés indésirables : tendance à interagir de manière non-spécifique, composés réactifs modificateurs de liaisons covalentes, chélateurs ou encore les composés qui s'agrègent. On exclura en général les composés qui comportent un accepteur de Michael (composé carbonylé α,β -insaturé de type aldéhyde, cétone, nitrile, amide,...susceptible de subir une addition nucléophile), des fonctions halogénure d'alkyl ou encore époxyde. D'autres filtres servent également souvent à limiter le nombre de liaisons rotatives, de systèmes cycliques ou de molécules trop planes. Enfin, certains tests permettent d'identifier des fragments indésirables comme la méthode appelée ALARM en RMN [28] ou encore le PAINS (pan-assay interference compounds) [29]. De la même façon qu'il est important d'avoir des fragments aussi divers que possible pour couvrir un maximum l'espace chimique, il est aussi intéressant d'avoir plusieurs composés proches

pour détecter d'éventuelles relations structure/activité (SAR). Ainsi, une bibliothèque de fragments peut varier de 500 à 20 000 molécules mais en contient le plus souvent entre 1 000 et 5 000.

3.2. Les étapes de criblage

Pour cribler des fragments contre une cible d'intérêt thérapeutique, il est nécessaire de disposer de techniques assez sensibles pour détecter de faibles affinités ($\mu\text{M} < K_d < \text{mM}$), robustes pour éviter les faux positifs, rapides pour cribler un maximum de composés en un minimum de temps et peu consommatrices en réactifs (en protéine cible principalement puisqu'elle constitue en général le réactif le plus coûteux et délicat à obtenir).

Il existe une grande variété de méthodes biophysiques pour le criblage de fragments, mais en aucun cas les chercheurs ne pourront se satisfaire d'une seule et unique technique. La stratégie est donc, en fonction des forces et limitations de chacune ainsi que des informations qu'elles apportent, de trouver la meilleure combinaison ou cascade de méthodes pour optimiser le criblage [30,31]. La Figure I-7 ci-dessous illustre les principales méthodes utilisées ainsi que le nombre de méthodes par utilisateur. Il est intéressant de noter la croissance voire l'apparition de certaines méthodes en seulement cinq ans (l'ITC ou la MST par exemple), ainsi que l'augmentation du nombre de méthodes par utilisateur qui confirme bien la nécessité de méthodes orthogonales et complémentaires pour le criblage de fragments.

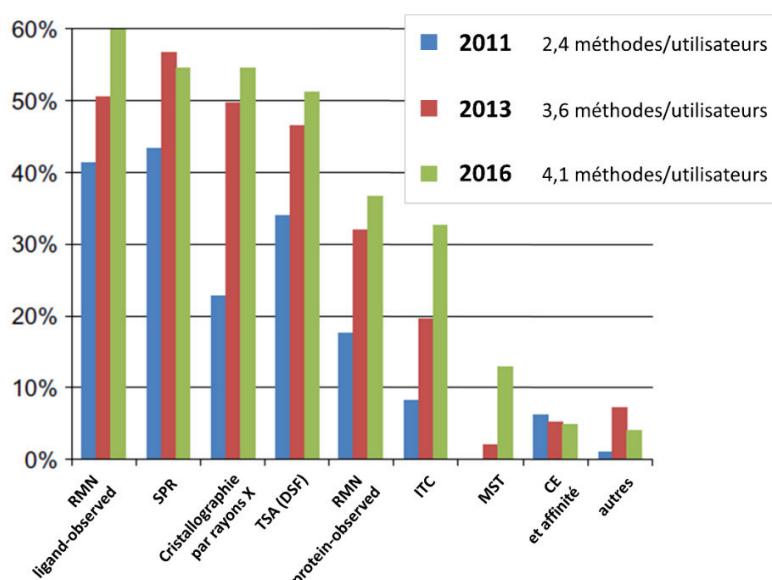


Figure I-7. Pourcentage d'utilisation des différentes méthodes de criblages en recherche pharmaceutique (adaptée de [27]). Réponses collectées auprès de 97 chercheurs, répartis entre laboratoires académiques et privés. En 2011 la RMN ligand-observed et la SPR prédominent avec plus de 40 % d'utilisation par les chercheurs interrogés. La même tendance se retrouve deux ans plus tard en 2013, avec également l'augmentation de la cristallographie et des expériences de thermostabilité des protéines (TSA). D'autres méthodes émergent ensuite comme la titration calorimétrique isotherme (ITC) ou la thermophorèse (MST) avec l'augmentation du nombre de méthodes employées par les chercheurs (plus de 4 méthodes en moyenne par utilisateur en 2016), à la recherche de méthodes de criblage orthogonales pour confirmer les hits.

Les principales méthodes de criblage seront décrites et détaillées par la suite (voir CHAPITRE I :4).

3.3. Validation des hits et évolution en leads

Les faux négatifs (c'est-à-dire des molécules qui interagissent réellement mais que l'on ne détecte pas) étant inévitables, il est préférable de fixer un seuil assez bas et il en résulte inévitablement des faux positifs (c'est-à-dire détecter une interaction qui n'existe pas). Avant d'aller plus loin dans le processus, il est donc important de confirmer les hits préliminaires avec plusieurs méthodes orthogonales. Il est également intéressant d'étudier les composés proches des fragments identifiés, certains pouvant avoir une meilleure affinité ou présenter des caractéristiques plus intéressantes en termes de solubilité ou de toxicité par exemple.

Après avoir validé les hits, il est nécessaire de les faire évoluer en molécules plus affines appelées leads puis éventuellement en candidats médicaments. Il existe différentes approches pour optimiser les hits [32], illustrées tout d'abord schématiquement (Figure I-8) puis avec des exemples concrets (Figure I-9):

- **Croissance de fragment « growing »**

C'est l'approche la plus similaire à la chimie médicinale classique où l'on vient ajouter des groupements au fragment puis tester les molécules qui en résultent dans le but d'augmenter l'efficacité de liaison (LE) en améliorant les interactions du hit avec la cible (K_d).

- **Liaison de fragments « linking »**

Cette approche consiste simplement à lier deux fragments ayant de l'affinité pour deux sites adjacents avec un linker en espérant augmenter l'affinité totale.

- **Fusion de fragments « merging »**

Ici il s'agit également de combiner un fragment avec un autre (ou avec une plus grosse molécule) ayant au moins un atome commun dans leurs modes de liaison respectifs et le « co-binding » n'est donc pas possible dans ce cas.

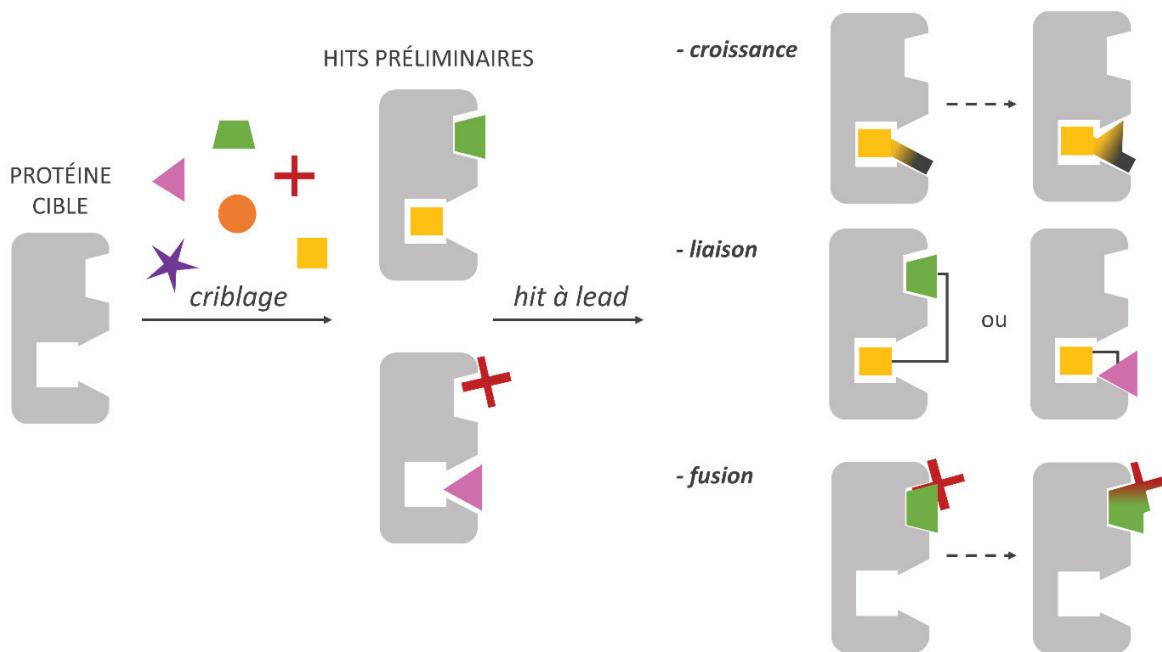


Figure I-8. Description schématique des différentes approches pour optimiser les hits en leads. La croissance consiste à rajouter des groupements pour améliorer l'affinité de la molécule. La liaison consiste à relier deux fragments entre eux à l'aide d'un linker ou bras espaceur. Les fragments peuvent interagir sur deux sites adjacents de la cible ou sur le même site mais sans superposition. Dans le cas où les deux fragments ont au moins un atome commun dans la liaison avec la cible, ils peuvent être alors fusionnés pour obtenir une molécule plus affine.

Plus concrètement, la Figure I-9 présente quelques exemples d'évolutions de fragments avec leurs LE et K_d (ou IC_{50} , concentration inhibitrice médiane, c'est-à-dire la concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité de la protéine).

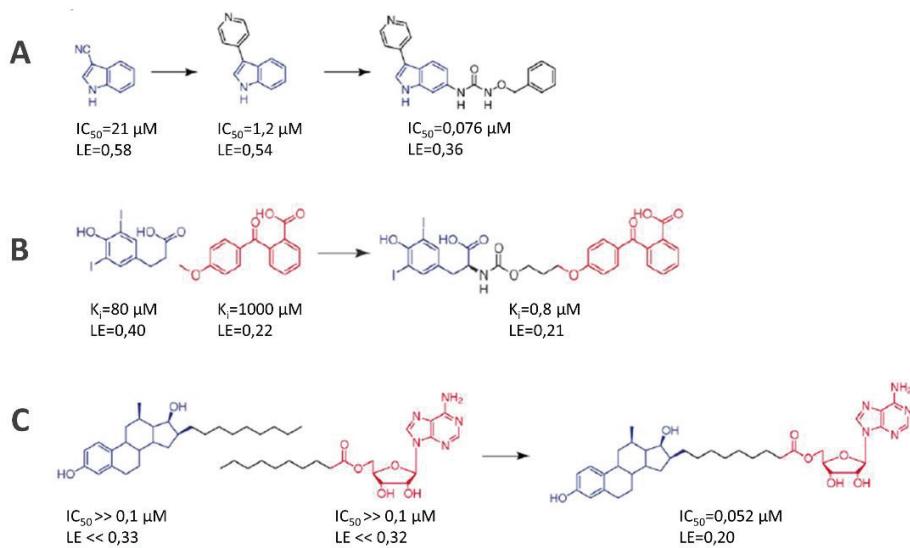


Figure I-9. Exemples d'évolution de fragments en FBDD (tirée de [33]). L'exemple A montre l'évolution d'un fragment par croissance, tandis que l'exemple B représente la liaison deux fragments via un linker et le C la fusion.

3.4. Futur et améliorations pour le FBDD

Pour continuer de faire évoluer le processus de FBDD, il est possible d'optimiser au maximum la composition des bibliothèques de fragments, de pousser les recherches sur la partie « hit to lead » avec l'assistance des approches informatiques par exemple et enfin, il est toujours nécessaire d'améliorer les techniques de criblage existantes ou d'en développer de nouvelles.

Ainsi, nous allons à présent décrire les différentes approches biophysiques principalement utilisées pour le criblage en FBDD et les comparer sur les points essentiels comme le type d'informations apportées (K_d , site d'interaction, constantes cinétiques ...), la gamme de K_d mesurable, la consommation en protéine ou encore le temps de criblage (Tableau I-2).

4. TECHNIQUES BIOPHYSIQUES UTILISÉES POUR LE CRIBLAGE DE FRAGMENTS EN FBDD

Tout d'abord, historiquement, on retrouve deux approches qui ont été utilisées au début du FBDD : la cristallographie par rayons X et la RMN « protein-observed ». Ces deux techniques apportent des informations sur la structure du complexe cible-ligand, donnée primordiale dans la plupart des campagnes FBDD pour l'évolution de hits en leads :

4.1. Cristallographie par rayons X

Ici, dans un premier temps, la protéine cible est cristallisée (le plus souvent séparément) puis trempée dans un mélange de fragments (jusqu'à 8 en général, de formes variées pour faciliter l'analyse de données). Sinon, pour les cas les plus difficiles, la co-cristallisation de la cible en présence de fragments est envisageable. L'acquisition des données est ensuite réalisée par diffraction des rayons X (DRX) avec rayonnement synchrotron. Les améliorations techniques des 15 dernières années (préparation et manipulation des cristaux, acquisition et traitement des données) permettent aujourd'hui de faire du criblage par DRX. Certaines entreprises l'utilisent comme première approche et la plupart ne sélectionnent que des fragments qui peuvent être caractérisés par cristallographie. Cette technique permet d'obtenir des informations structurales sur le complexe ligand-protéine et donc sur le mode de liaison du fragment. Cependant, la cible doit cristalliser sous une forme adaptée au criblage : la forme cristalline doit pouvoir supporter le trempage et le réseau cristallin doit être suffisamment ouvert pour permettre l'accès au site de liaison. Enfin, la méthode par trempage étant davantage contrôlée cinétiquement que thermodynamiquement, il y a un risque assez élevé de faux négatifs avec cette technique. La Figure I-10 présente un résumé des étapes de criblage par DRX. La cible cristallisée est d'abord caractérisée seule puis un mélange de fragments est ajouté (assez différents pour permettre de distinguer leurs cartes de densité électronique). Le ligand le plus fort se lie à la protéine et le complexe ainsi formé peut être observé dans une seconde analyse. [34]

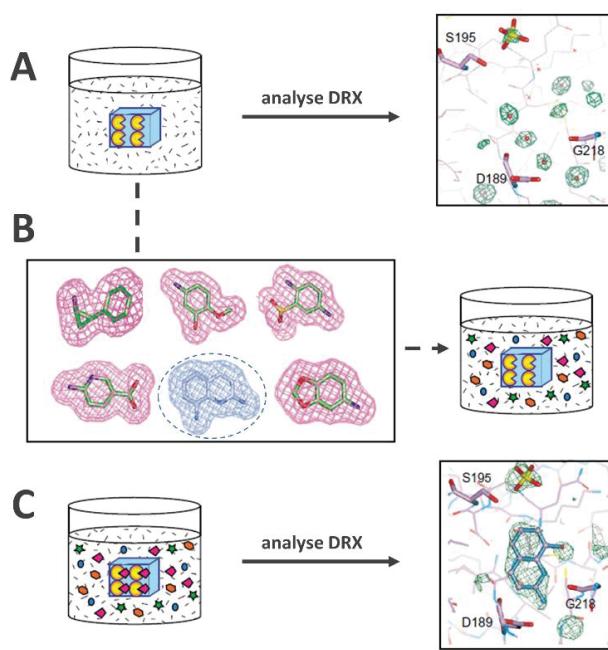


Figure I-10. Les étapes de criblage par DRX (adaptée de [34]). La protéine cristallisée est caractérisée seule dans le solvant dans un premier temps (A) puis on ajoute un mélange de fragments de formes différentes pour pouvoir différencier leurs cartes de densité électronique (B). Le ligand le plus fort (en bleu) se lie à la protéine et peut être identifié avec une nouvelle analyse DRX (C).

4.2. RMN en mode « protein-observed »

Suivre une macromolécule par RMN permet d'observer son interaction avec une petite molécule. En effet cette technique est très sensible aux faibles perturbations dues à la formation d'un complexe et permet également de caractériser la liaison (atomes du ligand engagés et sites de liaison sur la macromolécule si le spectre de la protéine est attribué). En théorie, une expérience classique en 1D ^1H RMN suffit pour identifier la liaison d'un ligand sur une protéine de petite taille ($< 15 \text{ kDa}$) mais en pratique ce sont plutôt des expériences 2D ^1H - ^{15}N HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation) qui sont réalisées car elles procurent une bien meilleure résolution et permettent l'identification structurale des épitopes (partie responsable de la reconnaissance). Le spectre de la protéine cible est donc réalisé en absence puis en présence de fragment et les phénomènes de liaison sont repérés par des modifications des déplacements chimiques. La Figure I-11 présente une partie du spectre 2D d'une protéine au niveau de deux acides aminés d'intérêt, d'abord seule puis en présence de différents ligands. La modification du spectre de la protéine lors de l'ajout de fragments permet de mettre en évidence l'interaction et de localiser le site d'interaction de chacun [35].

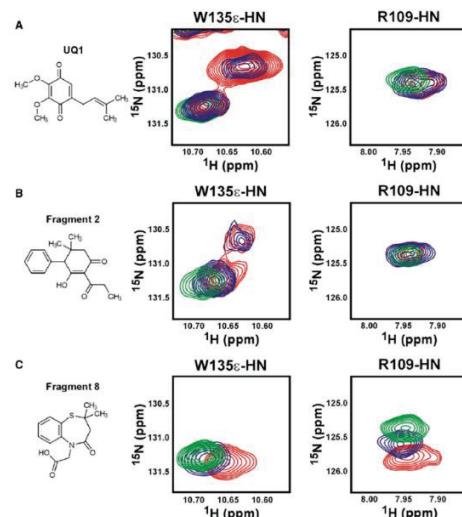


Figure I-11. Spectres RMN en protein-observed (tirée de [35]). Cette figure présente une partie du spectre 2D de la protéine DsbB[CSSC], au niveau de deux acides aminés d'intérêt (le tryptophane 135 à gauche et l'arginine 109 à droite) d'abord seule (en vert) puis en présence de trois fragments (A, B et C) à 5 mM (en bleu) et 10 mM (en rouge). Ces spectres permettent d'observer l'interaction de ces fragments avec la protéine : en A et en B, les fragments modifient totalement le spectre de la protéine au niveau du W135, c'est donc à ce niveau que l'interaction a lieu. En C, le spectre est principalement modifié au niveau de R109, le fragment interagit donc probablement sur ce site.

Cette technique est fiable (peu de faux négatifs et faux positifs) et permet également d'accéder au K_d du fragment. L'approche « SAR by NMR » est une approche puissante qui a mené au premier médicament développé par FBDD. Cependant la protéine doit être marquée et ne pas dépasser 30 à 40 kDa et sa consommation est élevée ce qui n'est pas idéal dans une démarche de criblage.

Par la suite, d'autres approches ont été élaborées, souvent moins coûteuses et plus adaptées au criblage.

4.3. RMN en mode « ligand-observed »

Tout d'abord, toujours en utilisant la RMN, il est également possible d'observer le ligand au lieu de la protéine. Celle-ci n'a donc plus de taille maximale et n'a pas besoin d'être marquée. Il est également possible de réaliser ces expériences avec un mélange de fragments (une dizaine au maximum en général) et de déterminer un K_d par compétition avec un ligand connu. Les deux méthodes les plus communes en ligand-observed sont le STD (saturation transfer difference) et le water-LOGSY (water-ligand observed via gradient spectroscopy), toutes deux basées sur l'effet NOE (nuclear Overhauser effect) qui correspond à une interaction entre deux spins à travers l'espace et non pas à travers les liaisons chimiques.

Le procédé en STD consiste à irradier sélectivement les protons de la protéine pour les saturer. Les spectres RMN sont enregistrés sans saturation puis avec saturation de la cible. Si un fragment se lie à la protéine, il sera alors assez proche pour subir la saturation par effet NOE intermoléculaire. Comme il s'agit d'un équilibre, ces fragments ne vont pas rester liés à la protéine et ils sont détectés dans leur état libre. Cependant, les signaux des protons des composés qui se lient à la protéine seront atténués par la saturation qu'ils ont subi. En observant la soustraction des spectres avec et sans saturation, seuls les protons des composés qui interagissent avec la protéine sont encore visibles (les signaux de la protéine et des non-ligands ne sont pas modifiés donc disparaissent comme présenté sur la Figure I-12).

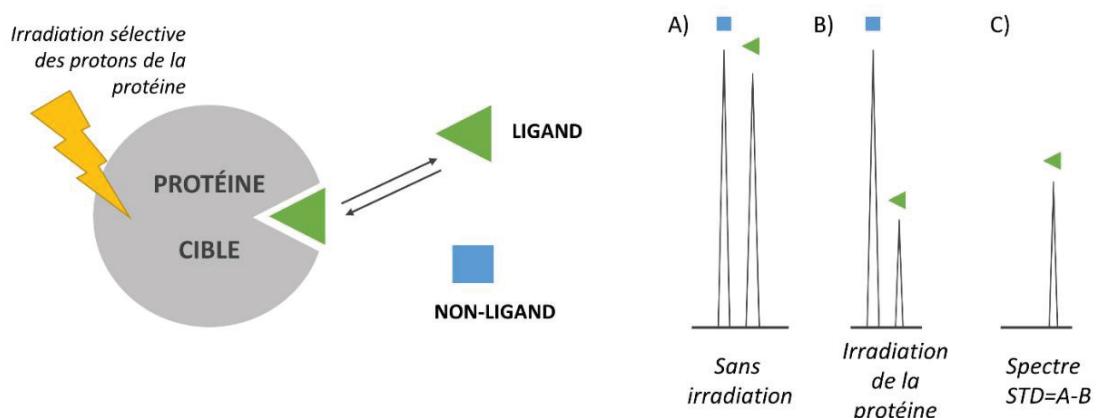


Figure I-12. Principe du STD en RMN ligand-observed (adaptée de [36]). Un premier spectre RMN est réalisé sans irradiation (A). Ensuite la protéine cible est sélectivement irradiée pour saturer ses protons et une nouvelle acquisition est réalisée. Les composés avec une affinité pour la protéine (les ligands) subissent la saturation par effet NOE intermoléculaire dû à la proximité avec la cible et donc leur signal diminue tandis que le signal des non-ligands reste inchangé (B). La différence de ces deux spectres ($C=A-B$) ne fait apparaître que les ligands.

Dans le cas du waterLOGSY, ce sont les protons de l'eau qui sont irradiés. Ensuite, l'aimantation se transmet à la cible par effet NOE ou par échange de protons avec des groupements réactifs (acides carboxyliques, amines, hydroxyl). Pour faire simple, les fragments liés à la protéine (ligands) auront un effet NOE négatif tandis que les fragments qui interagissent avec l'eau de l'échantillon (non-ligands) auront

un NOE positif. Par conséquent, les molécules libres et les molécules liées à la protéine auront des spectres de signe opposé, ce qui permet de discriminer facilement les ligands et les non-ligands comme illustré sur la Figure I-13.

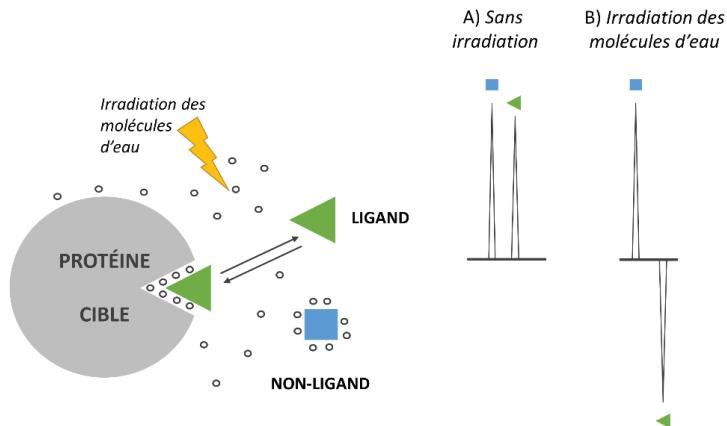


Figure I-13. Principe du waterLOGSY en RMN ligand-observed (adaptée de [36]). Le premier spectre est réalisé sans irradiation (A). Ensuite les molécules d'eau de l'échantillon sont irradiées et les composés subissent une saturation par effet NOE, de signe opposé en fonction du fait qu'ils soient liés à la protéine (ligands) ou libres (non-ligands) (B).

Ces approches, bien que largement utilisées, entraînent tout de même une consommation importante en protéine et sont limitées pour les trop petites protéines (inférieures à 15-20 kDa) dont le transfert de saturation vers les ligands sera moins efficace. De ce fait, plus la protéine est petite, plus sa concentration doit être importante. Les trop fortes affinités (souvent associées à des cinétiques d'interactions lentes pour les petites molécules) sont aussi un problème pour le criblage par RMN : si la cinétique d'interaction est trop lente, il n'y aura que peu de ligand libre saturé, le signal sera donc très faible et on risque d'obtenir un faux négatif. Enfin, des interactions non-spécifiques entre les composés testés et la protéine (en dehors du site actif) peuvent générer des faux positifs et il est donc nécessaire de réaliser de contrôles en présence d'un compétiteur par exemple [37].

4.4. Résonance des Plasmons de Surface (SPR)

La SPR est probablement une des techniques les plus utilisées avec la RMN pour le criblage de fragments. Elle repose sur un phénomène physique (la résonance des plasmons de surface) qui permet de mesurer la liaison d'un ligand sur un récepteur fixé à la surface d'une couche métallique en mesurant une variation de l'indice de réfraction quand le ligand se fixe aux récepteurs (Figure I-14). La protéine cible (le récepteur) est donc immobilisée ce qui diminue considérablement sa consommation par rapport à la RMN. Il est possible de déterminer l'affinité (K_d) ainsi que les données cinétiques (k_{on} et k_{off}) avec une analyse SPR. Un seul fragment est analysé à la fois mais les biocapteurs peuvent être multi-canaux et donc permettre un criblage en parallèle. Il est tout de même nécessaire de conserver un canal « blanc » car la technique ne permet pas de différencier une interaction spécifique fragment-cible d'une interaction non-spécifique fragment-support par exemple [38]. De plus, la SPR est limitée au niveau de la taille des fragments étudiés : on travaille en général avec des masses molaires supérieures à 100 g.mol^{-1} pour que la modification potentielle de l'indice de réfraction soit suffisante pour être détectée. Il est également nécessaire de travailler à des concentrations en fragments proches de leur K_d ($0,1 K_d < [\text{fragment}] < 10 K_d$) [39], ce qui peut donc poser des problèmes de solubilité pour les faibles affinités (K_d élevés). Enfin, le DMSO, solvant classique pour les fragments, peut engendrer des perturbations à cause de son fort indice de réfraction.

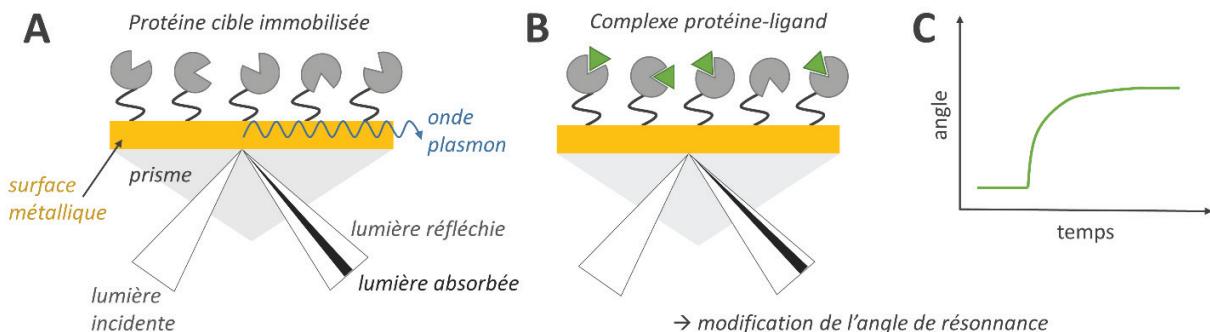


Figure I-14. Principe de mesure en SPR (adaptée de [40]). La protéine cible est immobilisée sur une surface métallique. Un laser entre dans le prisme et la lumière atteint le métal avec différents angles, tous réfléchis, sauf à l'angle de résonance plasmonique de surface où la lumière est absorbée par le métal et transformée en onde plasmon qui se propage à la surface (A). Lorsqu'un ligand est infusé et interagit avec la protéine, l'angle de résonance est modifié (changement d'indice de réfraction) (B). En suivant la variation de cet angle en fonction du temps (sensorgramme), il est possible de détecter s'il y a interaction entre la protéine et le composé infusé (C).

Il existe également différentes méthodes thermiques : l'ITC (Isothermal Titration Calorimetry) qui consiste à mesurer directement le dégagement de chaleur pendant une interaction entre deux molécules ou le TSA (Thermal Shift Assay) qui suit le changement de température de dénaturation des protéines dû à une stabilisation lors de l'interaction avec un ligand.

4.5. Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

L'ITC est une méthode sensible et précise pour étudier les interactions de fragments avec une protéine cible. En mesurant la variation de température produite lors de l'interaction entre deux molécules, il est possible d'identifier un ligand et de déterminer les paramètres thermodynamiques de la liaison (ΔH , ΔG , ΔS), l'affinité de l'interaction (K_d) ainsi que la stoechiométrie de la réaction. En pratique, une cellule échantillon contient la protéine cible et le fragment est ajouté par injection(s) (unique ou multiples) pour être titré (Figure I-15). Cette méthode est très informative mais demande une quantité relativement importante de protéine et n'offre qu'un faible débit de criblage.

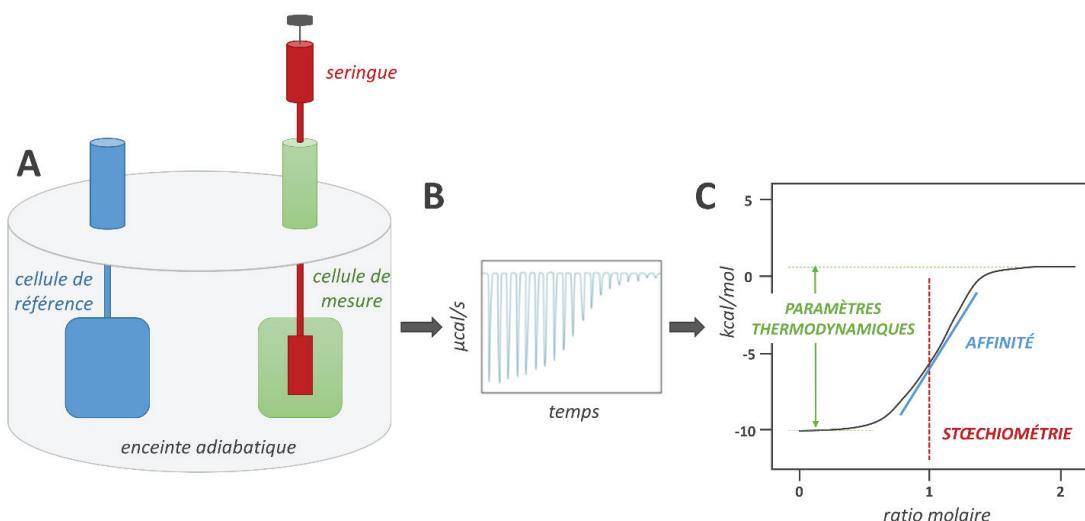


Figure I-15. Montage et données obtenues par titrage calorimétrique isotherme (adaptée de [41,42]). Dans une enceinte adiabatique se trouvent une cellule de référence (avec de l'eau ou le tampon de travail) et la cellule de mesure contenant la protéine. Une série de petits aliquots de ligand est injectée dans la cellule de mesure grâce à une seringue (A). Si le composé se lie à la protéine, une variation de chaleur sera alors détectée. Le microcalorimètre mesure toute la chaleur libérée/absorbée jusqu'à ce que la réaction de liaison atteigne un équilibre et que le signal revienne à la valeur de départ : cela forme un pic. Avec les injections successives de ligand, la protéine sature progressivement, la quantité de liaisons formées avec le ligand diminue et la variation de chaleur décroît jusqu'à se trouver en excès de ligand (B). L'aire de chaque pic est alors tracée en fonction du ratio ligand/protéine : l'isotherme qui en résulte permet d'accéder à la stoechiométrie de la réaction, aux paramètres thermodynamiques et au K_d (C).

4.6. Thermal Shift Assay TSA (DSF)

La seconde méthode basée sur la température est donc le TSA (Thermal Shift Assay) où l'on étudie la stabilité intrinsèque de la protéine cible en observant la température nécessaire à sa dénaturation (dépliement), le plus souvent avec un suivi par fluorescence. Cette technique est alors appelée DSF pour Differential Scanning Fluorimetry. Un colorant fluorescent qui se lie préférentiellement à la forme dépliée de la protéine (surfaces hydrophobes) permet de suivre le phénomène de dénaturation en fonction d'un gradient de température (Figure I-16). Dans le contexte du FBDD, on observe de petites variations de la stabilité thermique des protéines induites par leur liaison à un ligand. Bien que cette méthode ne fournit pas beaucoup d'informations sur la liaison, elle est simple à mettre en œuvre et réalisable en microplaques, format approprié au criblage.

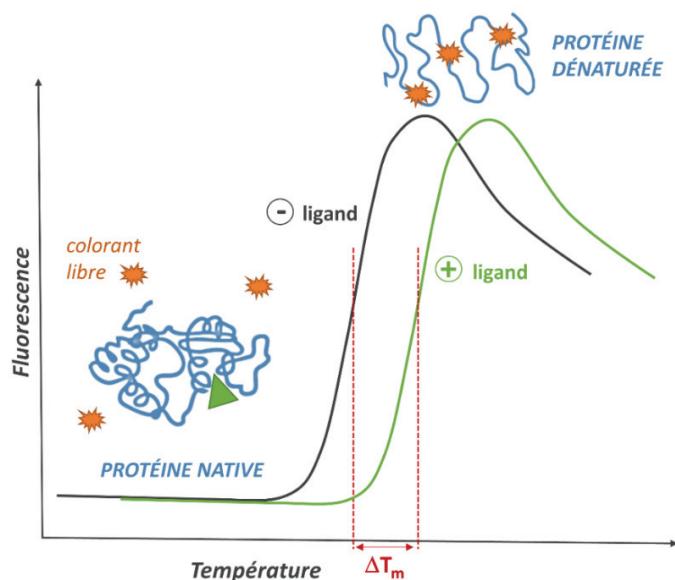
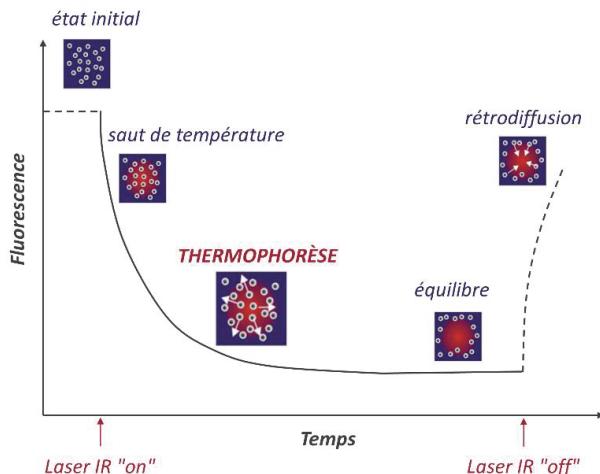


Figure I-16. Suivi de la dénaturation d'une protéine par DSF en présence et en absence de ligand (adaptée de [43]). La protéine est mise en solution avec un colorant fluorescent qui se lie par effet hydrophobe. Il interagit donc peu avec la protéine native et beaucoup plus avec la forme dénaturée de la protéine, qui présente davantage de surfaces hydrophobes. Sous l'effet d'un gradient de température, la protéine va se déplier et le suivi de la fluorescence permet de suivre ce phénomène de dénaturation. Ensuite la même expérience est réalisée en présence d'un ligand potentiel. La température de dénaturation (T_m) du complexe protéine-ligand est différente de celle de la protéine seule, il est alors possible de déterminer s'il y a interaction ou non entre les deux molécules.

4.7. Microscale Thermophoresis (MST)

Plus récemment, les techniques émergeantes se focalisent principalement sur la réduction de la consommation en protéines, notamment en travaillant à l'échelle capillaire comme la MST (Microscale ThermoPhoresis). La thermophorèse, aussi connue sous le nom de l'effet Ludwig-Soret, est définie par le mouvement direct des molécules sous un gradient de température (Figure I-17 A). Les propriétés thermophorétiques d'une molécule sont déterminées par sa charge, sa taille et son enveloppe aqueuse (hydration shell). Lors de la liaison à une autre molécule, un ou plusieurs de ces paramètres peuvent être modifiés, ce qui implique un changement du mouvement thermophorétique. La mesure des changements en thermophorèse peut permettre de quantifier l'affinité entre deux molécules. Pour mesurer la thermophorèse de biomolécules, les instruments développés par NanoTemper (appelés Monolith) utilisent un laser infrarouge qui chauffe l'échantillon aqueux se trouvant dans un capillaire en verre. La focalisation du laser produit un gradient de température microscopique et localisé et les complexes ligand-protéine présentent une vitesse de déplacement différente à travers ce gradient de température comparé aux molécules libres non-liées. Ce mouvement est mesuré par la fluorescence de la protéine cible (fluorescence UV intrinsèque aux acides aminés ou marquage de la protéine). Un balayage rapide d'une série de capillaires contenant une quantité constante de protéine cible et des concentrations croissantes de ligand permet la détermination des constantes de liaison (K_d) (Figure I-17 B). Le profil thermophorétique peut être modifié par un infime changement au niveau de la protéine (sans modification de charge ou de masse), il est donc possible de détecter des interactions entre la protéine et de très petits ligands, d'où l'intérêt croissant pour cette technique dans le cadre du FBDD [44].

A)



B)

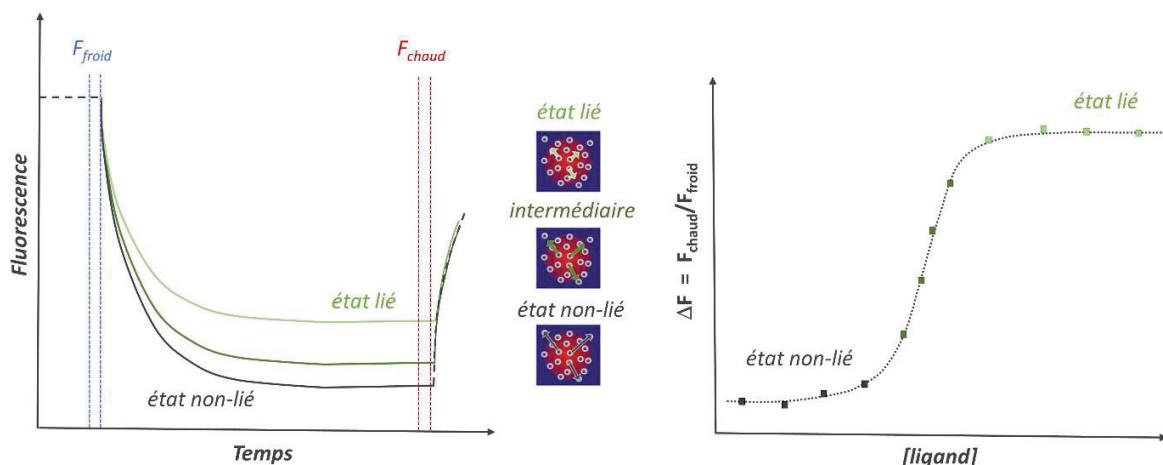


Figure I-17. Allure d'un signal classique en MST (A) et mesure d'affinité d'un ligand pour une protéine cible (B) (adaptée de [45,46]). La protéine en solution est introduite dans un capillaire en verre. Initialement, les molécules sont réparties de façon homogène et la fluorescence mesurée est constante. Quand le laser est mis en marche, il y a instantanément un saut de température suivi du phénomène de thermophorèse et on observe donc une chute de la fluorescence. Une fois l'équilibre atteint, le laser est arrêté et la fluorescence augmente à nouveau sous l'effet de la rétrodiffusion des molécules à leur état initial (A). Le mouvement thermophorétique d'une protéine (la courbe état non-lié) est impacté par sa liaison avec un ligand (état lié). Pour ce type d'analyse, le changement en thermophorèse est exprimé en fluorescence normalisée $\Delta F = F_{\text{chaud}}/F_{\text{froid}}$ (correspondants à la fluorescence moyenne au niveau des deux curseurs). Le dosage d'un ligand entraîne un changement progressif du mouvement thermophorétique de la protéine, et le tracé de la fluorescence normalisée ΔF en fonction de la concentration en ligand permet de remonter à la constante d'affinité.

La MST ne nécessite que de faibles quantités de ligands et de protéine grâce au faible volume des capillaires. Les analyses sont rapides (environ 30s/capillaire, avec jusqu'à 96 capillaires installés dans l'appareil automatisé) et la mesure des interactions se fait en solution avec la possibilité de travailler en tampon classique ou dans des systèmes plus complexes (lysats de cellules, sérum,...), avec une protéine soluble ou en liposomes [45]. En revanche, cette technique ne fournit pas d'informations cinétiques (constantes d'associations et de dissociation k_{on} et k_{off}) et est très sensible au moindre changement de propriété moléculaire.

Le Tableau I-2 résume les informations principales concernant chacune des techniques de criblage décrites précédemment.

Tableau I-2 Comparaison des principales méthodes de criblage pour le FBDD (adapté de [43])

Points forts	Limitations	Type d'information	Gamme d'affinité (K_d)	Consommation en protéine cible	Débit de criblage*
DRX (Cristallographie aux rayons X)					
<ul style="list-style-type: none"> Accès à la structure 3D du complexe protéine-ligand Mélange de fragments possible par trempage 	<ul style="list-style-type: none"> Cible cristallisée sous une forme adaptée (résiste au trempage, réseau cristallin permet l'accès au site d'interaction) Acquisition coûteuse (synchrotron) et faible débit de criblage Nombreux faux négatifs 	<ul style="list-style-type: none"> Informations sur le site d'interaction et le mode de liaison du ligand Pas de données quantitatives sur l'interaction 	jusqu'à 1 M	2,5-5 nmol par plaque de cristallisation 96 puits	100 ^{ne}
RMN protein-observed					
<ul style="list-style-type: none"> Informations sur le site de liaison (si le spectre RMN a été attribué) 	<ul style="list-style-type: none"> Forte consommation en protéine La protéine doit être marquée et inférieure à 40 kDa 	<ul style="list-style-type: none"> Site d'interaction K_d par titrage 	100 nM - 1mM	20-30 pmol de protéine marquée par composé testé	10 ^{ne}
RMN Ligand-observed					
<ul style="list-style-type: none"> Mesure en solution Pas de marquage Criblage de mélanges (5-10 fragments) 	<ul style="list-style-type: none"> Forte consommation en protéine, de minimum 15-20 kDa Limité pour les trop fortes affinités (cinétique lente) Risques de faux positifs (non-spécifique) 	<ul style="list-style-type: none"> K_d par compétition avec un ligand d'affinité connue 	100 nM - 10 mM	Quelques nmol de protéine par composé, excès de ligand (1:100 à 1:1000)	100 ^{ne}
SPR (Surface Plasmon Resonance)					
<ul style="list-style-type: none"> Criblage multi-canaux (avec référence pour distinguer le non-spécifique) Faible consommation en protéine 	<ul style="list-style-type: none"> Fragments > 100 g.mol⁻¹ Perturbations liées au solvant (DMSO) Nécessité de travailler à une concentration de fragment ~ K_d (problèmes de solubilité pour les faibles affinités) 	<ul style="list-style-type: none"> K_d Cinétique (k_{on} et k_{off}) 	1 nM - 500 μM	10 ^{ne} de nmol de protéine pour le développement des essais et une campagne de criblage (soit 10 ^{ne} de pmol/composé)	quelques milliers
ITC (Isothermal Titration Calorimetry)					
<ul style="list-style-type: none"> Mesure en solution Pas de marquage Informative 	<ul style="list-style-type: none"> Consommation élevée en protéine et fragments Requiert une concentration en fragment d'environ 10 fois le K_d (problèmes de solubilité) 	<ul style="list-style-type: none"> Paramètres thermodynamiques (ΔH, ΔS, ΔG) K_d stœchiométrie de liaison 	1 nM - 100 μM	10 ^{ne} de nmol de protéine par composé	10 ^{ne}

Points forts	Limitations	Type d'information	Gamme d'affinité (K_d)	Consommation en protéine cible	Débit de criblage*
DSF (Differential Scanning Fluorimetry - Thermal Shift Assay)					
• Développement simple, essais en plaque microtitre	• Nécessite un colorant fluorescent • Requiert une solubilité importante pour les fragments testés (concentrations au mM)	• Réponse oui/non	1 nM - 1 mM	Environ 100 pmol/analyse	quelques milliers
MST (MicroScale Thermophoresis)					
• Mesures en solution, rapide (15-25 s par capillaire) • Faible consommation de réactifs (protéine et fragments)	• Besoin de marquage ou d'une fluorescence intrinsèque suffisante	• K_d	1 pM - 1 mM	1-2 pmol par composé (pour environ 15 concentrations en fragment testé)	100 ^{ne} - 1000

*Débit de criblage : nombre de fragments/jour

Etant donné qu'aucune méthode ne semble idéale en tous points et qu'il a déjà été montré que les résultats d'un criblage pouvaient varier selon les techniques employées [30,31,47], il semble tout à fait pertinent de continuer à développer de nouvelles techniques de criblage ainsi qu'à faire évoluer les technologies existantes. Le point le plus critique semble être la consommation en protéine cible, suivi par les informations apportées et la rapidité d'analyse.

5. LA CHROMATOGRAPHIE DE FAIBLE AFFINITÉ COMME NOUVEL OUTIL DE CRIBLAGE

5.1. Pourquoi la chromatographie de faible affinité ?

D'après les méthodes existantes et les récents développements, les solutions pour réduire la consommation en protéine semblent être l'immobilisation sur un support (comme la SPR) et la réduction de l'échelle de travail (comme en MST). C'est ce que nous proposons avec la chromatographie de faible affinité miniaturisée. Cette technique, récemment adaptée à l'étude d'interactions protéine-ligand, consiste à immobiliser la cible sur un support chromatographique. Les fragments sont ensuite injectés dans la colonne et leur rétention sera directement liée à leur affinité pour la protéine cible (Figure I-18).

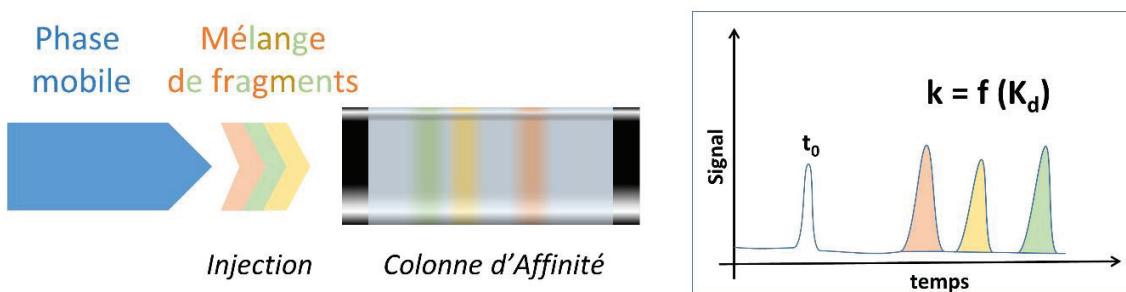


Figure I-18. Schéma du fonctionnement de la chromatographie de faible affinité en mode zonal pour un mélange de fragments. Le pouvoir séparatif permet d'identifier les ligands, leur facteur de rétention (k) étant lié à leur affinité pour la protéine cible (K_d).

La miniaturisation permet de diminuer drastiquement la consommation en protéine cible (ainsi que celle des fragments et autres consommables). En effet, en passant de l'échelle classique avec des colonnes 4,6 mm de diamètre interne à des colonnes capillaires de 75 µm (pour une même longueur d'une dizaine de centimètres), le volume de colonne passe d'environ 1,5 mL à moins de 500 nL. Cette miniaturisation permet alors de diviser la quantité de protéine nécessaire par un facteur 1000 en passant de l'échelle du mg à celle du µg.

La chromatographie de faible affinité propose de nombreuses possibilités d'analyse et différents modes d'élution qui peuvent donner accès à de multiples informations (constantes d'affinité K_d , stœchiométrie, données cinétiques et thermodynamiques). Il est également possible d'étudier les fragments en mélange grâce au pouvoir séparatif de la chromatographie, ce qui réduit considérablement la durée totale de criblage. La colonne peut être réutilisée pour de multiples injections, diminuant ainsi les incertitudes inter-analyses et la quantité totale de protéine nécessaire pour réaliser une campagne de criblage.

5.2. Les objectifs

Dans ce projet, nous proposons de développer la chromatographie de faible affinité à échelle miniaturisée en développant des colonnes à échelle capillaires (10 cm x 75 µm de diamètre interne). Il est nécessaire d'immobiliser une quantité suffisante de protéine afin d'être en mesure de détecter de faibles affinités. Il faut également limiter les interactions secondaires non-spécifiques pour limiter le risque de faux positifs lors d'un criblage. Enfin l'idéal serait d'obtenir des colonnes suffisamment stables dans le temps pour réaliser le criblage d'un maximum de fragments.

L'objectif dans un second temps est de développer cette technique pour étudier les interactions ligands-protéines membranaires. Ces cibles spécifiques sont complexes à produire, en termes de quantité et de stabilité. La consommation de protéine lors du criblage devient alors d'autant plus critique d'où l'intérêt voire la nécessité de la miniaturisation pour cette application.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. Hughes, S. Rees, S. Kalindjian, K. Philpott, Principles of early drug discovery, *Br J Pharmacol.* 162 (2011) 1239–1249. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x.
- [2] T.P. Kenakin, Chapter 11 - The Drug Discovery Process, in: T.P. Kenakin (Ed.), *A Pharmacology Primer* (Fifth Edition), Academic Press, 2019: pp. 323–371. doi:10.1016/B978-0-12-813957-8.00011-4.
- [3] M. M. Hann, Molecular obesity, potency and other addictions in drug discovery, *MedChemComm.* 2 (2011) 349–355. doi:10.1039/C1MD00017A.
- [4] S. Subramaniam, M. Mehrotra, D. Gupta, Virtual high throughput screening (vHTS) - A perspective, *Bioinformation.* 3 (2008) 14–17.
- [5] S.-Y. Yang, Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances, *Drug Discovery Today.* 15 (2010) 444–450. doi:10.1016/j.drudis.2010.03.013.
- [6] Pharmacophore in Drug Design and Discovery, (n.d.). http://www.kppub.com/articles/jan2011/pharmacophore_in_drug_design.html (accessed January 11, 2019).
- [7] R. Perkins, H. Fang, W. Tong, W.J. Welsh, Quantitative structure-activity relationship methods: perspectives on drug discovery and toxicology, *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (2003) 1666–1679.
- [8] X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, M. Cui, Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery, *Curr Comput Aided Drug Des.* 7 (2011) 146–157.
- [9] M. Hartenfeller, G. Schneider, De novo drug design, *Methods Mol. Biol.* 672 (2011) 299–323. doi:10.1007/978-1-60761-839-3_12.
- [10] De Novo Drug Design and Discovery | Medicilon Inc, (n.d.). <http://www.medicilon.com/de-novo-drug-design/> (accessed January 11, 2019).
- [11] M.J. Wildey, A. Haunso, M. Tudor, M. Webb, J.H. Connick, Chapter Five - High-Throughput Screening, in: R.A. Goodnow (Ed.), *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Academic Press, 2017: pp. 149–195. doi:10.1016/bs.armc.2017.08.004.
- [12] N.A. Roberts, J.A. Martin, D. Kinchington, A.V. Broadhurst, J.C. Craig, I.B. Duncan, S. Galpin, B.K. Handa, J.G. Kay, A. Kroehn, Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors., *Science.* 248 (1990) 358–361. doi:10.1126/science.2183354.
- [13] J. Wingfield, High-Throughput Screening, in: *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier, 2018. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.13983-6.
- [14] J. Eder, R. Sedrani, C. Wiesmann, The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution, *Nature Reviews Drug Discovery.* 13 (2014) 577–587. doi:10.1038/nrd4336.
- [15] D.C. Swinney, J. Anthony, How were new medicines discovered?, *Nature Reviews Drug Discovery.* 10 (2011) 507–519. doi:10.1038/nrd3480.
- [16] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced Drug Delivery Reviews.* 23 (1997) 3–25. doi:10.1016/S0169-409X(96)00423-1.
- [17] R. Macarron, M.N. Banks, D. Bojanic, D.J. Burns, D.A. Cirovic, T. Garyantes, D.V.S. Green, R.P. Hertzberg, W.P. Janzen, J.W. Paslay, U. Schopfer, G.S. Sittampalam, Impact of high-throughput screening in biomedical research, *Nature Reviews Drug Discovery.* 10 (2011) 188–195. doi:10.1038/nrd3368.
- [18] D.A. Erlanson, S.W. Fesik, R.E. Hubbard, W. Jahnke, H. Jhoti, Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery, *Nat Rev Drug Discov.* 15 (2016) 605–619. doi:10.1038/nrd.2016.109.
- [19] M. Congreve, R. Carr, C. Murray, H. Jhoti, A ‘Rule of Three’ for fragment-based lead discovery?, *Drug Discovery Today.* 8 (2003) 876–877. doi:10.1016/S1359-6446(03)02831-9.
- [20] P.J. Hajduk, G. Sheppard, D.G. Nettesheim, E.T. Olejniczak, S.B. Shuker, R.P. Meadows, D.H. Steinman, G.M. Carrera, P.A. Marcotte, J. Severin, K. Walter, H. Smith, E. Gubbins, R. Simmer, T.F. Holzman, D.W. Morgan, S.K. Davidsen, J.B. Summers, S.W. Fesik, Discovery of Potent Nonpeptide Inhibitors of Stromelysin Using SAR by NMR, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 5818–5827. doi:10.1021/ja9702778.

- [21] Laura Elizabeth Mason, Advances in Fragment-Based Drug Discovery, Technology Networks. (n.d.). <https://www.technologynetworks.com/drug-discovery/articles/advances-in-fragment-based-drug-discovery-303059> (accessed May 6, 2019).
- [22] G. Williams, G.G. Ferenczy, J. Ulander, G.M. Keserű, Binding thermodynamics discriminates fragments from druglike compounds: a thermodynamic description of fragment-based drug discovery., *Drug Discovery Today.* 22 (2017) 681–689. doi:10.1016/j.drudis.2016.11.019.
- [23] S.B. Shuker, P.J. Hajduk, R.P. Meadows, S.W. Fesik, Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR, *Science.* 274 (1996) 1531–1534. doi:10.1126/science.274.5292.1531.
- [24] M.M. Hann, A.R. Leach, G. Harper, Molecular Complexity and Its Impact on the Probability of Finding Leads for Drug Discovery, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 41 (2001) 856–864. doi:10.1021/ci000403i.
- [25] A.L. Hopkins, C.R. Groom, A. Alex, Ligand efficiency: a useful metric for lead selection, *Drug Discovery Today.* 9 (2004) 430–431. doi:10.1016/S1359-6446(04)03069-7.
- [26] Minh-Dao Duong-Thi, Introducing weak affinity chromatography to drug discovery with focus on fragment screening, Linnaeus University, 2013.
- [27] B.J. Davis, S.D. Roughley, Chapter Eleven - Fragment-Based Lead Discovery, in: R.A. Goodnow (Ed.), *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Academic Press, 2017: pp. 371–439. doi:10.1016/bs.armc.2017.07.002.
- [28] J.R. Huth, R. Mendoza, E.T. Olejniczak, R.W. Johnson, D.A. Cothron, Y. Liu, C.G. Lerner, J. Chen, P.J. Hajduk, ALARM NMR: a rapid and robust experimental method to detect reactive false positives in biochemical screens, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 217–224. doi:10.1021/ja0455547.
- [29] J.B. Baell, G.A. Holloway, New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 2719–2740. doi:10.1021/jm901137j.
- [30] J. Schiebel, N. Radeva, H. Köster, A. Metz, T. Krotzky, M. Kuhnert, W.E. Diederich, A. Heine, L. Neumann, C. Atmanene, D. Roecklin, V. Vivat-Hannah, J.-P. Renaud, R. Meinecke, N. Schlinck, A. Sitte, F. Popp, M. Zeeb, G. Klebe, One Question, Multiple Answers: Biochemical and Biophysical Screening Methods Retrieve Deviating Fragment Hit Lists, *ChemMedChem.* 10 (2015) 1511–1521. doi:10.1002/cmdc.201500267.
- [31] J. Schiebel, N. Radeva, S.G. Krimmer, X. Wang, M. Stieler, F.R. Ehrmann, K. Fu, A. Metz, F.U. Huschmann, M.S. Weiss, U. Mueller, A. Heine, G. Klebe, Six Biophysical Screening Methods Miss a Large Proportion of Crystallographically Discovered Fragment Hits: A Case Study, *ACS Chem. Biol.* 11 (2016) 1693–1701. doi:10.1021/acschembio.5b01034.
- [32] B. Lamoree, R.E. Hubbard, Current perspectives in fragment-based lead discovery (FBLD), *Essays Biochem.* 61 (2017) 453–464. doi:10.1042/EBC20170028.
- [33] D.A. Erlanson, Fragment-based lead discovery: a chemical update, *Current Opinion in Biotechnology.* 17 (2006) 643–652. doi:10.1016/j.copbio.2006.10.007.
- [34] V.L. Nienaber, P.L. Richardson, V. Klighofer, J.J. Bouska, V.L. Giranda, J. Greer, Discovering novel ligands for macromolecules using X-ray crystallographic screening., *Nat Biotechnol.* 18 (2000) 1105–1108. doi:10.1038/80319.
- [35] V. Früh, Y. Zhou, D. Chen, C. Loch, A. Eiso, Y.N. Grinkova, H. Verheij, S.G. Sligar, J.H. Bushweller, G. Siegal, Application of Fragment Based Drug Discovery to Membrane Proteins: Biophysical Identification of Ligands of the Integral Membrane Enzyme DsB_B, *Chem Biol.* 17 (2010) 881–891. doi:10.1016/j.chembiol.2010.06.011.
- [36] Isabelle Krimm, FragmentTech NMR screening, (n.d.). <http://fragmentech.univ-lyon1.fr/fragment-based-drug-design/> (accessed January 23, 2019).
- [37] A. Zega, NMR Methods for Identification of False Positives in Biochemical Screens: Miniperspective, *Journal of Medicinal Chemistry.* 60 (2017) 9437–9447. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01520.
- [38] I. Navratilova, A.L. Hopkins, Fragment Screening by Surface Plasmon Resonance, *ACS Medicinal Chemistry Letters.* 1 (2010) 44–48. doi:10.1021/ml900002k.

- [39] S. Perspicace, D. Banner, J. Benz, F. Müller, D. Schlatter, W. Huber, Fragment-Based Screening Using Surface Plasmon Resonance Technology, *Journal of Biomolecular Screening*. 14 (2009) 337–349. doi:10.1177/1087057109332595.
- [40] A. Ciulli, Biophysical Screening for the Discovery of Small-Molecule Ligands, *Methods Mol Biol.* 1008 (2013) 357–388. doi:10.1007/978-1-62703-398-5_13.
- [41] L. Mazzei, S. Ciurli, B. Zambelli, Chapter Nine - Isothermal Titration Calorimetry to Characterize Enzymatic Reactions, in: A.L. Feig (Ed.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, 2016: pp. 215–236. doi:10.1016/bs.mie.2015.07.022.
- [42] 2bind molecular interactions, ITC - Isothermal Titration Calorimetry - Thermodynamics, Affinity, Stoichiometry, 2bind. (n.d.). <https://2bind.com/itc/> (accessed May 9, 2019).
- [43] J.-P. Renaud, C.-W. Chung, U.H. Danielson, U. Egner, M. Hennig, R.E. Hubbard, H. Nar, Biophysics in drug discovery: impact, challenges and opportunities, *Nat Rev Drug Discov.* 15 (2016) 679–698. doi:10.1038/nrd.2016.123.
- [44] J.M. Rainard, G.C. Pandarakalam, S.P. McElroy, Using Microscale Thermophoresis to Characterize Hits from High-Throughput Screening: A European Lead Factory Perspective, *SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D.* 23 (2018) 225–241. doi:10.1177/2472555217744728.
- [45] M. Jerabek-Willemsen, C.J. Wienken, D. Braun, P. Baaske, S. Duhr, Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis, *Assay Drug Dev Technol.* 9 (2011) 342–353. doi:10.1089/adt.2011.0380.
- [46] NanoTemper Technologies, Quick & Accurate Protein Characterization & Analysis - NanoTemper, NanoTemper Technologies. (n.d.). <https://nanotempertech.com/> (accessed May 10, 2019).
- [47] J. Wielens, S.J. Headey, D.I. Rhodes, R.J. Mulder, O. Dolezal, J.J. Deadman, J. Newman, D.K. Chalmers, M.W. Parker, T.S. Peat, M.J. Scanlon, Parallel screening of low molecular weight fragment libraries: do differences in methodology affect hit identification?, *J Biomol Screen.* 18 (2013) 147–159. doi:10.1177/1087057112465979.

CHAPITRE II :

LA CHROMATOGRAPHIE DE FAIBLE AFFINITÉ

CHAPITRE II : LA CHROMATOGRAPHIE DE FAIBLE AFFINITÉ

1. DE LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ À LA CHROMATOGRAPHIE DE FAIBLE AFFINITÉ

La chromatographie d'affinité est utilisée depuis plus d'un siècle pour la purification de biomolécules en se basant sur des interactions spécifiques et réversibles. La première molécule est immobilisée, la seconde se trouve dans la phase mobile, composée le plus souvent d'un mélange complexe. La purification se déroule alors en deux étapes clés : l'adsorption spécifique de la molécule à isoler puis, après le lavage pour éliminer les autres composés, la molécule pure est élueée dans des conditions où la liaison avec le composé immobilisé n'est plus stable (Figure II-1 A).

Le premier exemple de chromatographie d'affinité retrouvé dans la littérature date de 1910 [1] où Starkenstein et al. ont exploité l'affinité entre l'enzyme amylase et l'amidon insoluble. Cependant, le véritable essor a eu lieu dans les années 50, avec le développement de supports solides et l'évolution de la chimie d'immobilisation des molécules. La chromatographie d'affinité est alors largement utilisée par les biochimistes, avec notamment les travaux de Campbell et al. en 1951 sur l'isolation d'anticorps grâce à des protéines greffées sur cellulose [2] ou encore par Lerman et al. (1953) et Cuatrecasas et al. (1968) pour la purification sélective d'enzymes [3,4]. Pour toutes ces applications de purification, la chromatographie d'affinité fait appel à des interactions réversibles, spécifiques et surtout de forte affinité (donc avec des constantes de dissociation faibles). On retrouve fréquemment les couples antigène-anticorps avec des K_d entre 10^{-6} et 10^{-12} M [5], les étiquettes polyhistidine retenues sur des résines comportant des ions métalliques (nickel ou cobalt) avec des affinités allant du micromolaire à 10^{-13} M pour des systèmes plus optimisés [6], ou encore l'utilisation de la forte interaction entre l'avidine et la biotine ($K_d=10^{-15}$ M).

Cependant, plus récemment, la chromatographie d'affinité a également été utilisée pour étudier les interactions entre une protéine (immobilisée) et des ligands (solutés dans la phase mobile). On parle alors de chromatographie de faible affinité avec des constantes de dissociation allant du μM [7] jusqu'à la dizaine de mM et l'établissement d'un équilibre dynamique entre la protéine et son ligand. Ici, c'est la rétention du soluté après son passage dans la colonne qui est étudiée et qui permet d'accéder à des informations concernant l'interaction, notamment les constantes d'équilibre décrivant la liaison du ligand à la molécule cible immobilisée.

Cette technique dispose de nombreux avantages comme la possibilité de réutiliser les colonnes d'affinité pour plusieurs essais ce qui minimise les variations inter-analyses. La protéine cible étant immobilisée, un grand nombre d'analyses peut être réalisé en ne consommant qu'une faible quantité de biomolécule. L'automatisation est simple (utilisation d'appareils d'HPLC par exemple) et les analyses relativement rapides. Nous allons ici présenter les deux modes d'analyse les plus communs en chromatographie de faible affinité : l'analyse zonale, classiquement utilisée en chromatographie, qui consiste à injecter une faible quantité de composé(s) dans la colonne ; et l'analyse frontale où le(s) composé(s) est (sont) infusé(s) en continu dans la colonne. (Figure II-1 B).

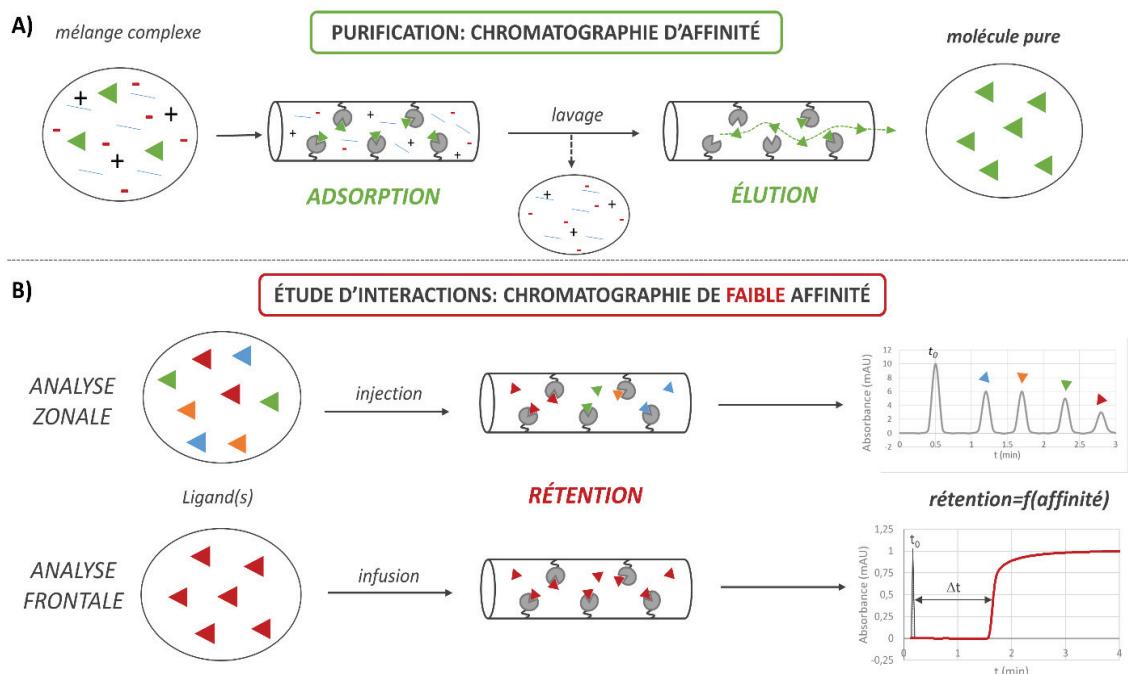


Figure II-1. Représentation schématique des deux grandes applications de la chromatographie d'affinité : la purification (A) et l'étude d'interactions entre deux molécules (B). On parle de chromatographie d'affinité lors de l'application à la purification de biomolécules (A). Cette méthode repose sur des interactions spécifiques, réversibles et de forte affinité entre une première molécule immobilisée et une seconde que l'on souhaite isoler, se trouvant souvent dans un mélange complexe. La molécule à purifier est alors adsorbée spécifiquement par la colonne d'affinité, les autres composés sont éliminés puis la molécule est éluée et récupérée pure en sortie de colonne. Pour l'étude d'interactions, on parle plutôt de chromatographie de faible affinité (B). Cette fois c'est la rétention des ligands sur la colonne greffée avec une biomolécule qui permet de remonter à des informations sur l'interaction. Cette application peut être utilisée avec deux modes d'élution : l'analyse zonale où une faible quantité du/des composé(s) est/sont injectée dans la colonne ou l'analyse frontale où il(s) est/sont infusé(s) en continu.

2. ANALYSE ZONALE

L'analyse zonale est la méthode la plus classique pour étudier les interactions protéine-ligand. C'est d'ailleurs le mode usuel pour la plupart des analyses en chromatographie : il consiste à injecter une petite quantité d'analyte dans une colonne et à mesurer son temps (ou son volume) de rétention grâce à un détecteur en ligne.

Ce mode d'élution ne nécessite que peu d'analyte et il est possible de les injecter en mélange (pour autant qu'il soit possible de détecter les composés séparément). Un appareil HPLC classique permet de faire des études en analyse zonale et de faibles affinités peuvent être détectées : dans de bonnes conditions, une modification du temps de rétention de quelques secondes peut être détectée.

Le mode d'élution zonal a été rapporté pour la première fois en chromatographie d'affinité dans les années 70 [8], puis plusieurs recherches ont été publiées dans les années 80-90 en utilisant des appareils d'HPLC. Aujourd'hui, la chromatographie de faible affinité en analyse zonale est largement utilisée pour permettre d'accéder à diverses informations sur les interactions protéine-ligands comme l'affinité, la nature de l'interaction ou encore les paramètres thermodynamiques et cinétiques de liaison.

2.1. De la théorie...

Les applications de l'analyse zonale sont basées sur le fait que le facteur de rétention k d'un analyte est le reflet direct de son interaction avec la colonne d'affinité. Il faut néanmoins distinguer deux phénomènes de rétention : les interactions spécifiques entre le ligand et un site actif de la protéine et les potentielles interactions non-spécifiques, générées par exemple par une partie hydrophobe de la protéine ou par la phase stationnaire, qui peuvent augmenter la rétention du ligand.

Le facteur de rétention k est relié au nombre de sites d'interaction i sur la cible et à leur fraction (n_i), aux constantes d'association du ligand pour chacun des sites ($K_{a,i}$), à la quantité totale de sites actifs par unité de volume (B_{act}/V_m) et éventuellement à une correction liée aux interactions non-spécifiques (k_{ns}) et peut être exprimé par la relation suivante :

$$k = \sum_i^n (K_{a,i} n_i) \times \frac{B_{act}}{V_m} + k_{ns} \quad (\text{Équation 1})$$

De façon expérimentale, k est calculé à partir du temps mort de la colonne (t_0) et du temps de rétention du composé étudié (t_r) :

$$k = \frac{t_r}{t_0} - 1 \quad (\text{Équation 2})$$

2.2. ...aux applications de l'analyse zonale

2.2.1. Criblage et classement de ligands

Le mode d'élution zonal est bien adapté au criblage de bibliothèques de composés grâce à la rapidité et à la simplicité des analyses. Un mélange de composés est injecté sur une colonne fonctionnalisée avec la cible à étudier. Plus la rétention est élevée, plus le composé a de l'affinité avec la protéine. Cependant, il est également nécessaire de tester les composés sur une colonne contrôle (non greffée ou contenant la protéine désactivée) pour appliquer une correction due aux potentielles interactions non-spécifiques (soustraction de la rétention non spécifique).

Il est également possible de comparer l'affinité de deux ligands pour une cible en comparant directement leurs facteurs de rétention sur une même colonne, à condition qu'ils interagissent sur un site d'interaction unique et commun. Dans ce cas, le ratio des facteurs de rétention équivaut directement au ratio des constantes d'affinité.

Enfin, si la colonne a été caractérisée précédemment (concentration de sites actifs connue, B_{act}/V_m), il est également possible d'estimer la constante d'affinité (K_a) dans le cas d'une interaction 1:1 (interaction du ligand sur un site unique de la protéine) en utilisant l'équation 1.

2.2.2. Expériences de compétition et de déplacement

Les expériences de compétition et de déplacement sont des applications courantes en analyse zonale. Le principe est d'injecter un ligand et d'étudier l'influence sur sa rétention de l'ajout d'un autre composé (compétiteur) dans la phase mobile. Il est alors simple de voir qualitativement s'il y a compétition entre les deux molécules. Sur l'exemple de la Figure II-2, on note une diminution de la rétention de la warfarine lorsque la concentration en compétiteur dans la phase mobile (tolbutamide) augmente : il y a compétition entre les deux molécules (ou un effet allostérique négatif, voir explications ci-après) sur une colonne greffée HSA.

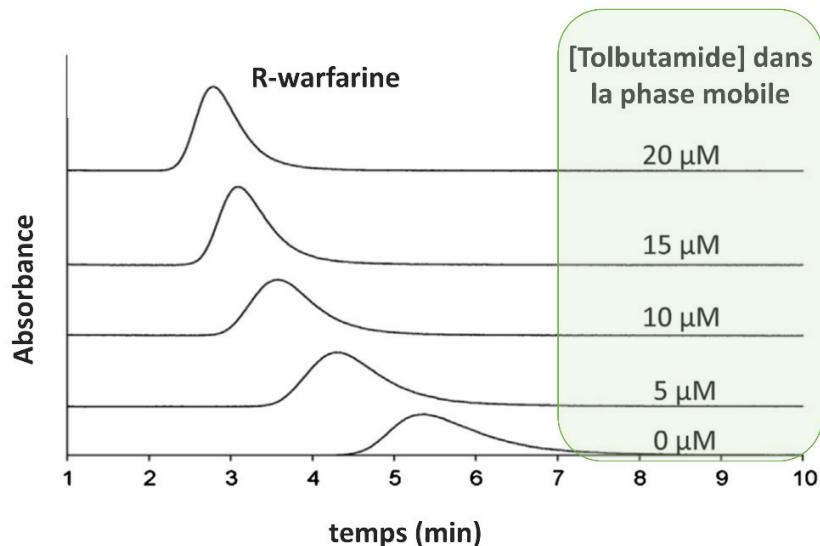


Figure II-2. Exemple d'expérience de compétition : on peut observer la diminution de la rétention de la R-warfarine sur une colonne greffée avec la HSA (Human Serum Albumin) en présence de quantités croissantes de tolbutamide en tant que compétiteur (adaptée de [9]).

Les expériences sont réalisées avec des concentrations croissantes en compétiteur et en comparant les résultats aux modèles théoriques, il est possible d'accéder à davantage d'informations comme la nature de la compétition (directe, effet allostérique, ...) ou le nombre de sites impliqués. Pour accéder à ces informations, la première étape consiste à tracer l'inverse du facteur de rétention du ligand en fonction de la concentration du compétiteur. En fonction de l'allure de ces courbes, il est possible de remonter au mécanisme impliqué, d'une compétition directe sur un unique site d'interaction aux interactions multi sites, effets allostériques simples ou encore absence de compétition (Figure II-3). On parle d'effet allostérique lorsque le compétiteur se fixe sur la protéine au niveau d'un site autre que le site d'interaction du ligand tout en influençant la liaison du ligand sur la protéine : si la liaison est défavorisée c'est un effet allostérique négatif, à l'inverse si le compétiteur favorise l'interaction du ligand avec la protéine c'est un effet allostérique positif.

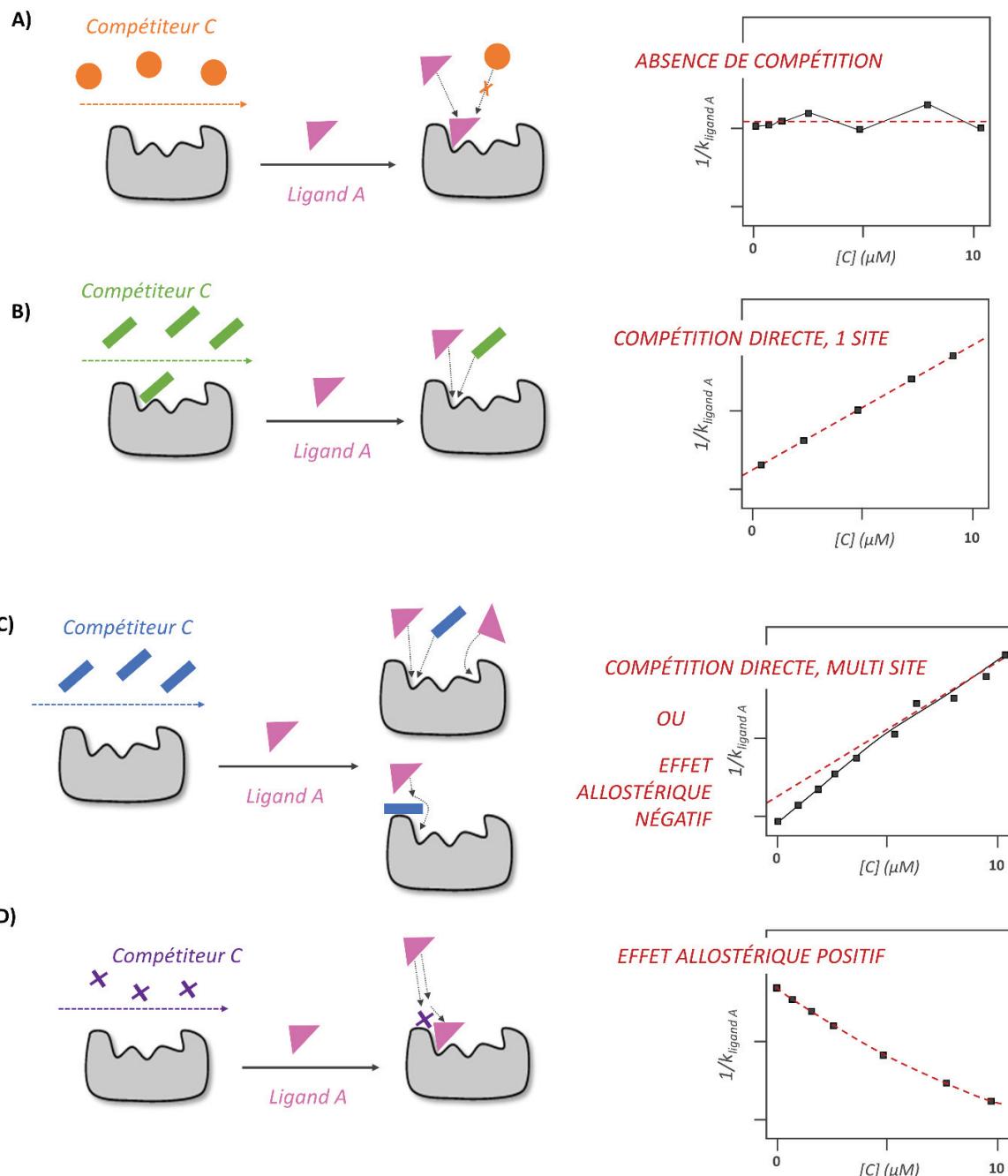


Figure II-3. Schéma des différents types d'interactions entre un ligand A et un compétiteur C et allure des graphes associés ($1/k_{\text{ligand } A} = f([C])$) (partiellement inspirée de [10,11]). L'absence de compétition n'entraîne pas de variations de k en fonction de la concentration du compétiteur (A). Une compétition directe donnera une droite croissante (B). La courbe dévie de la linéarité dans le cas d'une compétition multi-sites ou d'un effet allostérique négatif (C). Enfin, un effet allostérique positif entraîne une courbe décroissante et non-linéaire (D).

S'il n'y a pas de compétition entre les deux composés, la valeur du facteur de rétention ($k_{ligand\ A}$) ne varie pas en fonction de la concentration du compétiteur ajouté (Figure II-3 A). S'il existe une compétition directe entre les deux molécules au niveau d'un site unique et commun, la rétention du ligand A diminue avec l'augmentation de la concentration du compétiteur et le modèle ($1/k_{ligand\ A} = f([C])$) est alors linéaire avec une pente positive (Figure II-3 B). Une interaction multi-site ou un effet allostérique négatif du compétiteur qui défavorise l'interaction protéine-ligand entraîne une déviation à la linéarité mais la pente reste positive (Figure II-3 C). Au contraire, si la rétention du ligand augmente avec la concentration de compétiteur il s'agit alors d'un effet allostérique positif : le compétiteur favorise cette fois l'interaction et la pente est négative (Figure II-3 D).

En fonction de l'allure de la courbe obtenue, il est alors possible de déterminer le type d'interaction et d'écrire l'équation correspondante. Par exemple, pour une compétition directe d'un compétiteur C interagissant sur le même site que le ligand A, on a :

$$\frac{1}{k_A} = \frac{K_{a,C}}{K_{a,A} \times \frac{B_{act}}{V_m}} \times [C] + \frac{1}{K_{a,A} \times \frac{B_{act}}{V_m}} \quad (\text{Équation 3})$$

La pente de la droite $\frac{1}{k_A} = f([C])$ divisée par l'ordonnée à l'origine donne la constante d'affinité de l'interaction de ce compétiteur avec la cible ($K_{a,C}$). La mesure séparée de B_{act}/V_m permet aussi d'accéder à la constante d'affinité du ligand pour la cible ($K_{a,A}$). La plupart des équations correspondant aux différents modèles d'interactions ont été répertoriées dans la littérature [12].

2.2.3. Étude de la nature des interactions protéine cible-ligand

2.2.3.a) Influence de la composition de la phase mobile (conditions de reconnaissance)

En analyse zonale, il est également possible d'étudier l'effet de la modification de diverses conditions expérimentales sur l'interaction protéine-ligand (pH, force ionique, composition de la phase mobile ...). Ce type d'essais permet de comprendre l'influence de certains paramètres et de certaines espèces sur la force et la stabilisation de l'interaction. La modification du pH de la phase mobile peut par exemple modifier la conformation ou la charge globale des espèces (ligand et/ou cible) et donc impacter leur interaction. De même, l'ajout d'un faible pourcentage de solvant organique dans la phase mobile tend à diminuer l'effet hydrophobe, parfois nécessaire à la liaison d'un ligand à la protéine cible [13].

2.2.3.b) Influence de modifications structurales de la cible ou du ligand

Pour obtenir des informations sur le site de liaison en analyse zonale, il est possible d'étudier l'impact d'une modification structurale de la cible ou du ligand sur leur interaction. Ce type d'expérience permet alors de remonter à des relations structure-rétention appelées QSSR (quantitative structure-retention relationship) en étudiant un large panel de molécules structurellement proches. Il est ensuite possible de déterminer les facteurs les plus importants à l'établissement de la liaison. Il est également envisageable de modifier le site de liaison sur la cible et d'étudier l'altération de la liaison [14].

2.2.4. Détermination des paramètres thermodynamiques de l'interaction

La température est un autre facteur qu'il est possible de faire varier en analyse zonale. Au-delà de fournir des informations sur l'influence de la température sur la liaison protéine-ligand, ces essais peuvent également permettre de déterminer les paramètres thermodynamiques de l'interaction. En se basant à la fois sur l'équation générale reliant l'énergie libre de Gibbs ΔG d'une interaction aux variations d'enthalpie et d'entropie (ΔH et ΔS) et à la constante d'association K_a (Équation 4) et sur la relation entre la rétention et l'affinité (Équation 5) [15],

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT\ln K_a \quad (\text{Équation 4})$$

et

$$k = K_a \times \frac{B_{act}}{V_m} \quad (\text{Équation 5})$$

on peut écrire pour un système de liaison 1:1 protéine-ligand:

$$\ln k = -\left(\frac{\Delta H}{RT}\right) + \frac{\Delta S}{R} + \ln\left(\frac{B_{act}}{V_m}\right) \quad (\text{Équation 6})$$

(avec ΔG la variation d'enthalpie libre ($J \cdot mol^{-1}$), T la température absolue à laquelle le facteur de rétention est mesuré (K), R la constante des gaz parfaits ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$), ΔH et ΔS respectivement les changements d'enthalpie et d'entropie du système liés à l'interaction ($J \cdot mol^{-1}$ et $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$), k le facteur de rétention mesuré et B_{act}/V_m la concentration de sites actifs).

En considérant que la quantité de sites actifs B_{act} reste constante avec les changements de température, il est alors possible de tracer $\ln k$ (ou $\ln K_a$) en fonction de $1/T$ (appelée courbe de Van't Hoff) et la pente de cette droite donne directement accès à la valeur de ΔH (Figure II-4) [13].

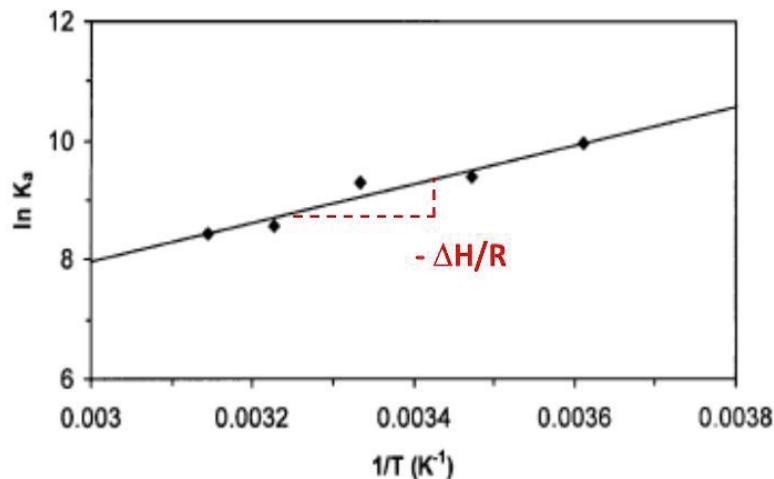


Figure II-4. Courbe de Van't Hoff pour l'interaction de la carbamazépine avec la HSA (tirée de [13]). La mesure a été effectuée à pH 7,4 en tampon phosphate 67 mM, et la régression linéaire donne un coefficient de corrélation 0.971 ($n=5$). La valeur de la pente permet de calculer une variation d'enthalpie d'interaction $\Delta H = -6,45 \pm 0,05 \text{ kcal.mol}^{-1}$

La formation d'un complexe protéine-ligand se produit car elle est thermodynamiquement favorable (le complexe est thermodynamiquement plus stable que le ligand et la protéine seule) : la thermodynamique fournit donc la force motrice pour la liaison des molécules thérapeutiques sur leurs cibles. La connaissance des paramètres thermodynamiques semble donc profitable lors d'un processus de drug discovery et peut orienter la sélection des composés à développer. En effet, pour atteindre une très forte affinité, il faut que les variations d'enthalpie et d'entropie soient favorables à la liaison. L'entropie est un paramètre relativement simple à optimiser mais l'enthalpie s'avère plus complexe [16]. Cependant cette optimisation est de plus en plus exploitée dans les programmes de recherche, notamment grâce aux améliorations techniques des appareils comme la microcalorimétrie (ITC) [17]. La balance entre l'enthalpie et l'entropie peut aussi impacter la sélectivité et dans le cas des fragments, les composés les plus intéressants auraient une contribution enthalpique à la liaison supérieure à leur contribution entropique [18]. Il semble donc avantageux de disposer de techniques capables de déterminer simplement les paramètres thermodynamiques au cours d'un projet de drug discovery pour être en mesure de les améliorer afin d'obtenir de meilleurs résultats plus rapidement.

2.2.5. Détermination des paramètres cinétiques de l'interaction

Il est également possible d'étudier la cinétique des interactions ligand-protéine (détermination des k_{on} et k_{off}) grâce à la chromatographie de faible affinité en s'intéressant à l'élargissement de pics.

Les études d'élargissement ou « band-broadening » ont été utilisées pour des études cinétiques en chromatographie à la fin des années 90 [19]. En se basant sur le mode d'élution zonal, des injections de ligand sont réalisées à différents débits (différentes vitesses u). En mesurant la largeur et le nombre de plateaux de chacun des pics obtenus il est possible de tracer des courbes de type Van Deemter (hauteur de plateau en fonction de la vitesse linéaire de la phase mobile). Les mêmes tests sont également réalisés sur des colonnes « contrôle » non greffées avec la protéine pour corriger les contributions à l'élargissement de pics autre que la résistance au transfert de masse. La contribution à la hauteur de plateau théorique (H_s) due aux interactions avec la phase stationnaire est calculée par différence entre la hauteur de plateau totale (H_{tot}) mesurée pour la colonne d'affinité et la hauteur de plateau mesurée sur la colonne contrôle (H_0). Ensuite, on peut écrire [20] :

$$H_s = \frac{2uk}{k_{off}(1+k)^2} \quad (\text{Équation 7})$$

Avec : H_s = hauteur de plateau théorique corrigée ($H_{tot}-H_0$)

u = vitesse linéaire de la phase mobile

k = facteur de rétention du ligand étudié

k_{off} = constante cinétique de dissociation du complexe protéine-ligand

Le tracé de H_s en fonction de $uk/(1+k)^2$ donne une droite de pente $2/k_{off}$ et d'ordonnée à l'origine nulle. La Figure II-5 illustre l'application de cette méthode pour la détermination de la constante cinétique de dissociation de l'interaction entre le D-tryptophane et la HSA.

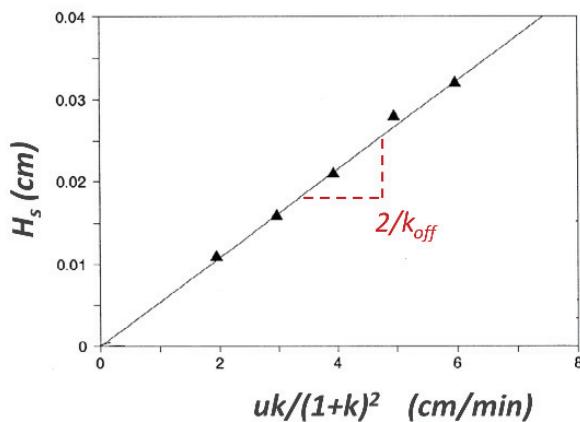


Figure II-5. Tracé de la hauteur de plateau H_s en fonction de $uk/(1+k)^2$ (tirée de [20]), avec u la vitesse linéaire de la phase mobile et k le facteur de rétention du D-Tryptophane. La pente de la droite a permis de déterminer une constante cinétique de dissociation (k_{off}) entre le D-tryptophane et la HSA de 5 s^{-1} à 25°C dans une phase mobile à pH 7,0.

Ensuite, avec la valeur de k_{off} obtenue et en connaissant la constante de dissociation K_d du complexe, il est possible de déterminer la constante cinétique d'association k_{on} sachant que :

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (\text{Équation 8})$$

Dans le cadre du drug discovery, la sélection de composés est le plus souvent basée sur l'affinité et la thermodynamique comme vu précédemment. Cependant, les paramètres cinétiques sont plus récemment au cœur de nombreuses discussions concernant leur intérêt dans l'optimisation des molécules leads. En effet, les constantes cinétiques vont définir le temps de séjour de la molécule au sein du site d'interaction, paramètre très important pour l'efficacité d'un médicament. De plus, la sélectivité thermodynamique n'est pas toujours corrélée avec la sélectivité cinétique, ce qui peut permettre de discriminer certains composés au cours du processus. [21,22]

2.3. Considérations pratiques

L'analyse zonale est assez simple à mettre en œuvre, cependant il est important d'être capable de mesurer précisément la rétention des composés testés et de bien sélectionner la colonne, la phase mobile et la quantité d'échantillon à injecter.

2.3.1. Détermination de la rétention

En analyse zonale, il est essentiel que le composé ait un temps de rétention mesurable (significativement différent du temps mort) et reproductible. Dans la majorité des études, le barycentre du pic sera considéré comme représentant l'équilibre local de l'analyte dans la colonne. Cette hypothèse peut être vérifiée en testant différents débits et en vérifiant que le facteur de rétention du composé reste constant. Dans le cas contraire, cela signifie qu'il est nécessaire de travailler avec un débit plus faible pour pouvoir atteindre ce point d'équilibre. La chromatographie de faible affinité engendre des pics asymétriques qui traînent, même en conditions d'élution linéaire, principalement à cause des cinétiques lentes d'association et de dissociation. Ainsi, pour mesurer la rétention de manière précise, il est recommandé de relever le temps de rétention au barycentre du pic plutôt qu'à son sommet.

2.3.2. Quantité injectée

La plupart du temps on cherche à se placer en conditions d'élution linéaire, c'est-à-dire à se situer dans la zone de concentration pour laquelle le rapport C_s/C_m est constant (C_s et C_m étant respectivement la concentration du ligand dans la phase stationnaire et dans la phase mobile). Pour respecter ces conditions, la quantité de ligand injectée doit être bien inférieure à la quantité de protéine active dans la colonne. Cela implique que la concentration en ligand soit très faible par rapport au K_d [23]. Cependant, la difficulté de greffer des quantités importantes de protéine cible et la perte potentielle d'activité au cours du

greffage limitent la quantité de sites actifs et il est souvent nécessaire de s'assurer d'être en conditions linéaires pour les analyses. Pour cela, le composé est injecté à différentes concentrations et le facteur de rétention doit rester constant, sinon il faut diminuer la quantité injectée. Cette quantité injectée est toutefois bornée d'une part par la solubilité du composé qui impose la concentration maximale injectable et d'autre part par la limite de détection qui fixe la concentration minimale envisageable. Pour améliorer la solubilité des composés trop hydrophobes, du solvant organique peut être ajouté dans l'échantillon mais le pourcentage doit rester faible pour garder une composition proche de celle de la phase mobile et ne pas modifier l'interaction avec la cible (voir CHAPITRE II :2.2.3.a).

2.3.3. Détection

La détection se fait la plupart du temps par spectrophotométrie UV voire en spectrométrie de masse, l'important étant toujours de maximiser le rapport signal sur bruit (S/N). L'ajout de certains additifs dans la phase mobile peut modifier la réponse du composé (notamment en spectrométrie de masse) et il est donc nécessaire de tester la détection avec les différentes compositions de phase mobile qui seront étudiées.

2.3.4. Phase mobile et température

Il est essentiel de bien contrôler et relever le pH ainsi que la composition de la phase mobile (type de tampon, concentration, additifs éventuels) sachant que même une faible variation peut modifier l'interaction protéine-ligand. Il est également idéal de pouvoir contrôler la température de la colonne pour un maximum de précision lors des études en analyse zonale.

2.3.5. Choix de la colonne pour l'analyse zonale

La colonne et plus particulièrement la quantité de protéine greffée doit être adaptée et contrôlée : il est préférable d'avoir une colonne de forte capacité (B_{act}/V_m élevé) pour tester des ligands de faible affinité pour maximiser le temps de rétention et détecter plus facilement un décalage avec le temps mort. En revanche, pour limiter le temps d'analyse dans le cas de composés plus affins, on préférera des colonnes plus courtes et/ou contenant moins de protéine. Il est également possible de travailler avec un débit plus élevé, en vérifiant que cela n'impacte pas les facteurs de rétention des composés, c'est-à-dire que l'équilibre est toujours atteint. Étant donné que la rétention en analyse zonale dépend de la quantité de protéine cible immobilisée active sur la phase stationnaire, il est important de greffer les colonnes dans des conditions permettant de conserver l'activité de la cible. Dans un premier temps, il est conseillé de caractériser la colonne avec un composé connu avant d'étudier de nouveaux ligands.

La nature de la phase stationnaire (support) est également à prendre en considération, certaines générant davantage d'interactions non-spécifiques que d'autres. Il est souvent indispensable de corriger les résultats avec une colonne contrôle contenant la même phase stationnaire mais pas de protéine cible ou une protéine cible désactivée. Lorsqu'on travaille en analyse zonale, il est important de préciser les dimensions de la colonne, le type de support (avec la taille des pores et des particules) ainsi que la quantité de protéine greffée (B_{tot}) et la proportion restée active (B_{act}), c'est-à-dire capable d'interagir de façon spécifique avec les ligands. Ces informations sont essentielles pour comparer entre eux les résultats de différentes études.

3. ANALYSE FRONTALE

L'analyse frontale est le second mode d'élution utilisé en chromatographie de faible affinité. Contrairement à l'analyse zonale où l'on injecte un créneau (un faible volume), l'analyse frontale consiste à infuser le composé à étudier de manière continue dans la colonne. Tant que le ligand est capturé par la protéine, la concentration de ligand en sortie de colonne est nulle. À la saturation de la colonne, la concentration du ligand augmente brutalement en sortie et est observée sous la forme d'une **courbe de percée** caractéristique. Le **temps de plateau** (également appelé **temps d'élution** ou **temps de demi-vague**, et parfois exprimé en volume) peut alors être relié à la **concentration** du composé, à la **quantité de sites actifs** et à la **constante d'affinité** du ligand pour la cible (K_a ou K_d). Bien qu'elle nécessite une quantité d'analyte plus importante que l'élution zonale, l'analyse frontale permet d'accéder à davantage d'informations. En effet, l'intérêt principal de ce mode d'élution réside dans la possibilité de déterminer à la fois la constante d'affinité et le nombre de sites actifs de la colonne en une seule série d'expériences. Cette technique est donc largement utilisée pour la caractérisation des colonnes et la détermination précise de l'affinité de l'interaction et de l'activité de la protéine immobilisée. De plus, contrairement au mode d'élution zonal, il n'y a pas de risques de surcharger la colonne ce qui peut représenter un second avantage. L'analyse frontale peut donc être utilisée pour de nombreuses applications comme la caractérisation de la colonne d'affinité (nombre de sites actifs), la détermination de la constante d'affinité (K_a ou K_d) et du mode de liaison (site unique ou multiple) comme mentionné précédemment ou encore pour des expériences de compétition ou pour l'étude de l'influence de la température ou de l'ajout de solvant sur l'affinité.

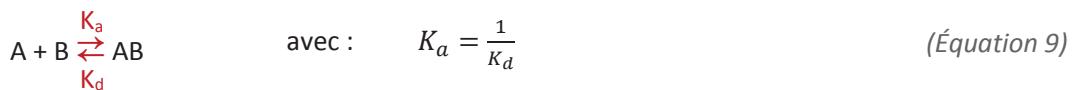
L'analyse frontale a été utilisée pour la première fois pour l'étude des interactions protéine-ligand par Kasai et Ishii en 1975 [24]. En 1978 ont suivi les études de Nakano et al. [25] sur des colonnes greffées BSA (bovine serum albumin) et les travaux des groupes de Lagercrantz en 1979 [26] et Hage et Loun en 1992 [27] sur la HSA et l'étude de différents ligands, permettant ainsi de poser les bases de la théorie en analyse frontale.

3.1. Quelques points de théorie

Dans un premier temps, dans le but d'exposer les principes de bases de l'analyse frontale, l'hypothèse sera faite que le ligand (A) possède un site d'interaction unique sur la protéine (B) (interaction 1:1) et des interactions non-spécifiques négligeables.

3.1.1. Définition de la quantité de ligand capturée

On peut écrire la réaction de formation d'un complexe ligand-protéine (AB) :



En analyse frontale, il est intéressant de déterminer la quantité d'analyte capturée par la colonne, c'est à dire la quantité de composé formant un complexe avec la protéine immobilisée sur la phase stationnaire (soit la quantité de AB). Cette quantité peut alors être exprimée en fonction de la concentration initiale de l'analyte percolé [A], du volume d'élution V du ligand étudié et du volume d'élution V_0 d'un composé qui n'a pas d'affinité pour la protéine (soit le volume mort ici) :

$$q_{\text{capturée}} = [A] \times (V - V_0) \quad (\text{Équation 10})$$

En traçant la concentration du composé en sortie de colonne $[A]_{\text{sortie}}$ en fonction du volume percolé pour le ligand (en bleu) et pour le composé non-retenu (en noir), l'aire tracée en rouge entre les deux courbes de percée représente la quantité d'analyte capturée $q_{\text{capturée}}$ (en mol) (Figure II-6) [28] et permet d'illustrer la relation précédente (Équation 10).

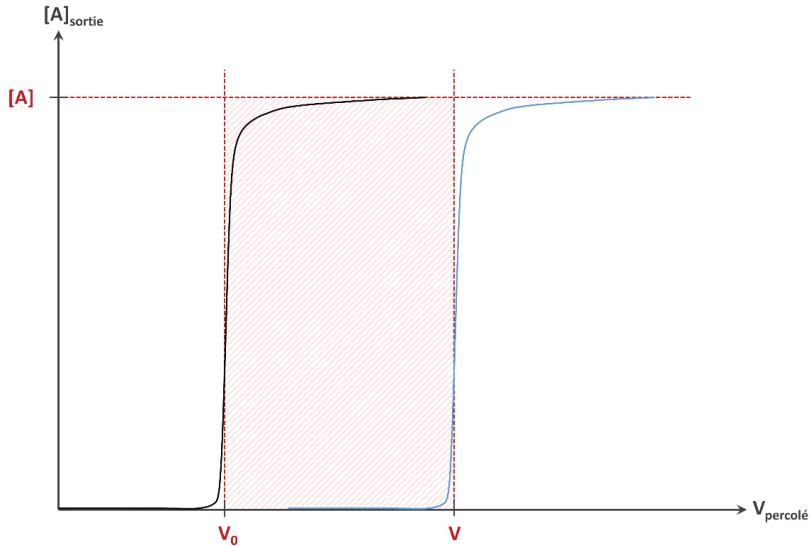


Figure II-6. Tracé du volume percolé en fonction de la concentration du ligand en sortie de colonne $[A]_{\text{sortie}}$ (reproduite de [28]). Cette représentation permet la détermination graphique de la quantité d'analyte capturée en prenant l'aire délimitée par les deux courbes, c'est-à-dire entre le volume d'élution du ligand en bleu (V) et celui d'un composé non retenu en noir (V_0).

3.1.2. Relations entre la quantité capturée, la constante de dissociation K_d et la quantité de sites actifs B_{act}

Ensuite, il est possible de relier cette quantité capturée à la quantité de sites actifs B_{act} et à la constante de dissociation du complexe protéine-ligand (K_d) en repartant de la définition de ce dernier :

$$K_d = \frac{[A]_{\text{éq}}[B]_{\text{éq}}}{[AB]_{\text{éq}}} \quad (\text{Équation 11})$$

En faisant l'hypothèse que $[A]_{\text{éq}} = [A]_{\text{infusée}}$ (noté $[A]$ ensuite) car le ligand A est continuellement infusé dans la colonne, on peut écrire :

$$K_d = \frac{[A]([B]_0 - [AB]_{\text{éq}})}{[AB]_{\text{éq}}} \quad (\text{Équation 12})$$

$[B]_0$ correspond alors à la quantité de sites actifs sur la colonne par unité de volume (noté B_{act}/v) et $[AB]_{\text{éq}}$ correspond à la concentration du complexe ligand-protéine formé, ce qui équivaut à la quantité de ligand capturée par unité de volume ($q_{\text{capturée}}/v$).

On a donc :

$$K_d = \frac{[A] \left(\frac{B_{act} - q_{capturée}}{\nu} \right)}{\frac{q_{capturée}}{\nu}} \quad (\text{Équation 13})$$

et

$$q_{capturée} = \frac{[A](B_{act} - q_{capturée})}{K_d} \quad (\text{Équation 14})$$

enfin, on a :

$$q_{capturée} = [A] \times (V - V_0) = \frac{B_{act} \times [A]}{[A] + K_d} \quad (\text{Équation 15})$$

L'équation 15 permet de faire le parallèle avec l'équation de Michaelis-Menten, bien connue pour décrire la cinétique enzymatique basée sur le principe de l'isotherme de Langmuir. En traçant la quantité capturée en fonction de la concentration de l'analyte percolé $[A]$ (Figure II-7 A), on retrouve une courbe hyperbolique similaire à celle de Michaelis-Menten. On peut alors noter que la colonne tend vers la saturation ($q_{capturée}$ tend vers la quantité de sites actifs B_{act}) pour une concentration d'analyte qui tend vers l'infini. De plus, il est possible de faire apparaître la constante de dissociation (K_d) sur le graphe lorsque la courbe atteint la moitié de la quantité de sites actifs sur la colonne soit $B_{act}/2$.

L'équation 15 peut être linéarisée (Figure II-7 B) pour permettre de déterminer la quantité de sites actifs ainsi que la constante de dissociation (toujours dans l'hypothèse d'un site d'interaction unique et d'interactions non-spécifiques négligeables, voir les applications CHAPITRE II :3.2), c'est l'équation de Lineweaver-Burk :

$$\frac{1}{q_{capturée}} = \frac{K_d}{B_{act}} \times \frac{1}{[A]} + \frac{1}{B_{act}} \quad (\text{Équation 16})$$

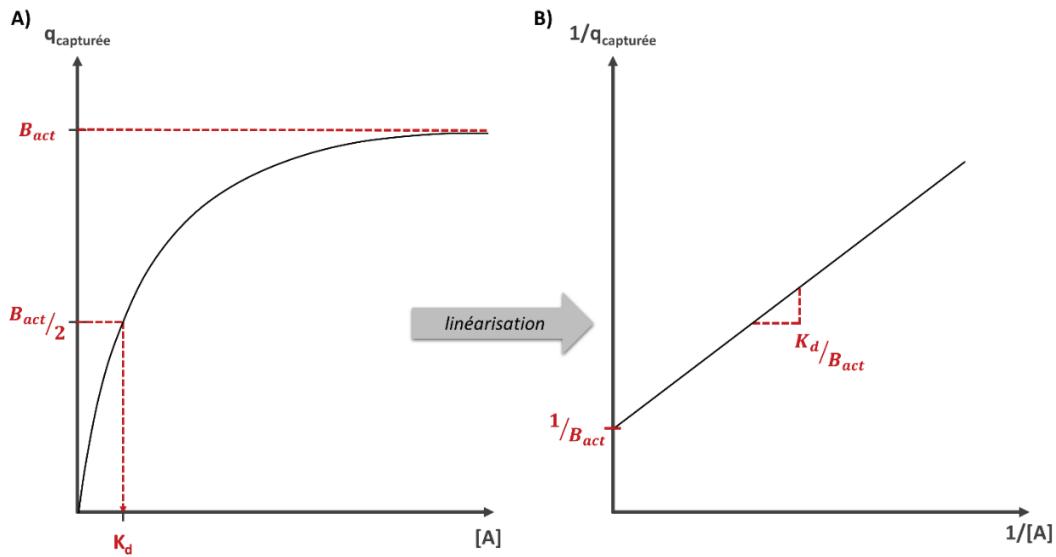


Figure II-7. Représentation de la quantité de ligand capturée en fonction de la concentration percolée $[A]$ (à gauche, reproduite de [28]) et représentation de la double réciproque $1/q_{\text{capturée}}=f(1/[A])$ (à droite). La colonne tend vers la saturation ($q_{\text{capturée}} \rightarrow B_{\text{act}}$) pour une concentration percolée qui tend vers l'infini. La constante de dissociation K_d se trouve à l'intersection de la courbe avec l'horizontale $B_{\text{act}}/2$. La linéarisation permet la détermination de la quantité de sites actifs (ordonnée à l'origine= $1/B_{\text{act}}$) et de la constante d'affinité K_d (la pente équivaut à K_d/B_{act}).

3.1.3. Interactions spécifiques vs interactions non-spécifiques

Les interactions dites « spécifiques » entre un ligand et la protéine sont caractérisées par le décalage du temps (ou volume) d’élution lors de la variation de la concentration de l’analyte infusé (ce qui n’est pas le cas pour des interactions non-spécifiques, Figure II-8).

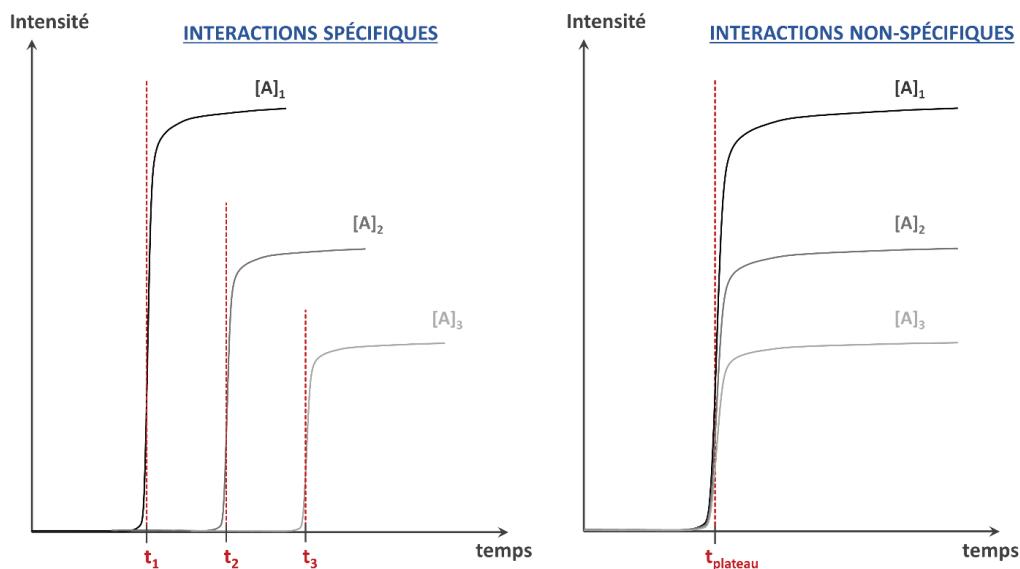


Figure II-8. Allure théorique des plateaux en analyse frontale (intensité du signal en fonction du temps) à différentes concentrations de ligands, pour des interactions spécifiques et non-spécifiques. Les interactions spécifiques sont caractérisées par une augmentation du temps de plateau lorsque la concentration de ligand infusé diminue. En revanche, dans le cas d’interactions non-spécifiques du ligand avec la colonne, le temps de plateau est constant pour toute concentration infusée et la quantité capturée directement proportionnelle à la concentration infusée.

En traçant le volume d'élution en fonction de la concentration d'analyte [A] (Figure II-9), on peut en effet observer que la courbe tend vers un minimum V_0 (soit le volume d'élution d'un composé non-retenu) pour des concentrations élevées et vers un volume maximum V_{max} pour une concentration d'analyte infiniment faible.

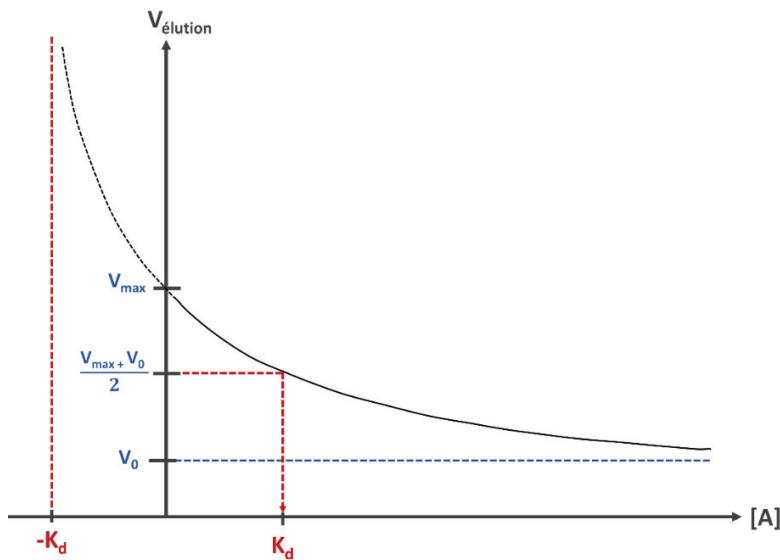


Figure II-9. Représentation de l'évolution du volume d'élution en fonction de la concentration de l'analyte percolé [A] (reproduite de [28]). Le volume d'élution est borné par un maximum V_{max} pour une concentration [A] qui tend vers 0, et par un minimum V_0 pour une concentration qui tend vers l'infini. On retrouve la constante de dissociation K_d à l'intersection entre la courbe et l'horizontale au niveau de la valeur moyenne entre V_{max} et V_0 .

Pour comprendre ces tendances, il est possible d'écrire l'équation 10 sous la forme :

$$q_{capturée} = [A] \times (V - V_0) = B_{act} - K_d \times (V - V_0) \quad (\text{Équation 17})$$

puis ensuite

$$V = V_0 + \frac{B_{act}}{[A] + K_d} \quad (\text{Équation 18})$$

L'équation 18 permet d'illustrer les asymptotes de la figure précédente : lorsque [A] tend vers l'infini, le volume d'élution tend vers un minimum V_0 et quand [A] tend vers zéro, le volume s'approche d'un maximum $V_{max} = V_0 + \frac{B_{act}}{K_d}$. On notera également qu'il est possible ici aussi de mettre en évidence la valeur du K_d au niveau du volume moyen $\left(\frac{V_{max}+V_0}{2}\right)$ ou de l'asymptote verticale ($-K_d$).

En réalité, certains cas peuvent se révéler plus complexes, notamment à cause d'interactions non-spécifiques importantes entre le ligand et la colonne (phase stationnaire, protéine hors sites d'interactions, ...) ou si le ligand présente plusieurs sites d'interactions spécifiques. La nature des interactions doit donc être déterminée pour parvenir à caractériser la colonne et à calculer les constantes d'affinité du ligand étudié (voir l'application CHAPITRE II :3.2.1 ci-après).

3.2. De la théorie à la pratique : applications de l'analyse frontale

3.2.1. Mesure de l'affinité (K_d) et du nombre de sites actifs (B_{act})

L'analyse frontale est principalement appliquée à la détermination quantitative de l'affinité et du nombre de sites actifs sur la colonne. Le ligand est alors infusé successivement à des concentrations croissantes, avec une étape de rinçage entre chaque concentration afin d'éliminer toutes les molécules précédemment retenues par la protéine. Dans la partie théorique précédente, la plupart des courbes de percée sont présentées en concentration d'analyte [A] en fonction du volume percolé mais dans la pratique on suivra plutôt l'intensité du signal (absorbance UV par exemple) en fonction du temps.

Pour chaque concentration, la quantité de ligand capturée par la colonne est ensuite calculée : en pratique, la quantité capturée décrite par l'équation 15 ci-dessus peut aussi s'exprimer en fonction du débit dans la colonne (F), de la concentration du ligand [A] et du temps de plateau pour chaque analyse :

$$q_{capturée} = F \times [A] \times \Delta t \quad (\text{Équation 19})$$

et $\Delta t = t_{plateau} - t_0 \quad (\text{Équation 20})$

avec le temps de plateau noté $t_{plateau}$ et t_0 le temps mort de la colonne.

Cependant, la quantité totale de ligand capturée représente parfois la somme de la quantité capturée de façon **spécifique** par la protéine (c'est-à-dire au niveau d'un site d'interaction) et d'une quantité d'analyte capturée de façon **non-spécifique**, par la phase stationnaire qui sert de support à la cible ou par des parties hydrophobes de la protéine par exemple. La quantité de ligand capturée de façon non-spécifique varie linéairement avec la concentration de l'analyte et peut donc s'écrire :

$$q_{non-spécifique} = k_{ns} \times [A] \quad (\text{Équation 21})$$

Avec k_{ns} une constante représentant l'importance de ces interactions. Contrairement au cas des interactions spécifiques, le temps de demi-vague des courbes de percée pour des interactions non-spécifiques reste le même quelle que soit la concentration de l'analyte (Figure II-8). Et on a donc pour chaque analyse :

$$q_{capturée} = q_{spécifique} + q_{non-spécifique} = (F \times [A] \times \Delta t) + (k_{ns} \times [A]) \quad (\text{Équation 22})$$

Dans la pratique, les interactions non-spécifiques peuvent parfois être négligées, sinon il est possible de les estimer le plus souvent grâce à des colonnes contrôles ne comportant pas de protéine cible, une protéine cible désactivée ou une protéine dont le site actif est bloqué par un ligand de forte affinité.

Le tracé de la double réciproque $\frac{1}{q_{capturée}} = f\left(\frac{1}{[A]}\right)$ est le plus souvent utilisé pour déterminer le modèle d'interaction le plus approprié aux résultats obtenus (Figure II-7). On distingue alors trois cas de figure (Tableau II-1) :

3.2.1.a) Interaction sur un site unique et interactions non-spécifiques négligeables

Dans le cas où le ligand n'interagit que sur un site unique de la protéine et que les interactions non spécifiques sont négligeables, la courbe est linéaire et on retrouve l'équation 16 (Tableau II-1 a). La quantité de sites actifs B_{act} est équivalente à l'inverse de l'ordonnée à l'origine puis la constante K_d est directement déterminée en divisant la pente par l'ordonnée à l'origine.

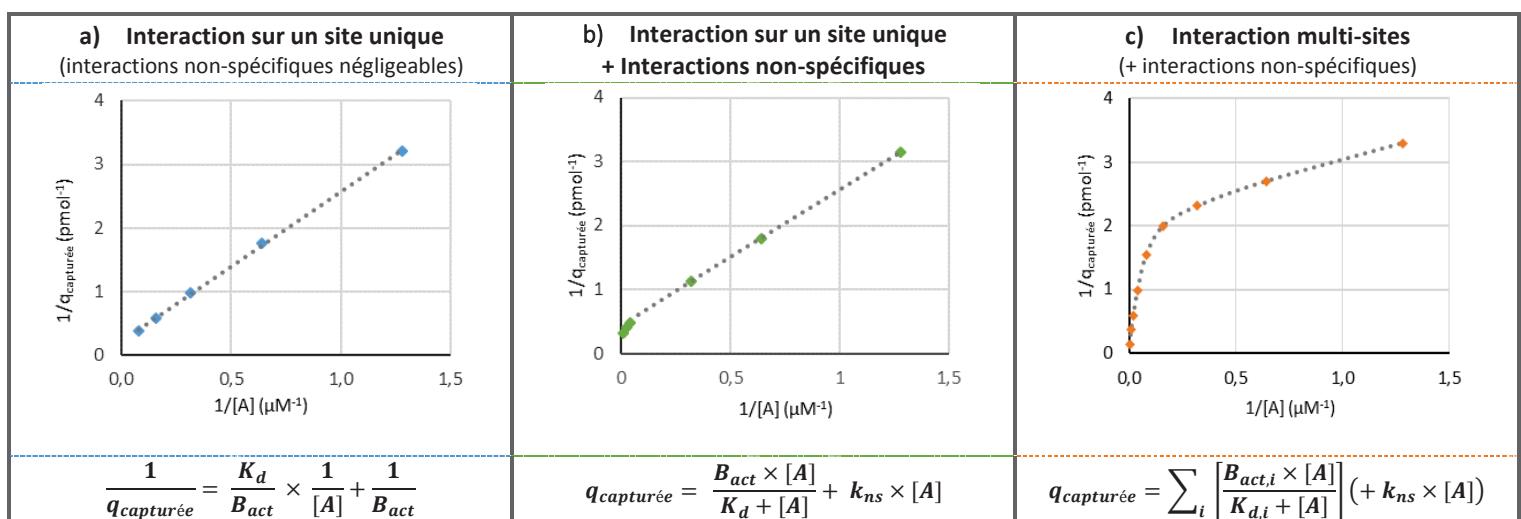
3.2.1.b) Interaction sur un site unique et interactions non-spécifiques non-négligeables

Si le ligand interagit toujours de façon spécifique sur un unique site de la protéine mais que ses interactions non-spécifiques sont non-négligeables, on remarque une déviation de la linéarité pour les concentrations les plus élevées. Les résultats peuvent alors être modélisés en ajoutant le terme lié au non-spécifique. (Tableau II-1 b)

3.2.1.c) Interaction multi-sites

Enfin, il est possible que le ligand interagisse de façon spécifique au niveau de plusieurs sites de la protéine. Le profil de la double réciproque n'est alors plus linéaire et les résultats sont modélisés avec le nombre de sites qui convient (Tableau II-1 c). Une constante pour le non-spécifique peut ici aussi potentiellement être ajoutée.

Tableau II-1 Allures de la double réciproque de la quantité capturée en fonction de la concentration de l'analyte pour différents types d'interactions ainsi que les équations correspondantes.



3.2.2. Une alternative : la méthode « staircase »

L'inconvénient majeur de la mesure d'affinité par analyse frontale est le temps de rinçage entre chaque concentration d'analyte infusée. En effet, il est indispensable de rincer suffisamment la colonne (mais uniquement dans des conditions douces pour ne pas altérer la biomolécule) pour s'assurer que tout le ligand précédemment capturé soit bien éliminé. Ces étapes de rinçage sont longues et peuvent se révéler critiques pour des colonnes avec un temps de vie limité. L'approche « staircase » consiste alors à infuser l'analyte à des concentrations croissantes mais en supprimant l'étape de rinçage entre chaque infusion (Figure II-10) [29].

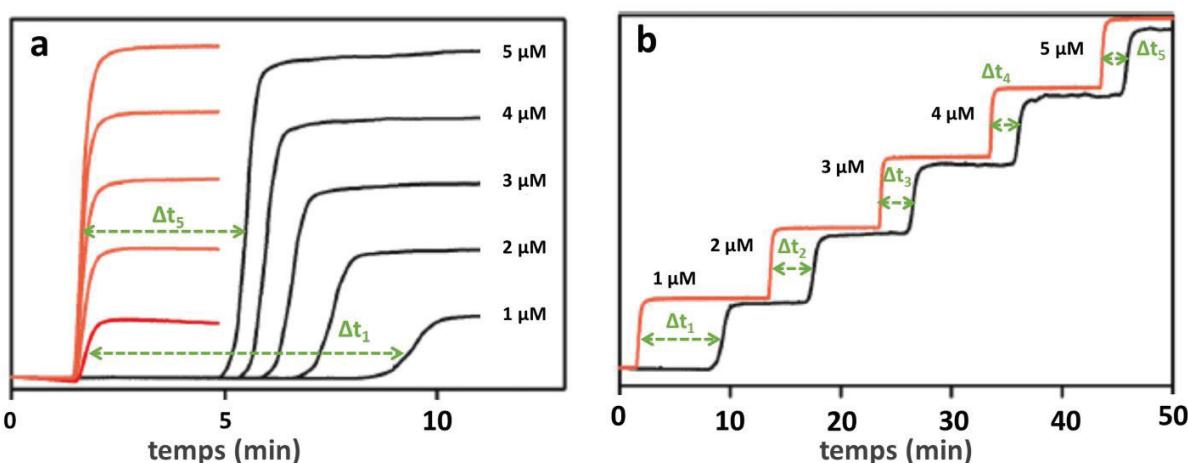


Figure II-10. Allure des plateaux en analyse frontale « classique » (a) et « staircase » (b) pour la warfarine sur une colonne greffée HSA (en noir) et sur une colonne contrôle (en orange) pour des concentrations allant de 1 à 5 μM . (Tirée de [30])

La quantité capturée pour une concentration j est calculée avec la formule habituelle, mais l'on retranche à la concentration infusée $[A]$ la concentration infusée précédemment $[A]_{j-1}$:

$$q_{\text{capturée},i} = F \times ([A]_j - [A]_{j-1}) \times \Delta t_j \quad (\text{Équation 23})$$

Dans l'exemple ici, l'écart de temps Δt est relevé entre le temps de plateau du composé sur une colonne greffée avec la biomolécule et celui de ce même composé sur une colonne contrôle (non-greffée), c'est une des façons de retirer la rétention due aux interactions non-spécifiques. La quantité capturée ainsi calculée correspond alors uniquement aux interactions spécifiques. Ensuite il est toujours possible d'utiliser le modèle linéaire de $1/q_{\text{capturée}} = f(1/[A])$ mais en considérant pour chaque étape les sommes cumulées des quantités capturées. Cette méthode conduit à des résultats comparables à ceux obtenus par analyse frontale classique comme explicité par He et al. [30] pour différents ligands (Tableau II-2).

Tableau II-2. Constantes de dissociation de différents ligands de la HSA (Human Serum Albumin) et de AGP (alpha-1-acid glycoprotein) mesurées par analyse frontale « classique » et par l'analyse en « staircase », comparaison à la littérature. (adapté de [30])

Composé infusé	Colonne	K _d (μM)		
		analyse frontale	analyse « staircase »	littérature
Warfarine	HSA	1,77±0,14	2,62±0,02	2,04 - 13,8 [31–34]
Digitoxin	HSA	13,8±0,2	13,5±0,2	19,2 [35]
Verapamil	AGP	7,66±0,11	7,56±0,27	2,48 - 4,79 [36]
Tamsulosin	AGP	6,04±0,08	6,13±0,24	1,57[37]

3.2.3. Expériences de compétition et de déplacement

Il est également fréquent de réaliser des expériences de compétition en analyse frontale. Ce type d'expérience est réalisé de la même façon qu'en élation zonale : on observe l'influence de l'ajout d'un compétiteur sur le temps de plateau du ligand étudié. Une compétition directe ou un effet allostérique négatif peuvent être mis en évidence par la diminution du temps de plateau du ligand lorsque la concentration du compétiteur est augmentée dans la phase mobile. À l'inverse, une augmentation de ce temps traduit souvent la présence d'un effet allostérique positif (voir CHAPITRE II :2.2.2 sur la compétition par analyse zonale). Il est également possible de classer différents compétiteurs de façon qualitative voire même quantitative en comparant leurs effets respectifs sur un ligand de référence. La Figure II-11 illustre un exemple d'expériences de déplacement par analyse frontale sur une colonne greffée avec une protéine nommée Sirtuine 6 ou SIRT6. [38]

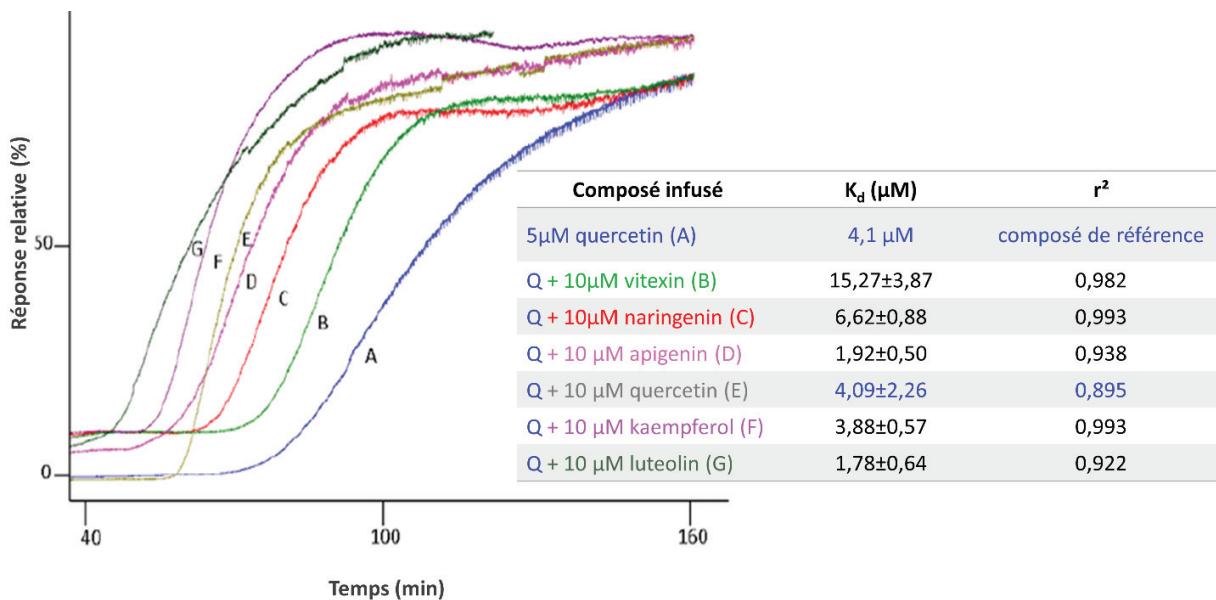


Figure II-11. Exemple d'expériences de déplacement en analyse frontale (tirée de [38]). La quercétine (Q) a été choisie comme composé de référence et sa rétention a été mesurée seule à 5 μM sur une colonne greffée avec la protéine Sirtuine 6. Ensuite, différents compétiteurs ont été ajoutés à la phase mobile et la rétention de la quercétine (5 μM) a été mesurée en présence de chacun de ces composés à 10 μM . L'influence sur la rétention du composé référence permet de classer la plupart des compétiteurs par affinité croissante et même de calculer leurs constantes de dissociation en connaissant celle du composé référence.

En observant l'effet de l'ajout de différents compétiteurs flavonoïdes sur la rétention d'un composé référence (la quercétine), il a été possible de classer les compétiteurs par ordre d'affinité pour la cible. Connaissant la constante d'affinité du composé de référence ($K_{d,\text{réf}}$) et la quantité de sites actifs sur la colonne (B_{act}), il est possible de calculer la constante d'affinité du compétiteur testé ($K_{d,C}$) grâce à la relation [9]:

$$K_{d,C} = \frac{K_{d,\text{réf}} \times [C]}{\frac{B_{\text{act}}}{(V_r - V_{\text{min}})} - K_{d,\text{réf}}} \quad (\text{Équation 24})$$

avec V_r le volume d'élution du composé de référence seul et V_{min} ce même volume d'élution lorsque l'interaction spécifique avec la protéine est totalement supprimée (en présence d'une forte concentration de compétiteur par exemple).

3.2.4. Etudes de la température et de l'ajout de solvants

Comme mentionné précédemment, la modification de certains paramètres comme la température ou l'ajout de solvant dans la phase mobile peuvent altérer une interaction biomoléculaire. Comme l'analyse zonale, l'analyse frontale peut être utilisée pour étudier l'influence de ces paramètres sur l'interaction protéine-ligand. L'avantage ici est qu'il est possible d'étudier l'influence d'un changement de température ou de la composition de la phase mobile de façon indépendante sur l'affinité (K_d) et sur la quantité de sites actifs (B_{act}).

3.3. Considérations pratiques

3.3.1. Détermination du temps de plateau

L'analyse frontale nécessite une mesure précise du temps (ou volume) de demi-vague de la courbe de percée. Lorsque les courbes sont symétriques, il s'agit simplement de prendre le point équidistant entre la ligne de base et le plateau ou encore le maximum du pic de la dérivée du signal. Cependant dans de nombreux cas les paliers ne sont pas parfaitement symétriques et le temps de plateau est déterminé soit par intégration sous la courbe de percée soit en prenant non plus le maximum mais le barycentre du pic de la dérivée.

En utilisant les modèles pour calculer la quantité de sites actifs et les constantes d'affinité, il est supposé que le temps de plateau représente le point d'équilibre entre la protéine immobilisée et le ligand infusé. Pour valider cette hypothèse, il est possible de vérifier que ce temps reste constant pour des analyses à différents débits. Si ce n'est pas le cas, il sera alors nécessaire soit de diminuer la concentration de l'analyte ou le débit de travail soit d'augmenter la capacité de la colonne (donnant accès à une quantité de sites actifs plus importante).

Enfin, pour un maximum de précision, il est important d'avoir un décalage suffisant entre le temps mort de la colonne et le temps de plateau du ligand ainsi que de s'assurer que le ligand soit infusé suffisamment longtemps pour atteindre et former un plateau.

3.3.2. Choix des concentrations de l'analyte

Il est possible d'exprimer la fraction de protéine formant un complexe avec le ligand par rapport à la quantité totale de sites actifs et cette fraction dépend uniquement de la concentration de l'analyte infusé ($[A]$) et de la constante d'affinité (K_d) :

$$\frac{AB}{B_{act}} = \frac{[A]}{K_d + [A]} \quad (\text{Équation 25})$$

Par exemple, pour obtenir une variation d'au moins 10% dans la position de la courbe de percée, il faut donc travailler avec des concentrations en analyte entre 0,1 et 10 fois la valeur du K_d . La détectabilité et la solubilité vont ici aussi limiter la gamme de concentration utilisable.

Quand la gamme de concentration adaptée a été déterminée, on peut également jouer sur les dimensions de la colonne, la quantité de sites actifs (B_{act}) et le débit de travail (F) pour ajuster le temps d'analyse. En effet, l'écart de temps entre le temps de plateau et le temps mort de la colonne (Δt) ne dépend que de ces paramètres et de la force de l'interaction (K_d) :

$$\Delta t = \frac{B_{act} \times [A]}{F \times [A](K_d + [A])} \quad (\text{Équation 26})$$

La différence de temps est donc augmentée avec une quantité de protéine plus importante ou un débit plus faible mais la consommation en protéine sera alors plus élevée et l'analyse plus longue.

3.3.3. Choix de la colonne

Comme pour l'analyse zonale, le choix des dimensions de la colonne ainsi que la quantité de protéine qu'elle contient permettent d'adapter le temps d'analyse. Ici aussi, le procédé d'immobilisation de la biomolécule doit permettre la conservation de son activité. Enfin, il est nécessaire d'estimer l'importance des potentielles interactions non-spécifiques pour les différents ligands étudiés (colonne contrôle, protéine désactivée, ajout d'un compétiteur, ...).

4. LA CHROMATOGRAPHIE DE FAIBLE AFFINITÉ : UN OUTIL DE CHOIX POUR LE DRUG DISCOVERY

En reprenant les critères de comparaison des différentes techniques biophysiques (Tableau I-2), la chromatographie de faible affinité apparaît comme une méthode attrayante pour le criblage de fragments. En effet, comme il a été décrit dans ce chapitre, c'est une méthode qui permet d'accéder à de nombreuses informations sur l'interaction protéine-ligand : la constante d'affinité, la quantité de sites actifs ainsi que le mode d'interaction (simple ou multiple) peuvent être précisément déterminées par analyse frontale, tandis que l'analyse zonale permet d'évaluer rapidement le K_d par l'injection d'une seule concentration sur la colonne greffée (précédemment caractérisée; ainsi que sur une colonne contrôle). Les expériences de compétition permettent souvent de confirmer le site de liaison. Enfin il est également possible de déterminer les paramètres thermodynamiques et cinétiques de la liaison, informations pouvant s'avérer décisives dans le cadre du drug discovery.

Cette technique est également bien adaptée au FBDD puisqu'elle permet de détecter des affinités de l'ordre du μM à la dizaine de mM [39], correspondant aux K_d des fragments, généralement compris entre $10 \mu\text{M}$ et 10 mM [40].

La consommation en protéine est un des paramètres critiques dans le processus de recherche par criblage. Ici cette consommation est fortement limitée par l'immobilisation de la protéine : quelques milligrammes suffisent pour préparer une colonne à échelle classique. On peut noter aussi que ni la protéine ni les fragments n'ont besoin d'être marqués ici.

Ces colonnes sont utilisées pour de nombreuses analyses et ont montré une stabilité suffisante pour réaliser une campagne de criblage [39] (la stabilité dépend également de la protéine étudiée, mais l'immobilisation semble avoir tendance à stabiliser les biomolécules [23]). Par exemple, Duong-Thi et al. ont greffé des colonnes ($35 \times 2,1 \text{ mm}$; trypsin et thrombine) en consommant environ 5 mg de protéine et ils ont rapporté un taux d'activité d'environ 50 % après greffage [40].

Le débit de criblage est assez élevé lorsque la technique est couplée à la détection en spectrométrie de masse, qui donne la possibilité d'analyser les fragments en mélange. L'étude de plusieurs dizaines de composés à la fois est possible, ce qui permet de cribler de quelques centaines à quelques milliers de fragments par jour [39–41]. Meiby et al. [39] ont réalisé le criblage d'une centaine de fragments sur une colonne greffée avec la HSP90, en analysant des mélanges de 16 ou 17 composés par analyse zonale avec une détection en spectrométrie de masse (Figure II-12).

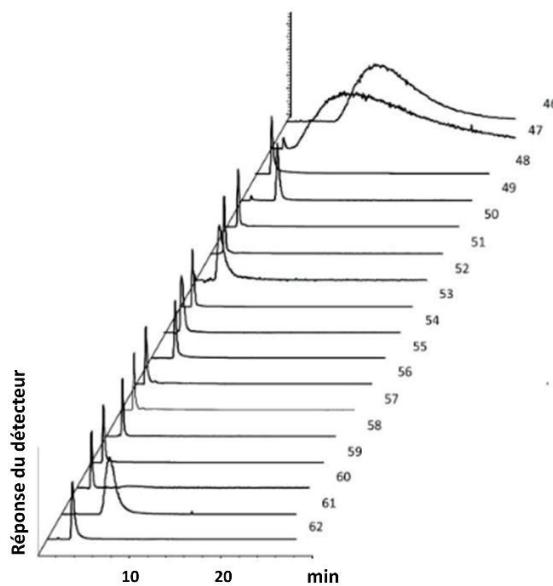


Figure II-12. Analyse par WAC-MS d'un mélange de 17 fragments sur une colonne HSP90 ($100 \times 0,5 \text{ mm}$). Chromatogrammes d'ions extraits (EIC) de chaque fragment à $100 \mu\text{M}$ en analyse zonale. Une différence de temps de rétention de 0,5 min ou plus entre le criblage non-compétitif et compétitif permet d'identifier les hits (avec un K_d inférieur à 2 mM). (Tirée de [39])

En outre, avec un traitement de données adapté, Ng et al. [42] ont été capables d'étudier jusqu'à 100 fragments par analyse frontale en une seule infusion de 30 minutes (Figure II-13).

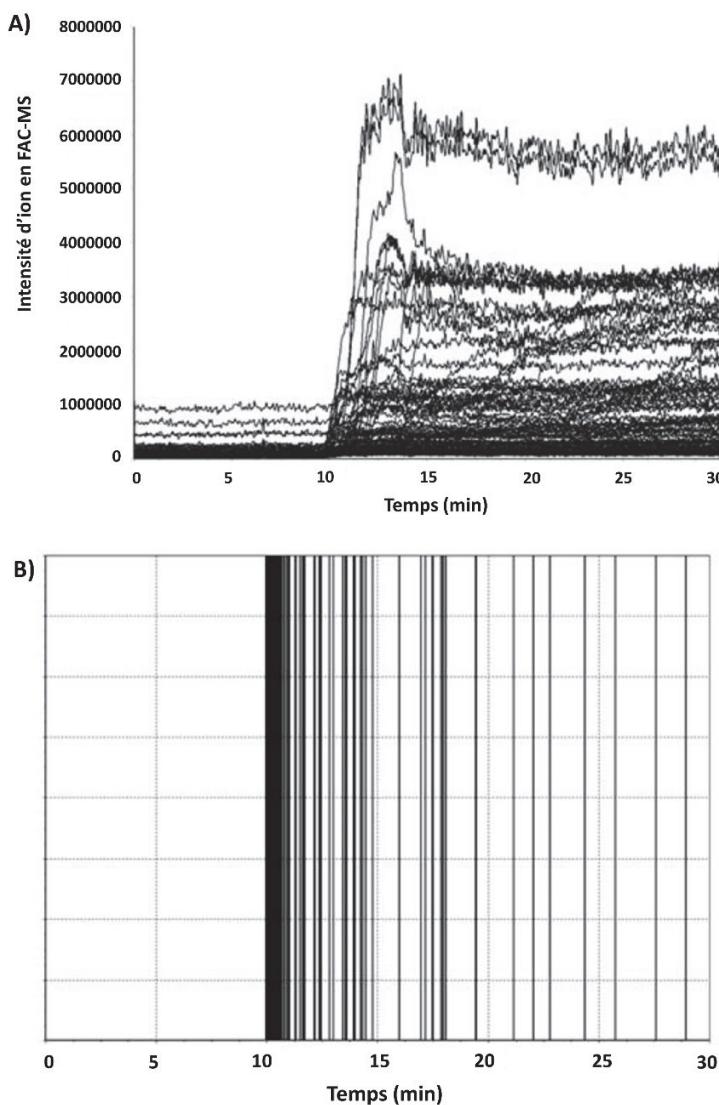


Figure II-13. WAC-MS d'un mélange de 100 composés sur une colonne greffée hER β (2,5 cm x 250 μ m d.i.). EIC des ligands à 1 μ M par analyse frontale (A) et diagramme en barre représentant le temps de plateau de chaque composé. (Tirée de [42]).

Le groupe d'Ohlson a également montré avec ses travaux sur la HSP90 que la chromatographie de faible affinité est comparable aux autres techniques en termes de résultats de criblage, avec notamment un taux de corrélation de 88 % avec la RMN et 83 % avec la SPR sur plus de 100 fragments testés (Figure II-14) [39].

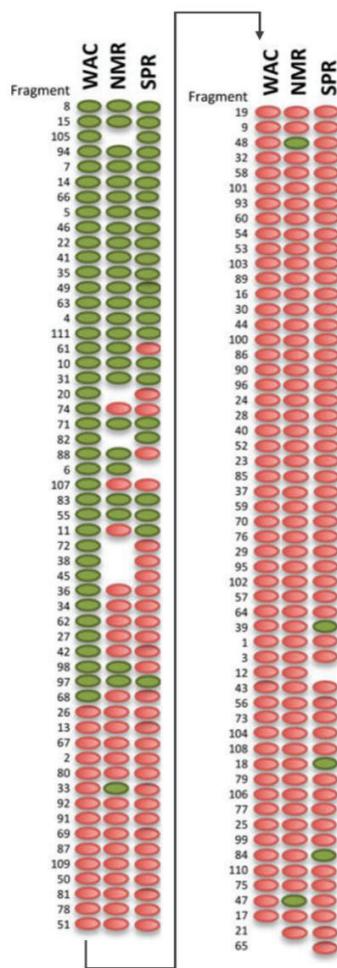


Figure II-14. Criblage de 111 fragments sur le domaine N-terminal de la HSP90 en chromatographie de faible affinité, RMN, et SPR (tirée de [39]). Les fragments sont classés par ordre décroissant d'affinité (basé sur les résultats en chromatographie de faible affinité). Les ligands ou « hits » sont représentés en vert, les non-ligands en rose et les cases vides signifie qu'aucune donnée n'est disponible. Cette figure permet d'illustrer la similitude des résultats obtenus par ces trois techniques de criblage.

Cependant, il est également important de noter les potentiels limitations et inconvénients de cette technique : l'immobilisation doit être réalisée de façon à conserver la conformation de la protéine ainsi que l'accès au site d'interaction. Il est donc souvent nécessaire de vérifier le taux d'activité de la biomolécule une fois greffée. De plus, comme pour la plupart des méthodes biophysiques, il est nécessaire d'avoir recours à des colonnes contrôles pour évaluer les interactions non-spécifiques et ainsi éviter les faux-positifs.

Au-delà de ces différents points de comparaison avec les autres techniques biophysiques, il est également possible de mettre en avant d'autres avantages propres à la chromatographie de faible affinité :

- la mise en œuvre est simple et rentable, grâce à la possibilité d'utiliser un équipement classique (HPLC, nano-LC) qui ne nécessite donc pas forcément un nouvel investissement et dont l'utilisation est souvent déjà maîtrisée [40].
- L'analyse des fragments se fait à faible concentration (du mM au µM) ce qui limite les problèmes éventuels de solubilité et également la consommation de chaque composé (de l'ordre du ng) [40].
- Les essais sont réalisés en conditions physiologiques (tampon phosphate ou acétate, pH 7), ce qui donne un environnement favorable à la stabilité de la protéine.
- Enfin il faut noter que le pouvoir séparatif de cette technique est un vrai atout. Cela permet d'analyser plus facilement les composés en mélange dès lors qu'il est possible de détecter chaque composé séparément. Il est également envisageable d'analyser directement des matrices complexes sans pré-traitement (échantillons biologiques, mélanges de synthèse organique non-purifiés, extraits de produits naturels, etc...)[40]. Enfin, ce pouvoir séparatif permet aussi de minimiser les interférences potentiellement dues au DMSO (solvant couramment utilisé pour solubiliser les fragments) car il n'est pas retenu sur les colonnes d'affinité et sortira donc au temps mort.

La chromatographie de faible affinité apparaît donc un outil de choix pour le drug discovery et plus précisément pour le FBDD.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. Starkenstein, Ferment Action and the Influence Upon It of Neutral Salts, Biochem. Z. 24 (1910) 210–218.
- [2] D.H. Campbell, E. Luescher, L.S. Lerman, Immunologic Adsorbents, Proc Natl Acad Sci U S A. 37 (1951) 575–578.
- [3] L.S. Lerman, A Biochemically Specific Method for Enzyme Isolation, Proc Natl Acad Sci U S A. 39 (1953) 232–236.
- [4] P. Cuatrecasas, M. Wilchek, C.B. Anfinsen, Selective enzyme purification by affinity chromatography., Proc Natl Acad Sci U S A. 61 (1968) 636–643.
- [5] Lucie MANACHE, Les puces à anticorps : nouveaux outils de diagnostic. Préparation d'un support plan fonctionnalisé et structuré pour une application dans le dépistage et le suivi des cancers bronchiques, UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1, 2010.
- [6] J.A. Bornhorst, J.J. Falke, [16] Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags, Methods Enzymol. 326 (2000) 245–254.
- [7] S. Ohlson, A. Lundblad, D. Zopf, Novel approach to affinity chromatography using “weak” monoclonal antibodies, Analytical Biochemistry. 169 (1988) 204–208. doi:10.1016/0003-2697(88)90275-8.
- [8] B.M. Dunn, I.M. Chaiken, Quantitative affinity chromatography. Determination of binding constants by elution with competitive inhibitors, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71 (1974) 2382–2385. doi:10.1073/pnas.71.6.2382.
- [9] X. Zheng, Z. Li, S. Beeram, M. Podariu, R. Matsuda, E.L. Pfaunmiller, C.J.W. Li, N. Carter, D.S. Hage, Analysis of biomolecular interactions using affinity microcolumns: A review, Journal of Chromatography B. 968 (2014) 49–63. doi:10.1016/j.jchromb.2014.01.026.
- [10] Z. Zhivkova, V. Russeva, New mathematical approach for the evaluation of drug binding to human serum albumin by high-performance liquid affinity chromatography, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 707 (1998) 143–149.
- [11] A. Sengupta, D.S. Hage, Characterization of minor site probes for human serum albumin by high-performance affinity chromatography, Anal. Chem. 71 (1999) 3821–3827.
- [12] DS Hage, J Chen, Quantitative affinity chromatography: practical aspects, in: Handbook of Affinity Chromatography, Taylor & Francis, DS Hage, Boca Raton, Florida, 2006: pp. 596–628.
- [13] H.S. Kim, D.S. Hage, Chromatographic analysis of carbamazepine binding to human serum albumin, Journal of Chromatography B. 816 (2005) 57–66. doi:10.1016/j.jchromb.2004.11.006.
- [14] R. Matsuda, J. Anguizola, K.S. Hoy, D.S. Hage, Analysis of drug-protein interactions by high-performance affinity chromatography: interactions of sulfonylurea drugs with normal and glycated human serum albumin, Methods Mol. Biol. 1286 (2015) 255–277. doi:strandh.
- [15] R. O'Brien, N. Markova, G.A. Holdgate, Thermodynamics in Drug Discovery, in: Applied Biophysics for Drug Discovery, John Wiley & Sons, Ltd, 2017: pp. 7–28. doi:10.1002/9781119099512.ch2.
- [16] G. Williams, G.G. Ferenczy, J. Ulander, G.M. Keserű, Binding thermodynamics discriminates fragments from druglike compounds: a thermodynamic description of fragment-based drug discovery., Drug Discovery Today. 22 (2017) 681–689. doi:10.1016/j.drudis.2016.11.019.
- [17] E. Freire, Do Enthalpy and Entropy Distinguish First in Class From Best in Class?, Drug Discov Today. 13 (2008) 869–874. doi:10.1016/j.drudis2008.07.005.
- [18] M. Whittaker, R.J. Law, O. Ichihara, T. Hesterkamp, D. Hallett, Fragments: past, present and future, Drug Discovery Today: Technologies. 7 (2010) e163–e171. doi:10.1016/j.ddtec.2010.11.007.
- [19] B. Loun, D.S. Hage, Chiral separation mechanisms in protein-based HPLC columns. 2. Kinetic studies of (R)- and (S)-warfarin binding to immobilized human serum albumin, Anal. Chem. 68 (1996) 1218–1225.
- [20] J. Yang, D.S. Hage, Effect of mobile phase composition on the binding kinetics of chiral solutes on a protein-based high-performance liquid chromatography column: interactions of D- and L-tryptophan with immobilized human serum albumin, J Chromatogr A. 766 (1997) 15–25.

- [21] P.J. Tonge, Drug–Target Kinetics in Drug Discovery, *ACS Chem Neurosci.* 9 (2017) 29–39. doi:10.1021/acschemneuro.7b00185.
- [22] V. Georgi, D. Andres, A.E. Fernandez-Montalvan, C.M. Stegmann, A. Becker, A. Mueller-Fahrnow, Binding kinetics in drug discovery - A current perspective, *Front Biosci (Landmark Ed).* 22 (2017) 21–47.
- [23] S. Ohlson, M.-D. Duong-Thi, Weak Affinity Chromatography (WAC), in: *Applied Biophysics for Drug Discovery*, John Wiley & Sons, Ltd, 2017: pp. 107–130. doi:10.1002/9781119099512.ch7.
- [24] K. Kasai, S. Ishii, Affinity chromatography of trypsin and related enzymes. I. Preparation and characteristics of an affinity adsorbent containing tryptic peptides from protamine as ligands, *J. Biochem.* 78 (1975) 653–662. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a130952.
- [25] N.I. Nakano, T. Oshio, Y. Fujimoto, T. Amiya, Study of drug–protein binding by affinity chromatography: Interaction of bovine serum albumin and salicylic acid, *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 67 (1978) 1005–1008. doi:10.1002/jps.2600670737.
- [26] C. Lagercrantz, T. Larsson, H. Karlsson, Binding of some fatty acids and drugs to immobilized bovine serum albumin studied by column affinity chromatography, *Analytical Biochemistry.* 99 (1979) 352–364. doi:10.1016/S0003-2697(79)80019-6.
- [27] B. Loun, D.S. Hage, Characterization of thyroxine—albumin binding using high-performance affinity chromatography, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 579 (1992) 225–235. doi:10.1016/0378-4347(92)80386-5.
- [28] K. KASAI, Frontal affinity chromatography: A unique research tool for biospecific interaction that promotes glycobiology, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 90 (2014) 215–234. doi:10.2183/pjab.90.215.
- [29] P. Draczkowski, D. Matosiuk, K. Jozwiak, Affinity Chromatography as a Tool for Quantification of Interactions Between Drug Molecules and Their Protein Targets, in: 2012. doi:10.5772/36282.
- [30] X. He, Y. Sui, S. Wang, Stepwise frontal affinity chromatography model for drug and protein interaction, *Anal Bioanal Chem.* 410 (2018) 5807–5815. doi:10.1007/s00216-018-1194-4.
- [31] A. Bhattacharya, S. Das, T.K. Mukherjee, Insights into the Thermodynamics of Polymer Nanodot–Human Serum Albumin Association: A Spectroscopic and Calorimetric Approach, *Langmuir.* 32 (2016) 12067–12077. doi:10.1021/acs.langmuir.6b02658.
- [32] H. Rimac, C. Dufour, Ž. Debeljak, B. Zorc, M. Bojić, Warfarin and Flavonoids Do Not Share the Same Binding Region in Binding to the IIA Subdomain of Human Serum Albumin, *Molecules.* 22 (2017) 1153. doi:10.3390/molecules22071153.
- [33] E.K. Schneider, J.X. Huang, V. Carbone, M. Baker, M.A.K. Azad, M.A. Cooper, J. Li, T. Velkov, Drug–drug plasma protein binding interactions of ivacaftor, *Journal of Molecular Recognition.* 28 (2015) 339–348. doi:10.1002/jmr.2447.
- [34] X. Zheng, M. Podariu, C. Bi, D.S. Hage, Development of enhanced capacity affinity microcolumns by using a hybrid of protein cross-linking/modification and immobilization, *Journal of Chromatography A.* 1400 (2015) 82–90. doi:10.1016/j.chroma.2015.04.051.
- [35] D.S. Hage, High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 768 (2002) 3–30.
- [36] K. Hanada, T. Ohta, M. Hirai, M. Arai, H. Ogata, Enantioselective Binding of Propranolol, Disopyramide, and Verapamil to Human α 1-Acid Glycoprotein, *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 89 (2000) 751–757. doi:10.1002/(SICI)1520-6017(200006)89:6<751::AID-JPS6>3.0.CO;2-8.
- [37] K. Hanada, N. Tochikura, H. Ogata, Selective binding of tamsulosin to genetic variants of human alpha1-acid glycoprotein, *Biol. Pharm. Bull.* 30 (2007) 1593–1595.
- [38] N. Singh, S. Ravichandran, D.D. Norton, S.D. Fugmann, R. Moaddel, Synthesis and characterization of a SIRT6 open tubular column: predicting deacetylation activity using frontal chromatography, *Anal. Biochem.* 436 (2013) 78–83. doi:10.1016/j.ab.2013.01.018.

- [39] E. Meiby, H. Simmonite, L. le Strat, B. Davis, N. Matassova, J.D. Moore, M. Mrosek, J. Murray, R.E. Hubbard, S. Ohlson, Fragment screening by weak affinity chromatography: comparison with established techniques for screening against HSP90, *Anal. Chem.* 85 (2013) 6756–6766. doi:10.1021/ac400715t.
- [40] M.-D. Duong-Thi, E. Meiby, M. Bergström, T. Fex, R. Isaksson, S. Ohlson, Weak affinity chromatography as a new approach for fragment screening in drug discovery, *Analytical Biochemistry*. 414 (2011) 138–146. doi:10.1016/j.ab.2011.02.022.
- [41] M.-D. Duong-Thi, M. Bergström, T. Fex, R. Isaksson, S. Ohlson, High-throughput fragment screening by affinity LC-MS, *J Biomol Screen.* 18 (2013) 160–171. doi:10.1177/1087057112459271.
- [42] W. Ng, J.-R. Dai, J.J. Slon-Usakiewicz, P.R. Redden, A. Pasternak, N. Reid, Automated Multiple Ligand Screening by Frontal Affinity Chromatography–Mass Spectrometry (FAC-MS), *Journal of Biomolecular Screening.* 12 (2007) 167–174. doi:10.1177/1087057106297567.

CHAPITRE III :

DÉVELOPPEMENT DE

COLONNES D'AFFINITÉ

MINIATURISÉES

CHAPITRE III : DÉVELOPPEMENT DE COLONNES D'AFFINITÉ MINIATURISÉES

Ces dernières années la chromatographie de faible affinité a montré ses avantages et sa complémentarité avec les autres méthodes de criblage biophysiques [1]. Sa mise en œuvre, relativement simple, se base sur la colonne d'affinité qui se trouve au cœur du système. Si des colonnes sont disponibles commercialement pour la chromatographie de forte affinité à des fins de purification, les colonnes dédiées à la chromatographie de faible affinité sont préparées à façon par les équipes de recherche.

Les objectifs principaux lors du développement d'une colonne d'affinité sont :

- Maximiser la concentration de sites actifs (B_{act}/V_m) afin de détecter de très faibles affinités et d'étendre la gamme de K_d accessible
- Minimiser les interactions non-spécifiques pour réduire les risques de faux positifs
- Consommer un minimum de protéine et permettre la réalisation de multiples analyses.

1. LES DIFFÉRENTS TYPES DE COLONNES D'AFFINITÉ

Il existe différentes géométries de colonnes, phases stationnaires et voies de biofonctionnalisation donnant accès à une multitude de combinaisons possibles.

1.1. Géométrie

Tout d'abord, dans la littérature on retrouve majoritairement des colonnes dites à « échelle classique », c'est-à-dire avec une longueur de quelques centimètres et un diamètre interne de 4,6 ou 2,1 mm. La consommation en protéine cible pour préparer ces colonnes s'élève alors à plusieurs de mg par colonne.

Il est donc intéressant de réduire cette échelle pour limiter la quantité de protéine nécessaire :

- soit en raccourcissant les colonnes : on parle alors de colonnes disques, de quelques mm de long (1 à 10 mm en général) [2,3]
- soit en diminuant le diamètre interne, comme l'a fait le groupe d'Ohlson en travaillant avec des colonnes de 0,5 mm [1,4] ce qui leur a permis de réduire la consommation à environ 1 mg de protéine cible par colonne.

1.2. Support chromatographique

Les phases stationnaires les plus couramment utilisées sont des phases particulaires à base de silice et plus particulièrement des particules de silice de 5 à 10 µm avec des pores de 30 nm [5–9]. Cette taille de pores est indispensable pour envisager le greffage de protéines. Ces particules de silice sont le plus souvent greffées en batch, en quantité suffisante pour préparer plusieurs colonnes identiques et donc limiter les incertitudes inter-colonnes. Cependant, l'étape de remplissage peut se révéler délicate pour des colonnes à échelle miniaturisée. C'est une des raisons pour lesquelles il est possible de remplacer les particules de silice par des phases stationnaires monolithiques de perméabilité élevée et synthétisées directement *in situ*. Les monolithes peuvent être à base de silice [10,11] ou de polymère organique (type glycidylméthacrylate/diméthacrylate d'éthylène GMA-co-EDMA) [12,13]. Les monolithes de silice préparés par procédé sol-gel présentent généralement des macropores de quelques µm qui assurent la perméabilité et des mésopores de quelques nm qui génèrent une surface spécifique élevée (plusieurs centaines de m²/g). Les monolithes organiques quant à eux disposent uniquement de macropores et leur surface spécifique est alors beaucoup plus faible (de l'ordre de quelques m²/g). Cependant, pour l'utilisation en chromatographie de faible affinité, il est nécessaire que les biomolécules à greffer aient accès à la surface du matériau et donc malgré une surface spécifique largement plus élevée, les monolithes de silice ne permettent pas obligatoirement de fixer davantage de biomolécules car les mésopores seront la plupart du temps inaccessibles [11]. De plus, les monolithes organiques peuvent présenter directement des fonctions réactives à la surface (époxydes par exemple, en fonction du(des monomère(s) utilisé(s)), ce qui évite une étape de pré-fonctionnalisation, indispensable dans le cas de la silice.

1.3. Immobilisation des biomolécules

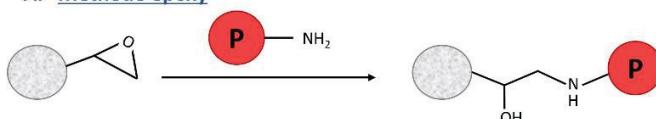
Pour l'étape de greffage des biomolécules, de nombreuses voies sont envisageables, la plupart impliquant la réactivité des amines primaires des protéines (portées par les lysines). Il est possible soit de faire réagir directement ces amines avec les groupements époxyde de la phase stationnaire (Figure III-1 A), soit d'activer le support avec des fonctions plus réactives. Il existe alors différentes voies d'activation, les plus utilisées étant schématisées sur la Figure III-1, avec une première étape d'ouverture des époxydes en diols réalisée en milieu acide :

- La méthode de la base de Schiff consiste à réaliser une amination réductrice (Figure III-1 B): les diols sont oxydés en aldéhydes par l'acide périodique (HIO₄). Les aldéhydes vont ensuite réagir avec les amines primaires de la biomolécule pour former des imines (appelées bases de Schiff, d'où le nom de la méthode), instantanément stabilisées en amines par un agent réducteur comme le NaBH₃CN.

- Dans la méthode CDI (Figure III-1 C), les groupements hydroxyle terminaux des diols réagissent avec le 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) pour former un intermédiaire carbamate sur lequel les amines vont se fixer par substitution nucléophile.
- Enfin, la méthode DSC (Figure III-1 D) consiste à activer le support avec le N,N'-disuccinimidyl carbonate, formant des groupements succinimidyl carbonate qui vont ici aussi réagir avec les NH₂ de la molécule à greffer.

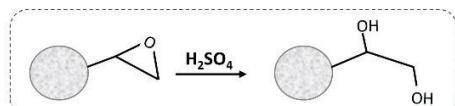
Greffage direct:

A. Méthode époxy

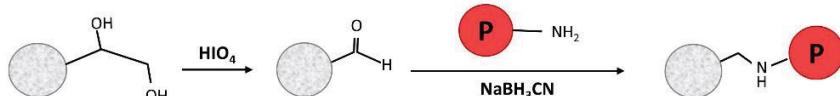


Support phase stationnaire P Protéine

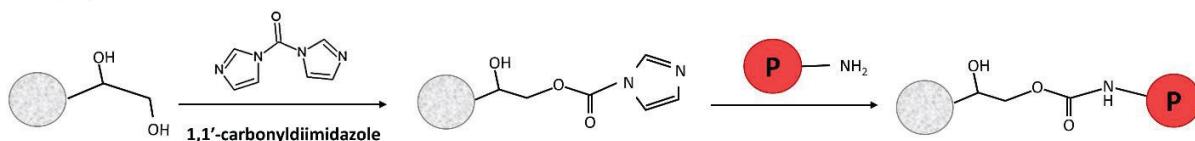
Activation via un diol:



B. Base de Schiff



C. CDI



D. DSC

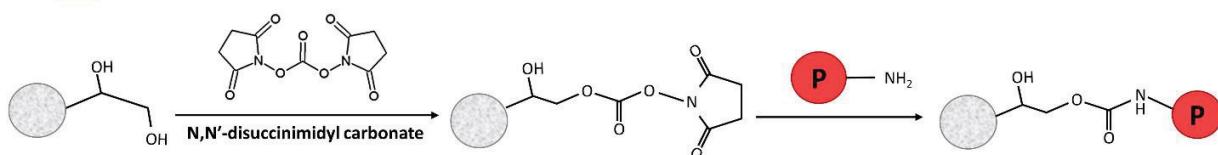
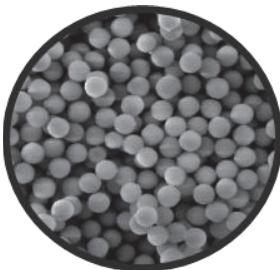
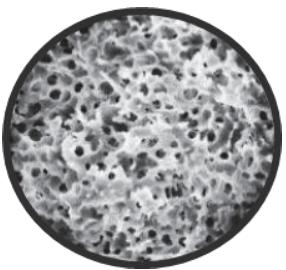
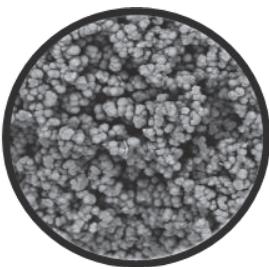
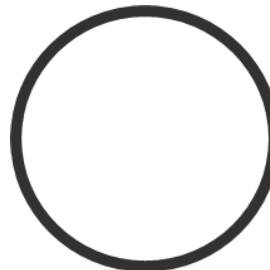


Figure III-1. Les différentes voies de greffage principalement utilisées en chromatographie de faible affinité pour l'immobilisation de biomolécules.

Dans tous les cas, ces phases stationnaires sont susceptibles de générer des interactions non-spécifiques avec les composés étudiés (structure du support, fonctions résiduelles après greffage, ...). Certains groupes de recherche ont alors développé des colonnes non-(ou partiellement) remplies notées OT (pour Open Tubular) dans l'objectif de minimiser ces interactions non-spécifiques. Développées à échelle capillaire (100 µm de diamètre interne i.d.) les colonnes OT sont fonctionnalisées directement à la surface du tube de silice fondue, via des voies de greffages indirectes (réaction des amines primaires de la biomolécule avec du glutaraldéhyde ou un groupe biotine-X (X=NHS ou CDI par exemple) fixés à la surface du capillaire) [14,15]. Cependant, dans ces deux exemples, les études ont révélé une quantité de sites actifs inférieure à celle obtenue sur des colonnes remplies (jusqu'à 200 fois moins dans le cas de l'immobilisation de la P-glycoprotein par Moaddel et al. [14]). Dans la même idée, mais pour augmenter la quantité de sites actifs, des colonnes dites PLOT ont alors été développées (Porous Layer Open Tubular) qui possèdent une couche de phase stationnaire à la surface du capillaire. Grâce à cette technologie, la quantité de sites actifs a pu être multipliée par un facteur 10 environ pour une même protéine greffée sur un tube vide [16]. Le Tableau III-1 illustre les différents types de colonnes et résume leurs caractéristiques principales.

Tableau III-1. Récapitulatif des différents types de colonnes utilisés en chromatographie de faible affinité avec leurs principales caractéristiques

COLONNES REMPLIES			COLONNES OUVERTES	
Particules de silice	Monolithe de silice	Monolithe organique	Open Tubular Column (OTC)	Porous layer Open Tubular (PLOT)
				
<ul style="list-style-type: none"> • Capacité élevée • Surface spécifique élevée • Greffage en batch puis remplissage : lot de colonnes identiques, remplissage délicat à échelle réduite • Taille des pores adaptée aux biomolécules • Génère des interactions non-spécifiques • Étape de pré-fonctionnalisation nécessaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Capacité élevée • Surface spécifique très élevée • Synthèse et greffage in-situ (facilite la réduction d'échelle) • Perméabilité élevée • Taille des mésopores peut limiter l'accès aux biomolécules • Génère des interactions non-spécifiques • Étape de pré-fonctionnalisation nécessaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Capacité intermédiaire • Surface spécifique limitée • Synthèse et greffage in-situ (facilite la réduction d'échelle) • Perméabilité élevée • Génère des interactions non-spécifiques • Présence de fonctions réactives directement après synthèse 	<ul style="list-style-type: none"> • Capacité faible • Échelle capillaire (réduction de la consommation en protéine cible) • Génère très peu d'interactions non-spécifiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Capacité intermédiaire • Échelle capillaire (réduction de la consommation en protéine cible) • Génère peu d'interactions non-spécifiques

2. STRATÉGIE, OPTIMISATION ET RÉSULTATS

2.1. Stratégie et design des colonnes d'affinité

Au vu de notre objectif de départ de développer la chromatographie de faible affinité à échelle capillaire, des caractéristiques des différents types de colonne et du savoir-faire de l'équipe Techniques Séparatives, nous avons décidé de travailler avec des colonnes capillaires de 75 µm de diamètre interne avec une phase stationnaire monolithique et plusieurs configurations ont été sélectionnées pour être évaluées.

Tout d'abord, les monolithes sont bien adaptés au travail à l'échelle capillaire. En effet, ces phases stationnaires seront directement synthétisées in-situ, évitant ainsi une délicate étape de remplissage. Le choix s'est porté sur deux types de monolithes :

- Un monolithe à base de silice [17], qui possède une surface spécifique élevée mais dont la synthèse est assez complexe (par voie sol-gel) et la taille des pores délicate à contrôler. La silanisation post-synthèse par le 3-glycidyloxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) permet d'obtenir des fonctions époxyde à la surface.
- Un monolithe à base de polymère organique GMA-co-EDMA [18], avec une surface spécifique plus faible mais qui possède directement des groupements époxyde réactifs à la surface et dont la synthèse est simple et rapide (par photopolymérisation).

Ensuite différentes voies de biofonctionnalisation ont été sélectionnées :

- Le greffage direct époxy-amine pour sa simplicité (en effet il ne nécessite aucune étape intermédiaire sur le monolithe GMA).
- La méthode de la base de Schiff, qui semble donner la quantité de sites actifs la plus élevée parmi les méthodes testées dans la littérature [8,12,13]. De plus, une réduction post greffage permet d'obtenir des groupements hydroxyle polaires en surface, qui limitent les interactions non-spécifiques par effet hydrophobe.
- Une troisième méthode a été élaborée, basée sur la très forte affinité entre la streptavidine et la biotine ($K_d \sim 10^{-15} M$) : dans un premier temps les colonnes monolithiques sont greffées avec la streptavidine par la méthode de la base de Schiff. Dans un second temps, la protéine d'intérêt précédemment biotinylée est infusée dans la colonne et se fixe instantanément grâce à la capture des molécules de biotine par la streptavidine. Cette méthode comporte de nombreux avantages : (i) elle est universelle et peut s'appliquer à n'importe quelle protéine biotinylée ; (ii) les colonnes streptavidine peuvent être préparées à l'avance et le greffage de la protéine cible ne dure alors que quelques dizaines de minutes (contre plusieurs heures, voire jours pour les méthodes classiques), (iii) l'étape de greffage peut être suivie (en UV par exemple) ce qui permet d'évaluer la quantité de protéine greffée et de ne consommer aucun excès (le greffage est arrêté aussitôt la saturation de la phase stationnaire atteinte). Cette voie de biofonctionnalisation peut donc se révéler d'un grand intérêt dans le cas d'études de protéines sensibles, produites en très faible quantité et dont la stabilité serait éprouvée par la durée des greffages classiques.

Ces différentes configurations ont été testées avec la HSA (Human Serum Albumin), une protéine soluble largement étudiée, considérée comme modèle dans la littérature. Trois ligands connus ont été utilisés pour réaliser les expériences en analyse frontale pour tester les colonnes en termes d'interactions spécifiques (détermination du nombre de sites actifs B_{act} et de la constante de dissociation K_d) et d'interactions secondaires non-spécifiques sur les colonnes à différents stades de préparation.

Les principaux résultats de cette étude sont résumés ci-après et les détails des manipulations et des résultats sont présentés dans l'article qui suit : Lecas et al., *Monolith weak affinity chromatography for µg-protein-ligand*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 166 (2019) 164–173.

2.2. Optimisation

D'autres précisions sont apportées en annexe concernant l'optimisation de la pré-fonctionnalisation du support et notamment le suivi de l'oxydation des fonctions diol en aldéhyde (pour la méthode de la base de Schiff) par électrophorèse capillaire (voir Annexe 1) ainsi que sur le procédé de biotinylation des protéines (voir Annexe 2).

2.3. Résultats

2.3.1. Monolithe de silice

Le monolithe de silice génère des interactions non-spécifiques importantes avec les composés étudiés. Les tests par analyse frontale aux différents stades de préparation (silice vierge post-synthèse, après silanisation avec des fonctions époxyde, puis diol et enfin aldéhyde réduit en groupements hydroxyle) ont mis en évidence l'augmentation des interactions non-spécifiques après silanisation, probablement due au caractère peu polaire des groupements propyl introduits par le biais du bras espaceur du silane. Si la modification des fonctions époxyde résiduelles de surface en fonctions plus polaires permet de diminuer les interactions non-spécifiques, celles-ci restent cependant élevées.

La HSA, immobilisée par la méthode de la base de Schiff sur monolithe de silice, a conservé sa capacité de reconnaissance spécifique sur ses deux sites d'interaction. Cependant, en termes de quantité de sites actifs, les valeurs obtenues ne sont pas plus élevées que celles de la littérature sur des particules avec des pores de 30 nm, malgré une surface spécifique presque 5 fois plus importante. Les biomolécules n'ont en fait pas accès à l'intégralité des mésopores à cause de leur dimension (8 nm en moyenne).

Pour ces deux raisons, le choix du support s'est porté sur les monolithes organiques.

2.3.2. Monolithe organique GMA-co-EDMA

L'étude des interactions non-spécifiques a conduit à des résultats cohérents avec les résultats obtenus sur silice : les fonctions époxyde génèrent davantage d'interactions non-spécifiques que les fonctions plus polaires comme les diols ou les aldéhydes réduits (groupements hydroxyle en surface). De plus, l'immobilisation de la streptavidine n'augmente que légèrement la rétention non-spécifique (< 10 % de la rétention totale).

Les trois voies de greffage ont été testées sur le monolithe organique. Les constantes de dissociation déterminées par analyse frontale (de l'ordre de la dizaine de μM) sont dans l'ordre de grandeur de celles de la littérature pour les trois approches [19]. Cependant, la détermination des quantités de sites actifs après greffage direct sur monolithe époxyde est probablement biaisée par l'importance des interactions non-spécifiques. Plusieurs stratégies ont été envisagées pour modifier les fonctions résiduelles époxyde et diminuer l'effet hydrophobe (réaction des époxydes avec le TRIS, l'éthanolamine ou la cystéine) mais sont restées sans succès. Le greffage de la protéine par la base de Schiff a donné des résultats cohérents et un taux d'activité élevé d'environ 70% (rapport de la quantité de protéine active/quantité de protéine totale greffée). Enfin, le greffage par l'intermédiaire de la streptavidine a permis d'obtenir les résultats les plus intéressants : la quantité de sites actifs la plus élevée (environ 40 pmol de protéine active pour une colonne de $8,5 \times 0,0075$ cm), un taux d'activité supérieur à 80 % et tous les avantages cités précédemment (colonnes universelles, immobilisation rapide et suivie de la protéine cible, consommation de protéine limitée).

Afin d'évaluer complètement ces supports vis-à-vis d'une utilisation en criblage, une étude de stabilité a ensuite été réalisée :

- les colonnes streptavidine peuvent être préparées plusieurs mois à l'avance (stockées à +4°C) et conservent leur capacité de capture de HSA biotinylée.
- les colonnes streptavidine-HSA sont également stables plusieurs mois en conditions de stockage (tampon phosphate, +4°C). En conditions de criblage (utilisation en dynamique), il a été montré qu'après 24h d'utilisation continue, 80 % des sites sont encore actifs. La perte d'activité observée ensuite (64% de sites actifs après 80h) est principalement due à l'utilisation à température ambiante.

La combinaison d'une phase stationnaire monolithe organique (GMA-co-EDMA) biofonctionnalisée par la voie streptavidine-biotine a donc donné les meilleurs résultats dans cette étude.

2.3.3. Colonnes d'affinité HSP90

Les colonnes développées précédemment ont alors été évaluées avec une autre protéine soluble, le domaine N-terminal de la HSP90. La quantité de protéine greffée est similaire à celle obtenue pour la HSA et les constantes de dissociation de deux ligands connus ont été vérifiées par analyse frontale (de la dizaine à la centaine de μM). Nous avons donc montré la possibilité de greffer d'autres protéines par l'approche streptavidine-biotine tout en conservant leur capacité de liaison spécifique.

Monolith weak affinity chromatography for µg-protein-ligand interaction study

Lucile Lecas, Jérôme Randon, Alain Berthod, Vincent Dugas, Claire Demesmay*

*Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques
UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 VILLEURBANNE, France*

E-mail addresses:

lucile.lecas@isa-lyon.fr

jerome.randon@isa-lyon.fr

alain.berthod@univ-lyon1.fr

vincent.dugas@univ-lyon1.fr

* Corresponding author:

Tel.: +33437423552

Email address: demesmay@univ-lyon1.fr

Declarations of interest: none

Abstract

Affinity monolith columns of 375 nL (effective length 8.5 cm, internal diameter 75 μ m) were developed for protein-ligand affinity investigations needing only 3 μ g of human serum albumin (HSA). To promote specific interactions and avoid non-specific ones, different combinations of monolithic supports and bio-functionalization pathways were evaluated. Silica and glycidylmethacrylate based monoliths were *in-situ* synthesized and grafted with HSA. Two direct grafting methods epoxy-amine and Schiff Base plus the streptavidin-biotin method were compared. The columns were evaluated by frontal analysis with ligands of known affinity for HSA. It is shown that a classical capillary electrophoresis instrument equipped with an external pressure device can be used to do weak affinity chromatography at low pressure (less than 1.2 MPa) in a fully automated way and with very low reagent consumption. The grafting pathways were compared in terms of (i) total and active amounts of immobilized protein, (ii) non-specific interactions, (iii) protein denaturation. According to these criteria, the organic monoliths combined with the streptavidin-biotin approach provided the best results. This immobilization pathway led to the highest active protein content (40 pmol of HSA per 8.5-cm column) with less than 10% non-specific interactions and 84% protein activity. The target grafting step lasts only 10 min and is UV-monitored, the UV breakthrough curve giving the exact amount of bound protein. This novel approach was validated by K_d measurements of 3 known ligands of HSA. Streptavidin generic monolith columns could be stored at 4°C for 3 months maintaining activity. μ g of a biotin modified sensitive protein could be attached to a stable streptavidin monolith for immediate interaction studies avoiding stability problems. This development was subsequently extended to another protein of higher pharmaceutical interest: the N-terminal domain of HSP90. Affinity was measured for two known ligands and determined K_d values were in accordance with the literature, proving that our technique is applicable to other proteins.

Keywords: weak affinity chromatography, miniaturization, monoliths, protein-ligand interaction, HSA, HSP90

1. Introduction

Understanding and quantifying biomolecular interactions is at the very heart of life sciences. From a fundamental point of view, it allows for a better understanding of biological processes. Biomedical interactions are also needed for health applications, such as drug discovery applied to the development of new therapeutic molecules [1]. Recently, weak affinity chromatography (WAC) has been introduced as a chromatographic technique where biomolecules such as proteins are immobilized on the stationary phase [2–4]. WAC has been increasingly used to study interactions in biological systems [2–7]. The chromatographic retention of a ligand injected in WAC is linked to the protein-ligand interaction strength. Hence, WAC can be used to obtain fundamental and/or mechanistic information in a variety of fields such as: (i) chiral separations [8,9], (ii) fragment screening in fragment-based drug discovery [3,4], (iii) selection of site-selective probe for use in the high-throughput screening of drug binding to protein [10] and (iv) thorough thermodynamic and kinetic studies of protein-ligand interaction [11,12]. A study reported that the data obtained by WAC were coherent with what the more sophisticated NMR and Thermal Shift Assay techniques were producing [5]. Since running cost is an important factor, WAC appears to be very competitive for biomolecular interaction studies [4].

The WAC studies were mainly performed using “classical” columns with an internal diameters of 4.6 mm or 2.1 mm, a length varying from one to 20 cm, and using 5 μm silica particles with wide 30 nm pore size [3,5,10,11,13–16]. Few studies were also conducted with silica monoliths at classical scale (columns with a 4.6 mm i.d and with lengths ranging from a few centimeters [8] to a few millimeters [17]), or with organic polymer monoliths (4.6 mm i.d., length from a few centimeters [18] to a few millimeters [9]). The immobilization of the target protein onto the stationary phase allows for a significant decrease of the amount of protein needed for the interaction studies compared to what was needed with the *in vitro* solution studies. However, the preparation of a “classical” affinity column can require up to a few dozen milligrams of the target protein. This amount is still significant. Obtaining milligram amounts of stable and functionally folded proteins can be highly challenging. A first attempt to reduce the amount of protein needed in the sub-milligram range was described by the group of Ohlson who prepared 500 μm i.d. silica particles affinity columns [3,19]. Further down-sizing the column diameter should allow using even less target protein (μg for 75 μm i.d.) but cannot be straightforwardly achieved. The packing of 75 μm i.d. capillary columns is very difficult so monolithic columns appear to be a viable alternative. Monoliths can be synthesized *in-situ* leading to chromatographic capillary columns with high permeability. After the bare monolith synthesis, the protein grafting step has to be *in-situ* performed by flowing the protein solution.

The numerous bio-functionalization pathways of chromatographic supports with a target protein have been recently reviewed [20]. The simplest pathway is the direct covalent coupling of the protein onto an

epoxy ring via the reaction of the primary amine of a lysine side chain of the protein. This grafting way has drawbacks: it is time-consuming (48 to 72 h) due to the low reactivity of the epoxy moieties [9,18]. Among the reviewed grafting methods, the Schiff base method stands out [9,18,21] as this method should produce 1.5 to 4 time higher grafting densities than the epoxy method for similar reaction times [9,18]. Although the epoxy and Schiff base grafting methods have proved to work well for model proteins such as HSA and few soluble proteins [4], they are less usable with fragile proteins (that may partially denature during the time consuming grafting step) or with proteins available in scarce amount (a great excess of protein is consumed). Therefore, we intended to develop an alternative method overcoming such drawbacks and to compare it with the previously reported methods. It relies on the instantaneous capture of the biotinylated-target protein onto a streptavidin-modified support. The streptavidin-biotin interaction ($K_d=10^{-15}$ M [22]) should be strong enough to support dynamic affinity studies under mild conditions.

In this study, silica-based and organic-based monolithic nano-columns were prepared, investigated and compared in frontal analysis mode for nano-WAC applications. Human Serum Albumin (HSA) was used as model target protein and grafted according to three different immobilization pathways, namely: the epoxy-amine, Schiff base and streptavidin-biotin methods. The immobilization pathways were considered in term of (i) amount of total and active protein per column, (ii) secondary non-specific interactions and (iii) protein activity conservation. K_d were measured and compared to the literature in order to validate this new approach. For the streptavidin-biotin grafting path the stability of the columns was investigated in screening and storage conditions. After the development with HSA as target model, nano-columns were grafted with the N-terminal domain of HSP90, in order to confirm the applicability of our technique to another protein, and the K_d of three fragments (ligands) were measured.

2. Material and methods

2.1. Reagents and chemicals

Ethylene dimethacrylate (EDMA, 97%), glycidyl methacrylate (GMA, 98%), 1-propanol, 1,4-butanediol, (3-methacryloxypropyl)-trimethoxysilane (γ -MAPS), tetramethoxysilane (TMOS), methyltrimethoxysilane (MTMS), urea, polyethylene glycol (PEG, MW=10,000), methanol (HPLC grade), triethylamine (TEA), sodium periodate, lithium hydroxide, dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4), o-phosphoric acid, dimethylsulfoxide (DMSO), acetic acid, coomassie brilliant blue G (CBB), (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GPTMS), sodium cyanoborohydride, ibuprofen (racemic), warfarin (racemic), furosemide, adenosine 5'-diphosphate sodium salt, n,n-diethylvanillamide, 3-hydroxy-4-methoxybenzyl alcohol, magnesium chloride ($MgCl_2$), human serum albumin (HSA, fatty acid free, globulin

free, ≥99%), streptavidin (from *streptomyces avidinii*, affinity purified, ≥ 13 U.mg⁻¹ of protein), were purchased from Sigma Aldrich (L’Isle d’Abeau Chesne, France). Ammonia solution (28-30 %) was from Merck (Darmstadt, Germany). Sulfuric acid (18 M) was from VWR (Fontenay-sous-bois, France). All aqueous solutions were prepared using >18 MΩ deionized water. Preparation of the phosphate buffer was done by dissolving 1.17 g of K₂HPO₄ in 100 mL of ultrapure water and pH was adjusted to 7.4 with ortho-phosphoric acid. An EZ-LinkNHS-PEG4-Biotinylation Kit was purchased from Thermo Scientific (VWR). HSP90 protein was produced by a partner laboratory (Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon France). The N-terminal fragment of HSP90 (9-236) was expressed in E.coli (BL21) with a histidine tag and purified by a monoQ column. Protein samples were delivered at 6.7 mg.mL⁻¹ in PBS buffer and stored at -80°C before use.

2.2. Instrumentation

Liquid flow into capillary columns was driven by pressure gradient using the microfluidic flow controller MFCS-EZ100 system (Fluigent, Villejuif, France). Inlet pressure values are reported to specify the liquid flow conditions (outlet pressure was always set up at atmospheric pressure). An LC pump L-6000 (Merck, Darmstadt, Germany) was used to rinse the freshly prepared capillaries in pressure mode (3 MPa). Nano-LC experiments (frontal weak affinity chromatography experiments) were carried out with a capillary electrophoresis Agilent HP3D CE system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with external pressure nitrogen supply allowing to work up to 1.2 MPa. System control and data acquisition were carried out using the Chemstation software (Agilent).

2.3. Capillary monolith syntheses

2.3.1 Epoxy-functionalized silica monoliths

Polyimide-coated fused-silica capillaries (75 µm i.d.) were purchased from Polymicro Technologies (Molex, Phoenix, Arizona, USA). The silica monolith preparation was extensively described [23]. Briefly, a 18 mL mixture of TMOS/MTMS (85/15, v/v) was added to 40 mL 0.01 M acetic acid solution containing 1.9 g PEG and 4.05 g urea. The sol mixture was stirred at 0°C for 30 min. Then, the temperature was raised to 40°C and the mixture was loaded into 15-cm 75-µm i.d. fused-silica capillary pieces. Next, the partially filled capillaries (approximately 10 cm on the total length of 15 cm), were end-plugged and kept at 40°C overnight for gelification. Mesopores were formed by urea decomposition through gently raising the capillary temperature up to 120°C maintained for 4 h. After cooling, the monoliths were thoroughly washed with methanol. GPTMS surface functionalization was done by flushing monoliths with a solution containing 5 % of GPTMS and 2.5 % of TEA in methanol/water (95/5, v/v). The reaction was conducted for 3 h at room temperature. Monoliths were then rinsed with methanol for 30 min (0.7 MPa).

2.3.2 Glycidyl methacrylate monoliths

Fused-silica capillaries with UV transparent coating (TSH, 75- μm i.d.) were purchased from Polymicro Technologies (Molex). A pre-treatment procedure was carried out in order to ensure a strong covalent attachment of monoliths to capillary walls. Capillaries were flushed with a 5 % (v/v) solution of γ -MAPS in methanol/water (95/5, v/v) with 2.5 % TEA for 1 h at 0.7 MPa. Next, they were rinsed with methanol for 15 min at 0.7 MPa and dried at room temperature under nitrogen stream. A polymerization mixture adapted from [24] was prepared by mixing 0.9 mL GMA, 0.3 mL EDMA, 1.05 mL 1-propanol, 0.6 mL 1,4-butanediol and 0.15 mL ultra-pure water. Prior to UV irradiation, potential oxygen in the solution was removed by 15 min ultrasonication, and 12 mg of the initiator 2,2-azobisisobutyronitrile were added under magnetic stirring. The pre-treated capillary was then filled with the polymerization mixture under 0.1 MPa N_2 pressure. The photopolymerization reaction was performed in a Bio-link UV cross-linker (VWR International, France) under 365 nm UV light for a total energy of 6 J.cm $^{-2}$. In order to localize the monolith inside the silica capillary, a PEEK tubing (380 μm i.d.) was used as a mask to cover non-irradiated areas. After polymerization, the 8.5-cm monolithic column segment of the 15-cm capillary was rinsed with methanol for 1 h using a LC pump in pressure mode (3 MPa) to remove any unreacted reagents.

2.4. Protein immobilization protocols

2.4.1 Direct coupling methods

2.4.1.1 Epoxy method.

Proteins can be directly immobilized onto epoxy-functionalized monolithic columns via reactions involving primary amines ($-\text{NH}_2$), such as the lysine side-chains, or the amino-termini of proteins. This grafting was carried out by circulating a 2 mg.mL $^{-1}$ HSA solution in phosphate buffer (67 mM, pH 7.4) for 48 h at 0.7 MPa. The column was then rinsed with phosphate buffer solution and stored at 4°C prior to use.

2.4.1.2 Schiff base method.

The Schiff base method consists in the reaction of aldehyde reactive surface groups of the solid support with the amino-groups of the protein. Aldehyde reactive moieties are classically obtained by oxidation of diol functions. First, the epoxy groups of the epoxy-functionalized silica or GMA-co-EDMA monoliths were hydrolyzed into diols flowing 1 M sulfuric acid for 2 h at 0.7 MPa. After rinsing all residual acid, the diol-monolith was oxidized to aldehyde using a 0.12 M NaIO $_4$ solution at pH 5.5. Then a 2 mg.mL $^{-1}$ HSA and 8 mg.mL $^{-1}$ NaBH $_3$ CN solution in 67 mM pH 6 phosphate buffer was percolated through the column for 48 h at 0.7 MPa and room temperature. Sodium cyanoborohydride reduces imine groups, a necessary treatment in order to get reliable immobilization. After immobilization, the column was flushed with sodium borohydride (2.5 mg.mL $^{-1}$, phosphate buffer 67 mM pH 8 (2 h, 0.7 MPa) to reduce residual aldehydes. The HSA affinity columns were then rinsed with

phosphate buffer and stored at 4°C. The same protocol was used to evaluate the impact of protein concentration (1 mg.mL⁻¹ and 0.5 mg.mL⁻¹ HSA were also tested) and grafting duration (12 h instead of 48 h was tested) on final protein content.

2.4.1.3 Streptavidin-biotin method. The streptavidin-biotin method relies on the instantaneous capture of the biotinylated-target protein onto a streptavidin-modified monolith. The affinity of the streptavidin-biotin interaction is so high (in the femtomolar range, $K_d=10^{-15}$ M [22]) that this coupling may be considered as covalent. Streptavidin was grafted on the organic monolith following the Schiff base method described above using a 1 mg.mL⁻¹ streptavidin solution. Coupling of biotin to HSA was done following the instructions of the Thermo EZ-Link NHS-PEG4-Biotinylation Kit. Being a small molecule, biotin (M.W. 244 g.mol⁻¹) can be attached to many proteins without altering their biological activities [25]. The molar ratio of NHS-PEG₄-biotin to protein was adjusted to obtain the desired level of incorporation. Biotin incorporation (1.7 biotin/protein molecule) was estimated using the HABA assay. All excess of biotin reagent was removed using a desalting column. The concentration of the resulting biotin-HSA solution was calculated with the solution's absorbance at 280 nm ($\epsilon_{HSA}= 0.5982\text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Finally, the biotin-HSA solution was loaded through the streptavidin immobilized column using the Agilent CE system at 1.2 MPa pressure, monitoring UV absorbance at 230 and 280 nm. The percolation was stopped when saturation of the support was reached, i.e. the biotin-HSA reached the detector (observation of a plateau at 230 and 280 nm). The breakthrough curve was used to estimate the quantity of captured protein on the streptavidin immobilized support. Similar protocol was used for the HSP90 protein. Biotin incorporation was 2.8 biotin/HSP90 N-ter and resulting biotinylated protein concentration was calculated using $\epsilon_{HSP90}= 0.5822\text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

2.5. Columns evaluation

Affinity columns were evaluated by frontal chromatography using a capillary electrophoresis system (S.1). The experiments were conducted using the CE system in the so-called “short-end” injection mode. The system was exclusively operated in the pressurization mode by applying external pressure (no voltage applied). The inlet of the capillary column is simply immersed in the solution to be infused and the external pressure forces the liquid to flow inside the capillary column. The detection was achieved “on-column” (in an empty section of the 10-cm capillary located just after the monolith), with a diode array detector operated in a multi-wavelength mode. The effective length was 8.5 cm. Experiments were conducted under controlled room temperature (25°C). After every analysis, the capillary column was rinsed with 20 column volumes of phosphate buffer to eliminate the infused compounds.

2.5.1 Determination of the number of actives sites (B_{act}) and protein-ligand dissociation constant (K_d) by in-capillary frontal analysis

The total number of actives sites (B_{act}) and the protein-ligand dissociation constant (K_d) were evaluated by frontal analysis [10]. Different ligands of known affinity for HSA (Fig. 1) were selected to characterize the columns : warfarin, furosemide and ibuprofen [8,13,26].

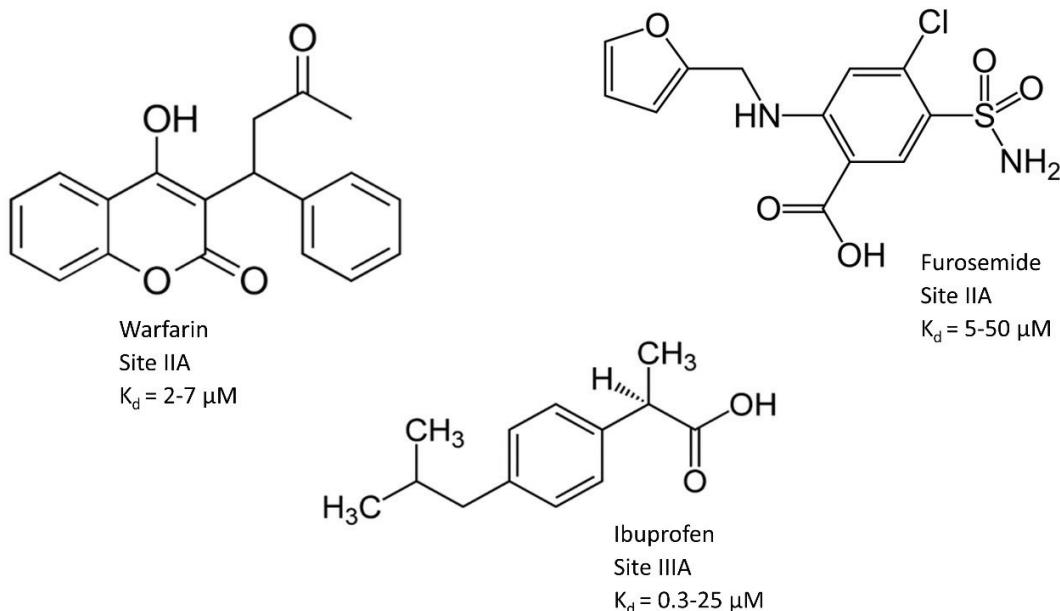


Fig.1. Ligands of HSA used for columns characterization.

10 mM stock solutions of the probe ligands were prepared in DMSO to ensure complete solubilization. Solutions of increasing ligand concentration (5, 7, 10 and 20 μM) were prepared in phosphate buffer (67 mM K_2HPO_4 , pH 7.4) and percolated at 1.2 MPa (about 240 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ or 0.1 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ for 8.5-cm length columns). The flow rate, F , was calculated using a non-retained solute or the plateau of residual DMSO. Compounds were monitored at their characteristic wavelength (DMSO 214 nm, warfarin 308 nm, furosemide 280 nm, and ibuprofen 230 nm). The accurate determination of the saturation time, t_{plateau} , *viz* inflection point of the breakthrough curves, was determined using the 1st derivative of the UV-signal. For each ligand concentration, $[L]$, the breakthrough curve is used to determine the amount of ligand captured by the HSA affinity support, q , using eq. 1:

$$q = \Delta t \times F \times [L] \quad (\text{Eq.1})$$

Δt being the time difference between dead time, t_0 , and saturation time, t_{plateau} .

The total number of active sites on the affinity column, B_{act} , and the dissociation equilibrium constant, K_d , of the HSA-ligand complex were determined according to eq. 2 after plotting $1/q$ versus $1/[L]$:

$$\frac{1}{q} = \frac{k_d}{B_{act}} \times \frac{1}{[L]} + \frac{1}{B_{act}} \quad (\text{Eq.2})$$

B_{act} was first determined in pmol and then converted to pmol.cm^{-1} and nmol.mL^{-1} using the monolith density (300 and 320 mg.mL^{-1} respectively for silica and organic monolith).

2.5.2. Evaluation of non-specific interactions

Non-specific interactions were quantified by frontal analysis using a ligand concentration of 10 μM in phosphate buffer (67 mM K_2HPO_4 , pH 7.4) on monolithic columns before the protein immobilization step. For each support, the amount of probe ligands captured by non-specific interaction was determined according to Eq.1. For non-specific interactions, the breakthrough volume is the same at all concentrations and the amount of ligand captured is directly proportional to the concentration. The contribution of non-specific interactions to total retention was also expressed as the fraction of ligand captured by non-specific interactions compared to the total amount captured by frontal affinity chromatography on the same monolith after the protein immobilization step (at the same ligand concentration).

2.5.3 Determination of the total amount of immobilized protein B_{tot}

In order to thoroughly characterize the influence of the immobilization process on the protein activity, the active amount of HSA, B_{act} , has to be compared to the total amount of immobilized protein, B_{tot} . So different methods were designed to determine *in-situ* the total amount of target protein immobilized according to the protein grafting process.

For monoliths bio-functionalized with the streptavidin-biotin coupling method, the UV-monitoring of the breakthrough curve of biotin-HSA at 230 and 280 nm during the dynamic grafting step allowed the direct quantification of biotin-HSA captured by the monolith.

For affinity monoliths prepared with the Schiff base method, the Amino Density Estimation by Colorimetric Assay (ADECA) method was adapted to micro-format and hydrodynamic mode from results previously obtained in a static mode on macro-monoliths synthesized in batch [27]. The on-line modified ADECA method use the Coomassie Brilliant Blue (CBB) dye and allows for *in-situ* determinations of the total amount of protein grafted inside miniaturized capillary column, independently of its activity. The experiments were conducted using the CE system in the short-end injection mode using external pressuring device. The monolith is initially flushed with ultrapure water to remove the phosphate buffer, and a 10% methanol-5% acetic acid solution to protonate all amino groups, both at 1.2 MPa for 10 min. Then, a 100 mg.L^{-1} CBB in 10 % v/v methanol-5 % v/v acetic acid solution is loaded under a 1.2 MPa pressure

monitoring the corresponding breakthrough curve at 260 nm. Eq. 1 was used to determine the amount of captured CBB and the quantity of immobilized protein was calculated taking into account the 103 amino acids, distributed between lysine, histidine and arginine, in the HSA sequence [31]. The rinsing step was performed by flushing the column with a 50/50 1 M ammonia/methanol solution at 1.2 MPa for 10 min.

3. Results and discussion

Two types of monolithic capillary supports were investigated for the development of miniaturized weak affinity experiments: silica and organic monoliths. Both types were first *in-situ* synthesized in 75 µm i.d. capillary and then bio-functionalized with HSA as model target protein. Depending on the type of monolith, several bio-functionalization pathways were considered: the direct “epoxy” and “Schiff base” methods and the “streptavidin-biotin” coupling method (Fig. 2).

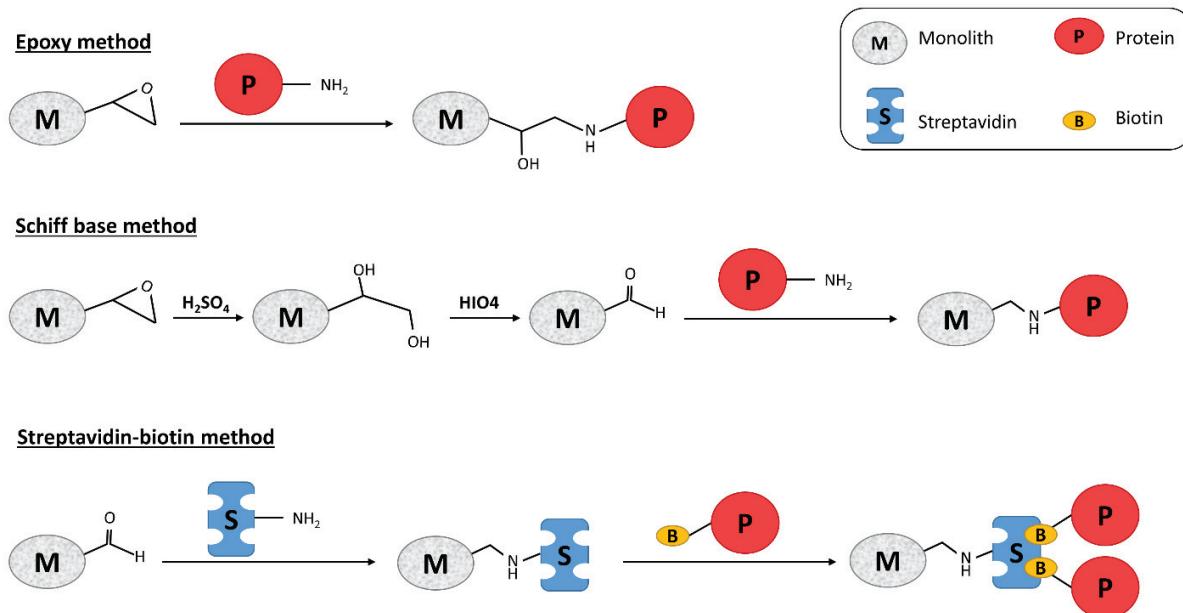


Fig.2. Schematic illustration of the three different bio-functionalization pathways of monoliths with HSA

For the streptavidin-biotin coupling method described in this paper, streptavidin was grafted on the surface and biotin was attached to HSA. Then, due to the rapid and complete streptavidin-biotin interaction, the capture of the biotin-protein was monitored *in-situ* by UV spectrophotometry during its breakthrough percolation.

The HSA immobilized organic and silica monoliths were evaluated in terms of unwanted non-specific interactions and specific interactions (affinity), with the goal to minimize the former and to enhance the latter. Considering the high permeability of monoliths, the use of an expensive nano-LC set-up was put aside and all experiments were conducted in frontal affinity chromatography using a capillary electrophoresis system, operated in the pressurized mode (maximum external pressure of 1.2 MPa) in the short-end mode.

3.1. Affinity Silica monoliths

A first attempt to downsize weak affinity chromatography at nanoscale was made with silica monoliths that present similar chemical and textural features to that of silica particles used in the literature. Bare silica monoliths were *in-situ* synthesized according to a previously described sol-gel protocol [23]. Such monolithic capillary columns have 2 µm through-pores with 8 nm mesopores giving a surface area of 480 m².g⁻¹ with a 1.5 µm skeleton diameter giving a permeability of 5.10⁻¹⁴ m² (determined by Darcy's law). For comparison, classical 3-5 µm silica particles have larger mesopores, specific areas between 100 and 300 m².g⁻¹, and permeabilities two orders of magnitude lower.

Only the two direct epoxy-amine and the Schiff base bio-functionalization processes of Fig. 2 were initially considered with silica monolithic columns. Indeed, the streptavidin-biotin coupling is not amenable with 8 nm nanopores. Bare silica monoliths were silanized with glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) leading to epoxy-functionalized silica monoliths. Epoxy-ring opening was achieved in acidic medium to form diol groups that were oxidized into aldehyde groups. The silica monoliths were evaluated at different stages of modification in terms of non-specific and specific affinity interactions.

3.1.1 Non-specific interactions on silica monoliths.

Characterization of non-specific interactions was estimated through adsorption of three HSA-specific ligands: warfarin, furosemide and ibuprofen, at a unique concentration of 10 µM. Their adsorption on silica monolith surfaces was done at four different stages of modification: (i) bare silica monolith, (ii) epoxy-modified silica monolith, (iii) diol monolith after the epoxy-ring opening, and (iv) reduced-aldehyde monolith. Fig. 3 shows the absorbed amounts of three ligands on the 8.5 cm effective length 75 µm i.d. capillaries, expressed in pmol.cm⁻¹, obtained on bare monolith and at the different stages of modification. The epoxy-activated silica monoliths present the highest level of non-specific interactions, probably linked to the less hydrophilic character of the glycidoxypropyl group introduced during the silanization step. Hydrolysis of the epoxy-ring into diol groups significantly decreases the amount of non-specifically adsorbed ligands but the level remains twice higher than on bare silica (Fig. 3). The oxidation of the diol

moieties into aldehydes, followed by their reduction by NaBH_4 to polar hydroxyl groups does not significantly decrease non-specific interactions.

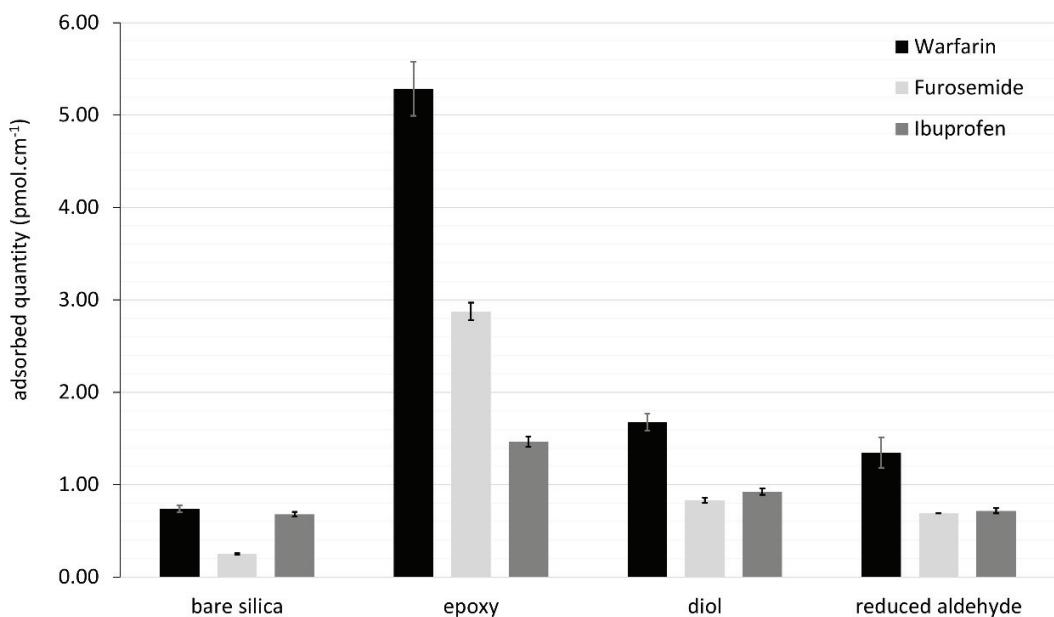


Fig.3. Evaluation of non-specific interactions on silica monoliths at different stages of preparation (bare silica, epoxy, diol, and reduced aldehyde), and for different ligands at 10 μM concentration. Absolute fragment amount adsorbed onto the support (pmol.cm^{-1} for 8.5 cm effective length, 75 μm i.d. capillaries, n=3 columns).

Since the log D values at pH=7.4 of these three negatively charged ligands, respectively around -1, 0.8 and 1 for furosemide, warfarin and ibuprofen [28], do not match the non-specific interaction levels, hydrophobicity is not the only contributing factor. This significant level highlights that non-specific interactions should not be neglected on silica affinity monoliths and that reference columns have to be prepared to quantify their contribution to overall retention. When the Schiff base method is used, diol columns can be used instead of a reduced-aldehyde ones as non-specific interactions are of the same order of magnitude for both column types (Fig. 3). Diol columns are easier-to-synthesize references. If such a strategy, evaluation of non-specific interactions without any protein immobilized onto the surface, is usually recommended by several groups (Hage, Ohlson) it may not be fully representative of the final affinity column. Indeed, once proteins are grafted onto the support, the resulting surface is partially covered by the targets, thus probably limiting ligand accessibility to the underlying support. However, the grafting of another protein is not a satisfactory alternative as it may lead itself to other non-specific interactions (from electrostatic to hydrophobic ones).

3.1.2 Affinity on HSA-silica monoliths.

The epoxy-method is known to proceed through the quick adsorption of the protein onto the surface followed by a slower covalent links formation between epoxy and amino residues of biomolecules [29]. Adsorption of a protein onto a hydrophobic surface is known to partially denature it i.e. to alter its biological activity [30]. Thus the epoxy method was not further investigated on the epoxy silica and HSA-affinity silica monolithic columns were exclusively prepared though the Schiff base method. The performances of these affinity columns were assessed in frontal affinity chromatography (FAC) with the three ligands. These ligands target the two main interaction sites of HSA (Sudlow sites IIA and IIIA) [8,13,31]. For each solute, the breakthrough volume increased when the infused concentration decreased, which is characteristic of affinity. Both the experimental K_d values and the total amount of active binding sites (B_{act}) of immobilized target proteins were determined by plotting the reciprocal of the amount of captured ligand ($1/q$) versus the reciprocal of the ligand concentration ($1/[L]$) (Eq. 2). The values are reported in Table 1.

Grafting method	Columns tested	Binding site	Compound	K_d in literature (μM)	Calculated K_d (μM)	Active HSA content (B_{act})	
						(pmol.cm $^{-1}$)	(nmol.mL $^{-1}$)
Schiff base	n=3	IIA	Warfarin	2 – 7	20 ±8	10 ±2	212 ±47
			Furosemide	5 – 50	97 ±36	32 ±7	680 ±150
		IIIA	Ibuprofen	0.3 – 25	116 ±43	32 ±7	680 ±150

Table 1. Experimental K_d values and active HSA-content for silica monoliths bio-functionalized with HSA via the Schiff base method. Frontal analysis experiments implemented on silica monolithic columns (effective length = 8.5 cm, 75 μm i.d.). Relative standard deviations for the three experiments.

The fact that the three ligands exhibit a measurable affinity for the HSA-column indicates that the two HSA binding sites are active. However, the experimental K_d values obtained in this work (Table 1) are slightly higher than those reported in the literature [26] (Fig. 1). The high surface area of the silica monolith (480 $m^2.g^{-1}$) did not produce a higher number active sites B_{act} compared to the number of sites found on silica particles with only 100 $m^2.g^{-1}$ [17]. The relative small size of the monolith mesopores (8 nm) combined to the high total monolith porosity may account for this relatively low active site density. The native HSA protein is quite large with a hydrodynamic radius of 3.5 nm likely to produce steric hindrances in mesopores that make most of the surface area. In addition, the small phase ratio V_s/V_m of silica monoliths, that are about 90 % porous, is less favorable to binding than that of silica particles with only 70-80 % total porosity.

Considering the relative amounts of solutes captured at the same concentration (10 µM concentration) on the HSA-silica monoliths and on reduced-aldehyde monoliths, non-specific interactions make a substantial contribution to the overall retention (respectively 7%, 18% and 41% for ibuprofen, furosemide and warfarin at 10 µM). This level of non-specific interactions to overall retention is similar to what was observed by several authors on silica particles [17]. The difference in active HSA-content (B_{act}) obtained for the same IIA binding site with two different ligands (Table 1) suggests that these values could be partially biased by non-specific interactions that are more important for warfarin. Considering (i) the relatively high part of non-specific interactions and (ii) the impossibility to enlarge the mesopore diameter of our silica monoliths to increase access to the pore volume, further investigation was focused on organic monoliths.

3.2. Glycidyl methacrylate affinity monoliths

Among the great diversity of organic monoliths [19], the GMA ones were selected for the simplicity and rapidity of their photochemically induced synthesis leaving directly available epoxy reactive groups at their surface. They were *in-situ* synthesized in UV-transparent capillaries according to a described protocol [24]. UV-masks allow for an easy selection of monolith length and location in the capillary. This monolith had a specific area of $4 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ and a permeability of 10^{-13} m^2 .

All the protein immobilization pathways described in Fig. 2 were possible with the GMA monoliths. The systematic non-specific interaction study was done in order to estimate the benefits of each pathway with respect to affinity measurement on GMA-based monolith.

3.2.1. Non-specific interactions on organic GMA monoliths

Possible non-specific interactions were investigated at the different stages of the monolith elaboration: (i) as-synthesized, (ii) after the epoxy-ring opening to form diols, (iii) after diol oxidation into aldehyde and reduction of the aldehyde with NaBH_4 , and (iv) after the covalent grafting of streptavidin. Fig. 4 presents the non-specific adsorption of the three ligands at each step.

The highest adsorption value in Fig. 4 ($0.43 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-1}$) is lower than the adsorption values on silica monolith (Fig. 3). Clearly, organic monoliths, at all elaboration stages, show less non-specific interactions than silica monoliths. The dramatically lower amounts of ligands adsorbed onto GMA and GMA-modified monoliths compared to silica monoliths may be due to the much lower surface area of the organic monoliths. Among the GMA-based monoliths, epoxy monolith exhibits the highest level of non-specific interactions. As expected, the conversion of epoxy into diol groups led to a significant decrease in non-specific interactions that remain quite identical after oxidation.

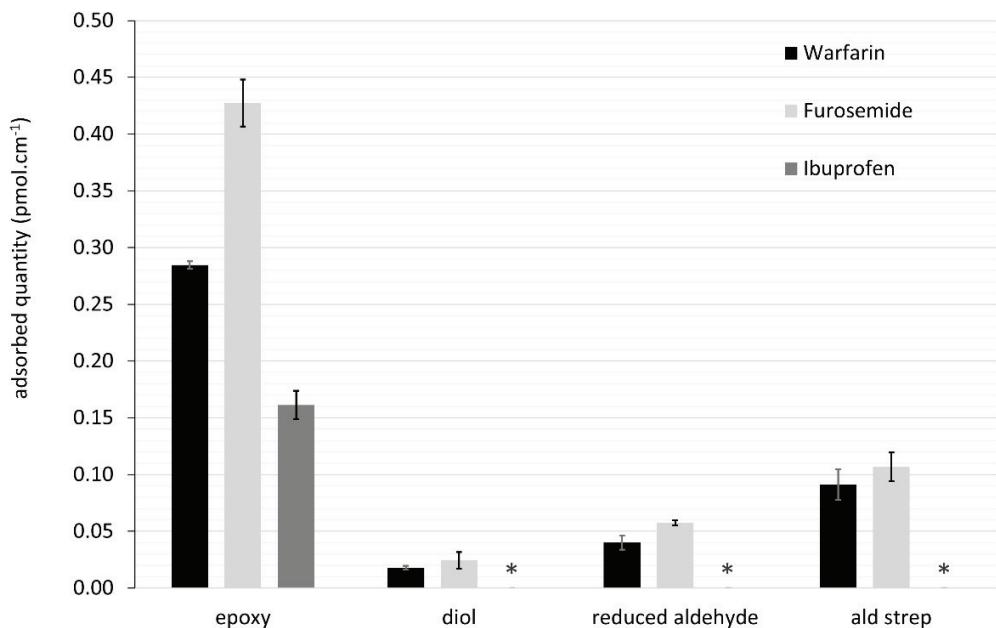


Fig.4. Evaluation of non-specific interactions on poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) monoliths at different stages of preparation (epoxy, diol, reduced aldehyde, aldehyde streptavidin), and for the three ligands at 10 μ M. Absolute fragment amount adsorbed onto the support (pmol.cm^{-1} for 8.5 cm effective length, 75 μm i.d. capillaries, $n=3$ columns), (*): ibuprofen not detected or $<0.001 \text{ pmol.cm}^{-1}$.

After the grafting of streptavidin, the level of non-specific interaction slightly increases, thus demonstrating that the grafting of a protein onto the surface is not a better alternative to hide the underlying surface and may lead to small non-specific interactions.

3.2.2. Affinity on GMA-based monoliths

Frontal affinity chromatography was used to characterize the immobilized-HSA activity and accessibility with respect to the three HSA immobilization pathways. The K_d values and amount of active binding sites B_{act} are gathered in Table 2. An illustration of the affinity experiments conducted on a streptavidin-biotin monolith (breakthrough curves and plot of $1/q$ vs $1/[L]$) is given in S.2. For HSA-columns prepared through the Schiff base and streptavidin-biotin methods, the total HSA content was *in-situ* determined. The colorimetric ADECA method was implemented to quantify the total amount (B_{tot}) of HSA immobilized onto the aldehyde monolith via the Schiff base method. The total amount of biotin-HSA captured on the streptavidin-column was directly quantified through the breakthrough curves (S.2). The ratio between active and total HSA contents gives the HSA activity yield.

Grafting method	Columns tested	Binding site	Compound	Calculated K _d (μM)	Active HSA content (B _{act})		Total HSA content (B _{tot})		Activity yield	
					(pmol.cm ⁻¹)	(nmol.mL ⁻¹)	(pmol.cm ⁻¹)	(nmol.mL ⁻¹)		
Epoxy	n=3	IIA	Warfarin	17 ±9	5 ±1	103 ±27	Not determined (high non-specific interactions)			
			Furosemide	24 ±13	4.0 ±0.8	91 ±24				
		IIIA	Ibuprofen	21 ±11	2.6 ±0.5	59 ±15				
Schiff base	n=13	IIA	Warfarin	11 ±5	1.9 ±0.5	43 ±11	2.4 ±0.8	54 ±18	71%	
			Furosemide	17 ±3	1.7 ±0.6	38 ±14				
		IIIA	Ibuprofen	12 ±1	1.5 ±0.4	34 ±9				
Streptavidin	n=13	IIA	Warfarin	13 ±4	4 ±1	91 ±22	4.9 ±0.6	111 ±14	84%	
			Furosemide	18 ±7	4.2 ±0.8	95 ±18				
		IIIA	Ibuprofen	16 ±4	4.0 ±0.5	91 ±12				

Table 2. Experimental K_d values, active HSA-content (B_{act}) and total HSA-content (B_{tot}) for GMA-based monoliths bio-functionalized with HSA via different immobilization pathways. Frontal analysis experiments implemented on monolithic columns (effective length = 8.5 cm, 75 μm i.d.). Relative standard deviations for the n experiments.

The K_d values obtained for the three test ligands are in good agreement with previously reported values and show that the two binding sites of immobilized HSA are active whatever the grafting method used.

Another important point is the relative amount of ligand captured by non-specific versus that captured by specific interactions. The level of non-specific interactions (at 10μM) ranges from 16 to 34 % (epoxy), 0 to 8 % (Schiff base) and 0 to 7 % (streptavidin monoliths). These results show that GMA-modified monoliths present a significantly lower contribution of non-specific interaction than their silica counterparts.

3.2.2.1. Epoxy method. Regarding the active sites content (B_{act}), different values were obtained for the two HSA binding sites. Whereas about 4-5 pmol.cm⁻¹ of active sites is measured on the site IIA, only about 2.5 pmol.cm⁻¹ of active sites is afforded for the site IIIA (n=3) (Table 2). This difference may be partially ascribe to non-specific interactions on the epoxy-monolith and/or to a partial loss of activity of the Sudlow site IIIA consecutive to the HSA immobilization process as already observed on silica [11]. Several attempts were made to reduce or suppress non-specific interactions on epoxy monoliths using different post-grafting reactions. Post-grafting modification proposed in the literature were tested unsuccessfully: the monoliths were treated with tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) (0.1 M, pH 8.6, 48 h), cysteine (1 M, 48 h), or ethanolamine (1 M, 15 h) [9,18,32]. FTIR spectroscopy was used to follow the reaction of epoxy groups. No reduction of the intensity of the C-O vibration band of the epoxy at 907 cm⁻¹ was observed, which confirms the lack of reactivity of Tris and ethanolamine at room temperature.

Increasing the temperature to 60°C was effective in opening the epoxy groups but it was not practical due to obvious protein stability issues. Conversely, the reaction of epoxy groups with cysteine was efficient by totally eliminating non-specific interactions at room temperature, but it also suppressed all HSA-specific interactions with the ligands. According to the literature, cysteine may form a disulfide bond with the free ³⁴Cysteine of HSA impairing all activity of the binding sites by oxidation cascade [33]. Despite the simplicity of the direct grafting of HSA onto poly(GMA-co-EDMA) monoliths, this modification pathway was no further investigated due to excessive non-specific interactions and potential partial deactivation of site IIIA.

3.2.2.2. Schiff base and streptavidin-biotin method. Very coherent active sites B_{act} were obtained with the three ligands on affinity monoliths prepared by immobilization of HSA using the Schiff base method or the streptavidin-biotin coupling (Table 2). This accurate determination of B_{act} is probably related to the very low level of non-specific interactions (in the low percent range). Also, the concordant values obtained for the two sites indicate that no partial deactivation of the IIIA site occurs with these two bio-functionalization methods. This outlines the proper accessibility of immobilized proteins with equivalent activities for the two binding sites (IIA and IIIA).

There is more than twice less HSA on the Schiff base monoliths *viz* 1.7 pmol.cm⁻¹ ($n=13$) compared to the streptavidin-biotin one with 4 pmol.cm⁻¹ ($n=13$) (Table 2). Also, the amount of active HSA, ratio $(B_{act}) / (B_{tot})$ is 84% for the streptavidin monolith, slightly better than the 71% for the Schiff base monoliths. Assuming that reduced-aldehyde monoliths bind the same amount of streptavidin than of HSA (these two proteins have similar features in terms of mass, hydrophobicity and isoelectric point), it was estimated that one tetramer of streptavidin binds to two biotin-HSA.

3.2.3. Grafting duration and protein consumption considerations

Optimization of the protein immobilization concerns the reaction time and the quantity of target protein used for the immobilization step. In the literature, grafting durations with the Schiff base method range from 3 to 6 days (0.5 mL.min⁻¹) for HSA concentrations of 5 mg.mL⁻¹ [8,9,18]. Our protocol uses a twice to ten times less concentrated HSA solution (2 down to 0.5 mg.mL⁻¹) and the grafting time is six to ten times faster completed in 48h then downed to 12 h in dynamic mode at a linear velocity of about 0.06 cm.s⁻¹. No significant difference in active HSA content was observed between the different columns, validating the grafting under flow conditions (dynamic mode) [5,11]. Another real advantage, beside time and protein mass savings, is the greatly reduced risk of loss of protein activity and/or denaturation.

The streptavidin-biotin coupling process is faster than the two other modes which is a great advantage with proteins of low stability. The coupling of biotinylated-target protein can be achieved in few minutes, e.g. about 15 min with a 1 mg.mL⁻¹ protein concentration and a 8.5 cm effective length 75 µm i.d. column

at a percolation pressure of 1.2 MPa. This coupling can be applied just before the affinity experiments: the column is installed in the CE cartridge, grafted in dynamic mode (under UV monitoring) and ready to use. Last but not least, the UV monitoring during the grafting step of the biotin-protein onto the streptavidin support allows for (i) minimizing the protein consumption to a few pmol per centimeter of capillary column, and (ii) the exact determination of the amount of grafted protein which is a tremendous asset for the quality control of each column before its use.

3.2.4. *Stability of the streptavidin-biotin affinity columns*

Stability of the bio-functionalized columns is of great concern. Indeed, screening affinity of unknown ligands against a specific target protein implies preserving the protein activity during the screening process as well as the protein content constant during successive analyses. Long-term stability and storage conditions must be also examined.

3.2.4.1 Stability of streptavidin-functionalized monolithic columns. The stability of streptavidin-functionalized columns was not considered so far. So, it was checked if it is possible to prepare and to stock streptavidin-functionalized columns for a long time at 4°C before their coupling with the biotinylated-target protein.

Six streptavidin-functionalized columns synthesized through the Schiff base method were prepared. Three were coupled with biotin-HSA and used immediately. The other three were stored at 4°C for three months. The columns stored at 4°C kept their trapping ability intact as per biotin-HSA content after 3 months. Thus, the streptavidin-functionalized columns can be prepared in advance and stored for at least three months before use, knowing that protein coupling is rapid and easy and can be done freshly before the affinity study.

3.2.4.2 Stability of affinity-HSA columns (prepared by the streptavidin-biotin coupling). The stability of HSA-affinity columns may be a critical parameter especially in the case of a screening campaign as it will determine the useful lifetime of the column. The stability of the HSA affinity columns was evaluated in phosphate buffer (67 mM, pH=7.4) using frontal analysis with warfarin to determine the remaining amount of active protein (B_{act}) under various temperature conditions, namely: (i) at 4°C i.e. in storage conditions, (ii) at room temperature in static mode and (iii) at room temperature in dynamic mode (screening conditions).

At 4°C, no variation of the active HSA content (B_{act}) was observed within 3 months, thus indicating that affinity columns can be prepared in advance and used later. At room temperature and in dynamic conditions, the column being continuously flushed with buffer at 0.06 cm.s⁻¹, 80% of active HSA were remaining after 24 hours and around 550 column volumes. 64% remained after 80 hours of extensive use or over 1800 column volumes. In order to assess if the partial loss of activity was due to protein stability

or to the sustained released of poorly or unbound HSA, the same experiment was carried out in static mode. After 80 h of storage at room temperature in static mode, the remaining activity was only 55%. This result indicates that exposure to room temperature is responsible for the loss of activity and that there is no loss of protein by leaching.

3.3. HSP90 affinity columns

As HSA affinity columns gave promising results with organic monolith grafted by the streptavidin-biotin approach, affinity columns were then prepared by the same method with another soluble protein: the N-terminal domain of HSP90. Grafted quantity of HSP90 ($5.8 \pm 0.7 \text{ pmol.cm}^{-1}$, n=11 columns) is similar to HSA ($4.9 \pm 0.6 \text{ pmol.cm}^{-1}$, Table 2). Two known ligands were studied by frontal affinity chromatography to validate the technique on a different protein: adenosine diphosphate (ADP, $K_d=10-15 \mu\text{M}$ [34]) and n,n-diethylvanillamide ($K_d=790 \mu\text{M}$ [34]). Specific interactions were detected for both ligands and calculated dissociation constants ($14 \pm 2 \mu\text{M}$ and $150 \pm 70 \mu\text{M}$ respectively for ADP and n,n-diethylvanillamide) were in the literature range. It may be noted that the weaker the affinity, the higher the incertitude on K_d determination. Specific affinity was also detected for a third ligand, 3-hydroxy-4-methoxybenzyl alcohol and the affinity was estimated at about $40 \mu\text{M}$ (no reference K_d was found in the literature). It seems therefore possible to graft different proteins with the streptavidin-biotin approach while maintaining their specific binding capacity.

4. Conclusion

Results obtained during this evaluation of two types of monoliths, a silica based and an organic glycidyl methacrylate based one, and different ways of protein grafting led us to the following conclusions: silica based monoliths can load a higher amount of active protein, but a high level of non-specific interactions is noted when interacting with ligands. The silica grafting of reactive moieties requires a first step that is silanization with glycidoxypropyltrimethoxysilane. It is thought that this silanization step is responsible, at least partly, for the non-specific interactions. Non-specific hydrophobic interactions with the propyl linker are possible. Due to a higher adsorption and a lower permeability on silica monoliths, it seems better for our purpose to work with GMA monoliths.

GMA monoliths may be directly grafted with proteins. However, some residual epoxy moieties are left over after target grafting. These reactive epoxy groups cannot be efficiently suppressed under reaction conditions compatible with the grafted protein stability. Protein grafting using the Schiff base method or the streptavidin-biotin method produced the best organic monoliths: negligible non-specific interactions and high active protein content. The very low protein consumption is another significant advantage for the streptavidin-biotin method.

The method requires a first step that is attaching biotin to the target protein, which is straightforward. This said the method presents several advantages over the Schiff base method: (i) it binds up to twice more active sites allowing targeting lower affinity ligands. (ii) The streptavidin column can be loaded in a few minutes with the target protein just prior its use thus limiting stability issues. (iii) For each column, the exact amount of biotinylated-target protein captured during the grafting step is exactly known, which is a major asset for quality control. (iv) The amount of bound protein (a few ten picomoles per column) is just what is needed. (v) The method does not denature the protein giving an activity rate passing 80%. Such streptavidin-biotin grafting way is generic, as it may be implemented to any other biotinylated target. Indeed, it has been shown that this method was successfully applied to the N-terminal domain of HSP90.

As an example of the benefits of 8.5 cm effective length 75 µm i.d. miniaturized monolith columns modified by the streptavidin-biotin method, the grafting requires only 40 pmol of the target protein (3 µg for a 70 kDa protein). It is achieved in about 10 min with a pressure drop of 1.2 MPa giving a flow rate of 240 nL·min⁻¹ and a 1 mg·mL⁻¹ protein concentration. The great monolith permeability of these nano-columns can be operated in a very simple and automated way with the external pressure device of a common capillary electrophoresis system using its in-situ UV detection avoiding all nano-LC problems with high pressure particle-filled columns.

In the frame of screening process (using zonal affinity chromatography analysis coupled to mass spectrometry), it will be possible to screen mixtures of about 10-20 compounds in one analysis of about 30 min, which gives around 48 runs/day i.e. around 500-1000 compounds/day (namely an entire fragment library in the fragment-based drug discovery (FDBB) approach). Thus, boosting the fragment screening step using a generic method (applicable to any biotinylated proteins) is of great interest in FBDD.

Funding

This work was partially funded by Servier laboratories.

References

- [1] Hans-Joachim Böhm, Gisbert Schneider, Raimund Mannhold, Hugo Kubinyi, Gerd Folkers, Protein-Ligand Interactions: From Molecular Recognition to Drug Design, Wiley-VCH, H.-J. Böhm and G. Schneider, Weinheim, 2003.
- [2] N.W.C. Chan, D.F. Lewis, P.J. Rosner, M.A. Kelly, D.C. Schriemer, Frontal affinity chromatography–mass spectrometry assay technology for multiple stages of drug discovery: applications of a chromatographic biosensor, *Anal. Biochem.* 319 (2003) 1–12. doi:10.1016/S0003-2697(03)00193-3.
- [3] M.-D. Duong-Thi, M. Bergström, T. Fex, R. Isaksson, S. Ohlson, High-throughput fragment screening by affinity LC-MS, *J. Biomol. Screen.* 18 (2013) 160–171. doi:10.1177/1087057112459271.
- [4] E. Meiby, H. Simmonite, L. le Strat, B. Davis, N. Matassova, J.D. Moore, M. Mrosek, J. Murray, R.E. Hubbard, S. Ohlson, Fragment screening by weak affinity chromatography: comparison with

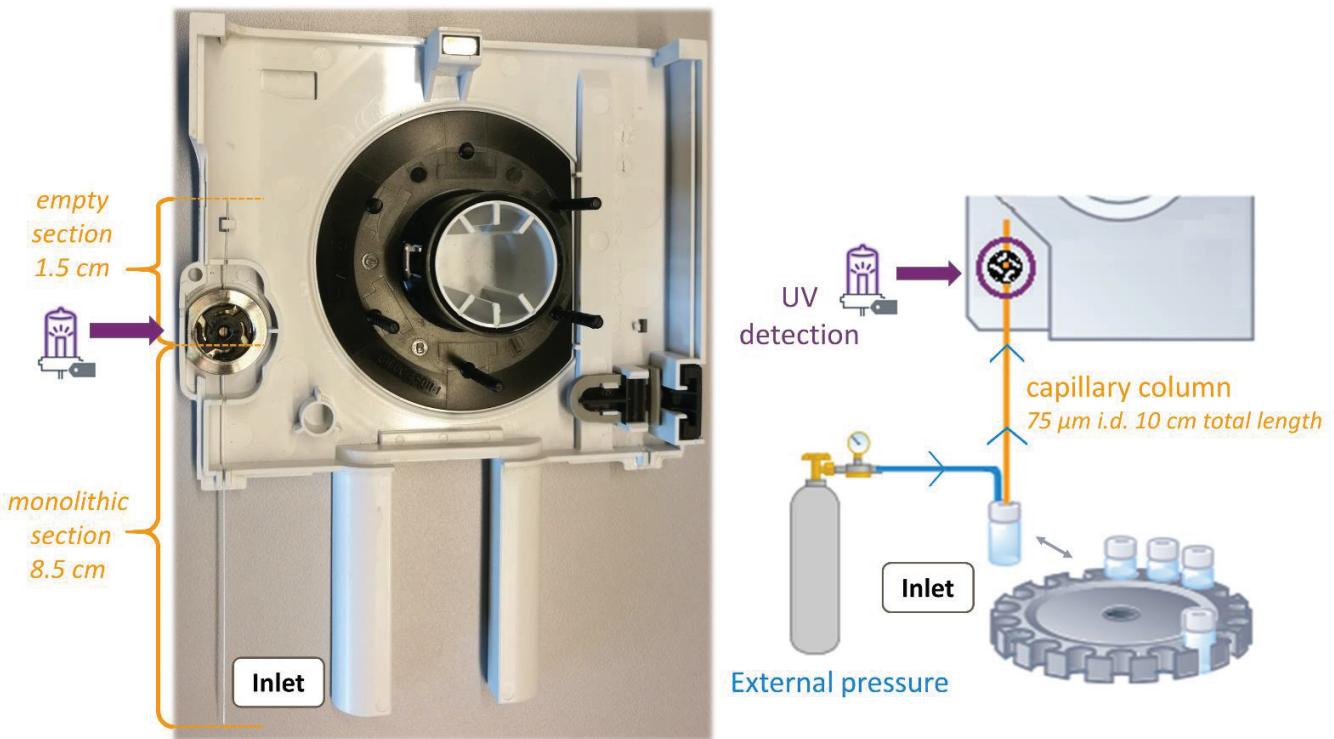
- established techniques for screening against HSP90, *Anal. Chem.* 85 (2013) 6756–6766. doi:10.1021/ac400715t.
- [5] M.J. Yoo, J.E. Schiel, D.S. Hage, Evaluation of affinity microcolumns containing human serum albumin for rapid analysis of drug–protein binding, *J. Chromatogr. B.* 878 (2010) 1707–1713. doi:10.1016/j.jchromb.2010.04.028.
 - [6] Z. Li, D.S. Hage, Analysis of stereoselective drug interactions with serum proteins by high-performance affinity chromatography: A historical perspective, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 144 (2017) 12–24. doi:10.1016/j.jpba.2017.01.026.
 - [7] S. Ohlson, M.-D. Duong-Thi, Fragment screening for drug leads by weak affinity chromatography (WAC-MS), *Methods.* (2018). doi:10.1016/j.ymeth.2018.01.011.
 - [8] R. Mallik, D.S. Hage, Development of an affinity silica monolith containing human serum albumin for chiral separations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 820–830. doi:10.1016/j.jpba.2007.03.017.
 - [9] E.L. Pfaunmiller, M. Hartmann, C.M. Dupper, S. Soman, D.S. Hage, Optimization of human serum albumin monoliths for chiral separations and high-performance affinity chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1269 (2012) 198–207. doi:10.1016/j.chroma.2012.09.009.
 - [10] M.L. Conrad, A.C. Moser, D.S. Hage, Evaluation of indole-based probes for high-throughput screening of drug binding to human serum albumin: analysis by high-performance affinity chromatography, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1145–1155. doi:10.1002/jssc.200800567.
 - [11] B. Loun, D.S. Hage, Characterization of thyroxine—albumin binding using high-performance affinity chromatography, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 579 (1992) 225–235. doi:10.1016/0378-4347(92)80386-5.
 - [12] Y. Liang, J. Wang, F. Fei, H. Sun, T. Liu, Q. Li, X. Zhao, X. Zheng, Binding kinetics of five drugs to beta2-adrenoceptor using peak profiling method and nonlinear chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1538 (2018) 17–24. doi:10.1016/j.chroma.2018.01.027.
 - [13] K.S. Joseph, A.C. Moser, S. Basiaga, J.E. Schiel, D.S. Hage, Evaluation of alternatives to warfarin as probes for sudlow site I of human serum albumin characterization by high-performance affinity chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 3492–3500. doi:10.1016/j.chroma.2008.09.080.
 - [14] X. Zheng, M. Podariu, C. Bi, D.S. Hage, Development of enhanced capacity affinity microcolumns by using a hybrid of protein cross-linking/modification and immobilization, *J. Chromatogr. A.* 1400 (2015) 82–90. doi:10.1016/j.chroma.2015.04.051.
 - [15] R. Matsuda, J. Anguizola, K.S. Hoy, D.S. Hage, Analysis of drug-protein interactions by high-performance affinity chromatography: interactions of sulfonylurea drugs with normal and glycated human serum albumin, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 1286 (2015) 255–277. doi:10.1007/978-1-4939-2447-9_21.
 - [16] M. Strandh, H.S. Andersson, S. Ohlson, Weak Affinity Chromatography, in: *Affin. Chromatogr.,* Humana Press, New Jersey, 2000: pp. 7–23. doi:10.1385/1-59259-041-1:7.
 - [17] M.J. Yoo, D.S. Hage, Evaluation of silica monoliths in affinity microcolumns for high-throughput analysis of drug–protein interactions, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2776–2785. doi:10.1002/jssc.200900346.
 - [18] R. Mallik, T. Jiang, D.S. Hage, High-performance affinity monolith chromatography: development and evaluation of human serum albumin columns, *Anal. Chem.* 76 (2004) 7013–7022. doi:10.1021/ac049001q.
 - [19] M.-D. Duong-Thi, M. Bergström, T. Fex, S. Svensson, S. Ohlson, R. Isaksson, Weak affinity chromatography for evaluation of stereoisomers in early drug discovery, *J. Biomol. Screen.* 18 (2013) 748–755. doi:10.1177/1087057113480391.
 - [20] C. Acquah, C.K.S. Moy, M.K. Danquah, C.M. Ongkudon, Development and characteristics of polymer monoliths for advanced LC bioscreening applications: A review, *J. Chromatogr. B.* 1015–1016 (2016) 121–134. doi:10.1016/j.jchromb.2016.02.016.
 - [21] H.S. Kim, R. Mallik, D.S. Hage, Chromatographic analysis of carbamazepine binding to human serum albumin, *J. Chromatogr. B.* 837 (2006) 138–146. doi:10.1016/j.jchromb.2006.03.062.

- [22] M. Ozawa, T. Ozawa, M. Nishio, K. Ueda, The role of CH/π interactions in the high affinity binding of streptavidin and biotin, *J. Mol. Graph. Model.* 75 (2017) 117–124. doi:10.1016/j.jmgm.2017.05.002.
- [23] R. El Debs, V. Dugas, C. Demesmay, Photografting as a versatile, localizable, and single-step surface functionalization of silica-based monoliths dedicated to microscale separation techniques., *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 993–1001. doi:10.1002/jssc.201200878.
- [24] A. Bruchet, V. Dugas, C. Mariet, F. Goutelard, J. Randon, Improved chromatographic performances of glycidyl methacrylate anion-exchange monolith for fast nano-ion exchange chromatography, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2079–2087. doi:10.1002/jssc.201100180.
- [25] G.T. Hermanson, Chapter 11 - (Strept)avidin–Biotin Systems, in: G.T. Hermanson (Ed.), *Bioconjugate Tech.* Third Ed., Academic Press, Boston, 2013: pp. 465–505. doi:10.1016/B978-0-12-382239-0.00011-X.
- [26] M.D. Shortridge, D.S. Hage, G.S. Harbison, R. Powers, Estimating protein-ligand binding affinity using high-throughput screening by NMR, *J. Comb. Chem.* 10 (2008) 948–958. doi:10.1021/cc800122m.
- [27] C. Faye, J. Chamieh, T. Moreau, F. Garnier, K. Faure, V. Dugas, C. Demesmay, O. Vandenabeele-Trambouze, In situ characterization of antibody grafting on porous monolithic supports, *Anal. Biochem.* 420 (2012) 147–154. doi:10.1016/j.ab.2011.09.016.
- [28] Y.W. Alelyunas, L. Pelosi-Kilby, P. Turcotte, M.-B. Kary, R.C. Spreen, A high throughput dried DMSO LogD lipophilicity measurement based on 96-well shake-flask and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 1950–1955. doi:10.1016/j.chroma.2010.01.071.
- [29] C. Mateo, V. Grazú, B.C.C. Pessela, T. Montes, J.M. Palomo, R. Torres, F. López-Gallego, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisán, Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization–stabilization, *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007) 1593–1601. doi:10.1042/BST0351593.
- [30] J.E. Butler, Solid Supports in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Other Solid-Phase Immunoassays, *Methods.* 22 (2000) 4–23. doi:10.1006/meth.2000.1031.
- [31] U. Kragh-Hansen, V.T.G. Chuang, M. Otagiri, Practical Aspects of the Ligand-Binding and Enzymatic Properties of Human Serum Albumin, *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 695–704. doi:10.1248/bpb.25.695.
- [32] G.T. Hermanson, A.K. Mallia, P.K. Smith, *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press, San Diego, 1992, p.156.
- [33] K. Oettl, R.E. Stauber, Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties, *Br. J. Pharmacol.* 151 (2007) 580–590. doi:10.1038/sj.bjp.0707251.
- [34] R. Buratto, D. Mammoli, E. Chiarparin, G. Williams, G. Bodenhausen, Exploring weak ligand–protein interactions by long-lived NMR states: improved contrast in fragment-based drug screening, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 53 (2014) 11376–11380. doi:10.1002/anie.201404921.

Monolith weak affinity chromatography for µg-protein-ligand interaction study – Supplementary material

Lucile Lecas, Jérôme Randon, Alain Berthod, Vincent Dugas, Claire Demesmay*

*Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques
UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 VILLEURBANNE, France*

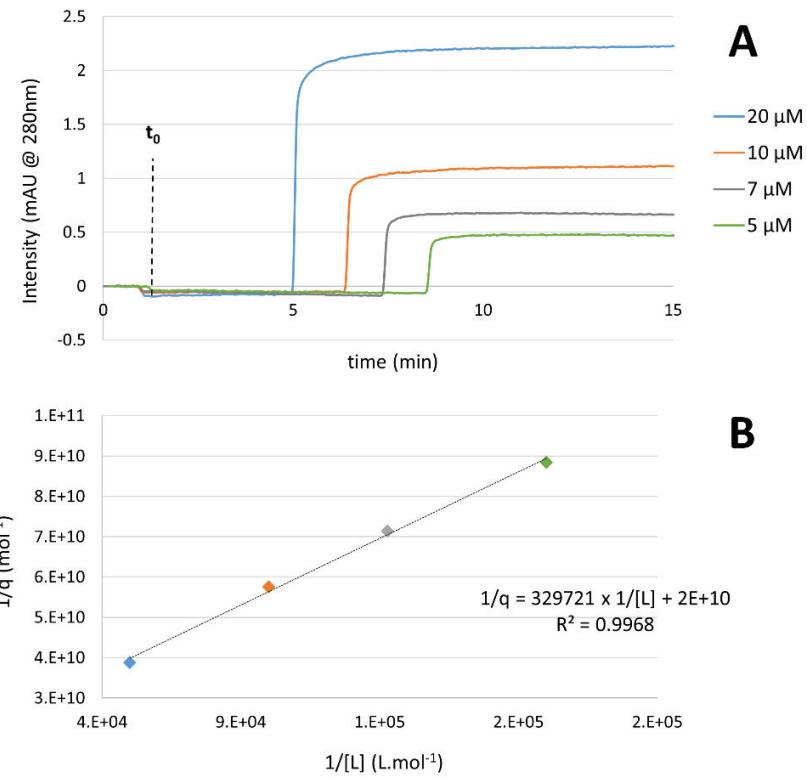


S.1. Representation of the CE system adapted to capillary affinity chromatography.

Left: picture of the CE cartridge showing the monolithic capillary column connected to the UV detection interface.

Right: schematic representation of the CE system set-up for nano-LC experiments.

Frontal affinity chromatography experiments were done using a capillary electrophoresis device. To do this the monolithic column was installed at the outlet of the 7100 CE Agilent system and directly connected to the UV detection system (at 8.5 cm from the column inlet). The CE system allows (i) loading vial containing liquid to be flow (ii) immersing the inlet of the capillary column into the liquid (iii) applying gas pressure to force the liquid to flow through the column and (iv) detect at the column outlet. So we adapt the use of a standard capillary electrophoresis system to do nano-LC experiments.



S.2. Affinity measurements in frontal analysis on a HSA-monolithic column (8.5 cm effective length; 75 μm i.d.). HSA was grafted through the streptavidin-biotin coupling method on the glycidyl methacrylate-modified monoliths.

- A- Breakthrough curves of furosemide at different concentrations in phosphate buffer (67 mM pH 7.4), UV detection at 280 nm, t_0 : dead time measured with breakthrough curve of DMSO, linear velocity 0.1 cm.s⁻¹.
- B- Plot of the reciprocal of the quantity of bound ligand ($1/q$) versus the reciprocal of the ligand concentration ($1/[L]$) (Eq. 2).

3. OUVERTURE AUX PROTÉINES MEMBRANAIRES

Nous avons donc développé des colonnes monolithiques d'une dizaine de centimètres de long avec un diamètre interne de 75 µm, biofonctionnalisées avec seulement quelques µg de protéine, greffées en quelques dizaines de minutes, qui permettent de détecter et de mesurer des interactions spécifiques avec des ligands de faible affinité (K_d du µM à la centaine de µM).

Le challenge à présent pour la chromatographie de faible affinité (et pour les autres techniques biophysiques) consiste à étudier les interactions de ligands avec des protéines membranaires. En effet, ces protéines sont très délicates à produire et à manipuler, principalement à cause de leur caractère hydrophobe [20]. Des efforts importants sont donc nécessaires pour être en mesure d'appliquer la chromatographie de faible affinité à ces cibles de fort intérêt pharmaceutiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. Meiby, H. Simmonite, L. le Strat, B. Davis, N. Matassova, J.D. Moore, M. Mrosek, J. Murray, R.E. Hubbard, S. Ohlson, Fragment screening by weak affinity chromatography: comparison with established techniques for screening against HSP90, *Anal. Chem.* 85 (2013) 6756–6766. doi:10.1021/ac400715t.
- [2] M.J. Yoo, J.E. Schiel, D.S. Hage, Evaluation of affinity microcolumns containing human serum albumin for rapid analysis of drug–protein binding, *Journal of Chromatography B*. 878 (2010) 1707–1713. doi:10.1016/j.jchromb.2010.04.028.
- [3] X. Zheng, M. Podariu, C. Bi, D.S. Hage, Development of enhanced capacity affinity microcolumns by using a hybrid of protein cross-linking/modification and immobilization, *Journal of Chromatography A*. 1400 (2015) 82–90. doi:10.1016/j.chroma.2015.04.051.
- [4] M.-D. Duong-Thi, M. Bergström, T. Fex, S. Svensson, S. Ohlson, R. Isaksson, Weak Affinity Chromatography for Evaluation of Stereoisomers in Early Drug Discovery, *Journal of Biomolecular Screening*. 18 (2013) 748–755. doi:10.1177/1087057113480391.
- [5] M. Strandh, H.S. Andersson, S. Ohlson, Weak Affinity Chromatography, in: *Affinity Chromatography*, Humana Press, New Jersey, 2000: pp. 7–23. doi:10.1385/1-59259-041-1:7.
- [6] M.L. Conrad, A.C. Moser, D.S. Hage, Evaluation of indole-based probes for high-throughput screening of drug binding to human serum albumin: analysis by high-performance affinity chromatography, *J Sep Sci.* 32 (2009) 1145–1155. doi:10.1002/jssc.200800567.
- [7] K.S. Joseph, A.C. Moser, S. Basiaga, J.E. Schiel, D.S. Hage, Evaluation of alternatives to warfarin as probes for sudlow site I of human serum albumin characterization by high-performance affinity chromatography, *J Chromatogr A*. 1216 (2009) 3492–3500. doi:10.1016/j.chroma.2008.09.080.
- [8] H.S. Kim, R. Mallik, D.S. Hage, Chromatographic analysis of carbamazepine binding to human serum albumin, *Journal of Chromatography B*. 837 (2006) 138–146. doi:10.1016/j.jchromb.2006.03.062.
- [9] R. Mallik, C. Wa, D.S. Hage, Development of Sulfhydryl-Reactive Silica for Protein Immobilization in High-Performance Affinity Chromatography, *Anal. Chem.* 79 (2007) 1411–1424. doi:10.1021/ac061779j.
- [10] M.J. Yoo, D.S. Hage, EVALUATION OF SILICA MONOLITHS IN AFFINITY MICROCOLUMNS FOR HIGH-THROUGHPUT ANALYSIS OF DRUG-PROTEIN INTERACTIONS, *Journal of Separation Science*. 32 (2009) 2776. doi:10.1002/jssc.200900346.
- [11] R. Mallik, D.S. Hage, Development of an affinity silica monolith containing human serum albumin for chiral separations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 46 (2008) 820–830. doi:10.1016/j.jpba.2007.03.017.
- [12] E.L. Pfaunmiller, M. Hartmann, C.M. Dupper, S. Soman, D.S. Hage, Optimization of human serum albumin monoliths for chiral separations and high-performance affinity chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1269 (2012) 198–207. doi:10.1016/j.chroma.2012.09.009.
- [13] R. Mallik, T. Jiang, D.S. Hage, High-performance affinity monolith chromatography: development and evaluation of human serum albumin columns, *Anal. Chem.* 76 (2004) 7013–7022. doi:10.1021/ac049001q.
- [14] R. Moaddel, P.L. Bullock, I.W. Wainer, Development and characterization of an open tubular column containing immobilized P-glycoprotein for rapid on-line screening for P-glycoprotein substrates, *Journal of Chromatography B*. 799 (2004) 255–263. doi:10.1016/j.jchromb.2003.10.054.
- [15] M.C. de Moraes, C. Temporini, E. Calleri, G. Bruni, R.G. Ducati, D.S. Santos, C.L. Cardoso, Q.B. Cass, G. Massolini, Evaluation of capillary chromatographic supports for immobilized human purine nucleoside phosphorylase in frontal affinity chromatography studies, *Journal of Chromatography A*. 1338 (2014) 77–84. doi:10.1016/j.chroma.2014.02.057.

- [16] F. Zhang, X. Zhao, B. Xu, S. Cheng, C. Tang, H. Duan, X. Xiao, W. Du, L. Xu, Preparation and characterization of micro-cell membrane chromatographic column with silica-based porous layer open tubular capillary as cellular membrane carrier, *Anal Bioanal Chem.* 408 (2016) 2441–2448. doi:10.1007/s00216-016-9339-9.
- [17] R. El Debs, V. Dugas, C. Demesmay, Photografting as a versatile, localizable, and single-step surface functionalization of silica-based monoliths dedicated to microscale separation techniques., *Journal of Separation Science.* 36 (2013) 993–1001. doi:10.1002/jssc.201200878.
- [18] A. Bruchet, V. Dugas, C. Mariet, F. Goutelard, J. Randon, Improved chromatographic performances of glycidyl methacrylate anion-exchange monolith for fast nano-ion exchange chromatography, *Journal of Separation Science.* 34 (2011) 2079–2087. doi:10.1002/jssc.201100180.
- [19] M.D. Shortridge, D.S. Hage, G.S. Harbison, R. Powers, Estimating protein-ligand binding affinity using high-throughput screening by NMR, *J Comb Chem.* 10 (2008) 948–958. doi:10.1021/cc800122m.
- [20] S. Ohlson, M.-D. Duong-Thi, Weak Affinity Chromatography (WAC), in: *Applied Biophysics for Drug Discovery*, John Wiley & Sons, Ltd, 2017: pp. 107–130. doi:10.1002/9781119099512.ch7.

CHAPITRE IV :

LA CHROMATOGRAPHIE

D'AFFINITÉ POUR L'ÉTUDE DES

PROTÉINES MEMBRANAIRES

CHAPITRE IV : LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ POUR L'ÉTUDE DES PROTÉINES MEMBRANAIRES

1. LES PROTÉINES MEMBRANAIRES, UN CHALLENGE ATTRACTIF

Les protéines membranaires sont des protéines qui font partie ou qui interagissent avec la membrane des cellules. Elles sont divisées en différentes catégories en fonction de leur localisation et permettent d'assurer une grande diversité de fonctions biologiques et notamment la liaison entre les milieux intra et extra cellulaires. Les protéines membranaires dites intégrales font partie intégrante de la membrane cellulaire et possèdent une surface hydrophobe impliquant leur stabilité dans la partie hydrophobe de la bicouche lipidique. Elles représentent entre 20 et 30 % des protéines encodées par le génome humain. Plus précisément, parmi cette sous-catégorie se trouvent les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs pour G-protein-coupled receptor) qui représentent la famille la plus grande et la plus diversifiée (plus de 800 protéines différentes) [1]. Ces protéines de signalisation reconnaissent puis transfèrent l'information contenue dans une variété de signaux, ce qui leur confère un rôle clé dans de nombreux procédés physiologiques (système immunitaire, prolifération cellulaire, neurotransmission, ...). Par conséquent leur dysfonctionnement entraîne un grand nombre de pathologies comme les maladies neurodégénératives ou respiratoires, le diabète ou encore certains cancers [2]. Cela justifie donc le fait qu'actuellement plus de 30 % des médicaments sur le marché ciblent des GPCRs car elles représentent des cibles thérapeutiques à fort potentiel pour les programmes de drug discovery.

Cependant, bien qu'elles représentent près d'un tiers des protéines, seulement 0,2 % des structures déterminées sont celles de protéines membranaires [3]. En effet, il est très difficile d'établir des conditions expérimentales permettant de préserver la conformation de ces protéines une fois isolées de leur environnement d'origine, ce qui rend la détermination structurale très complexe. Ce sont donc des protéines peu stables, au mode d'activation complexe qui sont difficiles à produire et à purifier en quantité importante. Enfin, ce sont des protéines dynamiques capables d'adopter différentes conformations pour moduler leur activité. En fonction du ligand qui interagit, la protéine est alors stabilisée dans une conformation active (qui génère une réponse cellulaire) ou inactive. On appelle agonistes les ligands qui ont tendance à stabiliser la protéine dans sa forme active, tandis que les antagonistes présentent en général une affinité similaire pour les états actifs et inactifs de la protéine mais peuvent gêner (par compétition) l'interaction d'autres ligands au niveau du site d'interaction. Les protéines membranaires ont

donc besoin d'une certaine liberté conformationnelle pour conserver toutes leurs propriétés. Par conséquent, la découverte de nouveaux ligands apparaît comme un réel challenge lorsqu'on s'intéresse aux protéines membranaires.

La solubilisation des protéines membranaires dans un détergent classique n'offre en général pas une stabilité satisfaisante donc de nombreuses études ont été réalisées pour les stabiliser. Les protéines peuvent alors être mutées ou tronquées par exemple [3,4] mais cela implique une modification de la séquence protéique qui peut engendrer des conséquences sur leur activité [5]. C'est pour cela que dans ce projet l'objectif consiste à travailler avec des protéines natives.

Ainsi, les critères essentiels pour le développement de la chromatographie de faible affinité visant à l'étude d'interactions ligands-protéines membranaires sont donc la faible consommation en protéine, la rapidité des analyses ainsi que la capacité à les immobiliser dans un environnement favorable, à la fois en termes de stabilité et de liberté conformationnelle, garantissant au maximum l'inaltération de leur activité.

2. L'ÉTAT DE L'ART

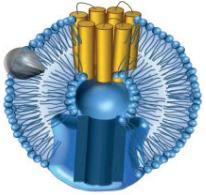
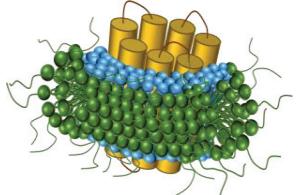
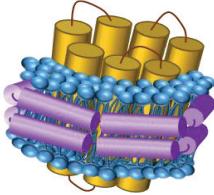
Dans un premier temps nous avons dressé un état de l'art sur la chromatographie d'affinité pour l'étude des protéines membranaires afin d'appréhender plus en détails les challenges et spécificités de ce type d'application ainsi que de détailler les différentes approches proposées pour l'étude de ces cibles particulières. Les conclusions de cette étude bibliographique sont présentées dans l'article « *Affinity Chromatography : a powerful tool in Drug Discovery for investigating ligand/membrane protein interactions* », qui souligne la principale difficulté liée à l'environnement de la protéine et à son immobilisation.

Les premières stratégies décrites proposent l'immobilisation de la protéine dans son environnement lipidique naturel, c'est-à-dire soit par l'immobilisation de cellules entières soit par l'immobilisation de fragments de cellule (c'est ce qu'on appelle la CMC pour Cell Membrane Chromatography). Comme mentionné dans cet article, la stabilité de ces types de colonnes est limitée, elles génèrent beaucoup d'interactions secondaires non-spécifiques liées au contenu des fragments membranaires (multiples composés dont une grande variété de protéines autres que la protéine d'intérêt) et la consommation cellulaire est très importante.

Une autre alternative consiste à solubiliser les protéines membranaires contenues dans les fragments de cellules à l'aide de détergents avant de les immobiliser sur des phases stationnaires IAM (Immobilized Artificial Membranes), on parle alors de CMAC (Cell Membrane Affinity Chromatography). Une fois encore, la protéine d'intérêt n'est pas purifiée donc toutes les autres protéines de la membrane sont présentes, il y a peu de sites actifs sur les colonnes et la protéine étudiée subit des restrictions de conformation.

Enfin, plus récemment, le développement de diverses structures mimant les propriétés des membranes a permis de nouveaux travaux en chromatographie d'affinité. Ces structures biomimétiques permettent alors de travailler avec la protéine purifiée et sont majoritairement composées de lipides afin de procurer un environnement favorable à la protéine membranaire d'intérêt. On retrouve principalement trois types de structures : le protéoliposome, le lipodisque et le nanodisque (Tableau IV-1).

Tableau IV-1. Représentation des différentes structures biomimétiques stabilisant les protéines membranaires et leur description.

Protéoliposome	Lipodisque	Nanodisque
		

Les protéoliposomes (à gauche) sont des vésicules formées par une bicouche lipidique (en bleu) dans laquelle est insérée la protéine membranaire (en jaune). Les lipodisques (au centre) sont également composés d'une bicouche lipidique (en bleu) circulaire et plane, stabilisée par des phospholipides portant un groupement polyéthylène glycol (PEG ; en vert). Enfin le nanodisque (à droite), correspond à l'auto-assemblage d'une bicouche de phospholipides (en bleu) maintenue par une protéine appelée MSP (membrane scaffold protein ; en violet). Pour ces deux dernières structures, la protéine membranaire (en jaune) est insérée au centre et l'accès aux côtés intra et extracellulaires de la protéine est assuré.

Affinity Chromatography: a powerful tool in drug discovery for investigating ligand/membrane protein interactions

Lucile Lecas, Vincent Dugas, Claire Demesmay*

Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, ENS de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 VILLEURBANNE, France

* Corresponding author. Tel.: +33437423552

E-mail address: demesmay@univ-lyon1.fr

Abstract

Affinity chromatography is an oft-overlooked chromatographic technique regarding receptor/ligand studies. Indeed, biologists are more likely to focus on more recent biophysical techniques such as NMR or SPR methods, among others. However, in order to face challenges related to the use of membrane proteins in drug discovery, alternative/complementary methods are welcome. In this frame, chromatographic methods through affinity mode bring new perspectives due to their relatively simplicity and the great diversity of information that can be provided. Affinity chromatography methods relies on the immobilization of targets and when dealing with membrane proteins this step is crucial. Different immobilization strategies with their own specificities (surface density, non-specific interaction, give or take a complex surface chemistry) were developed allowing to encompass a wide range of applications: from ligand ranking (synthetic compounds of medium to high affinity) to fragment screening (small compounds of weak affinity), adsorption, distribution, metabolism and excretion studies or identification of active components from natural extracts.

Keywords: Affinity chromatography, Membrane proteins, Cell membrane affinity chromatography, Ligand-receptor binding

1. Introduction

Membrane protein functions are of utmost importance for cells and organelles activities. They (i) mediate signal transduction processes (response to hormones, synaptic nerve transmission and immune reactions), (ii) control the uptake of nutrients and release of metabolic products and (iii) regulate the balance of ions and solutes between the interior of the cell and its surrounding environment. Due to their major role in many physiological or disease-related processes they are therefore key targets for therapeutic compounds. However, the promise potentialities held by membrane proteins in drug discovery has not been totally fulfilled, as illustrated, for example, by the small fraction of G protein-coupled receptors (GPCRs) - about 15% of all non-odorant GPCRs – that has been successfully targeted by the pharmaceutical industry. This reality mainly stems in the difficulty to study membrane proteins outside their biological environment compared to soluble ones.

In target-based drug discovery, once the biological target identified, the ligand-identification (hit) phase includes the screening of compound chemical libraries. For such screening of new ligands, two typical assay strategies are available: function-based screening and affinity-based screening. Function-based screenings are performed using cell-based assays that monitor signaling events while affinity-based screenings rely on biophysical analytical methods. Among the available affinity-based screening methods (including Magnetic Nuclear Resonance (NMR), Surface Plasmon Resonance (SPR), IsoThermalCalorimetry (ITC), thermophoresis, thermal shift assays). Affinity Chromatography (also called bio-affinity chromatography) has recently established itself as a label-free technology for the identification and the characterization of ligands. It allows to quickly prioritize hits (ranking of affinity) and holds particular appeal due its simplicity and to the modularity of the experimental chromatographic set-up that supports the use of various detectors (from UV spectrophotometry, to mass spectrometry, and scintillation).

Used for the first time for a transmembrane protein in 1995 by Lundahl's group for the study of Glut1 transporter, affinity chromatography has undergone many developments since its earliest applications first reviewed in 1997¹ then in 2001 by Lundahl². The objective of this review is to focus on the recent development of affinity chromatography in the field of the highly challenging membrane proteins for the quantitation and characterization of biospecific interactions between protein and ligands.

2. What is the challenge with membrane proteins?

The crucial criteria for ligand interaction studies on membrane proteins are low protein consumption, unbiased conformational states and rapidity due to stability issues. This is clearly a bottleneck for membrane proteins in general, and particularly for GPCRs, because of the difficulties in obtaining sufficient

amounts of stable and functionally folded proteins³. Indeed, although membrane proteins have been produced so far with a full range of expression systems, functional production of large amounts of unmodified (native) membrane proteins still represents a real challenge. Compared to other classes of proteins, the study of membrane proteins has also remained a challenge in large part due to the difficulty in establishing experimental conditions where the correct conformation of the protein in isolation from its native environment is preserved. Indeed, stabilization of native membrane proteins fold out of the lipid bilayer is an additional problem as it requires well-controlled membrane-mimicking environments. At last, the activity of membrane proteins decreases very fast in contrast to other proteins (stability issues).

3. How does affinity chromatography work? Which kind of information does it provide?

In affinity chromatography, the protein target is immobilized on the stationary phase filling the chromatographic column and the retention of injected ligands is studied. The experiments can be performed with classical HPLC systems in a fully automated way. Two main different elution modes may be implemented in affinity chromatography: Frontal Affinity Chromatography (FAC) and Zonal Affinity Chromatography (ZAC).

In Zonal Affinity Chromatography, a small plug of analyte is injected and the ligand analytes are eluted as individual peaks according to their increasing affinity with the immobilized target protein. Only ranking of ligands is directly accessible in a single analysis in ZAC. The K_d determination requires the prior determination of the active amount of immobilized proteins. Operation has to take place in the linear region of isotherm so that a great excess of protein is required when compared to the ligand amount. This may lead to detection issues if also considering the inherent effect of dilution during chromatographic elution. Usually chromatographic efficiencies are low either or both due to low efficiencies of affinity columns and to slow kinetics of the protein-ligand interactions that itself prohibits high resolution. Specific detection, for example with mass spectrometry, will alleviate this issue and allows individual detection of fragments even when not fully chromatographically separated. The main advantage of ZAC is the low consumption of ligands and the simplicity of the experimental set-up (standard chromatographic mode).

In frontal analysis, the analyte is continuously infused through the column until its breakthrough, due to saturation of the binding sites (observation of a typical sigmoid-like profile with front and plateau). The main advantage of FAC over ZAC is its ability to provide more information. Indeed, the infusion of several solutions of increasing concentrations allows both the determination of the binding type (one-site or multi-site binding), the quantification of the binding constant (K_a) with accuracy and precision and the determination of the amount of active binding sites (B_{act}) on the affinity column. In the last decade, the coupling of FAC with mass spectrometric detection has attracted more and more attention^{4,5}.

The different practical aspects of these two elution methods as well as their respective advantages and pitfalls have been reviewed in excellent reviews^{6–8} and the principal features of affinity chromatography are summarized Figure 1.

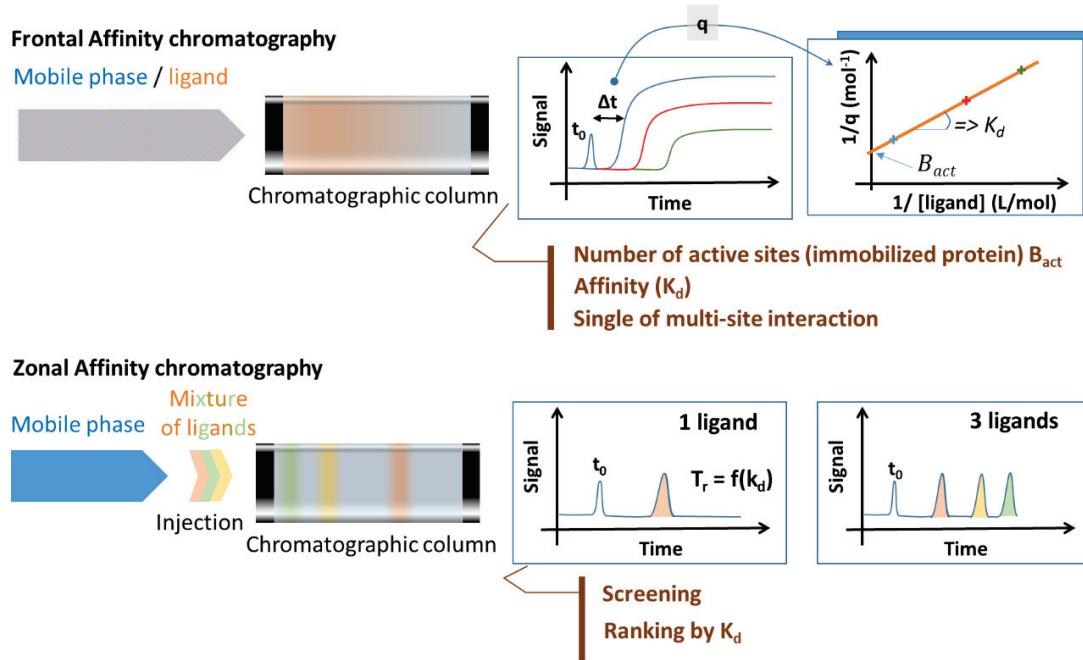


Figure 1. Schematic representation of the Frontal affinity and Zonal affinity chromatography modes with their respective signals and related binding properties.

The key feature of affinity chromatography is its ability to reuse of the same column for multiple experiments i.e. to study numerous ligands, provided that the column is stable enough in hydrodynamic conditions of use (no loss of immobilized proteins and no loss of activity of the immobilized protein). In this frame, only a relatively small amount of protein target is needed. Using the same column for multiple use leads also to good precision by minimizing run-to run variations.

3.1. Affinity Column types

The affinity column is at the heart of the chromatographic set-up. Different chromatographic supports and formats have been considered as well as different immobilization pathways depending on the native or biomimetic membrane in which the protein is embedded. The important criteria for an affinity column are its high protein content per volume unit (the higher the protein content the weaker the affinity that can be detected) and the low non-specific interactions to avoid false positives.

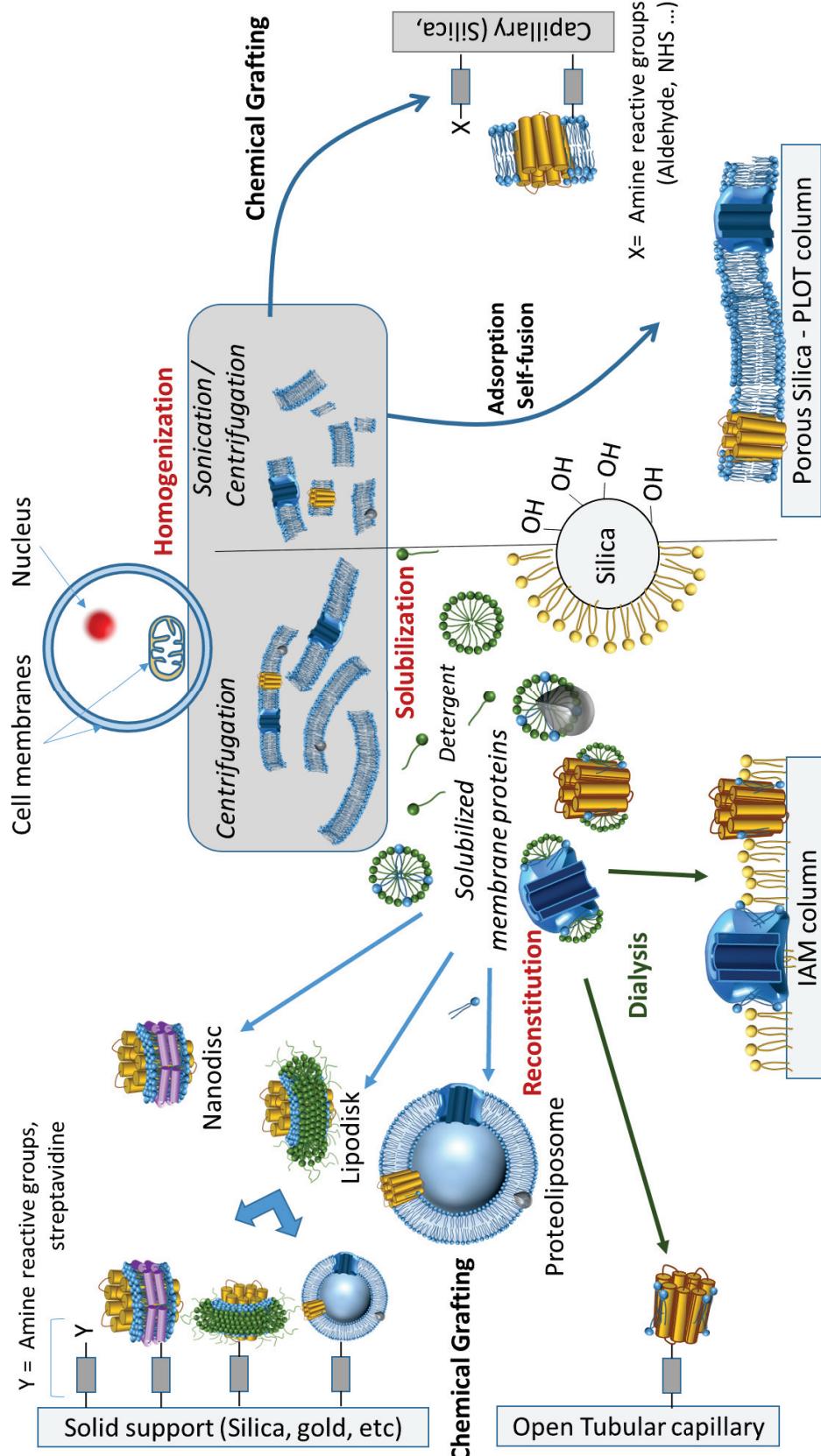


Figure 2. Overview of the preparation of affinity columns : from cell lines to affinity column

3.1.1. *Column format.* As illustrated Figure 2 several formats have been explored for affinity chromatography. The most common format remains the filled columns: particulate columns or monolithic ones. In the case of membrane proteins that are difficult to express, the reduction in column size has been of interest to minimize the protein consumption for many years. Small volume columns include short-length columns⁹⁻¹⁵ (a few millimeters) and more recently small-internal diameter^{16,17} (a few hundred micrometers) columns. Small internal diameter columns with a volume in the microliter range, allow a huge reduction of protein consumption (a few hundred picomole per column)¹⁶. In order to further reduce the amount of protein needed, several authors have developed open tubular columns (OTC) in fused silica capillary¹⁸⁻²³ or in microfluidic channels²⁴ and even Porous Layer Open tubular (PLOT) columns²⁵.

The use of OTC was first proposed by Moaddel in 2004²¹ to reduce the non-specific interactions arising from the underlying chromatographic support and thus to reduce the chromatographic run times from several hours to a few ten minutes when compared with filled columns. However, the number of available binding sites on the open tubular column was 200 times lower than for particulate column. The consequence of the reduced amount of binding sites on the OTC was a significant reduction in the relative capacity of the column. The same strategy was proposed by Temporini in 2013²⁰ to favor specific interactions over non-specific ones.

To solve the problem associated with the very low capacity of OTC , the group of Xu^{25,26} proposed for the first time in 2016 the fabrication of a silica based Porous Layer Open Tubular column. They demonstrated that the PLOT columns synthesized with the optimized feed composition exhibits a higher membrane capacity, leading to a binding capacity nine times higher than silica OTC columns. Moreover, they showed in a comparative study with classical particulate columns, that their PLOT column provided similar chromatographic retention factors and stability than classical columns while reducing by 460-fold the consumption of cellular membranes.

3.1.2. *Stationary-phase support.* In affinity chromatography and especially in weak affinity chromatography where weak binding events are studied, the support used for the immobilization of the target protein should meet “ideally” several prerequisite requirements: (i) presenting low non-specific binding to ligands, (ii) having pores large enough to ensure their accessibility to proteins embedded in their native or in biomimetic membrane and (iii) being easily modified for target immobilization. In high performance affinity chromatography, supports traditionally used in classical affinity chromatography for their low non-specific interaction level (i.e. agarose gels)²⁷⁻²⁹ have been progressively replaced by chromatographic supports with higher mechanical stability and efficiency (silica particles). When considering the application dealing with membrane proteins, macroporous silica particulate stationary

phase is the most popular stationary phase. Indeed, it combines pores large enough (usually 30 nm and up to 100 nm) to immobilize proteins embedded in their biomimetic membrane and a high specific area (ranging from 30 to 100 m²/g depending on the pore size) to ensure a high protein content after immobilization.

Besides these particulate supports, silica monolithic ones have also been considered¹⁷ for miniaturized columns. Their main key feature for miniaturization is their ability to be *in-situ* synthesized in miniaturized format, thus avoiding difficulties in filling capillary columns with protein-modified particles. Their high permeability leading to low back pressures and their rapid mass transfer properties are also of great interest. Although a bio-compatible sol-gel processing method to entrap membrane proteins has been developed by the group of Brennan¹⁷, most of the chromatographic support have to be functionalized with the target protein through immobilization processes.

3.1.3. *Immobilization of the membrane protein.* A crucial step toward a successful study of membrane protein-solute interactions is to achieve a functional immobilization of the membrane protein in/on the chromatographic supports. Indeed, binding interactions are strongly dependent on (i) a correct structural conformation and orientation of the target and (ii) full accessibility of the protein. The functional immobilization of membrane proteins is particularly challenging as it requires consideration on their surrounding assembly i.e. the components of their natural hydrophobic environment. Depending on the environment of the membrane protein (natural or biomimetic environment), several immobilization pathways (oriented or not) have been proposed such as entrapment, covalent immobilization and adsorption. The protein may be either directly tethered to the stationary phase or via its membrane or only sterically entrapped in the pores. Of important concern may also be the preparation time of the stationary phase containing membrane proteins. Whereas the covalent immobilization can require several days, rapid immobilization through adsorption²⁴ may require only a few hours which is a tremendous advantage for low-stability proteins.

Immobilization pathways that rely on covalent, adsorption or affinity coupling to solid supports can result in loss of protein activity that can be avoided by their entrapment¹⁷ in monoliths.

3.2. *Natural lipidic environment vs Biomimetic membranes*

The main challenge associated with the study of membrane proteins is related to the fact that they require a lipidic environment closed to their natural surroundings for optimal conformation and activity. Two main solutions have been proposed to study them in affinity chromatography: either in their natural lipidic environment, i.e. as whole cell or in cell membrane fragments (cell membrane chromatography) or in a

membrane-like environment (biomimetic membranes). Model membranes, that closely resemble the natural lipid bilayer have been developed to simplify cell membrane systems.

3.2.1. *Membrane proteins in their natural lipidic environment.* Earlier studies with MPs, because of the difficulties in purifying them, involved whole cells or cellular membrane fragments. The main advantage is that the proteins were studied in their native environment.

3.2.1.a) Whole cell: study of glucose Transporter Glut1

Immobilization of whole cells was achieved by adhering them to agarose gel beads pre-functionalized with wheat germ lectin³⁰. Wheat germ lectin binds to N-acetylglucosamine and N-acetylneuraminic acid on the extra-cellular side of red blood cell membranes. The transporter Glut 1 was indirectly immobilized by simply incubating cells overexpressing the receptor with gel beads. According to the authors, the advantage of this technique is that cells remain intact, in contrast to electrostatic adsorption that causes hemolysis. Another key feature of such an immobilization process is that protein purification is not needed. However, resulting stationary phases are sensitive to pressure change and chromatographic operation leads to the progressive leaching (detachment) of the cells inducing poor reproducibility.

That's why cellular membrane fragments have been mostly used as natural environments for affinity chromatographic studies.

3.2.1.b) Cellular membrane fragments: Cell membrane chromatography (CMC)

In cell membrane chromatography the MPs are immobilized in their native environment. The cells are first suspended in buffer and ruptured by means of ultrasounds. The resulting solution is first centrifuged at low speed to remove nuclei and then at high speed to yield cell membranes. These cell membranes are resuspended in buffer and then added to activate silica. According to He et al.³¹ phospholipids of cell membranes are able to fuse spontaneously with each one (self-fusion) on the silica surface until a cell membrane layer is obtained. The insertion/self-fusion mechanism for cell membrane immobilization on porous silica has been thoroughly studied in 2017 by Wand et al.³². According to them, the silanol groups of porous silica beads enables a strong and irreversible adsorption of cell membranes that are capable of inserting into the pores of the beads with an appropriate pore size. Thus, they form a stable multilayer membrane on the surface by self-fusion mechanism. The protein amount immobilized on silica particles increases from 0.025 mg/mL to 0.4 mg/mL with increasing feeding amount of cell membranes. A pore diameter of 17 nm appears optimal: pore size exclusion effects are observed with a 10 nm pore size whereas 30 nm pore size results in subsequent leaching of entrapped proteins.

Depending on the type of tissue used the life time of the columns varied in the range of one day to one week (in the consideration of enzymatic activity)³¹. In 2014, Ding et al.¹¹ proposed quality improvements of cell membrane chromatographic columns since their short lifespan and poor quality control was

previously highlighted. They first optimized the disruption conditions by an ultrasonic processor (5 controlled ultrasonic cycles). They also optimized the cell loading, a factor that can greatly affect the quality of CMC columns. Moreover, cell membranes coated on the stationary phase were for the first time tentatively fixed by paraformaldehyde (PFA) to stabilize the membranes adsorbed on silica. Column quality improvement and life time extension was observed due to the crosslinks established by PFA. However, despite the improvement brought by PFA, an exponential decrease of retention time was still observed due to cell membrane falling-off and activity loss of protein.

More recently and in order to circumvent drawbacks (low reproducibility and short lifespan) associated to decay and fall off of membranes from CMC columns the same group¹⁵ has proposed the covalent attachment of the membranes cells on a modified APTES-decorated silica gel instead of their adsorption. The modification of APTES-decorated silica gel with glutaraldehyde yields surface aldehyde groups that react with amino groups from phospholipids on cell membranes. According to the authors, the life time of the columns was increased to more than 12 days, while the control group prepared according to the classical adsorption showed a sharp decline in the first three days. Moreover, the reproducibility of the columns was greatly improved within 10% (instead of 20% for the previous protocol).

In such systems, a reliable signal interpretation is unfortunately limited by the high level of non-specific binding arising from the environment around the target MPs. In order to differentiate between specific binding to the membrane protein of interest and non-specific binding to the other components of the cellular membranes, membranes from a cell line that does not express the MP of interest (MP(-) membranes) are usually used to create MP(-)-columns. The retention measured on the MP(+)column can be corrected by subtraction of the retention on the MP(-)-column²¹. Indeed the retention on the MP(+)column is the sum of specific interactions with the MP of interest and other specific and non-specific interactions arising from the other components of the cellular membrane. If such a background binding to the immobilized cell membranes is not a problem in displacement studies it is an obstacle to the direct determination of the K_d values. Although these systems allow to study the protein in its native environment, the immobilization itself (of membrane fragments) is random and relatively unstable.

Unfortunately, a large amount of cells is required for column preparation (typically $5 \cdot 10^7$). Open Tubular column (OTC-CMC) has been proposed to reduce the required amount but suffers from low capacity. To solve this problem, Zhang et al.²⁵ proposed the synthesis of porous layers at the capillary wall (PLOT column) by physical adsorption of cell membranes onto the inner surface of the PLOT column. They demonstrated that the PLOT column exhibits a higher cell membrane capacity than bare capillary (about 9 times higher) with a reduced consumption (about 460 times lower) when compared to CMC. However, these columns always suffered from short lifespan (e.g. 3 days) leading to a progressive decrease of

retention times consecutive to falling-off of cell membranes. A covalent immobilization was adapted from the work of Ding et al.^{11,15} by preparing a N-hydroxysuccinimide ester (NHS)-modified silica-based porous layer²⁶. The NHS ester groups easily reacted with amino groups of the cell membrane to form a stable covalent amide bonds. According to this immobilization way the column lifespan was significantly improved to more than 16 days.

At its earliest, specificity, sensitivity and selectivity of cell membrane chromatography was limited by the various receptors on the surface of the cell membranes but development of cell lines with high expression of specific receptors have greatly improved its performances in terms of uniformity, specificity and sensibility.

3.2.1.c) Solubilized cell membrane (fragments) immobilized on Immobilized Artificial Membranes (IAM): Cell Membrane Affinity Chromatography (CMAC).

IAM stationary phases were initially developed by Pidgeon et al.²⁷ to study the diffusion of small compounds across membranes. The IAM supports are silica particles (12 µm particles with 30 nm pores) covered by a covalently coupled monolayer of phospholipid analogues terminating by functional head groups. The specific feature of IAM particles is the hydrophobicity of the monolayers that allows immobilization of membrane proteins. The preparation of cell membrane affinity columns (CMAC) has been reviewed in details by Moaddel et al.^{33,34}. The cell line or tissue is first homogenized, centrifuged at low speed to remove nuclei and then at higher speed to yield the cellular membranes which are then solubilized with a mild detergent. IAM particles are then suspended in the MP solution (components of the cellular membranes in detergent) and the suspension is dialyzed against solvent. Dialysis of the mixture of the receptor containing buffer and IAM support removes the detergent and forces the receptor into the support³⁵, resulting in the adsorption of the transmembrane proteins onto the surface of the IAM. In some cases (immobilization of GPCRs for example), the addition of lipids (phosphatidylcholine) to the solution containing the solubilized receptor is necessary (to maintain the protein integrity) before the addition of the IAM stationary phase and the initiation of the dialysis⁹. The immobilization itself takes a few hours, followed by several dialysis steps (one day each). After dialysis, the IAM support containing the immobilized MP is collected before filling the chromatographic column

The amount of immobilized proteins can be evaluated after protein extraction from immobilized beads⁹: the proteins stripped from the stationary phase can be quantified by bicinchoninic acid (BCA) protein assay. However, such a protein content represents the total amount of protein immobilized and not the amount active receptor.

The immobilization of solubilized tissues/cell lines may result in the co-immobilization of several receptors³⁶ that can be characterized in tandem. This has been reviewed by Singh et al.³⁷. In order to

differentiate between specific binding to the receptor and non-specific binding to the other solubilized components of the cellular membrane and/or to the IAM support, membranes from a cell line that does not express the receptor are usually used to create a MP(-)-IAM stationary phase. Only the differences in the retention on the MP(+)-IAM column relative to the MP(-)-IAM one account for specific interactions with the target. Usually all experiments are carried out in parallel on the two columns.

This immobilization pathway has been first described by Wainer for the immobilization of Nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) that are ligand-gated ion channels³⁵. According to the authors, the resulting CMAC allow ranking of the affinity ligands although the K_d values determined by affinity chromatography were consistently lower than the corresponding affinities determined using cell membranes homogenates. The concentration of binding sites (quantified by frontal analysis) was low (about 10 pmol.mL⁻¹ of column bed) but high enough to detect affinity in the μ M-nM range. In the following period the same group published several articles based on this immobilization technology^{9,21,38}. For the first time, they immobilized members of the superfamily of G protein-coupled receptors (partially purified Opioid receptors), on IAM⁹ stationary phase and demonstrated that the immobilized receptors (about 200 pmol.mL⁻¹) retained their ability to specifically bind known opioid ligands and that this stationary phase can be used to qualitatively assess the binding affinity of compounds. The huge difference between the total amount of immobilized protein content and the active amount one (30-fold difference) clearly showed that only the number of active sites determined by frontal affinity chromatography and not the amount of immobilized amount of protein (estimated by BCA) is a relevant parameter for the optimization of the stationary phase. However, there was a discrepancy (55-fold difference) between the K_d value determined by the chromatographic approach (110 nM) and the apparent functional inhibition constant (2 nM). According to the authors, this quantitative difference may reflect an artifact of the chromatographic approach: the immobilization of a receptor onto a solid support may alter the K_d value through the restriction of the conformational freedom of the receptor and/or the alteration of the association/dissociation kinetics of the receptor-ligand complex. Concerning the stability of the support, experiments conducted with known agonist and antagonist (with affinity in the nM range) indicated that the immobilized receptors retained their activity for 1200 column volumes over two weeks. In 2004, the same group³⁸ immobilized neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) and realized single displacement experiments for a rapid on-line screening of compounds for their relative affinities for the receptor. IAM stationary phases were also used by Temporini et al.³⁹ to prepare GPR17-IAM stationary phases. They optimized the stationary phase (by increasing the membrane/IAM ratio) in order to decrease the relative contribution of the non-specific interaction resulting from strong lipophilic interactions between the analytes and the IAM backbone. The full characterization of the stationary phase with known ligands has shown that the receptor retains its ability to bind them (consistency of the calculated K_d values

with previously reported data) and that ranking experiments can be carried out with this methodology. In 2010, they demonstrated that the use of this stationary phase may be extended to screening experiments⁵. A few years later, the same group²⁰ applied this strategy to immobilize the adenosine A_{2A} receptor (AA_{2A}R). Despite the low specific interaction with the receptor, immobilized AA_{2A}Rs retained their ability to specifically bind known ligands. The optimization of the chromatographic conditions (suppression of any amount of organic solvent, drastic reduction of the flow rate) allowed increasing the specific binding from 6% to 23% and the total binding capacity of a two-fold factor). Ligands of high affinity (K_d in the nM range) were used to further characterize the support by FAC in the classic or staircase approach. Owing to the low amount of available binding sites (only 1.6 pmol per column 100mm x 6.6mm i.d.), discrimination of a high number of competing ligands infused in mixture was not possible.

When non-specific interactions with the IAM stationary phase are greater than the specific ones (especially for lipophilic compounds)^{21,22}, an alternative approach is to directly immobilize the homogenized cell lines or tissues on the surface of silica capillaries to create a CMAC in open tubular columns (OTC). The cell membranes were immobilized by NHS ester coupling. Briefly, the bare silica is first silanized with an aminosilane allowing grafting of streptavidin using glutaraldehyde as coupling reagent. Finally, a NHS linked biotin cross-linker (biotin-X reagent) is then immobilized onto the streptavidin functionalized OTC. This reagent is used as a spacer arm of ~ 22 Å and aims at reducing the steric hindrance and it penetrates cell membranes because there is no charged group. The reactive NHS ester groups are used to covalently immobilized cell membranes through formation of stable amide bonds with amine groups of the MPs or phospholipids of the cell membranes. With AA_{2A} receptor the AA_{2A}(+)-OTC was able to discriminate ligands accordingly to receptor affinity and not only to hydrophobicity as observed with IAM column²⁰. Several transmembrane proteins have been immobilized in this open tubular format including GPCRs^{21,22,40-42}. With the Pgp transporter, the experimental run time was reduced more than 90 % when compared with the IAM format²¹. This approach was also used by Habicht et al.¹⁹ to immobilize mitochondrial membrane fragments for the characterization of translocator protein (TSPO) and sulfonylurea and mitochondrial permeability transition pore receptors (mPTP).

3.2.2. Biomimetic membranes. Recent advances in the development of native membrane mimics have opened new perspectives for bio-affinity chromatography. Although a great diversity of biomimetic membranes has been proposed to reconstitute membrane proteins only few of them have been used in affinity chromatography: proteoliposomes, lipodisks and more recently nanodiscs.

3.2.2.a) Proteoliposomes

Proteoliposomes are the first bio-mimetic membranes reported for quantitative interaction studies between solutes and integral membrane proteins²⁷ by Lundahl in 1995 (Immobilized Proteoliposomes

affinity Chromatography IPAC). Liposomes consist of a self-closed lipid bilayer. The group of Lundahl developed several methods for steric immobilization (non-covalent) during the formation or enlargement of proteoliposomes inside gel beads pores. The steric immobilization was done by freeze-thawing in small and rigid gel beads (superdex 200HRbeads). Indeed, it has been reported that freeze-thawing can cause proteoliposomes to fuse together and form larger particles that can be sterically trapped with thawing in the presence of gel beads. The authors demonstrated that the long-term stability of the IPAC gel beds (embedding the glucose transporter-1 (Glut1)) depended on the type of proteoliposomes *viz* the type of the phospholipids used for the reconstitution. For example, the loss of protein ranges from 16% for egg phospholipids (EPL) to 75% for egg phosphatidylcholine (EPC)²⁷. The good stability of the reconstituted Glut1 protein activity in the immobilized proteoliposomes as well as the high affinities of glucose demonstrated that the mixtures of phospholipids constitutes a favorable environment. However, the low concentration of membrane protein in the gel bed (1-8 µM), limits their use to the study of relatively strong affinities $K_d > 0.1\mu M$. One year later, they used the same strategy to prepare proteoliposomes with purified and non-purified Glut1 protein and to compare them with red cell membrane vesicles²⁸. They demonstrated that non-specific interactions of cytochalasin B (transport inhibitor of Glut1 protein) were higher on proteoliposomes than on cell-membrane vesicles due to the higher lipid concentration in the proteoliposome gel bed. Moreover, the affinity of Glut1 protein immobilized in membranes vesicle for glucose was significantly higher and more resistant against inactivation than in reconstituted systems (liposomes). Furthermore, the loss of activity associated with solubilization and reconstitution in proteoliposomes was avoided and high activity obtained even though only small amounts of membrane vesicles were immobilized. Despite the non-covalent immobilization way, the binding capacity remained constant over time (several weeks at room temperature). A few years later, The group of Miyake²⁹, proposed another immobilization pathway for proteoliposomes. Proteoliposomes were formed in the gel beads and outside them, by mixing detergent-solubilized biotinylated lipids and the membrane protein (RC) with streptavidin gels followed by dialysis to remove the detergents. The assistance of the streptavidin-biotin interaction leads to an increase in the amount of proteoliposomes immobilized when compared to entrapment alone and to a great increase of the stability. One possible issue with the reconstitution of membrane protein in proteoliposomes is the wrong orientation or accessibility of the receptor. For RC liposomes immobilized in avidin-superdex gel, around half of the immobilized proteins were available for interaction, which was explained by the authors by the random orientation of the receptor molecules in the liposome's membranes (only 50% exposed their binding sites on the outer surface of the liposomes). With liposomes, non-specific binding (mainly hydrophobic partitioning into the liposomes membranes) occurs²⁹.

Another possible issue with proteoliposomes is related to their wide distribution in size. So, the size of entrapped liposomes may be restricted by the size of the pores of the material. As the size of the liposomes has an influence on the orientation of the receptor (a liposomal size increase leads to an increase of the fraction of outwardly oriented receptor) the chromatographic support pore size plays an indirect role in activity. As an example, Miyake²⁹ demonstrated that larger pores favor the formation of proteoliposomes of larger size and thereby affect the receptor orientation.

More recently, proteoliposomes were prepared directly from cell membranes to serve as stationary phase in a microfluidic flow cell²⁴ (Figure 3). The gold coating of the plastic surfaces allows proteoliposomes to be non-covalently immobilized (1 h incubation by electrostatic, hydrophobic and covalent interactions, leaving a sandwich structure of proteoliposomes (no fusion to form bilayers on the substrates as previously reported). The main advantage of this immobilization pathway is its rapidity when compared to previously reported grafting thus preventing stability issues. The total binding capacity of this Open Tubular Columns (OTC) was estimated to about 0.075 pmol. Owing to the low amount of binding sites available, such a system was nevertheless limited to the study of relatively strong affinities (low μM to nM) but offer several benefits including reduction in ligand and protein consumption, minimization of the set-up time which can be of importance especially when the stability of the membrane protein target is a concern.

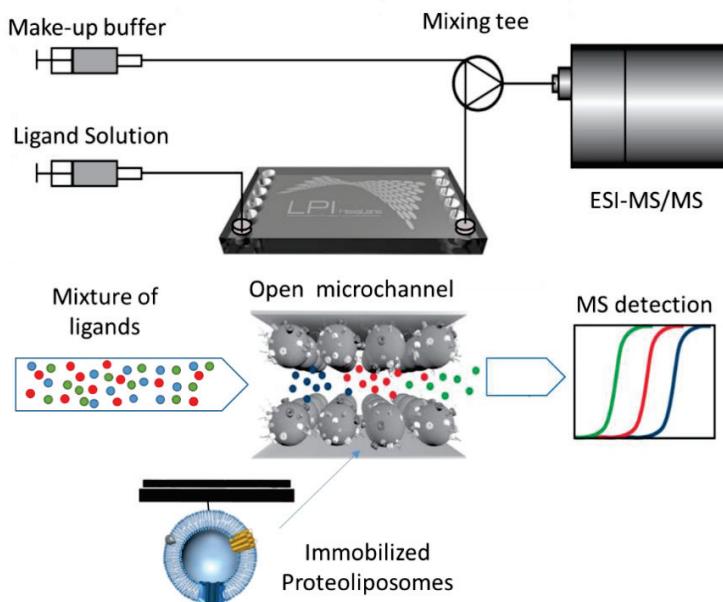


Figure 3. Schematic of the setup for the flow of ligands across the microfluidic flow cell which is mixed with a make-up buffer, prior entry into the ESI-MS/MS system. A cut-through view shows the sandwich structure with immobilized proteoliposomes at the bottom and top of the microchannel and the subsequent MS signal from the ligands where green (weak) ligands elute first and blue (strong) ligands elute last (adapted from ref²²).

A very recent study⁴³, proposes the covalent immobilization of proteoliposomes onto silica particles in only 2 hours. VDAC-1 protein (Voltage Dependent Anion Channel isoform 1) incorporated into liposome was covalently immobilized onto silica gel surface using phospholipid monolayer that was formed by lecithin.

3.2.2.b) Lipodisks

More recently, Duong-Thi et al. have demonstrated that lipodisks may be a reliable membrane biomimetic environment for the study of integral membrane proteins¹⁶. Lipodisks are composed of a circular planar lipid bilayer and can be prepared with a wide range of composition and size distributions. This lipid bilayer is stabilized by PEGylated lipids (lipids modified with a polyethylene glycol head group) that accumulate preferentially at the rim of the disks. Both sides (intra and extra-cellular) of the lipodisk-embedded membrane proteins are exposed to the bulk solution so that the active site is always exposed to the surrounding media. Such proteolipodisks have been covalently immobilized by reductive amination chemistry on diol-derivatized macroporous silica particles (10 µm in diameter and 210 nm pore size). According to the authors, the protein found in the silica material is mainly indirectly immobilized (i.e. via the lipodisk) and directly bound reconstituted proteins are in the minority. The main drawback of this immobilization pathway should be the long immobilization duration that should be not compatible with protein with a lower stability than the aquaporin investigated in this work.

3.2.2.c) Nanodiscs

Very recently, nanodiscs have been used to study membrane proteins / ligand interactions by affinity chromatography. Nanodiscs are steadily gaining more recognition as a tool for investigating membrane proteins. Access to both intra- and extracellular parts of membrane protein gives this model great advantage over commonly used liposomes and homogeneity of sample and absence of big quantities of detergent make this model more preferable than another membrane models⁴⁴. The nanodisc is a self-assembly of phospholipids and a membrane scaffold protein (MSP) derived from human serum apolipoprotein A1. The phospholipids associate as a bilayer domain while the membrane scaffold protein wraps around the edges of the discoidal structure in a belt-like configuration. Nanodiscs allows keeping the membrane proteins stable and soluble in aqueous solution in a monodisperse, detergent free and native-like phospholipid bilayer environment. Nanodiscs were immobilized onto streptavidin-monoliths via the biotinylated MSP. The immobilization was performed dynamically, by simply flowing through the column a few microliters of a dilute solution of nanodisc-embedded Adenosine A_{2A} Receptor (AA_{2A}R) (µM range). The immobilization step was monitored using in-situ UV detection to quantify the total amount of nanodiscs captured. The main advantage of such an immobilization is that it is quite instantaneous (the capture of biotinylated nanodiscs takes about 10 to 20 minutes depending on their concentration) thus

avoiding any stability issues. This immobilization strategy has been proposed for the first time in 2019 with AA_{2AR} as model membrane protein.

4. Bioaffinity, what for?

Membrane protein affinity chromatography is suited for use in several stages of drug discovery. It can be used for characterizing affinity (K_d determination, nature of the interactions between the ligand and the target) of known ligands with specific receptors, to rank compounds according to their relative affinity for the target and to screen either library of synthetic compounds or natural extracts for new ligands.

4.1. Characterizing binding characteristics of the immobilized receptors.

Membrane protein-based stationary phases have been initially used to study the binding characteristics of the immobilized membrane proteins. For example, Moaddel et al. have demonstrated the ability of cell membrane affinity chromatography to identify and characterize non-competitive inhibitors that bind other classes of binding sites than the primary binding sites for agonists and competitive antagonists. Later, they have reported other results with different immobilized subtypes of the neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChR)⁴¹. These results demonstrate that the immobilized nAChR undergoes agonist-induced conformational changes manifested by a change in receptor affinity towards the non-competitive inhibitors.

Wei et al.¹² studied the interaction of several alkaloids binding to $\alpha_{1A}AR$ (determination of K_d values) and demonstrated that electrostatic interactions are the main intermolecular forces between them and $\alpha_{1A}AR$.

4.2. Ranking compound according to their EC₅₀ values.

In view of the finding that binding affinity K_d values do not necessarily reflect functional properties such as EC₅₀ values (defined as the concentration of a ligand required to obtain 50% of the maximal elicited response) the group of Wainer³⁸ explored the possibility of the on-line determination of EC₅₀ values using chromatographic data in order to produce a rapid and inexpensive assay which can be automated. In their approach, a single chromatographic experiment (a single displacement experiment) was carried out with columns containing immobilized nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). This single chromatographic experiment was used to sort a series of conformationally constrained compounds based upon their ability to reduce the chromatographic retention of epibatidine (EB) relative to the reductions produced by a strong (nicotine) and a weak (carbachol) AChR agonist. They have demonstrated that their approach can be used to qualitatively rank compounds according to their EC₅₀ values and that the approach is able to identify subtype specific activities with a success rate exceeding 80%.

Moreover, this method allowed a huge reduction of the experimental duration when compared with functional studies: each experimental run took about two hours in contrast to functional studies which took one week for three compounds.

4.3. From ligand ranking (*synthetic compounds of medium to high affinity*) ...

In 2004, Moaddel et al.²¹ studied a small cohort of 6 compounds containing high affinity and moderate-low affinity substrates of P-glycoprotein immobilized on the inner surface of an open silica capillary column (OTC). Their results demonstrated that the test compounds could be accurately sorted into, high, moderate-low and non-substrates categories provided that the retention on the affinity column was corrected by subtraction of the reference column. They estimated that their approach permits one to rank up to 200 compounds per week and that a column, active for between 3 and 4 weeks, could be used to screen a minimum of 800 compounds. In order to avoid the parallel screening on a reference column (for retention correction) they later demonstrated²² that a single displacement study (that measures the change in retention volume between a marker alone and the same marker in the presence of a displacer) could be used to determine whether a compound had affinity for the target i.e. is a ligand or not. They also demonstrated that such a screen can be carried out with single as well as mixtures of compounds: they screened 11 newly synthesized compounds (in the nM affinity range) for cannabinoid receptors CB1 and CB2.

In 2010, Calleri et al.⁵ proposed the first screening of a small library of ligands (18 compounds in two series) by CMAC with an IAM stationary phase embedding GPR17, a GPCR playing a crucial role in the development of ischemic brain damage and in the later repair process. Screening was conducted with displacement studies in FAC-MS as it avoids running experiments in parallel on a reference column. This approach allowed a rapid and accurate ranking of the compounds (known or potent agonists and antagonists), the chromatographic data being validated using a reference functional assay. The chromatographic data allowed the drawing of preliminary structure-activity relationship. The method also allowed to explore the binding mode of the nucleotide site of the receptor by extending this approach to an artificial GPR17 receptor bearing a mutation in a key amino acid for ligand recognition. Comparison of the chromatographic behavior of the nucleotide derivatives together with in-silico studies was used to gain insight into the structure requirement of GPR17 ligands. With the GPCR A_{2A}, the ranking experiment (differentiation between low-, medium- and high-affinity compounds) was only successful on the OTC capillary due to the too high non-specific interaction level with the IAM support.

A study was also carried out to determine whether cell membrane chromatography can be used to reflect the selectivity and specificity of interactions between drugs and muscarinic acetylcholine receptor

(mAChR)⁴⁵. The retention factor measured in zonal affinity chromatography was used to characterize the interaction. The rank orders obtained by chromatography measurements were consistent with results from radioligand-receptor binding assays. Although, the equilibrium dissociation constant could not be directly calculated by chromatographic measurements, linear regression analysis revealed correlation between both data sets (with and without atropine as competitor).

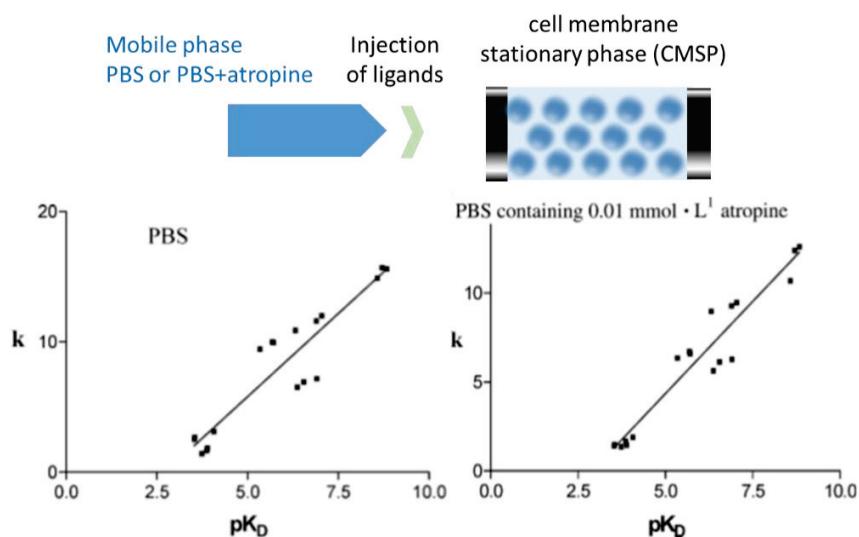


Figure 4. Relationship between retention factor (k) and the negative logarithm of equilibrium dissociation constant (pK_d) for PBS and PBS containing $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ atropine as mobile phase (adapted from ref⁴¹).

4.4. ...to fragment screening (small compounds of weak affinity)

Fragment screening is a strategy used in drug discovery to single out hits from a collection of organic compounds of low molecular weight and weak binding affinity for the target. Despite the promise held by this approach in drug discovery, the first example of fragment screening by weak affinity chromatography with membrane proteins was reported by Duong-Thi in 2016¹⁶. Aquaporin-1 was reconstituted in lipodisks (proteolipodisks) covalently immobilized to silica particles (Figure 5). 200 compounds arbitrarily selected from a fragment library were selected and screened by sets of 10-compounds mixtures. The authors limited the hits to compounds that bound significantly more to the AQP1-lipodisk column than to the control-lipodisk column (empty lipodisk), thus eliminating the risk of false positives. Using this approach only one compound in the collection was identified as a hit. Indeed, considering the low amount of protein in the lipodisk column, only compounds with K_d values in the low μM range were detected.

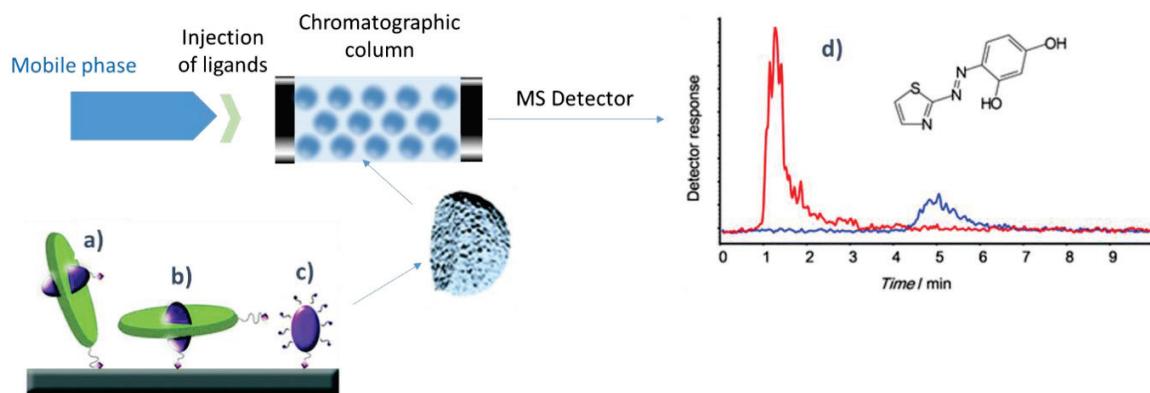


Figure 5. Schematic representation of the fragment screening on AQP1 lipodisks immobilized columns coupled to mass spectra detection. Representation of the possible forms in which AQP1 (represented as ovals) can be immobilized onto the silica material. Amine moieties are shown as squares: (a) indirectly bound (solely via the lipodisks), (b) directly bound reconstituted protein, and (c) directly bound “bare” protein (surrounded by detergent molecules). (d) Extracted-ion chromatograms of ST013868 on AQP1-lipodisk column (blue) and on control-lipodisk column (red) (adapted from ref¹⁶).

4.5. Determination of drug-protein parameters⁴³

Frontal affinity chromatography is by far the most used mode to characterize ligand-receptor interaction as it allows to determine the dissociation constant and the amount of active target on the support in a single experiment. The higher the amount of active immobilized target per volume unit (B_{act}/V_m), the higher the dissociation constant K_d that can be determined. As illustrated in Table 1, the accessible affinity range varies with the immobilization mode and with the type of column used. Filled columns (particulates or monolithic) present a higher amount of active immobilized target per volume unit than OTC or PLOT columns but at the expense of non-specific interactions. For small molecule-receptor interactions of weaker binders (K_d in the medium to high μM range) a competitive assay approach may be advantageously employed⁴⁶. A strong binder (acting as an indicator) is first applied and equilibrated in a classical FAC experiment before injecting a plug of a weaker test binder resulting in a spike of the indicator binder signal.

The group of Zheng (2017)⁴³ has developed a comparative assay of chromatographic methods including frontal analysis, zonal elution, injection dependent analysis and non-linear chromatography to investigate the bindings of three ligands (ATP, NADH and NADPH) to the voltage dependent anion channel isoform1 (VDAC-1) immobilized on silica particles modified with lecithin. They have demonstrated that the K_d values showed highly consistent among the data by diverse methods and were in excellent agreement with previously reported values. Compared with frontal analysis and zonal elution, injection amount analysis and non-linear chromatography displayed, according to the authors, clear superiorities of time- and ligand-saving. To understand the binding mechanism, Van't Hoff equation and Gibbs Helmholtz equation were

used to derive thermodynamic data. The negative sign of the enthalpy variation and the positive values of entropic variation revealed the binding occurred via electrostatic interactions.

Other groups have also used affinity chromatography to study thermodynamics of protein/ligand interactions. For example the group of Wainer⁴⁷ have analyzed the effect of temperature on chromatographic retention (Van't Hoff plots) to determine the thermodynamics of the NCI (non-competitive inhibitors)-nAChR interaction. The enthalpic changes ΔH° associated with the formation of the two partners were the major contributors to the ΔG° values. In a more recent study, the same group examined the thermodynamics of the same NCI-nAChR interactions with the extent of the enantioselective separation of two enantiomers i.e. the enantioselectivity factor. Indeed, this enantioselectivity factor (measured before and after the exposure to a competitor) can be used to determine the relative changes in ΔG° produced by the exposure of the immobilized receptor to a competitor.

4.6. ADME studies

Affinity chromatography experiments conducted on an immobilized P-glycoprotein (Pgp) column have been used in the Adsorption, Distribution, Metabolism and Excretion stage of the study. Indeed, Moaddel et al.²³ have compared chromatographic results obtained on a P-glycoprotein column with Caco-2 cell permeability, an assay developed to measure drug absorption. They have demonstrated that Pgp columns can be used in addition or in place of the Caco-2 assay as screen for Pgp substrates and non-substrates. A single pair of columns (with and without P-glycoprotein) can be used to screen at least 150 compounds a week and 600 compounds during the 4-week life time of the column. The Δt value (difference in retention time) between the Pgp(+) and Pgp(-) column allows ranking relative Pgp binding and net functional transport. According to the authors the interpretation of the results is more direct insofar as the chromatographic method isolates specific interactions between the test compounds and Pgp.

4.7. Identification of active components from natural extracts.

Natural products can be a source of new drug discovery but the identification of active components from natural extracts may be difficult, time consuming and costly. Analytical techniques such as cellular membrane affinity chromatography or cell membrane chromatography can be a valuable alternative for bioassay-guided fractionation approaches.

Several articles review recent advances in cell membrane chromatography or cell membrane affinity chromatography for traditional Chinese medicine analysis⁴⁸ and compare them with other established techniques⁴⁹.

Li et al.⁴³ selected *Rheum officinale* baill to screen bioactive compounds specifically binding VDAC-1. Through combination with mass spectrometry they were able to simultaneously screen and identify bioactive compounds from this complex matrix.

CMC was also used to isolate components interacting with vascular smooth muscle cell membranes immobilized on silica¹⁰. The retained fractions were collected and analyzed by GC-MS in an off-line coupling for the recognition, separation and identification of active components from traditional Chinese medicines. The authors combined the results with a pharmacological verification assay to demonstrate that it is an efficient way for fast screening of interacting components from complex samples

However, the low peak efficiency in affinity chromatography results in low peak capacity. In other words, affinity chromatography cannot resolve satisfactorily mixtures of compounds, thus leading to an inefficient structure identification which is a real bottleneck. Coupling affinity chromatography with liquid chromatography in a two-dimensional on-line set-up with a high sensitivity detector such as mass spectrometry may alleviate the aforementioned drawbacks. Muhammad et al.⁵⁰ propose an overview of these on-line two dimensional liquid chromatographic set-up based on cell membrane chromatography for screening target components from traditional Chinese Medicines.

As an example, 2D-CMC-LC-MS¹⁴ was proposed to screen compounds from total alkaloid of *Radix Caulophylli* (a kind of traditional medicine herb) on the human RGFR, a transmembrane phosphoglycoprotein considered as a primary target for antitumor treatment strategies.

The same group explored the same coupling for the identification of the active components of the same traditional herb medicine *Radix Caulophylli* on the human α_{1A} AR¹⁴. The α_{1A} AR -CMC-According to competitive displacement studies, two molecules were identified as active ones.

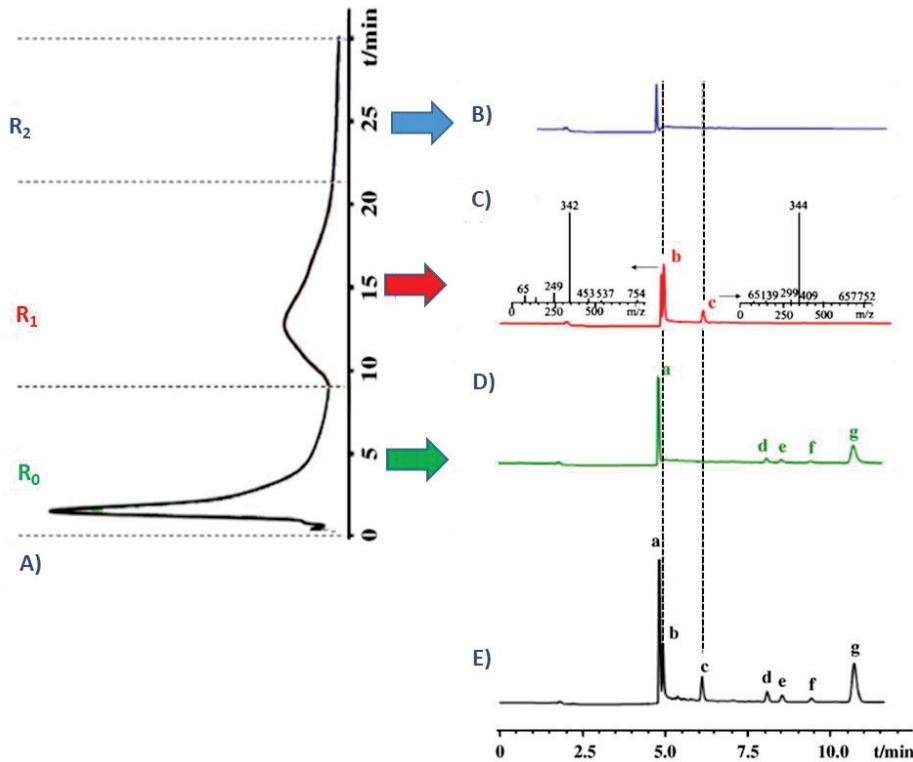


Figure 6. Chromatograms of total alkaloids of *Raix Caulophylli* using the $\alpha_{1A}AR$ -CMC-online-HPLC/MS method. (A) $\alpha_{1A}AR$ -CMC chromatogram of total alkaloids. (B) HPLC/MS chromatograms of the fractions R_0 captured into the loops. (C) HPLC/MS chromatograms of the fractions R_1 . (D) HPLC/MS chromatograms of the fractions R_2 . (E) HPLC/MS chromatograms of the fractions the mixed standards solution (adapted from ref¹⁰).

In a recent study⁵¹, another comprehensive two-dimensional (2D) chromatography approach was established for screening anti-tumor components from herbal medicines (HMs) (Figure 6). HepG2/CMC model was applied as the first dimensional column. Using an automatic ten-port switching valve equipped with two sample loops, the fractions of the first dimension were introduced in the second dimension (reversed phase monolithic column) and the detection achieved with a TOF-MS system. Berberine (BBR) and tetrahydropalmatine (THP) from *Cortex phellodendri amurensis*, oxymatrine and matrine from *Radix sophorae flavescentis* were screened and identified as potential active components. The proposed system has the advantages of strong recognition and rapid analysis abilities for a total screening procedure.

5. Conclusion

Affinity chromatography using immobilized membrane protein as receptors become an important tool in the arsenal of techniques available to (bio)analytical scientists. Immobilization of membrane proteins in native-like environment allows deciphering binding events and characterizing interaction parameters (like K_d values, thermodynamics binding parameters). Keeping the membrane proteins in active form is of course the main objective of the column elaboration and methods development. This is strongly dependent to phospholipids surrounding the protein. In order to limit non-specific interactions coming from the chromatographic support or interaction of ligands with phospholipids, different formats of column elaboration have been detailed. The power of chromatography methods compared to other biophysical methods concerns the great potential of screening. This is useful for identifying specific compounds from complex matrix as in the identification of active components from natural extracts, or for the screening of libraries of fragment at the basis of the fragment-based drug design.

ABBREVIATIONS

AA _{2A} R	Adenosine A _{2A} receptor
ADME	Adsorption, Distribution, Metabolism and Excretion
APTES	Aminopropyltriethoxysilane
ATP	Adenosine triphosphate
BCA	Bicinchoninic acid
BBR	Berberine
B _{act}	Active binding sites
CMC	Cell membrane chromatography
CMAC	Cell membrane affinity chromatography
EPC	Egg phosphatidylcholine
EPL	Egg phospholipids
FAC	Frontal affinity chromatography
Glut1	Glucose Transporter 1
GPCRs	G protein-coupled receptors
IAM	Immobilized artificial membranes
ITC	IsoThermalCalorimetry

K _a	Affinity constant
K _d	Dissociation constant
mAChR	musacarinic acetylcholine receptor
MSP	membrane scaffold protein
nAChR	Nicotinic acetylcholine receptors
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NHS	N-hydroxysuccinimide
NMR	Magnetic Nuclear Resonance
MP	Membranes proteins
mPTP	Transition pore receptors
OTC	Open tubular columns
PFA	Paraformaldehyde
Pgp	P-glycoprotein
PLOT	Porous Layer Open tubular
SPR	Surface Plasmon Resonance
THP	Tetrahydropalmatine
TSPO	Translocator protein
VDAC-1 protein	Voltage Dependent anion channel isoform 1)
ZAC	Zonal Affinity Chromatography

Table 1: Summary of literature use of affinity chromatography to study membrane proteins

REF	RECEPTOR	SUPPORT	GRAFTING	ANALYSIS MODE	INFORMATIONS	K _d RANGE	B _{tot} , B _{act}
whole cell							
30	Glut1 in human red cells	lectin-gel beads	adsorption	FAC	K _d determination	12 nM and 59 nM	0.46 CB binding sites/Glut1 monomer
cell membrane fragments CMC							
10	L-calcium channel receptors	silica gel	adsorption and self-fusion	ZAC coupled off-line with GC-TOF-MS	active components from TCMs	nd	nd
11	human hepatoma cell line and hepatic stellate cell line	silica gel	adsorption and self-fusion and tentatively fixation with paraformaldehyde	ZAC	optimization of the preparation of CMC columns (membrane cell preparation and membrane cell loading)	nd	about 300 µg /0,04 g silica
12	α _{1A} AR (GPCR) from overexpressed HEK293 α1A h cell line	silica gel	adsorption and self-fusion	FAC, ZAC and stoichiometric displacement mode	K _d determination	low µM range	a few nmol/column (V _m =30 µL)
13	AR adrenergic receptors (GPCR): α-AR and β-AR subtypes purified	macropores silica gel d _p =7 µm and d _{pores} =300 Å	covalent grafting on carbonyldiimidazole modified silica	FAC	comparison with radio binding assay	10 to 600 µM	100-500 nmol/L
14	α _{1A} AR	silica gel	adsorption and self-fusion	ZAC (displacement)	screening of active components from Radix Caulophylli (TCM) and determination of K _d	1-100 µM	nd
15	epidermal growth factor (EGFR) from HepG2 cancer stem cell	silica gel	covalent grafting of membranes fragments onto silica modified particles	ZAC and on-line coupling with RPLC-MS	identification of active components from Salvia miltorrhiza	nd	nd
17	nAChR nicotinic acetylcholine receptor	silica monoliths	encapsulation during monolith synthesis (steric entrapment)	FAC	K _d determination	3,4 nM	B _{act} = 100 fmol/µL
21	P-glycoprotein	silica capillary walls chemically modified	adsorption after dialysis	FAC (displacement)	K _d determination	97nM et 12,1µM	3 nmol /column (V _m =2 µL)
23	P-glycoprotein	NHS-modified silica capillary walls (OTC)	covalent grafting	FAC	Comparison of chromatographic results with Caco-2 permeability	nd	nd
25	L-calcium channel from rabbit red blood	silica PLOT column	adsorption and self-fusion	ZAC	comparison of the protein consumption between PLOT/OTC/filled columns	nd	cellular membrane consumption 460 times lower than with packed column
31	red blood cell membranes from rabbit	silica gel	adsorption and self-fusion	ZAC	correlation between retention and pharmaceutical action	nd	20 mg/g
32	multiple receptors from vascular smooth muscle cells	silica gel	adsorption and self-fusion	ZAC	influence of the pore size of the stationary phase	nd	up to 0,15 mg/mg
45	muscarinic acetylcholine receptor mAChR from rat's brain tissue	silica gel	adsorption and self-fusion	ZAC	correlation with radio-binding experiments	nM-100 µM	nd
52	AR adrenergic receptors: α-AR and β-AR subtypes	macroporous silica gel	covalent grafting on carbonyldiimidazole modified silica	FAC	distinction between the selective binding abilities of α1- and β2-AR	40 à 900 µM	100-500 nmol/L
53	epidermal growth factor (EGFR) from A431	silica gel	adsorption and self-fusion	ZAC and one-line LC-MS coupling	active components from Radix Caulophylli	1-100 µM	nd

REF	RECEPTOR	SUPPORT	GRAFTING	ANALYSIS MODE	INFORMATIONS	K _d RANGE	B _{tot} , B _{act}
IAM: CMAC							
5	GPR17 (wild type receptor and artificial mutated receptor)	IAM	entrapment/adsorption on IAM after dialysis	FAC	screening of a small library-validation with bio-assay	nd	nd
9	μ and κ opioid receptors	IAM	entrapment/adsorption on IAM after dialysis	FAC and ZAC (displacement)		110 nM and 84 nM	B _{act} = 100 pmol/column (V _m =280 μL)
19	translocator protein (TSPO); mitochondrial permeability transition pore receptor (mPTP); sulfonylurea receptor (SUR) from of U-87 MG and HEK-293 cells	IAM and silica capillary walls (OTC)	entrapment/adsorption on IAM after dialysis	FAC (displacement)	investigation of non-specific interactions	low nM to low μM	200 times less on OTC than on IAM
20	A ₂ AAR	IAM and silica capillary walls modified (OTC)	entrapment/adsorption on IAM or modified silica after dialysis	FAC (staircase)	screening of a small library-validation with bio-assay	nM	B _{tot} =2 pmol/column (V _m =3 μL)
22	CB1R/CB2R (cannabinoid receptors) of a chronic myelogenous leukemia cell line KU-812	silica capillary walls (OTC)	covalent grafting	FAC (displacement)	K _d determination, chemical library screening (11 compounds simultaneously) or botanical extracts screening	0,7- 5200nM	B _{tot} =0,1-3 pmol (CB2) and 8-20 pmol (CB1)/column (V _m =2 μL)
38	nicotinic acetyl choline receptors nAChR (ion channels, α3β4 α4β2 subtypes)	IAM and silica capillary walls (OTC)	entrapment/adsorption on IAM after dialysis	FAC (displacement)	agonist ranking, correlation between EC50 and K _d values	μM range	B _{act} = 346 fmol/column (V _m =2 μL)
39	GPR17 (P2Y-like receptor) from 1321N1cells (transfected or not)	IAM	entrapment/adsorption on IAM after dialysis	FAC	K _d determination (2 antagonists and 1 agonist); preliminary ranking experiments; optimization of amount of membrane cells	1nM à 1μM	0,8 to 9 nmol/column (V _m =2,7 mL)
40	purinergic receptor P2Y1	IAM	entrapment/adsorption on IAM after dialysis	FAC (displacement)	determination of K _d	200nM	B _{act} = 90 nmol/L
41	nicotinic acetyl choline receptors nAChR subtypes	IAM	entrapment/adsorption on IAM after dialysis	FAC (displacement) for agonists and ZAC of non-competitive inhibitors (NCIs)	determination of K _d ; determination of enthalpic changes associated with NCI-nChR complex	0,001 nM to 100 nM	from 5 to 350 fmol / column (V _m =2,3 mL)
proteoliposomes							
24	Pheromone alpha factor receptor (Ste2)	microfluidic device: LPI Hexaline flow cell (Au surface)	electrostatic, hydrophobic interactions and covalent linking (patented)	FAC	fragment ranking	fragment ranking μM-nM	0,075 pmol/device
27	glucose transporter Glut1	rigid gel beads (Superdex 200HR)	steric entrapment thawing/freeze	ZAC self-competition	weak competing interaction of D glucose revealed by competitive elution	0,15 μM and 67mM	1-8 μmol/L (appropriate for strong activity)
28	Human Red Cell transporter (Glut1) purified or not	gel beads: superdex 200; sephadex G-50	steric entrapment thawing/freeze	FAC and ZAC: comparison	K _d determination, influence of ionic strength on the affinity	nM - mM	B _{act} = 3,6 nmol for vesicles 1,4 nmol for liposomes /column (i.e/800 μL)

REF	RECEPTOR	SUPPORT	GRAFTING	ANALYSIS MODE	INFORMATIONS	K _d RANGE	B _{tot} , B _{act}
29	Photosynthetic Reaction center RC from rhodobacter sphaeroides	sephacryl S-1000 gel beads modified with streptavidine	avidin-biotin binding	FAC	K _d determination	0,2-0,6 μM	a few nmol/column (V _m =100 μL)
43	isoform 1 VDAC1 (anion channel)	macroporous silica modified with lecithin (IAM like)	entrapment/adsorption on IAM after dialysis	FAC, ZAC, non-linear chromatography	protein-ligand interaction study: determination of K _d , ΔH and ΔS and natural extract screening	30μM and 120μM	B _{tot} = 1 mg/g et B _{act} = 286 nmol/L
lipodisks							
16	human aquaporin1	macroporous silica gel (aldehyde modified)	covalent grafting (reductive amination chemistry with the amino moieties of the protein or of the lipids)	ZAC	fragment screening (200 fragments = 20 mixtures of 10 fragments)	low μM	B _{tot} = 320 pmol/column (V _m =7 μL)
REVIEWS on CMC							
54	Improvements of stationary phase preparation with over-expressed cell lines and of the 2D instrumentation						
37	Multiprotein stationary phases						
50	Improvement of the 2D LC system for the screening of traditional Chinese medicines						
34	IAM or OTC: review dedicated to the preparation of the stationary phases						
33	Overview of the potential of membrane-based affinity columns for the characterization of membrane proteins: determination of K _d , thermodynamics and kinetics						

REFERENCES

- (1) Lundqvist, A.; Lundahl, P. Chromatography on Cells and Biomolecular Assemblies. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **1997**, 699 (1), 209–220. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00143-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00143-6).
- (2) Lundqvist, A.; Lundahl, P. Advantages of Quantitative Affinity Chromatography for the Analysis of Solute Interaction with Membrane Proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2001**, 49 (1), 507–521. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00192-0](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00192-0).
- (3) Hartmann, L.; Kugler, V.; Wagner, R. *Heterologous Expression of Membrane Proteins: Methods and Protocols*; Mus-Veteau, I., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2016; Vol. 1432. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3637-3>.
- (4) Slon-Usakiewicz, J. J.; Ng, W.; Dai, J.-R.; Pasternak, A.; Redden, P. R. Frontal Affinity Chromatography with MS Detection (FAC-MS) in Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2005**, 10 (6), 409–416. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03360-4](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03360-4).
- (5) Calleri, E.; Ceruti, S.; Cristalli, G.; Martini, C.; Temporini, C.; Parravicini, C.; Volpini, R.; Daniele, S.; Caccialanza, G.; Lecca, D.; et al. Frontal Affinity Chromatography–Mass Spectrometry Useful for Characterization of New Ligands for GPR17 Receptor. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (9), 3489–3501. <https://doi.org/10.1021/jm901691y>.
- (6) Hage, D. S.; Chen, J. Quantitative Affinity Chromatography: Practical Aspects. In *Handbook of Affinity Chromatography*; Chromatographic Science Series. 2nd.; Hage DS: Boca Raton (FL), 2006; pp 595–627.
- (7) Hage, D. S.; Anguizola, J.; Barnaby, O.; Jackson, A.; Yoo, M. J.; Papastavros, E.; Pfaunmiller, E.; Sobansky, M.; Tong, Z. Characterization of Drug Interactions with Serum Proteins by Using High-Performance Affinity Chromatography. *Curr. Drug Metab.* **2011**, 12 (4), 313–328.
- (8) Zheng, X.; Li, Z.; Beeram, S.; Podariu, M.; Matsuda, R.; Pfaunmiller, E. L.; White, C. J., 2nd; Carter, N.; Hage, D. S. Analysis of Biomolecular Interactions Using Affinity Microcolumns: A Review. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **2014**, 968, 49–63. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.01.026>.
- (9) Beigi, F.; Wainer, I. W. Syntheses of Immobilized G Protein-Coupled Receptor Chromatographic Stationary Phases: Characterization of Immobilized μ and κ Opioid Receptors. *Anal. Chem.* **2003**, 75 (17), 4480–4485. <https://doi.org/10.1021/ac034385q>.
- (10) Hou, X.; Zhou, M.; Jiang, Q.; Wang, S.; He, L. A Vascular Smooth Muscle/Cell Membrane Chromatography–Offline-Gas Chromatography/Mass Spectrometry Method for Recognition, Separation and Identification of Active Components from Traditional Chinese Medicines. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216 (42), 7081–7087. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.062>.
- (11) Ding, X.; Chen, X.; Cao, Y.; Jia, D.; Wang, D.; Zhu, Z.; Zhang, J.; Hong, Z.; Chai, Y. Quality Improvements of Cell Membrane Chromatographic Column. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1359, 330–335. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.071>.
- (12) Wei, F.; Wang, S.; Lv, N.; Bu, Y.; Xie, X. Characterization the Affinity of A1A Adrenoreceptor by Cell Membrane Chromatography with Frontal Analysis and Stoichiometric Displacement Model. *J. Chromatogr. B* **2017**, 1040, 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.11.002>.
- (13) Zhao, X.; Huang, J.; Li, Q.; Wei, L.; Zheng, J.; Zheng, X.; Li, Z.; Zhang, Y. Revealing Binding Interaction between Seven Drugs and Immobilized B2-Adrenoceptor by High-Performance Affinity Chromatography Using Frontal Analysis. *J. Mol. Recognit. JMR* **2013**, 26 (5), 252–257. <https://doi.org/10.1002/jmr.2271>.
- (14) Wang, L.; Ren, J.; Sun, M.; Wang, S. A Combined Cell Membrane Chromatography and Online HPLC/MS Method for Screening Compounds from Radix Caulophylli Acting on the Human A1A-Adrenoceptor. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, 51 (5), 1032–1036. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.11.007>.

- (15) Ding, X.; Cao, Y.; Yuan, Y.; Gong, Z.; Liu, Y.; Zhao, L.; Lv, L.; Zhang, G.; Wang, D.; Jia, D.; et al. Development of APTES-Decorated HepG2 Cancer Stem Cell Membrane Chromatography for Screening Active Components from Salvia Miltiorrhiza. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (24), 12081–12089. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02709>.
- (16) Duong-Thi, M.-D.; Bergström, M.; Edwards, K.; Eriksson, J.; Ohlson, S.; To Yiu Ying, J.; Torres, J.; Agmo Hernández, V. Lipodisks Integrated with Weak Affinity Chromatography Enable Fragment Screening of Integral Membrane Proteins. *Analyst* **2016**, *141* (3), 981–988. <https://doi.org/10.1039/C5AN02105G>.
- (17) Besanger, T. R.; Hodgson, R. J.; Guillon, D.; Brennan, J. D. Monolithic Membrane-Receptor Columns: Optimization of Column Performance for Frontal Affinity Chromatography/Mass Spectrometry Applications. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *561* (1), 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.062>.
- (18) Singh, N.; Ravichandran, S.; Norton, D. D.; Fugmann, S. D.; Moaddel, R. Synthesis and Characterization of a SIRT6 Open Tubular Column: Predicting Deacetylation Activity Using Frontal Chromatography. *Anal. Biochem.* **2013**, *436* (2), 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.01.018>.
- (19) Habicht, K.-L.; Singh, N. S.; Indig, F. E.; Wainer, I. W.; Moaddel, R.; Shimmo, R. The Development of Mitochondrial Membrane Affinity Chromatography Columns for the Study of Mitochondrial Transmembrane Proteins. *Anal. Biochem.* **2015**, *484*, 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.05.018>.
- (20) Temporini, C.; Massolini, G.; Marucci, G.; Lambertucci, C.; Buccioni, M.; Volpini, R.; Calleri, E. Development of New Chromatographic Tools Based on A_{2A} Adenosine Receptor Subtype for Ligand Characterization and Screening by FAC-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (2), 837–845. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6353-4>.
- (21) Moaddel, R.; Bullock, P. L.; Wainer, I. W. Development and Characterization of an Open Tubular Column Containing Immobilized P-Glycoprotein for Rapid on-Line Screening for P-Glycoprotein Substrates. *J. Chromatogr. B* **2004**, *799* (2), 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.10.054>.
- (22) Moaddel, R.; Rosenberg, A.; Spelman, K.; Frazier, J.; Frazier, C.; Nocerino, S.; Brizzi, A.; Mugnaini, C.; Wainer, I. W. Development and Characterization of Immobilized Cannabinoid Receptor (CB1/CB2) Open Tubular Column for on-Line Screening. *Anal. Biochem.* **2011**, *412* (1), 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.12.034>.
- (23) Moaddel, R.; Hamid, R.; Patel, S.; Bullock, P. L.; Wainer, I. W. Identification of P-Glycoprotein Substrates Using Open Tubular Chromatography on an Immobilized P-Glycoprotein Column: Comparison of Chromatographic Results with Caco-2 Permeability. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *578* (1), 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.03.007>.
- (24) Olesen, K.; Karlsson, R.; Lind, U.; Davidson, M.; Blomberg, A.; Karlsson, A. Detection of Ligand-Receptor Binding Using Microfluidic Frontal Affinity Chromatography on Proteoliposomes Derived Directly from Native Cell Membranes. *J. Chromatogr. B* **2013**, *931*, 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.05.010>.
- (25) Zhang, F.; Zhao, X.; Xu, B.; Cheng, S.; Tang, C.; Duan, H.; Xiao, X.; Du, W.; Xu, L. Preparation and Characterization of Micro-Cell Membrane Chromatographic Column with Silica-Based Porous Layer Open Tubular Capillary as Cellular Membrane Carrier. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408* (10), 2441–2448. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9339-9>.
- (26) Xu, L.; Xu, B.; Zhao, Z.-Y.; Yang, H.-P.; Tang, C.; Dong, L.-Y.; Liu, K.; Fu, L.; Wang, X.-H. Preparation and Characterization of Micro-Cell Membrane Chromatographic Column with N-Hydroxysuccinimide Group-Modified Silica-Based Porous Layer Open Tubular Capillary. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1516*, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.08.028>.
- (27) Yang, Q.; Lundahl, P. Immobilized Proteoliposome Affinity Chromatography for Quantitative Analysis of Specific Interactions between Solutes and Membrane Proteins. Interaction of Cytochalasin B and D-Glucose with the Glucose Transporter Glut1. *Biochemistry* **1995**, *34* (22), 7289–7294. <https://doi.org/10.1021/bi00022a001>.

- (28) Brekkan, E.; Lundqvist, A.; Lundahl, P. Immobilized Membrane Vesicle or Proteoliposome Affinity Chromatography. Frontal Analysis of Interactions of Cytochalasin B and d-Glucose with the Human Red Cell Glucose Transporter. *Biochemistry* **1996**, *35* (37), 12141–12145. <https://doi.org/10.1021/bi9603231>.
- (29) Yang, Q.; Liu, X.-Y.; Hara, M.; Lundahl, P.; Miyake, J. Quantitative Affinity Chromatographic Studies of Mitochondrial Cytochrome c Binding to Bacterial Photosynthetic Reaction Center, Reconstituted in Liposome Membranes and Immobilized by Detergent Dialysis and Avidin–Biotin Binding. *Anal. Biochem.* **2000**, *280* (1), 94–102. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4474>.
- (30) Gottschalk, I.; Li, Y.-M.; Lundahl, P. Chromatography on Cells: Analyses of Solute Interactions with the Glucose Transporter Glut1 in Human Red Cells Adsorbed on Lectin-Gel Beads. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **2000**, *739* (1), 55–62. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(99\)00383-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(99)00383-7).
- (31) He, L.; Wang, S.; Geng, X. Coating and Fusing Cell Membranes onto a Silica Surface and Their Chromatographic Characteristics. *Chromatographia* **2001**, *54* (1), 71–76. <https://doi.org/10.1007/BF02491836>.
- (32) Wang, X.; Xu, L.; Mao, R.; Zhao, X.; Xu, B.; Tang, C.; He, J.; Zhang, Y. An Insertion/Self-Fusion Mechanism for Cell Membrane Immobilization on Porous Silica Beads to Fabricate Biomimic Carriers. *Biomater. Sci.* **2017**, *5* (7), 1334–1341. <https://doi.org/10.1039/C7BM00419B>.
- (33) Moaddel, R.; Wainer, I. W. Development of Immobilized Membrane-Based Affinity Columns for Use in the Online Characterization of Membrane Bound Proteins and for Targeted Affinity Isolations. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *564* (1), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.020>.
- (34) Moaddel, R.; Wainer, I. W. The Preparation and Development of Cellular Membrane Affinity Chromatography Columns. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 197.
- (35) Zhang, Y.; Xiao, Y.; Kellar, K. J.; Wainer, I. W. Immobilized Nicotinic Receptor Stationary Phase for On-Line Liquid Chromatographic Determination of Drug–Receptor Affinities. *Anal. Biochem.* **1998**, *264* (1), 22–25. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2828>.
- (36) Moaddel, R.; Cloix, J.-F.; Ertem, G.; Wainer, I. W. Multiple Receptor Liquid Chromatographic Stationary Phases: The Co-Immobilization of Nicotinic Receptors, γ -Amino-Butyric Acid Receptors, and N-Methyl D-Aspartate Receptors. *Pharm. Res.* **2002**, *19* (1), 104–107. <https://doi.org/10.1023/A:1013619802766>.
- (37) Singh, N. S.; Habicht, K.-L.; Dossou, K. S. S.; Shimmo, R.; Wainer, I. W.; Moaddel, R. Multiple Protein Stationary Phases: A Review. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **2014**, *968*, 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.04.005>.
- (38) Moaddel, R.; Jozwiak, K.; Yamaguchi, R.; Cobello, C.; Whittington, K.; Sarkar, T. K.; Basak, S.; Wainer, I. W. On-Line Screening of Conformationally Constrained Nicotines and Anabasines for Agonist Activity at the A3 β 4- and A4 β 2-Nicotinic Acetylcholine Receptors Using Immobilized Receptor-Based Liquid Chromatographic Stationary Phases. *J. Chromatogr. B* **2004**, *813* (1), 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.09.042>.
- (39) Temporini, C.; Ceruti, S.; Calleri, E.; Ferrario, S.; Moaddel, R.; Abbracchio, M. P.; Massolini, G. Development of an Immobilized GPR17 Receptor Stationary Phase for Binding Determination Using Frontal Affinity Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* **2009**, *384* (1), 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.09.010>.
- (40) Moaddel, R.; Calleri, E.; Massolini, G.; Frazier, C. R.; Wainer, I. W. The Synthesis and Initial Characterization of an Immobilized Purinergic Receptor (P2Y1) Liquid Chromatography Stationary Phase for Online Screening. *Anal. Biochem.* **2007**, *364* (2), 216–218. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.02.014>.
- (41) Moaddel, R.; Jozwiak, K.; Whittington, K.; Wainer, I. W. Conformational Mobility of Immobilized A3 β 2, A3 β 4, A4 β 2, and A4 β 4 Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (3), 895–901. <https://doi.org/10.1021/ac048826x>.

- (42) Moaddel, R.; Oliveira, R. V.; Kimura, T.; Hypolite, P.; Juhaszova, M.; Xiao, Y.; Kellar, K. J.; Bernier, M.; Wainer, I. W. Initial Synthesis and Characterization of an A7 Nicotinic Receptor Cellular Membrane Affinity Chromatography Column: Effect of Receptor Subtype and Cell Type. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (1), 48–54. <https://doi.org/10.1021/ac701943b>.
- (43) Li, Q.; Qiao, P.; Chen, X.; Wang, J.; Bian, L.; Zheng, X. Affinity Chromatographic Methodologies Based on Immobilized Voltage Dependent Anion Channel Isoform 1 and Application in Protein-Ligand Interaction Analysis and Bioactive Compounds Screening from Traditional Medicine. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1495*, 31–45. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.023>.
- (44) Stepien, P.; Polit, A.; Wisniewska-Becker, A. Comparative EPR Studies on Lipid Bilayer Properties in Nanodiscs and Liposomes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2015**, *1848* (1, Part A), 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.004>.
- (45) Bing-Xiang, Y.; Jin, H.; Guang-De, Y.; Li-mei, Z.; Lang-Chong, H. Comparison of Determination of Drug–Muscarinic Receptor Affinity by Cell-Membrane Chromatography and by Radioligand-Binding Assay with the Cerebrum Membrane of the Rat. *Chromatographia* **2005**, *61* (7), 381–384. <https://doi.org/10.1365/s10337-005-0497-8>.
- (46) Sharma, J.; Besanger, T. R.; Brennan, J. D. Assaying Small-Molecule-Receptor Interactions by Continuous Flow Competitive Displacement Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (9), 3213–3220. <https://doi.org/10.1021/ac702421e>.
- (47) Jozwiak, K.; Haginaka, J.; Moaddel, R.; Wainer, I. W. Displacement and Nonlinear Chromatographic Techniques in the Investigation of Interaction of Noncompetitive Inhibitors with an Immobilized A3β4 Nicotinic Acetylcholine Receptor Liquid Chromatographic Stationary Phase. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (18), 4618–4624. <https://doi.org/10.1021/ac0202029>.
- (48) Hou, X.; Wang, S.; Zhang, T.; Ma, J.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Lu, W.; He, H.; He, L. Recent Advances in Cell Membrane Chromatography for Traditional Chinese Medicines Analysis. *JPBA Rev.* **2014** *2014*, *101*, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.05.021>.
- (49) Cieśla, Ł.; Moaddel, R. Comparison of Analytical Techniques for the Identification of Bioactive Compounds from Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33* (10), 1131–1145. <https://doi.org/10.1039/C6NP00016A>.
- (50) Muhammad, S.; Han, S.; Xie, X.; Wang, S.; Aziz, M. M. Overview of Online Two-Dimensional Liquid Chromatography Based on Cell Membrane Chromatography for Screening Target Components from Traditional Chinese Medicines. *J. Sep. Sci.* **2017**, *40* (1), 299–313. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600773>.
- (51) Chen, X.; Cao, Y.; Lv, D.; Zhu, Z.; Zhang, J.; Chai, Y. Comprehensive Two-Dimensional HepG2/Cell Membrane Chromatography/Monolithic Column/Time-of-Flight Mass Spectrometry System for Screening Anti-Tumor Components from Herbal Medicines. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1242*, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.034>.
- (52) Wang, X.; Meng, X.; Pei, W.; Li, Z.; Zhang, Y.; Zheng, J.; Zheng, X. Construction of Adrenergic Receptor Subtype Affinity Chromatographic Models for Detection of Ligand–Receptor Interactions. *Anal. Methods* **2012**, *4* (10), 3420–3424. <https://doi.org/10.1039/C2AY25601K>.
- (53) Sun, M.; Ren, J.; Du, H.; Zhang, Y.; Zhang, J.; Wang, S.; He, L. A Combined A431 Cell Membrane Chromatography and Online High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Method for Screening Compounds from Total Alkaloid of Radix Caulophylli Acting on the Human EGFR. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878* (28), 2712–2718. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.08.010>.
- (54) de Moraes, M. C.; Vanzolini, K. L.; Cardoso, C. L.; Cass, Q. B. New Trends in LC Protein Ligand Screening. *Rev. Pap. Pharm. Biomed. Anal.* **2013** *2014*, *87*, 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.07.021>.

3. OBJECTIFS ET CHOIX STRATÉGIQUES

A l'issu de cette étude nous avons donc été en mesure de fixer les objectifs spécifiques pour ensuite élaborer notre stratégie de développement. Pour résumer, l'objectif est de préparer des colonnes fonctionnalisées avec la protéine d'intérêt stabilisée dans un milieu similaire à sa membrane d'origine, qui génèrent un minimum d'interactions non-spécifiques, et dont le mode d'immobilisation soit compatible avec l'utilisation dynamique qu'implique la chromatographie.

Pour cela, nous avons choisi de travailler avec la protéine purifiée insérée dans une structure biomimétique qui est le nanodisque. Il s'agit de l'auto-assemblage d'une bicouche de phospholipides maintenue par une protéine amphiphile appelée MSP (membrane scaffold protein). La protéine d'intérêt est insérée dans le nanodisque et les côtés intra et extra cellulaires sont exposés (comme pour le lipodisque) ce qui implique l'accessibilité systématique du site actif. Cette structure est monodisperse, la taille du nanodisque étant fixée par la MSP utilisée, et chaque nanodisque ne contient alors qu'une seule protéine membranaire d'intérêt. Le nanodisque permet également d'avoir la protéine solubilisée en milieu aqueux, sans nécessiter la présence de détergents ou de tensio-actifs et la reconnaissance de ligands peut alors se faire en tampon classique. En ce qui concerne le greffage, la MSP peut facilement porter un tag qui sert à l'immobilisation sur une phase stationnaire : la biotinylation de la MSP par exemple permet le greffage sur une phase stationnaire fonctionnalisée par la streptavidine. Cette voie de greffage a l'avantage d'être rapide (capture instantanée de la biotine par la streptavidine) et stable grâce à la force de l'interaction entre ces deux molécules.

Ensuite, nous avons décidé de réaliser notre développement avec le récepteur A_{2A} de l'adénosine (noté AA_{2A}R), qui est une protéine membranaire de la famille des GPCRs. Cette protéine a été largement étudiée ces dernières années ce qui en fait un modèle idéal (ligands connus, structure 3D). De plus, AA_{2A}R joue un rôle de régulation dans de nombreux processus physiologiques (vasodilatation, système immunitaire, libération d'hormones, ...) et la découverte de nouveaux ligands pourrait jouer un rôle important dans le traitement de diverses pathologies comme la dépression, les maladies cardiovasculaires, Parkinson ou encore certains cancers.

4. LES RÉSULTATS

AA_{2A}R a donc été immobilisée en nanodisques sur des colonnes capillaires monolithiques via l'interaction streptavidine-biotine. Le greffage est rapide (quelques dizaines de minutes pour une solution de protéine au μM) et consomme peu de protéine (quelques μL suffisent pour greffer une colonne de 8,5 x 0,0075 cm).

Des tests de reconnaissance ont été effectués par analyse frontale avec les ligands connus : les antagonistes théophylline et caféine et l'agoniste adénosine. Des interactions spécifiques ont pu être détectées ce qui montre que la protéine est active après immobilisation et que son site de reconnaissance est accessible aux ligands. De plus, le nanodisque confère suffisamment de liberté conformationnelle à la protéine pour permettre la reconnaissance à la fois d'antagonistes et d'agonistes. La modélisation des résultats a également permis la détermination de la stoechiométrie de l'interaction (1 ligand/1 site ou 1 ligand/2 sites).

Des expériences de compétition avec un autre ligand connu de plus forte affinité (ZM241385, $K_d \sim 1$ nM) ont permis de confirmer le site d'interaction de la théophylline.

Enfin, des fragments ont été étudiés (toujours par analyse frontale) et les colonnes d'affinité ainsi préparées ont permis d'identifier et de distinguer des ligands et des non-ligands de AA_{2A}R.

Ces premiers travaux sont présentés dans l'article « *Ultra-miniaturized weak affinity chromatography for ligand identification of nanodiscs-solubilized G-protein coupled receptors* » et montrent bien le potentiel et l'intérêt de la chromatographie de faible affinité pour le criblage de fragments dans le cadre de l'étude de protéines membranaires.

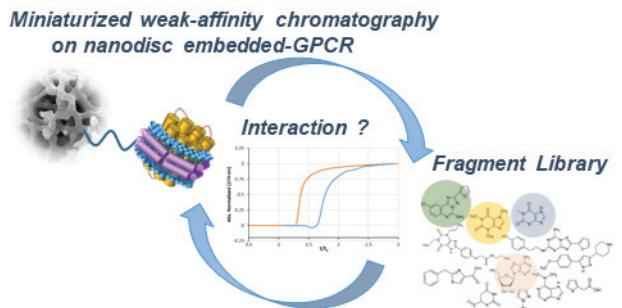
Ultra-miniaturized weak affinity chromatography for ligand identification of nanodiscs-solubilized G-protein coupled receptors

Lucile Lecas[#], Lucie Hartmann[&], Lydia Caro[&], Sarah Mohamed-Bouteben[&], Claire Raingeval[#], Isabelle Krimm[#], Renaud Wagner[&], Vincent Dugas[#], Claire Demesmay^{#*}

[#] Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 VILLEURBANNE, France

[&] Plateforme IMPReSs, CNRS UMR7242, Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Illkirch, France

ABSTRACT: Biophysical techniques that enable the screening and identification of weak affinity fragments against a target protein are at the heart of Fragment Based Drug Design approaches. In the case of membrane proteins, the crucial criteria for fragment screening are low protein consumption, unbiased conformational states and rapidity because of the difficulties in obtaining sufficient amounts of stable and functionally folded proteins. Here we show for the first time that lipid-nanodisc systems (membrane-mimicking environment) and ultra-miniaturized affinity chromatography can be combined to identify specific small molecule ligands that bind to an integral membrane protein. The approach is exemplified using the AA_{2A}R GPCR. Home-made affinity nano-columns modified with nanodiscs-embedded AA_{2A}R (only about 1 µg of protein per column) are fully characterized by frontal chromatographic experiments. This method allows (i) to distinguish specific and unspecific ligand/receptor interactions, (ii) to assess dissociation constants, (iii) to identify the binding pocket of uncharacterized ligands using a reference compound with competition experiments. Weak affinity ligands with K_d in the low to high micromolar range be detected. At last, the applicability of this method is demonstrated with 6 fragments recently identified as ligands or non-ligands of AA_{2A}R.



1. INTRODUCTION

Integral membrane proteins represent 20-30% of the total proteins encoded in the human genome, including ion channels, transporters, receptors and enzymes. The G protein-coupled receptors (GPCRs) family is the most diversified family of membrane proteins and play a key role in nearly all physiological processes including vision, immune system, neurotransmission, cellular proliferation. As a consequence, GPCRs are involved in many diseases such as asthma, diabetes, Alzheimer disease and cancer, representing approximatively 30% of currently marketed therapeutic drug targets¹. Still, 73% of the non-olfactory GPCRs remain untargeted², explaining why the pharmaceutical industry places intensive efforts on GPCR drug discovery programs and is seeking for innovative and robust drug screening methodologies.

Among these approaches, Structure-Based-Drug-Design (SBDD) applied to drugs targeting GPCRs appears highly promising but faces two main issues. Firstly, the overproduction of GPCRs leading to structure determination is challenging both in terms of quantities and stability. Because GPCRs are highly dynamics proteins that undergo a number of conformational changes upon ligand binding, this inherent conformational flexibility is actually a key issue for crystallographic structural studies. In the last decade, the implementation of GPCR-stabilization strategies, such as receptor mutagenesis, insertion of fusion proteins or use of antibody fragments³, induced a major breakthrough in GPCR structural biology, which in turn opened the route for SBDD^{4,5}. The second issue concerns the screening of novel ligands, and in particular weak affinity ligands such as fragments for the development of new drugs. Fragments are small molecules, with restricted physicochemical properties known as the rule of three. This rule suggests that fragments have limited molecular weight (< 300 g/mol), high solubility ($\log P < 3$) and few hydrogen bond donors (<3) and acceptors (<3)⁶. Screening such small compounds is highly effective in terms of chemical space, and fragment libraries are usually composed of only one to several thousand molecules. The fragments hits that are identified typically display low to high ΔM affinities and are then elaborated into active compounds through a second step based on structural approaches. Identifying such small molecules, the first step of the Fragment-Based Drug Design (FBDD) process, consists of screening fragments against a purified protein, using biophysical techniques, among which NMR, X-Ray crystallography and Surface Plasmon Resonance (SPR) are the most extensively used⁷⁻¹⁴. As recently demonstrated complementary screening methods are always needed^{15,16}. In the last few years, weak affinity chromatography has been proposed^{17,18} as this technique benefits from some interesting key features: (i) like in SPR the protein target is immobilized and can be reused reducing the protein consumption; (ii) pools of up to several tens of fragment in mixtures (multiplexed analysis)¹⁹ and unpurified samples or complex matrices (e.g. traditional Chinese medicine)²⁰⁻²² can be directly analyzed (with mass spectrometric detection). However, while fragment screening by weak affinity chromatography has been applied to soluble proteins^{20,23,24}, only one

article relates its application to a membrane proteins²⁵. Indeed, despite the extensive researches from multiple groups to develop chromatographic support with immobilized receptors either in their native environment, i.e cell membrane fragments in cell membrane chromatography (CMC) or in a bio-mimicking membrane environment (immobilized artificial membrane IAM) in Cell Membrane affinity chromatography (CMAC),^{26–28} these methods were mainly applied to pharmacological studies and to the identification of new potential high affinity ligands in traditional Chinese medicine ^{29,30}. In all these methodologies, non-purified receptors are used leading to potentially high non-specific interaction levels associated to the natural environment of the target protein. Moreover, due to the rather high affinity range covered by these methods, they are more drug screening tools (high affinity ligand) than fragment screening tools.

Undoubtedly, there is a major need for techniques that enable the screening and identification of weak affinity fragments. Ideally, such techniques should accommodate the GPCR-specific requirements discussed above *i.e.*, (i) minimize the sample size to fit the small amounts of purified GPCR that can be reasonably achieved, and (ii) be adapted to the dynamics and intrinsic conformational flexibility of the receptors in a membrane-like environment. In addition, they should involve purified receptors as the reduced complexity of such sample may advantageously lower the probability of non-specific interactions.

Among the variety of systems that have been developed over the years to investigate GPCRs in solution, lipid nanodiscs have particularly attracted attention for native GPCR interaction studies, most notably with techniques such as NMR and SPR^{31–34}. Nanodiscs are self-assembled soluble discoidal phospholipids bilayers encircled by an amphipathic protein called Membrane Scaffold Protein (MSP)³⁵. They have been proved to give the membrane proteins a native-like environment associated with a high homogeneity in size and a high solubility and stability in aqueous solution³⁶.

Here, we propose a strategy that combines the preparation of nanodiscs-embedded GPCRs and the ultra-miniaturization of weak affinity chromatography for the detection of GPCR-bound weak affinity fragments. In this approach, the nanodisc-embedded target is immobilized on the chromatographic support via the biotinylated nanodiscs. The primary innovations concern (i) the biomimetic assembly that allows the immobilization of a fully label-free and purified integral membrane protein, (ii) the immobilization strategy on a streptavidin generic monolithic column that allows an immediate (a few minutes) and in-situ UV-monitored grafting without any protein waste, (iii) the reduction of the protein consumption at the µg level for one reusable affinity column.

The technique is exemplified using the adenosine A_{2A} receptor (AA_{2A}R), a prototypical class A GPCR receptor. AA_{2A}R has been extensively studied during the past few decades making it an ideal model with a large repertoire of ligands^{37,38} and 3D X-ray structures available in the presence of antagonists, agonists and in complex with a G-protein³⁹. Nevertheless, AA_{2A}R remains a hot topic and the discovery of additional

compounds could lead to numerous possibilities for therapeutics applications against inflammation, asthma, cardiovascular diseases, central nervous system diseases and cancer⁴⁰⁻⁴³.

The home-made affinity nano-columns (Figure S1) are fully characterized by frontal chromatographic experiments. It is demonstrated that specific and unspecific ligand/receptor interactions can be distinguished, that binding constants from low to high μM range can be determined and that the binding pocket of uncharacterized ligands can be assessed with competition experiments using a reference compound. At last, the applicability of this method for FBDD is demonstrated with 6 fragments recently identified as ligands or non-ligands of AA_{2A}R.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Biochemistry Methods

2.1.1. Production and purification of AA_{2A}R

The wild-type human AA_{2A}R receptor N-terminally fused to the flag and deca-histidine tags was recombinantly produced with the *Pichia pastoris* system as previously described⁴⁴. AA_{2A}R receptors were then prepared as follows. After cell lysis and whole membrane preparation⁴⁴, membranes were diluted to ca. 2 mg.mL⁻¹ in cold solubilization buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.5 % n-Dodecyl-β-D-Maltopyranoside (β-DDM) (w/v), 0.05 % Cholesteryl Hemisuccinate (CHS) (w/v), 25 mM imidazole, 1 μM 1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX), 0.3 mM EDTA) containing an antiprotease cocktail (Roche). The suspension was incubated for 30 min at room temperature, followed by centrifugation at 100,000 x g for 30 minutes. Solubilized proteins were then loaded on a 1 mL HisTrap HP column (GE Healthcare) at 1 mL.min⁻¹ flow rate. After extensive washing with a 50 mM HEPES pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.05 % β-DDM (w/v), 0.005 % CHS (w/v), 25 mM imidazole, 1 μM DPCPX buffer, the bound receptor was eluted with a linear gradient of 25 to 500 mM imidazole. Fractions eluting at around 150 mM imidazole were pooled, concentrated down to 400-500 μL (Vivaspin 6, 30k MWCO), and loaded onto a Superdex 200 increase 10/300 GL column (GE Healthcare). Proteins were separated at 0.3 mL.min⁻¹ with a 50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.02 % β-DDM (w/v), 0.002 % CHS (w/v) 1 μM DPCPX buffer. Fractions containing the purified AA_{2A}R receptor in detergent were pooled and directly used for reconstitution in lipid nanodiscs.

2.1.2. Membrane scaffold protein purification and biotinylation

The membrane scaffold protein MSP1E3D1(-) was produced and purified as previously described⁴⁵. MSP1E3D1(-) was then incubated in presence of a biotinylation reagent (EZ-LinkTM NHS-PEG4-Biotin, Thermo Scientific) at a 1:5 MSP:biotin molar ratio in a 20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA buffer. After a one-hour incubation at room temperature, the reaction was stopped by adding 5 mM Tris-

HCl pH 7.4. The resulting biotinylated-MSP1E3D1(-) was isolated from the free reagent in a final desalting step (HiTrap desalting, GE Healthcare) in a 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA storage buffer, flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until use. The actual biotinylation was further confirmed in a standard Western-blot revealed with extravidin-HRP.

2.1.3. Nanodisc assembly and purification

The biotinylated-MSP1E3D1(-) was mixed at a 1:70 molar ratio with purified lipids (POPC/POPG; 3/2 molar ratio) previously dissolved at a 24 mM concentration in a 50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 48 mM Na-cholate buffer, and incubated for 15 minutes on ice. The purified receptor was then added to the MSP:lipid mixture at 1:10 receptor:MSP1E3(-) molar ratio and further incubated for 60 minutes on ice. Self-assembly was initiated by detergent removal using BioBeads SM-2 (Biorad) (0.25 g of Biobeads per mL of reconstitution mixture) and allowed to proceed overnight at 4 °C on a tube rotator. The Biobeads were then removed by centrifugation and the recovered supernatant was directly loaded on a 1 mL HisTrap HP column (GE Healthcare) previously equilibrated in a 50 mM HEPES pH 7.4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole buffer. After extensive washing with the equilibration buffer, the AA_{2AR}-containing discs were eluted with the same buffer containing 500 mM imidazole. The eluted fractions were then pooled and loaded on a Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare) previously equilibrated in a 50 mM HEPES pH7.4, 150 mM NaCl buffer. Elution was carried out at 0.3 mL·min⁻¹ and the fractions containing the pure AA_{2AR}-nanodiscs were finally aliquoted, flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The same procedure was followed for the preparation of empty nanodiscs, except that the MSP:lipids molar ratio was 1:130 instead of 1:70. In order to remove free lipids, empty nanodiscs were finally purified on a Superdex 200 10/300 GL column in the same conditions used for AA_{2AR}-nanodiscs.

2.1.4. Electron microscopy analysis

The nanodisc samples were diluted to approximately 0.2 µg·mL⁻¹ in purification buffer. Negative staining was performed using 2 % (w/v) uranyl acetate. Observation was carried out using a transmission electron microscope Philips CM 120 with a filament LaB6 (lanthanum hexaboride) at 120 kV. Images (Figure S3) were recorded at 45,000× magnification using a Gatan 794 CCD camera.

2.1.5. Competition ligand-binding assay

Competition ligand-binding assays were performed in triplicates using 5 nM of [³H]-ZM241385 as the tracer, and 10⁻¹⁰ to 10⁻³ M of competitor molecules. AA_{2AR} in lipid discs (1 µg/mL) were incubated in 96-well plates in binding buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA). After 1 h incubation at room temperature, proteins were precipitated by supplementation with 0.1% gamma globulins and 25% PEG 6000 (Sigma-Aldrich) for 15 min. The reaction was stopped by rapid filtration through GF/B unifilters (Perkin Elmer) pre-saturated in 0.3% (v/v) PEI, followed by three successive washes with icecold buffer

containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4 and 8% (w/v) PEG 6000. Binding data were analyzed with the GraphPad Prism7 software (Figure S3). Inhibition constants (K_i) were calculated according to the Cheng-Prusoff equation and were expressed as p K_i .

2.1.6. Scintillation Proximity Assay (SPA)

The SPA assay was adapted from Hansen et al.⁴⁶. Briefly, 100 ng of AA_{2A}R-nanodiscs, 100 ng of biotinylated-AA_{2A}R purified in detergent, 60 ng of empty nanodiscs or 10 µg of membrane preparation samples from the AA_{2A}R-expressing yeast clone were incubated in triplicates in 96-well plates (ProxiPlate-96, Perkin Elmer) in presence of 10 µL of streptavidin-coated yttrium silicate SPA beads (Perkin Elmer) and 25 nM of [³H]-ZM241385 in 100 µL final volume of binding buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA). Non-specific binding is determined in parallel in presence of 10 µM ZM241385. The sealed plate is then placed in a TopCount scintillation counter and measured every hour until 48 hours (Figure S6). Before the last measurement, proteins are denatured by adding 5 µL of 20% SDS to each well.

2.2. Chromatographic methods

2.2.1. Instruments

Nano-LC experiments (frontal weak affinity chromatography experiments) were carried out with a 7100 capillary electrophoresis Agilent system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with external pressure nitrogen supply allowing to work up to 1.2 MPa. System control and data acquisition were carried out using the Chemstation software (Agilent). The experiments were conducted using the CE system in the so-called “short-end” injection mode (Figure S2). The system was exclusively operated in the pressurization mode by applying external pressure (no voltage applied). The inlet of the capillary column is simply immersed in the solution to be infused and the external pressure forces the liquid to flow inside the capillary column. The detection was achieved “on-column” (in an empty section of the 10-cm capillary located just after the monolith), with a diode array detector operated in a multi-wavelength mode. The effective length was 8.5 cm. Experiments were conducted under controlled room temperature (25°C).

2.2.2. Capillary monolith synthesis

Fused-silica capillaries with UV transparent coating (TSH, 75-µm i.d.) were purchased from Polymicro Technologies (Molex). Poly(GMA-co-EDMA) monoliths were synthesized as described in a previous work^{47,48}. First, a pre-treatment procedure was carried out in order to ensure a strong covalent attachment of monoliths to capillary walls. Capillaries were flushed with a 5 % (v/v) solution of γ-MAPS in methanol/water (95/5, v/v) with 2.5 % TEA for 1 h at 0.7 MPa. Next, they were rinsed with methanol for 15 min at 0.7 MPa and dried at room temperature under nitrogen stream. A polymerization mixture was prepared by mixing 0.9 mL GMA, 0.3 mL EDMA, 1.05 mL 1-propanol, 0.6 mL 1,4-butanediol, 0.15 mL ultra-

pure water and 12 mg of the initiator 2,2-azobisisobutyronitrile. The pre-treated capillary was then filled with the polymerization mixture under 0.1 MPa N₂ pressure. The photopolymerization reaction was performed in a Bio-link UV cross-linker (VWR International, France) under 365 nm UV light for a total energy of 6 J.cm⁻². In order to localize the monolith inside the silica capillary, a PEEK tubing (380 µm i.d.) was used as a mask to cover non-irradiated areas. After polymerization, the 8.5-cm monolithic column segment of the 15-cm capillary was rinsed with methanol for 1 h.

2.2.3. *Streptavidin immobilization protocol*

Streptavidin columns were prepared using the Schiff base method as previously described⁴⁹. First, the epoxy groups of the GMA-co-EDMA monoliths were hydrolyzed into diols flowing 1 M sulfuric acid for 2 h at 0.7 MPa. After rinsing all residual acid, the diol-monolith was oxidized to aldehyde using a 0.12 M NaIO₄ solution at pH 5.5. Then a 1 mg.mL⁻¹ Streptavidin (from *Streptomyces avidinii*, affinity purified, ≥ 13 U.mg⁻¹ of protein, Sigma Aldrich) and 4 mg.mL⁻¹ NaBH₃CN solution in 67 mM pH 6 phosphate buffer was percolated through the column for 18 h at 0.7 MPa and room temperature. After immobilization, the column was flushed with sodium borohydride (2.5 mg.mL⁻¹, phosphate buffer 67 mM pH 8) (2 h, 0.7 MPa) to reduce residual aldehydes. The Streptavidin columns were then rinsed with phosphate buffer and stored at 4°C.

2.2.4. *Frontal affinity experiments*

Solutions of fragment concentration were prepared in phosphate buffer (67 mM K₂HPO₄, pH 7.4) and percolated at 1.2 MPa (about 240 nL.min⁻¹ or 0.1 cm.s⁻¹ for 8.5-cm length columns).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Preparation of nanodiscs-embedded AA_{2A}R

In this study, the wild-type human AA_{2A}R receptor N-terminally fused to a Flag and a deca-histidine tags was produced with a yeast *Pichia pastoris* recombinant clone overexpressing the corresponding DNA construct^{44,50}. After extraction from the yeast membranes and purification in presence of a DDM/CHS detergent mixture, AA_{2A}R was further assembled in lipid nanodiscs similarly to previously described conditions³². For the purpose of the present affinity chromatography strategy, nanodisc particles have to be firmly immobilized on the chromatographic support. Therefore, the MSP employed here (i.e. MSP1E3D1) was in vitro biotinylated using a NHS-PEG4-Biotin reagent. While the resulting AA_{2A}R nanodisc brings the receptor a stable membrane-mimicking environment compatible with an extensive use in dynamic conditions⁴⁶, it also allows a strong immobilization on streptavidin-coated supports via the biotin residues grafted on the MSP belt. Thanks to the presence of the PEG spacer arm that further maintains the

assembly at distance from the support, the overall particle design thus ensures a full accessibility of the extramembrane domains of the receptor to the solvent and to any potential ligands it may contains.

The homogeneity of the nanodisc preparation was assessed by size exclusion chromatography and by negative staining electron microscopy (Figure S3), and the functionality of AA_{2A}R in these nanodiscs was determined by ligand-binding assays performed in two different formats. In a first filtration-based competition binding assay, the pharmacology profiles of one agonist, adenosine, and three antagonist compounds, ZM241385, CGS15943 and xanthine amine congener (XAC) (Figure S4 for compounds structures) were evaluated (Figure S5). The pKi values obtained were relatively close to previously published data⁵¹, indicating that the receptor was correctly folded in the nanodisc preparation. In a second format relying on the SPA technology (Scintillation Proximity Assay), radio-ligand binding was followed over time in order to evaluate the stability of AA_{2A}R nanodiscs at room temperature. This assay revealed a consistent binding ability over time, with still about 50% of [³H]-ZM241385 bound after more than 40 hours of measurement (Figure S6). Overall, the quality and stability of the AA_{2A}R nanodisc samples fulfilled the requirements of the planned WAC studies.

3.2. AA_{2A}R affinity columns: preparation and evaluation with known ligands

One of the main objectives here was to drastically reduce the quantity of GPCR used for the characterization of GPCR-ligand interactions. Therefore, we used an in-house developed miniaturized affinity chromatographic column (75 µm internal diameter and 8.5 cm length i.e. less than 0.5 µL in volume). With their unique characteristics, these nano-columns have an internal diameter about 60 times smaller than commercially available affinity columns (4.6 mm i.d), and 7 times smaller than the smallest in-house microcolumns previously described in the literature for affinity studies (500 µm i.d)⁵², which corresponds to a 3600-fold or a 50-fold reduction of the column section, respectively and to a 18-fold reduction of the column volume considering the smallest column⁵². At this level of miniaturization, an in-situ synthesized poly(GMA-co-EDMA) monolith chromatographic support was preferred to conventional packed particulate ones. The epoxy surface groups of the monolith were then hydrolyzed into diols that were subsequently oxidized into aldehyde capable of reacting with streptavidin through Schiff base reaction⁴⁹. The resulting streptavidin-coated columns were finally used to immobilize the biotinylated nanodiscs containing AA_{2A}R. The immobilization was performed dynamically, by simply flowing through the column a few microliters of a dilute solution of nanodisc-embedded AA_{2A}R (µM range). The immobilization step was monitored using in-situ UV detection (Figure S7), in order to stop the sample flow once saturation is reached (no excess of protein consumed) and to quantify the total amount of nanodiscs captured. The typical immobilization step duration is quite short, viz about 10 minutes. For a set of 10 columns, around

14 pmol of protein were immobilized per column (14.2 ± 2.7 pmol, n= 10), which correspond to about 0.6 µg of AA_{2AR}-containing nanodiscs. These miniaturized and reusable affinity columns thus lead to a considerable reduction of protein consumption (less than 1 µg per column).

In order to assess the functionality of the column-immobilized AA_{2AR} nanodiscs, frontal affinity chromatography (FAC) was used to study protein-ligand interactions. FAC is a powerful chromatographic tool for the measurement of protein-ligand binding constants and is particularly suitable for the analysis of weak interactions. With this approach, solutions of increasing ligand concentration were continuously infused into the affinity column until their breakthrough, due to saturation of the binding sites. The on-line UV signal monitoring (or ion current signal monitoring if a mass spectrometer is used as detector) gives a typical sigmoid-like profile, with front and plateau at the breakthrough time ($t_{plateau}$). Binding interaction between the ligand and the immobilized protein is characterized by an increase in breakthrough time with decreasing ligand concentration. If there is no specific interaction, the breakthrough time remains constant regardless of the ligand concentration²⁰. Measuring the breakthrough times for several ligand concentrations permits to characterize the binding affinity, the amount of active proteins and to reveal potential non-specific interactions. Indeed, for each ligand concentration [L], the total amount of ligand captured in the column, q, can be experimentally determined using Equation (1):

$$q = (t_{plateau} - t_0) \times F \times [L] \quad (\text{Eq.1})$$

with F being the flow rate and t_0 the column dead time.

Ligands can be captured either by specific interactions with the target protein, or by non-specific ones (with the chromatographic support, with nanodiscs or with the target itself). The total amount of ligand captured is the sum of what is specifically interacting within each protein binding site and what is non-specifically interacting. If non-specific interactions are weak interactions (what is expected) the total amount of ligand captured can be written as shown in Equation (2):

$$q = \sum_{\text{specific}} \left[\frac{B_{act,i} \times [L]}{K_{d,i} + [L]} \right] + \sum_{\text{non-specific}} K_{ns} \times [L] \quad (\text{Eq.2})$$

with $B_{act,i}$ being the amount of each protein active binding site i, $K_{d,i}$ the dissociation constants of the ligand interacting with each of them and K_{ns} the constant related to non-specific interactions.

If only non-specific interactions occur, Equation 2 becomes a linear equation and the amount of ligand captured varies proportionally to the applied ligand concentration. Otherwise, if non-specific interactions

are negligible in comparison with specific ones, the type of interaction can be characterized by plotting a double reciprocal graph $1/q$ versus $1/[L]$. Thus, a one-site interaction leads to a linear fit whereas a multi-site interaction leads to a non-linear fit. From there, the dissociation constants $K_{d,i}$ and the numbers of active sites $B_{act,i}$ can be determined by linear or non-linear regression⁵³.

In order to detect and quantify potential non-specific binding of ligands, the experiments carried out on AA_{2A}R-nanodiscs grafted columns were also simultaneously performed on empty-nanodiscs grafted columns. Regardless of the ligand concentration, the reduced breakthrough time $t_{plateau}/t_0$ is equal to 1 if no non-specific interactions occur, or constant and higher than 1 otherwise. This provides a simple and convenient negative control. FAC experiments were performed with three well-characterized compounds, two antagonists, theophylline and caffeine, and one agonist, adenosine (see Figure S4 for compounds structures). The breakthrough curves obtained for theophylline are represented in Figure 1.

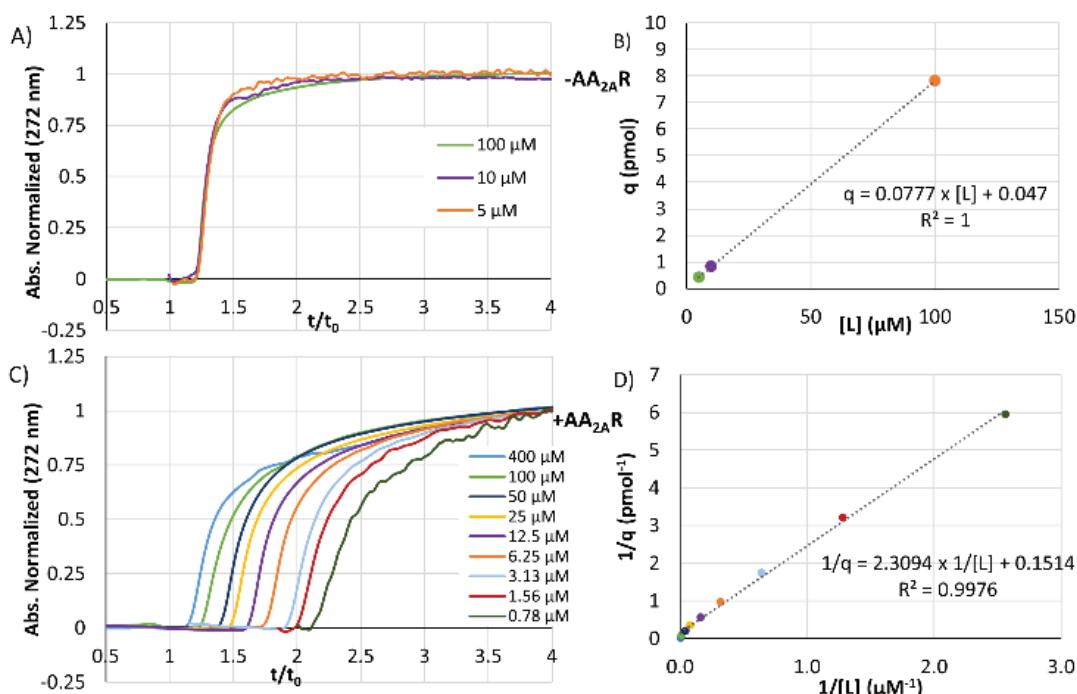


Figure 1. Frontal Affinity Chromatography analysis of the interaction between theophylline and immobilized nanodiscs columns (column dimensions: $l=8.5\text{ cm}$ $i.d.75\text{ }\mu\text{m}$; applied pressure 12 MPa (0.14 cm.s^{-1}))

-AA_{2A}R upper panels: empty nanodiscs. (A) Frontal affinity breakthrough curves (X-axis in reduced retention time t/t_0) on an empty-nanodiscs column. (B) Plot of captured quantities (q) versus ligand concentrations $[L]$ and on an empty-nanodiscs column accounting for non-specific interactions.

+AA_{2A}R lower panels: AA_{2A}R-nanodiscs. (C) Frontal affinity breakthrough curves (X-axis in reduced retention time t/t_0) on an AA_{2A}R-nanodiscs column. (D) Corresponding double reciprocal plot $1/q$ versus $1/[L]$ accounting for a one-site model.

In the absence of AA_{2A}R, the reduced breakthrough time was not modified upon theophylline concentration and was equal to 1.3 thus revealing low non-specific interactions (Figure 1A). In addition, as expected for non-specific interactions, the amount of theophylline captured on empty nanodiscs column varied proportionally to its concentration (Figure 1B). In the presence of AA_{2A}R, the reduced breakthrough time increased as the theophylline concentration was decreased, as expected for specific interactions (Figure 1C). At the highest ligand concentrations, where non-specific interactions predominate, the reduced breakthrough time tends to 1.3, corresponding to the reduced breakthrough time value measured on empty nanodiscs and characteristic of non-specific interactions. The 1/q versus 1/[L] plot was linear and thus typical of one-site interaction (Figure 1D). Only a small deviation occurred for the highest concentrations (lowest 1/[L] range) due to non-specific interactions that contribute more significantly to the overall amount captured. Overall, non-specific binding is considered low as it accounts for less than 30 % of total binding for theophylline concentrations lower than 25 μM. Assuming that the total amount of ligand retained in the column corresponds to the sum of what is specifically interacting with a unique protein binding site, and of what is non-specifically interacting with the column surface and/or the nanodiscs particles, the calculated K_d value for theophylline was 32 ± 11 μM. This K_d value is consistent with values reported in the literature (25 μM³⁷). The amount of active sites B_{act} was 7.2 ± 1.3 pmol (correlation coefficient 0.9997). Therefore, based on the known total protein content of the column (B_{tot} as equal to 11.3 pmol), the activity rate for AA_{2A}R (B_{act}/B_{tot}) was 63 ± 11 %.

For caffeine, similar breakthrough curves were observed in the presence of AA_{2A}R (Figure S8). A K_d of 41 ± 15 μM was calculated, in good agreement with the literature (23.4 μM³⁷). In addition, B_{act} was 11.6 ± 2.3 pmol (correlation coefficient 0.9999), indicating that the AA_{2A}R activity rate was 104 ± 21 % with low non-specific interactions. Such high specific activities show that the grafting process is protein-friendly as it preserves the functionality of the nanodiscs-embedded AA_{2A}R.

Concerning the binding of adenosine in the presence of AA_{2A}R (Figure 2), the reduced breakthrough time increased with decreased adenosine concentrations, as expected for specific interactions. However, a strong deviation from linearity was observed on the double reciprocal plot 1/q versus 1/[L], suggesting a multi-site interaction. As the adenosine has previously been reported to specifically bind streptavidin, a two-site model was used and turned out as the best-fit line. The calculated K_d values were 0.32 μM for the first site and 447 μM for the second (correlation coefficient 0.9998). These values are in good agreement with the reported values for the binding of the adenosine to AA_{2A}R (0.7 μM³⁷) or streptavidin (100-200 μM⁵⁴).

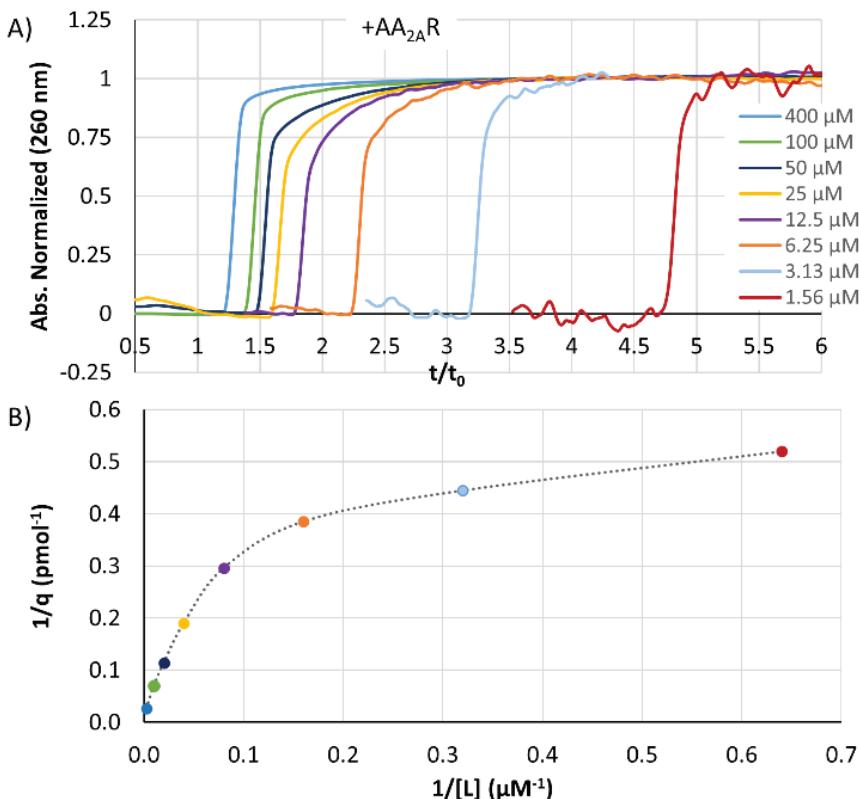


Figure 2. FAC analysis of the interaction between adenosine and immobilized AA_{2A}R nanodiscs. (A) Frontal affinity breakthrough curves with adenosine at various concentrations X-axis in reduced retention time t/t_0 ; (B) double reciprocal plot $1/q$ versus $1/[L]$ accounting for a two-site model.

These results were further confirmed using FAC experiments carried out on control columns with either non-complexed streptavidin or immobilized empty nanodiscs (Figures S9 and S10). The amounts of active binding sites were also determined using the two-site model. The calculated values were 2.3 pmol for AA_{2A}R resulting in an activity rate of approximatively 20 %, and 43 pmol for the streptavidin which is in good agreement with the expected amount of grafted streptavidin on the monolith⁴⁹. In the case of adenosine, interactions with streptavidin are specific interactions and contribute to the overall variation of the reduced breakthrough time when the adenosine concentration is varied. Such specific interactions with the underlying streptavidin are a potential source of false positive. Only complementary experiments on streptavidin column can discriminate between specific interactions with streptavidin and with the target proteins.

3.3. Competition experiments

In order to take the proof of concept a step further, ligand-binding experiments in a competition format were investigated. Competition experiments can be particularly valuable in the context of fragment screening to assess the binding site of fragments using a well-characterized competitor, or to serve as a

control experiment for non-specific interactions. In the case of FAC experiments, the strategy involves a constant infusion of the competitor into the column, first alone then with the monitored ligand. The chromatograms are analyzed by measuring the change in the breakthrough time of the monitored ligand in the absence and in the presence of the competitor: competition for the same binding site is expected to selectively reduce the breakthrough time.

Here, a competition experiment was achieved between theophylline and the high-affinity AA_{2A}R antagonist ZM241385 (ZM). When 10 μM ZM was added in the mobile phase with theophylline, the breakthrough time shrank to a value close to the one obtained with theophylline alone on empty nanodiscs (Figure 3). This competition experiment confirmed that the interaction between theophylline and AA_{2A}R nanodiscs, observed using the miniaturized FAC system, corresponds to a specific interaction in the orthosteric pocket of the protein.

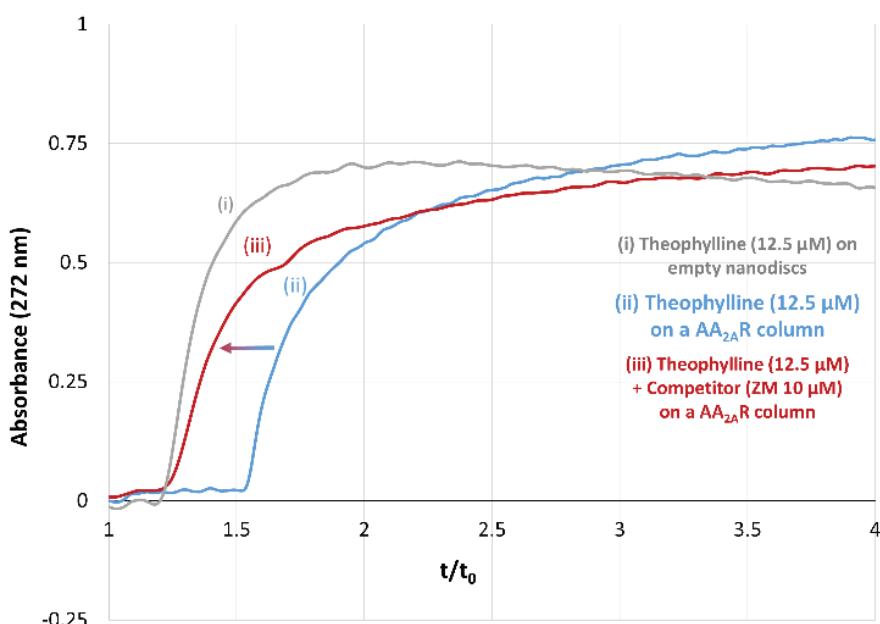


Figure 3. FAC analysis of the competition between theophylline and ZM241385 for the interaction with immobilized AA_{2A}R nanodiscs. Frontal affinity breakthrough curves (X-axis in reduced retention time t/t_0) of a 12.5 μM theophylline solution on (i) a control column with empty nanodiscs; (ii) on the AA_{2A}R-nanodiscs column without competitor; (iii) on the AA_{2A}R-nanodiscs column in presence of 10 μM ZM241385.

3.4. Identification of weak affinity ligands

Finally, the technique was tested for its capacity to identify weak affinity ligands such as fragments, and the possibility to discriminate weak affinity binders from non-binders, a particularly prominent issue with membrane proteins due to the presence of compounds used to maintain them in solution. The FAC strategy hitherto used to validate AA_{2A}R-ligand interactions, and shared by others^{25,55}, relies on the comparison of

the reduced breakthrough times measured on columns grafted with protein over control columns (columns with empty-nanodiscs here). However, using control columns may lead to an overestimation of non-specific interactions due to the absence of the targeted protein, thus resulting in potential false negative signals as was previously suggested²⁵. Since the reduced breakthrough time measured at high ligand concentrations in the presence of AA₂AR is close to the one measured on the control column (Figure 1) an alternative approach relies on the comparison between the reduced breakthrough times for two extreme fragment concentrations on a single column containing the immobilized protein. Nonetheless, since the measures are realized on the same column, this strategy further avoids uncertainties associated with column variability due to the grafting efficacy. In order to determine what those extreme concentrations should be, reduced breakthrough times were simulated for several K_d values and various fragment concentrations (Figure S11). With two experiments carried out at 10 and 1000 μM, the difference in reduced breakthrough times is 10 % (for a K_d value = 250 μM) and considered as the minimum significant difference. For lower K_d values (K_d < 250 μM i.e higher affinity) the difference in reduced breakthrough times measured at 10 and 1000 μM is higher and easy to detect (for example the difference reaches 30% for a K_d value of 100 μM).

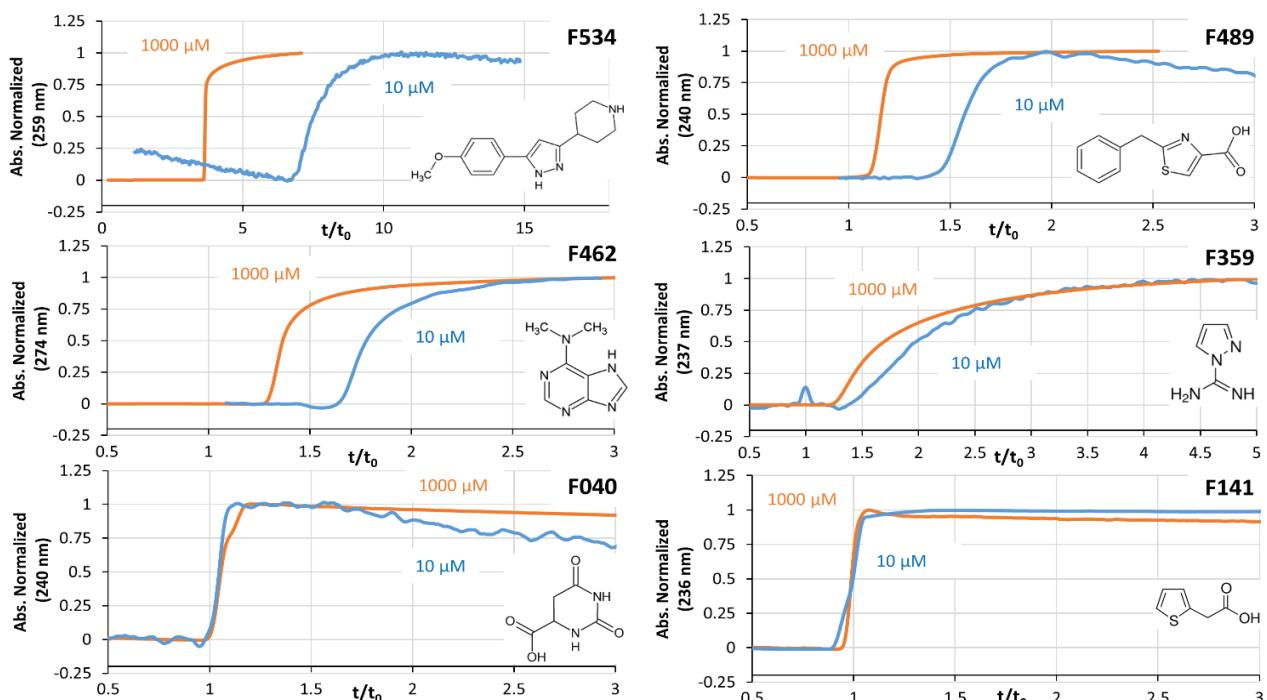


Figure 4. FAC analysis of fragments interaction with immobilized AA₂AR nanodiscs. Frontal affinity breakthrough curves obtained on an AA₂AR-nanodiscs column for several fragments prepared in a 67 mM phosphate pH 7.4 buffer.

This approach was applied to six fragments selected from a published NMR screening carried out on AA₂AR in detergent micelles⁹ (see Figure S4 for compounds structures). Four of them were shown to bind AA₂AR using STD-NMR experiments, while two were shown not to. As illustrated in Figure 4, significant differences

between reduced breakthrough times measured at low and high concentrations were observed for fragments F534, F489, F462 and F359, whereas fragments F040 and F141 displayed identical reduced breakthrough times regardless of the concentration. Consequently, F534, F489, F462 and F359 were identified as ligands of AA_{2A}R while F040 and F141 were identified as non-ligands. These results are in perfect agreement with the previously reported STD-NMR data⁹. Because the higher the reduced breakthrough time discrepancy, the higher the affinity for the target, these FAC experiments also allow a ranking of the ligands according to their increased affinities, starting from F359 than F462 and F489 and F534.

4. CONCLUSION

Here we have shown for the first time that lipid-nanodiscs systems and ultra-miniaturized affinity chromatography can be combined to identify specific small molecule ligands (fragments) that weakly bind to an integral membrane protein. The approach was exemplified using the AA_{2A}R GPCR. Specific and unspecific ligand/receptor interactions were distinguished using empty nanodiscs as a negative control. Competition experiments can be performed to identify the binding pocket of uncharacterized ligands using a reference compound. Weak affinity ligands with K_d smaller than 250 μM should be detected. At last, the applicability of this method was demonstrated with 6 fragments recently identified as ligands or non-ligands of AA_{2A}R. Here, experiments were carried out at two extreme concentrations on a unique affinity column.

Besides being a suitable membrane-mimicking environment for AA_{2A}R, the use of nanodiscs also offers multiple advantages with regards to the grafting procedure. AA_{2A}R is not itself tethered to the stationary phase but through the biotinylated MSP that enables a homogenous oriented immobilization, and the presence of the spacer arm ensures a full accessibility of the binding pocket to small molecules. AA_{2A}R remains full native, as evidenced by the high specific activities obtained. The strong and rapid biotin-streptavidin interaction associated with the UV-monitoring of the grafting step permits the use of the exact amount of grafted protein and a very rapid grafting step. The reduction of both the grafting duration and protein consumption represent two tremendous assets for proteins that are difficult to produce and that present a limited stability. A column contains only 0.6 μg of AA_{2A}R on average (14 pmol). Streptavidin columns can be prepared in advance, stored for several months (4°C) before being grafted with the target of interest.

Key features of the proposed method are (i) the very weak affinity that can be detected against membrane protein, (ii) the unrivalled amount of target consumed (less than in all other screening methods including SPR, the less consuming method⁸) and (iii) the use of purified receptor that limits undesirable interactions with other components of the cell membrane. However, it presents some pitfalls: false positive maybe

detected due to specific interactions with the underlying streptavidin layer and non-specific interactions (inherent to all screening methods) require additional control experiments.

The method reported here is applicable to any membrane protein reconstituted in biotinylated nanodiscs and offers a real potential for FBDD on membrane proteins. Its coupling with mass spectrometry via a nanospray interface, should allow a rapid screening of a library (for a 30 min total analysis time, and considering mixtures of 10-20 compounds, 500 to 1000 compounds should be screened in one day, with a minimal protein consumption and with reduced stability issues).

ASSOCIATED CONTENT

Supplementary methods, results and figures (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* Tel.: +33437423552

E-mail address: claire.demesmay@univ-lyon1.fr

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to the Imaging Center of the IGBMC (Illkirch) for the electron microscopy data.

REFERENCES

- (1) Hauser, A. S.; Attwood, M. M.; Rask-Andersen, M.; Schiöth, H. B.; Gloriam, D. E. Trends in GPCR Drug Discovery: New Agents, Targets and Indications. *Nat Rev Drug Discov* **2017**, *16* (12), 829–842. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.178>.
- (2) Shimada, I.; Ueda, T.; Kofuku, Y.; Eddy, M. T.; Wüthrich, K. GPCR Drug Discovery: Integrating Solution NMR Data with Crystal and Cryo-EM Structures. *Nat Rev Drug Discov* **2018**. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.180>.
- (3) Ghosh, E.; Kumari, P.; Jaiman, D.; Shukla, A. K. Methodological Advances: The Unsung Heroes of the GPCR Structural Revolution. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16* (2), 69–81. <https://doi.org/10.1038/nrm3933>.
- (4) Cooke, R. M.; Brown, A. J. H.; Marshall, F. H.; Mason, J. S. Structures of G Protein-Coupled Receptors Reveal New Opportunities for Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2015**, *20* (11), 1355–1364. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.08.003>.
- (5) Andrews, S. P.; Brown, G. A.; Christopher, J. A. Structure-Based and Fragment-Based GPCR Drug Discovery. *ChemMedChem* **2014**, *9* (2), 256–275. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201300382>.
- (6) Jhoti, H.; Williams, G.; Rees, D. C.; Murray, C. W. The “rule of Three” for Fragment-Based Drug Discovery: Where Are We Now? *Nat Rev Drug Discov* **2013**, *12* (8), 644–644. <https://doi.org/10.1038/nrd3926-c1>.
- (7) Erlanson, D. A.; Fesik, S. W.; Hubbard, R. E.; Jahnke, W.; Jhoti, H. Twenty Years on: The Impact of Fragments on Drug Discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2016**, *15* (9), 605–619. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.109>.
- (8) Renaud, J.-P.; Chung, C.; Danielson, U. H.; Egner, U.; Hennig, M.; Hubbard, R. E.; Nar, H. Biophysics in Drug Discovery: Impact, Challenges and Opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **2016**, *15* (10), 679–698.
- (9) Igonet, S.; Raingeval, C.; Cecon, E.; Pučić-Baković, M.; Lauc, G.; Cala, O.; Baranowski, M.; Perez, J.; Jockers, R.; Krimm, I.; et al. Enabling STD-NMR Fragment Screening Using Stabilized Native GPCR: A Case Study of Adenosine Receptor. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26113-0>.
- (10) Chen, D.; Errey, J. C.; Heitman, L. H.; Marshall, F. H.; IJzerman, A. P.; Siegal, G. Fragment Screening of GPCRs Using Biophysical Methods: Identification of Ligands of the Adenosine A_{2A} Receptor with Novel Biological Activity. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7* (12), 2064–2073. <https://doi.org/10.1021/cb300436c>.
- (11) Congreve, M.; Rich, R. L.; Myszka, D. G.; Figarola, F.; Siegal, G.; Marshall, F. H. Fragment Screening of Stabilized G-Protein-Coupled Receptors Using Biophysical Methods. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2011; Vol. 493, pp 115–136. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381274-2.00005-4>.
- (12) 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. Discovery of B2 Adrenergic Receptor Ligands Using Biosensor Fragment Screening of Tagged Wild-Type Receptor. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4* (10), 1005–1010. <https://doi.org/10.1021/ml400312j>.
- (13) Shepherd, C. A.; Hopkins, A. L.; Navratilova, I. Fragment Screening by SPR and Advanced Application to GPCRs. *Prog. Biophys. Mol. Bio.* **2014**, *116* (2), 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.09.008>.
- (14) Navratilova, I.; Hopkins, A. L. Fragment Screening by Surface Plasmon Resonance. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1* (1), 44–48. <https://doi.org/10.1021/ml900002k>.
- (15) Schiebel, J.; Radeva, N.; Krimmer, S. G.; Wang, X.; Stieler, M.; Ehrmann, F. R.; Fu, K.; Metz, A.; Huschmann, F. U.; Weiss, M. S.; et al. Six Biophysical Screening Methods Miss a Large Proportion of Crystallographically Discovered Fragment Hits: A Case Study. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11* (6), 1693–1701. <https://doi.org/10.1021/acschembio.5b01034>.

- (16) Schiebel, J.; Radeva, N.; Köster, H.; Metz, A.; Krotzky, T.; Kuhnert, M.; Diederich, W. E.; Heine, A.; Neumann, L.; Atmanene, C.; et al. One Question, Multiple Answers: Biochemical and Biophysical Screening Methods Retrieve Deviating Fragment Hit Lists. *ChemMedChem* **2015**, *10* (9), 1511–1521. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500267>.
- (17) Duong-Thi, M.-D.; Meiby, E.; Bergström, M.; Fex, T.; Isaksson, R.; Ohlson, S. Weak Affinity Chromatography as a New Approach for Fragment Screening in Drug Discovery. *Anal. Biochem.* **2011**, *414* (1), 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.02.022>.
- (18) Tsopelas, F.; Tsantili-Kakoulidou, A. Advances with Weak Affinity Chromatography for Fragment Screening. *Expert Opin. Drug Discov.* **2019**, *14* (11), 1125–1135. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1648425>.
- (19) Calleri, E.; Temporini, C.; Caccialanza, G.; Massolini, G. Target-Based Drug Discovery: The Emerging Success of Frontal Affinity Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *ChemMedChem* **2009**, *4* (6), 905–916. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200800436>.
- (20) Ohlson, S.; Duong-Thi, M.-D. Fragment Screening for Drug Leads by Weak Affinity Chromatography (WAC-MS). *Methods* **2018**, *146*, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.01.011>.
- (21) Yuan, X.; Hu, D.; Zhu, W.; Xu, X.; Lu, C. Application of Frontal Affinity Chromatography Combined On-Line with Mass Spectrometry to Screening PAI-1 Inhibitors from Traditional Chinese Medicine. *Anal. Methods* **2012**, *4* (11), 3744–3747. <https://doi.org/10.1039/C2AY25696G>.
- (22) Jiao, Q.; Wang, R.; Jiang, Y.; Liu, B. Study on the Interaction between Active Components from Traditional Chinese Medicine and Plasma Proteins. *Chemistry Central Journal* **2018**, *12* (1), 48. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0417-2>.
- (23) Meiby, E.; Simmonite, H.; le Strat, L.; Davis, B.; Matassova, N.; Moore, J. D.; Mrosek, M.; Murray, J.; Hubbard, R. E.; Ohlson, S. Fragment Screening by Weak Affinity Chromatography: Comparison with Established Techniques for Screening against HSP90. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (14), 6756–6766. <https://doi.org/10.1021/ac400715t>.
- (24) Duong-Thi, M.-D.; Bergström, M.; Fex, T.; Isaksson, R.; Ohlson, S. High-Throughput Fragment Screening by Affinity LC-MS. *J. Biomol. Screen.* **2013**, *18* (2), 160–171. <https://doi.org/10.1177/1087057112459271>.
- (25) Duong-Thi, M.-D.; Bergström, M.; Edwards, K.; Eriksson, J.; Ohlson, S.; To Yiu Ying, J.; Torres, J.; Agmo Hernández, V. Lipodisks Integrated with Weak Affinity Chromatography Enable Fragment Screening of Integral Membrane Proteins. *Analyst* **2016**, *141* (3), 981–988. <https://doi.org/10.1039/C5AN02105G>.
- (26) Moaddel, R.; Wainer, I. W. The Preparation and Development of Cellular Membrane Affinity Chromatography Columns. *Nat Protoc* **2009**, *4* (2), 197–205. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.225>.
- (27) Lundqvist, A.; Lundahl, P. Advantages of Quantitative Affinity Chromatography for the Analysis of Solute Interaction with Membrane Proteins. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **2001**, *49* (1), 507–521. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00192-0](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00192-0).
- (28) Calleri, E.; Temporini, C.; Massolini, G. Frontal Affinity Chromatography in Characterizing Immobilized Receptors. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *54* (5), 911–925. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.11.040>.
- (29) Ding, X.; Cao, Y.; Yuan, Y.; Gong, Z.; Liu, Y.; Zhao, L.; Lv, L.; Zhang, G.; Wang, D.; Jia, D.; et al. Development of APTES-Decorated HepG2 Cancer Stem Cell Membrane Chromatography for Screening Active Components from *Salvia Miltiorrhiza*. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (24), 12081–12089. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02709>.
- (30) Hou, X.; Wang, S.; Zhang, T.; Ma, J.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Lu, W.; He, H.; He, L. Recent Advances in Cell Membrane Chromatography for Traditional Chinese Medicines Analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *101*, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.05.021>.

- (31) Fredriksson, K.; Lottmann, P.; Hinz, S.; Onila, I.; Shymanets, A.; Harteneck, C.; Müller, C. E.; Griesinger, C.; Exner, T. E. Nanodiscs for INPHARMA NMR Characterization of GPCRs: Ligand Binding to the Human A2A Adenosine Receptor. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (21), 5750–5754. <https://doi.org/10.1002/anie.201612547>.
- (32) Bocquet, N.; Kohler, J.; Hug, M. N.; Kusznir, E. A.; Rufer, A. C.; Dawson, R. J.; Hennig, M.; Ruf, A.; Huber, W.; Huber, S. Real-Time Monitoring of Binding Events on a Thermostabilized Human A2A Receptor Embedded in a Lipid Bilayer by Surface Plasmon Resonance. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1848* (5), 1224–1233. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.02.014>.
- (33) Silvia, L.-H.; A, Y. A.; Klaus, G.; Inna, G. Surface Plasmon Resonance Applied to G Protein-Coupled Receptors. *Biomed. Spectrosc. Imaging* **2013**, No. 3, 155–181. <https://doi.org/10.3233/BSI-130045>.
- (34) Trahey, M.; Li, M. J.; Kwon, H.; Woodahl, E. L.; McClary, W. D.; Atkins, W. M. Applications of Lipid Nanodiscs for the Study of Membrane Proteins by Surface Plasmon Resonance. *Curr Protoc Protein Sci* **2015**, *81*, 29.13.1-29.13.16. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps2913s81>.
- (35) Bayburt, T. H.; Sligar, S. G. Membrane Protein Assembly into Nanodiscs. *FEBS Lett.* **2010**, *584* (9), 1721–1727. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.024>.
- (36) Serebryany, E.; Zhu, G. A.; Yan, E. C. Y. Artificial Membrane-like Environments for in Vitro Studies of Purified G-Protein Coupled Receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1818* (2), 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.047>.
- (37) de Lera Ruiz, M.; Lim, Y.-H.; Zheng, J. Adenosine A_{2A} Receptor as a Drug Discovery Target. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (9), 3623–3650. <https://doi.org/10.1021/jm4011669>.
- (38) Müller, C. E.; Jacobson, K. A. Recent Developments in Adenosine Receptor Ligands and Their Potential as Novel Drugs. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808* (5), 1290–1308. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.12.017>.
- (39) Carpenter, B.; Lebon, G. Human Adenosine A2A Receptor: Molecular Mechanism of Ligand Binding and Activation. *Frontiers in Pharmacology* **2017**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00898>.
- (40) Pinna, A. Adenosine A2A Receptor Antagonists in Parkinson's Disease: Progress in Clinical Trials from the Newly Approved Istradefylline to Drugs in Early Development and Those Already Discontinued. *CNS Drugs* **2014**, *28* (5), 455–474. <https://doi.org/10.1007/s40263-014-0161-7>.
- (41) Franco, R.; Navarro, G. Adenosine A2A Receptor Antagonists in Neurodegenerative Diseases: Huge Potential and Huge Challenges. *Frontiers in Psychiatry* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.00068>.
- (42) Sek, K.; Mølck, C.; Stewart, G.; Kats, L.; Darcy, P.; Beavis, P. Targeting Adenosine Receptor Signaling in Cancer Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sciences* **2018**, *19* (12), 3837. <https://doi.org/10.3390/ijms19123837>.
- (43) Chen, J.-F.; Eltzschig, H. K.; Fredholm, B. B. Adenosine Receptors as Drug Targets — What Are the Challenges? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12* (4), 265–286. <https://doi.org/10.1038/nrd3955>.
- (44) Hartmann, L.; Kugler, V.; Wagner, R. Expression of Eukaryotic Membrane Proteins in Pichia Pastoris. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1432*, 143–162. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3637-3_10.
- (45) Denisov, I. G.; Grinkova, Y. V.; Lazarides, A. A.; Sligar, S. G. Directed Self-Assembly of Monodisperse Phospholipid Bilayer Nanodiscs with Controlled Size. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (11), 3477–3487. <https://doi.org/10.1021/ja0393574>.
- (46) Hansen, R. W.; Wang, X.; Golab, A.; Bornert, O.; Oswald, C.; Wagner, R.; Martinez, K. L. Functional Stability of the Human Kappa Opioid Receptor Reconstituted in Nanodiscs Revealed by a Time-Resolved Scintillation Proximity Assay. *PLoS ONE* **2016**, *11* (4), e0150658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150658>.
- (47) Bruchet, A.; Dugas, V.; Mariet, C.; Goutelard, F.; Randon, J. Improved Chromatographic Performances of Glycidyl Methacrylate Anion-Exchange Monolith for Fast Nano-Ion Exchange Chromatography. *J. Sep. Sci.* **2011**, *34*, 2079–2087. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100180>.

- (48) Faye, C.; Chamieh, J.; Moreau, T.; Garnier, F.; Faure, K.; Dugas, V.; Demesmay, C.; Vandenabeele-Trambouze, O. In Situ Characterization of Antibody Grafting on Porous Monolithic Supports. *Anal. Biochem.* **2012**, *420* (2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.09.016>.
- (49) Lecas, L.; Randon, J.; Berthod, A.; Dugas, V.; Demesmay, C. Monolith Weak Affinity Chromatography for Mg-Protein-Ligand Interaction Study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *166*, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.01.012>.
- (50) André, N.; Cherouati, N.; Prual, C.; Steffan, T.; Zeder-Lutz, G.; Magnin, T.; Pattus, F.; Michel, H.; Wagner, R.; Reinhart, C. Enhancing Functional Production of G Protein-Coupled Receptors in Pichia Pastoris to Levels Required for Structural Studies via a Single Expression Screen. *Protein Sci* **2006**, *15* (5), 1115–1126. <https://doi.org/10.1110/ps.062098206>.
- (51) Fredholm, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Klotz, K. N.; Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53* (4), 527–552.
- (52) Duong-Thi, M.-D.; Bergström, M.; Fex, T.; Svensson, S.; Ohlson, S.; Isaksson, R. Weak Affinity Chromatography for Evaluation of Stereoisomers in Early Drug Discovery. *J. Biomol. Screen.* **2013**, *18* (6), 748–755. <https://doi.org/10.1177/1087057113480391>.
- (53) Matsuda, R.; Li, Z.; Zheng, X.; Hage, D. S. Analysis of Multi-Site Drug–Protein Interactions by High-Performance Affinity Chromatography: Binding by Glimepiride to Normal or Glycated Human Serum Albumin. *J. Chromatogr A* **2015**, *1408*, 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.012>.
- (54) Bing, T.; Chang, T.; Qi, C.; Zhang, N.; Liu, X.; Shangguan, D. Specific Interactions between Adenosine and Streptavidin/Avidin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (23), 7052–7055. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.09.088>.
- (55) Conrad, M. L.; Moser, A. C.; Hage, D. S. Evaluation of Indole-Based Probes for High-Throughput Screening of Drug Binding to Human Serum Albumin: Analysis by High-Performance Affinity Chromatography. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32* (8), 1145–1155. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800567>.

Ultra-miniaturized weak affinity chromatography for ligand identification of nanodiscs-solubilized G-protein coupled receptors – Supplementary material

Lucile Lecas[#], Lucie Hartmann[&], Lydia Caro[&], Sarah Mohamed-Bouteben[&], Claire Raingeval[#], Isabelle Krimm[#], Renaud Wagner[&], Vincent Dugas[#], Claire Demesmay^{#*}

[#] Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 VILLEURBANNE, France

[&] Plateforme IMPReSs, CNRS UMR7242, Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Illkirch, France

PREPARATION OF A GENERIC COLUMN

BIOFUNCTIONALIZATION WITH TARGET PROTEIN

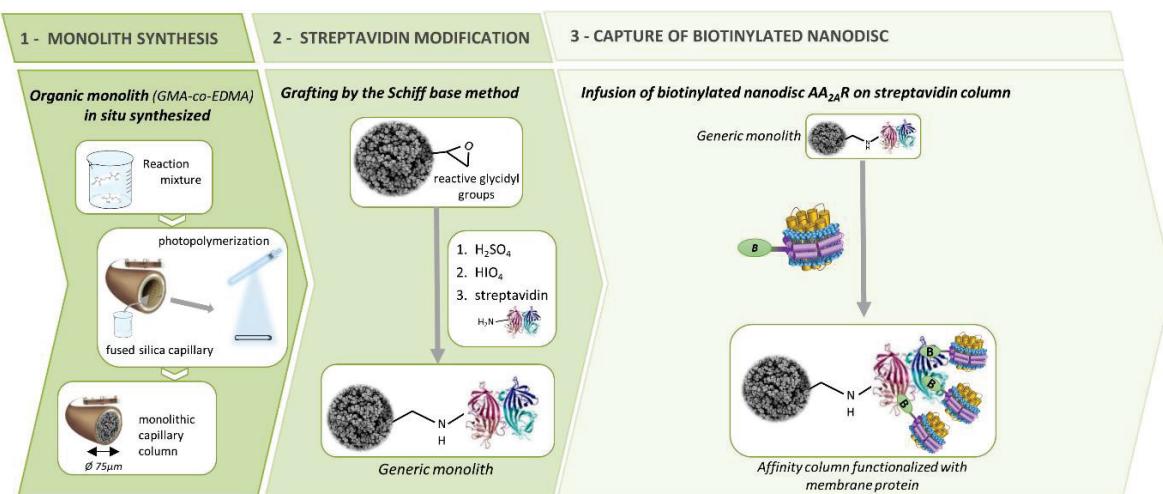


Figure S1. Schematic illustration of the of the affinity columns preparation. Step 1 is the synthesis of GMA-co-EDMA monolith inside UV-transparent fused silica capillary pre-activated with γ -MAPS. The reaction mixture is loaded inside the capillary column. Synthesis is triggered by UV-irradiation. Step 2 is the functionalization of the monolithic capillary column with streptavidin. Glycidyl groups are hydrolyzed and reduced to afford aldehyde reactive species on the monolith surface. Streptavidin is immobilized through Schiff-base reaction. The last step (step 3) consist in flushing the biotinylated nanodisc solution through the column. This step is monitored by UV absorbance and is stopped as soon as nanodiscs have saturated the streptavidin sites and reach the detector at the end of the column.

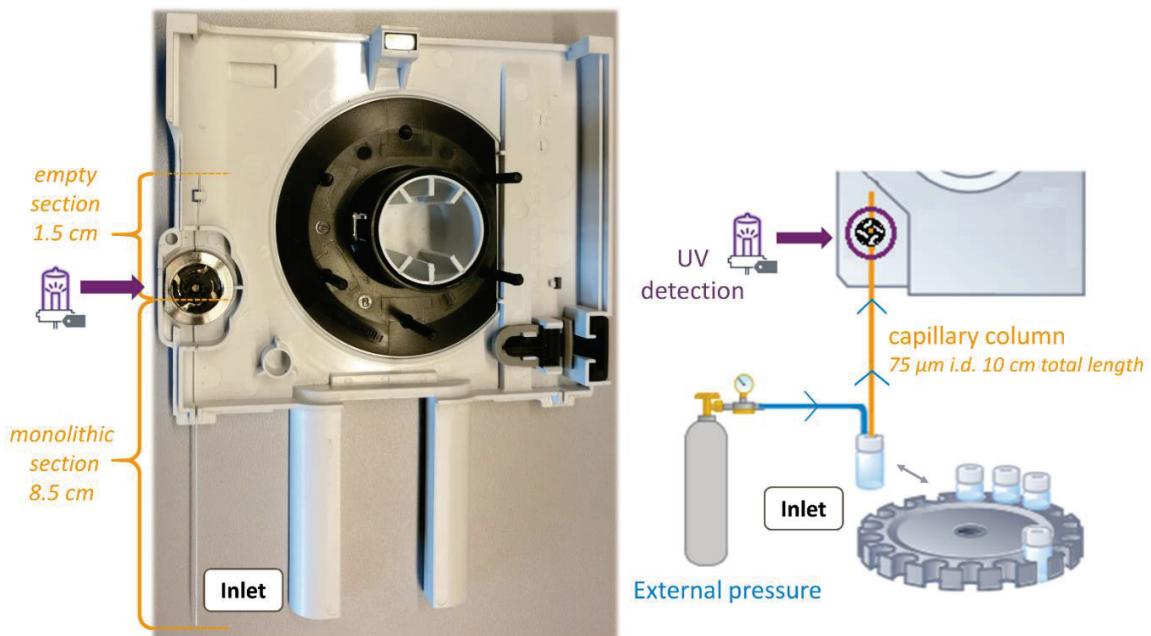


Figure S2. Representation of the CE system adapted to capillary affinity chromatography. Left: picture of the CE cartridge showing the monolithic capillary column connected to the in-line UV detection interface. Right: schematic representation of the CE system set-up for nano-LC experiments.

Frontal affinity chromatography experiments were done using a capillary electrophoresis device. To do this the monolithic column was installed at the outlet of the 7100 CE Agilent system and directly connected to the UV detection system (at 8.5 cm from the column inlet). The CE system allows (i) loading vial containing liquid to be flow (ii) immersing the inlet of the capillary column into the liquid (iii) applying gas pressure to force the liquid to flow through the column and (iv) detect at the column outlet. So we adapt the use of a standard capillary electrophoresis system to do nano-LC experiments in a fully automated way.

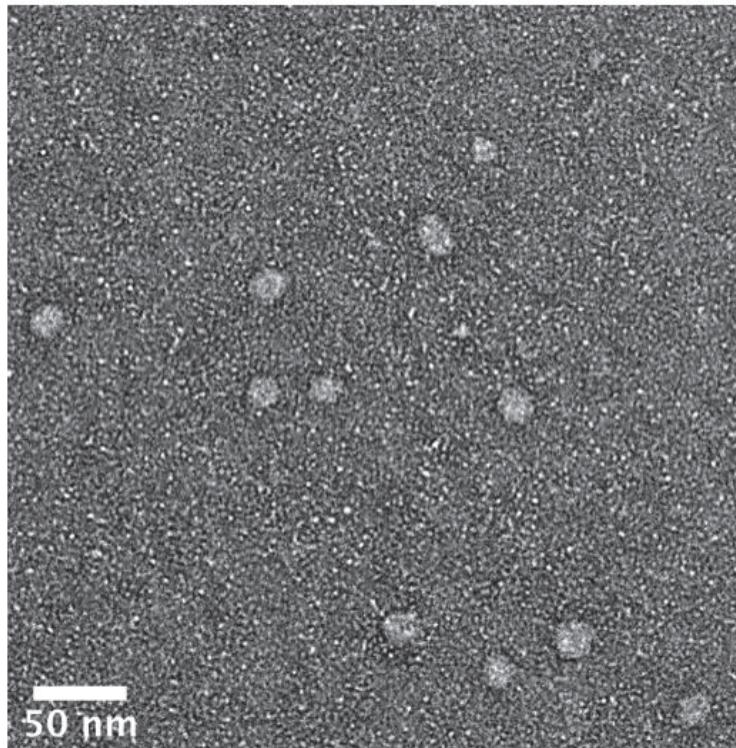


Figure S3. Electron microscopy analysis of AA₂AR nanodiscs. Observation of a negatively-stained 0.2 ng·μL⁻¹ nanodisc sample. The particles present a 14 nm diameter on average.

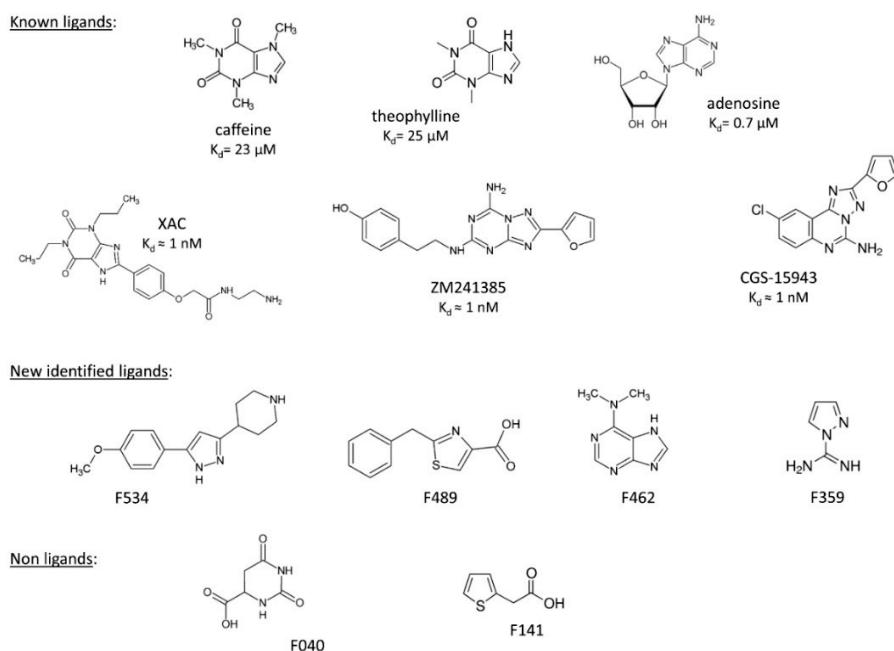


Figure S4. Compounds structures and affinities for AA₂AR

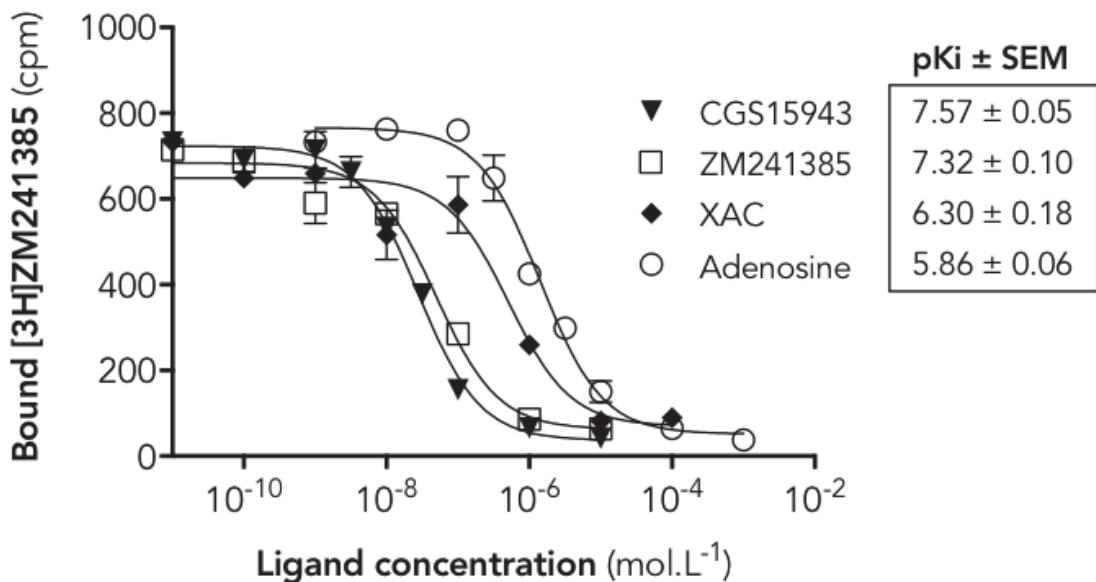


Figure S5. Competition ligand-binding analysis of AA_{2A}R nanodiscs. Evaluation of the inhibition profile of [³H]ZM241385 with increasing concentrations of four specific compounds. The corresponding nonlinear fits and $pK_i \pm SEM$ values were calculated with the GraphPad Prism7 software on the basis of a one-site model.

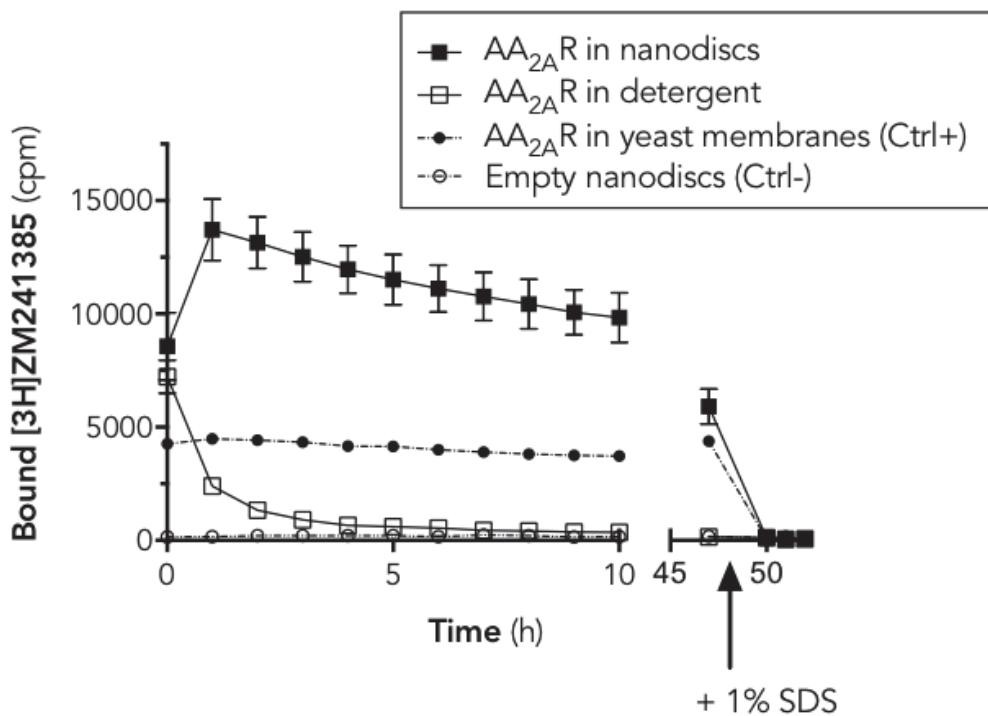


Figure S6. Ligand-binding stability of AA_{2A}R nanodiscs evaluated by SPA. Binding of [³H]ZM241385 was followed in real time, after one hour of incubation at room temperature to equilibrate ligand binding, for different samples immobilized on streptavidin-coated yttrium silicate SPA beads. AA_{2A}R in lipid discs appear stable for a much longer period of time than a biotinylated-AA_{2A}R purified in detergent used as a control.

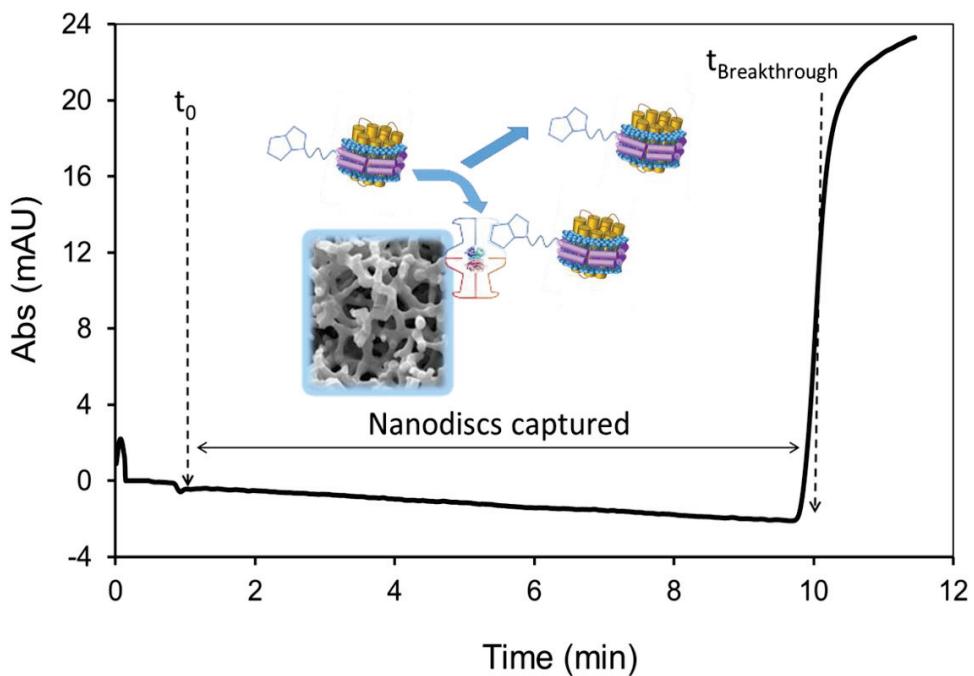


Figure S7. UV monitoring (@280 nm) of the capture of biotinylated AA₂AR nanodiscs by the streptavidin monolith. AA₂AR nanodiscs (3.3 μ M) solubilized in 67 mM phosphate buffer pH=7.4; Streptavidin monolith $l=8.5$ cm i.d. 75 μ m; applied pressure 12MPa (0.14 cm.s⁻¹); $t_{capture}=t_{breakthrough}-t_0=9$ min; amount of nanodiscs captured = 11 pmol

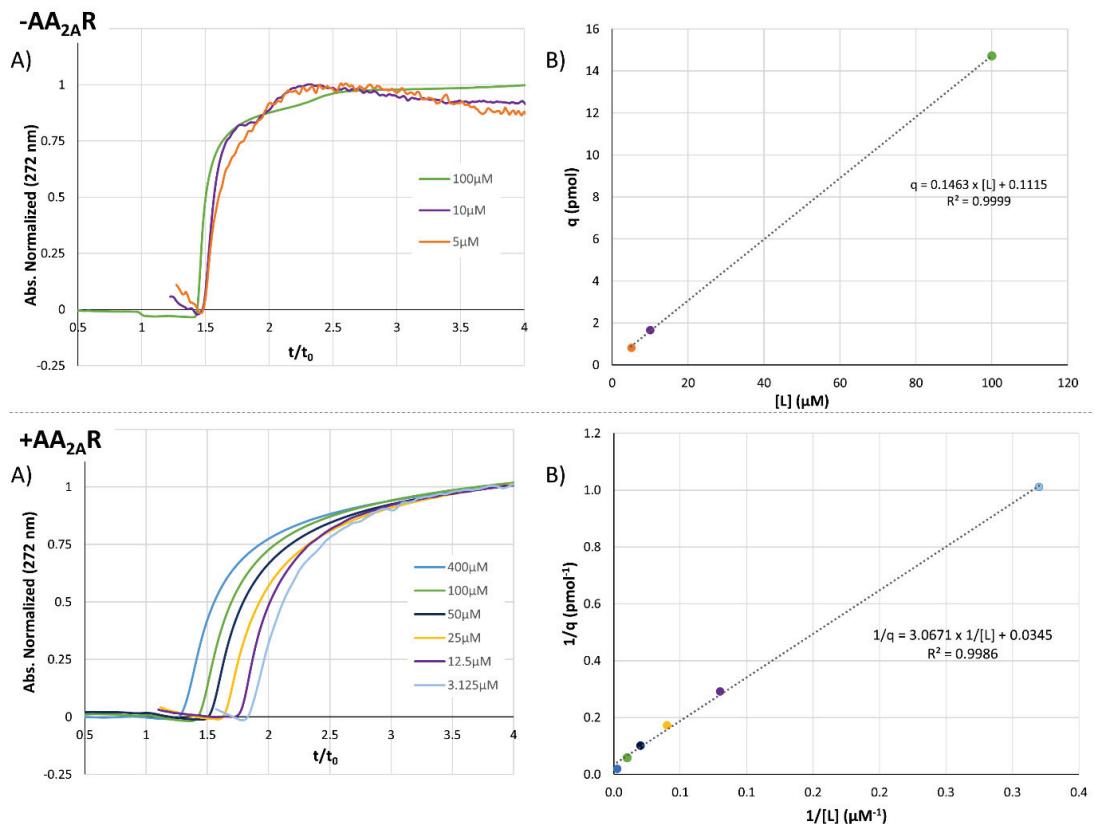


Figure S8. -AA_{2A}R : empty nanodiscs

(A) Frontal affinity breakthrough curves (reduced time axis) on an empty-nanodiscs column. Solute: caffeine at various concentrations in phosphate buffer 67 mM pH=7.4. Column dimensions: $l=8.5$ cm i.d.75 μm ; applied pressure 12 MPa (0.14 cm.s⁻¹)

(B) Plot of captured quantities (q) versus ligand concentrations [L] and on an empty-nanodiscs column accounting for non-specific interactions.

As observed for theophylline, the reduced breakthrough time was not modified upon caffeine concentration and was equal to 1.5 thus revealing low non-specific interactions (A). As expected, the amount of caffeine captured on empty nanodiscs column varied proportionally to its concentration (B) which confirms non-specific interactions.

+AA_{2A}R: AA_{2A}R-nanodiscs

(A) Frontal affinity breakthrough curves (X-axis in reduced retention time t/t_0) on an AA_{2A}R-nanodiscs column. Solute: caffeine at various concentrations in phosphate buffer 67 mM pH=7.4. Column dimensions: $l=8.5$ cm i.d.75 μm ; applied pressure 12 MPa (0.14 cm.s⁻¹)

(B) double reciprocal plot $1/q$ versus $1/[L]$ on an AA_{2A}R-nanodiscs column accounting for a one-site model.

As observed for theophylline, the reduced breakthrough time increases upon caffeine concentration thus revealing specific interactions (A). The $1/q$ versus $1/[L]$ plot is linear (B) and thus typical of one-site interaction.

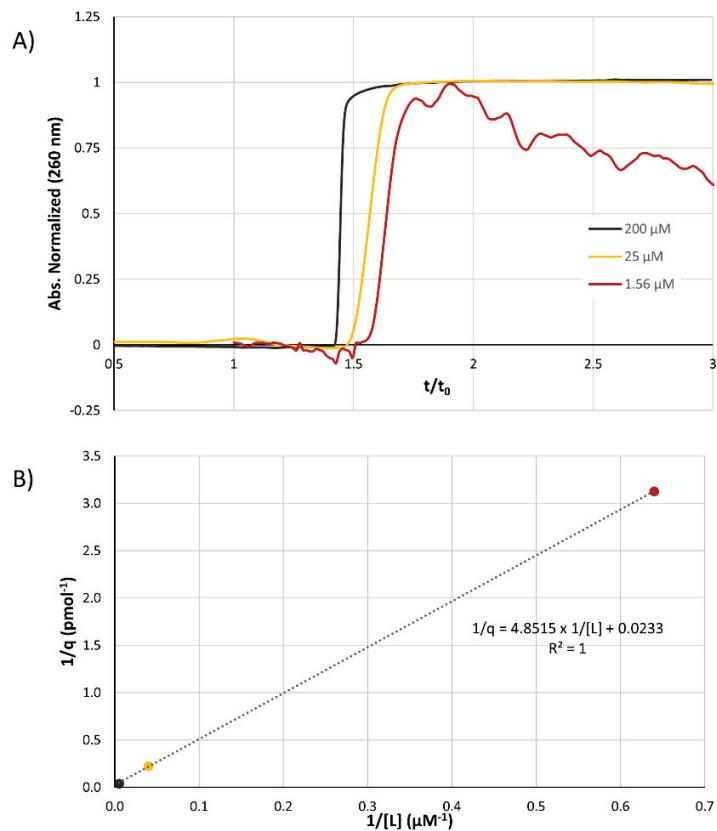


Figure S9. (A) Frontal affinity breakthrough curves (reduced time axis) on a streptavidin column. Solute: Adenosine at various concentrations in phosphate buffer 67 mM pH=7.4. Column dimensions : $l=8.5$ cm i.d.75 μ m; applied pressure 12 MPa (0.14 cm.s⁻¹)

(B) Plot of captured quantities (q) versus ligand concentrations [L] and on an empty-nanodiscs column accounting for specific interactions on a 1-site model.

On a streptavidin column (with no grafted nanodiscs), the reduced breakthrough time still increased as the adenosine concentration was decreased (A) which confirms specific interactions with streptavidin. The double reciprocal $1/q$ versus $1/[L]$ plot (B) is linear, typical of one-site interaction between adenosine and streptavidin. K_d was estimated around 125 μ M and B_{act} around 25 pmol which is consistent with the precedent results and literature.

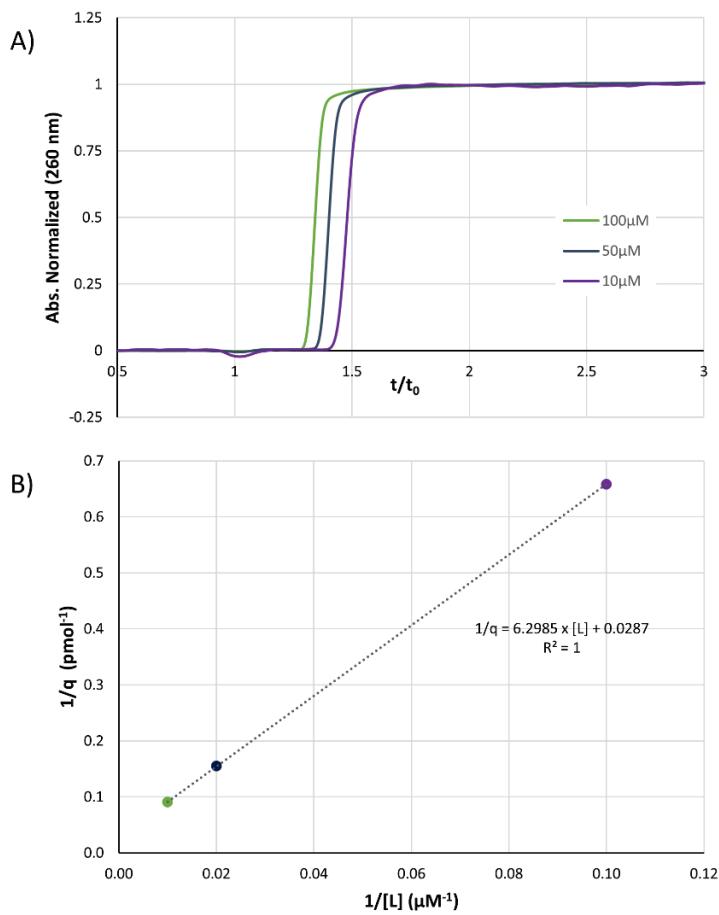


Figure S10. (A) Frontal affinity breakthrough curves (reduced time axis) on an empty-nanodiscs column.
Solute: Adenosine at various concentrations in phosphate buffer 67 mM pH=7.4. Column dimensions:
 $l=8.5$ cm i.d. $75\text{ }\mu\text{m}$; applied pressure 12 MPa (0.14 cm.s^{-1})

(B) Double reciprocal plot $1/q$ versus $1/[L]$ on an empty nanodiscs column accounting for specific interactions on a one-site model.

As adenosine showed a two-site interaction model, we wanted to confirm the second specific interaction site, besides AA_{2AR}.

The reduced breakthrough time of adenosine increased as the adenosine concentration was decreased even in the absence of AA_{2AR} (A) which confirms the presence of specific interactions with another site (most probably streptavidin). The double reciprocal $1/q$ versus $1/[L]$ plot (B) is linear, typical of one-site interaction. Values were estimated at $K_d=220\pm8\text{ }\mu\text{M}$ and $B_{act}=35\pm1\text{ pmol}$ which are in the same order of magnitude as the values determined with the 2-site model ($K_d=417\pm21\text{ }\mu\text{M}$ and $B_{act}=43\pm8\text{ pmol}$) in presence of AA_{2AR}.

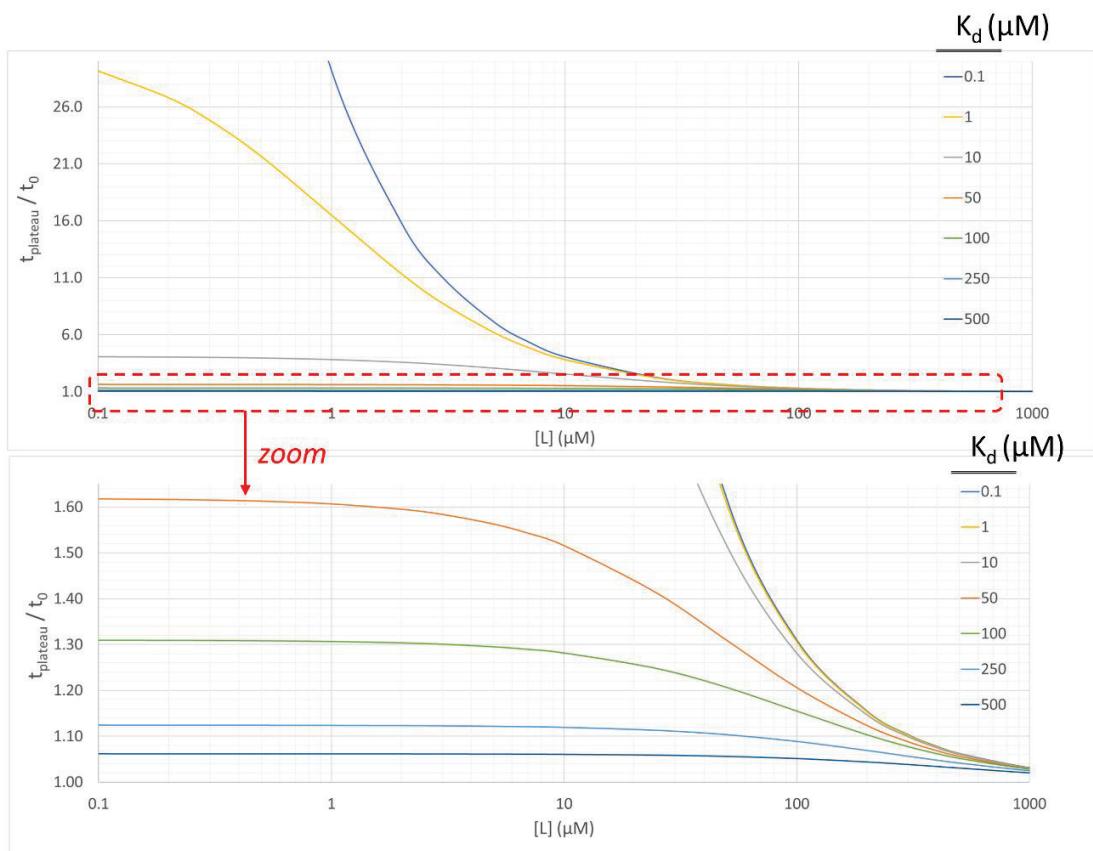


Figure S11. Mathematical modeling of reduced breakthrough times for different K_d values at several ligand concentrations considering a total amount of active sites B_{act} around 10 pmol/column.

Figure S11. presents the plots of the reduced breakthrough times versus the ligand concentration, for various K_d values and for a constant number of active sites ($B_{act} = 10$ pmol/column).

The difference between reduced breakthrough times measured at two ligand concentrations depends on the number of active sites (B_{act}), on the K_d value and on the two concentrations considered. For a given B_{act} , the higher the K_d value (the lower the affinity), the lower the observable reduced breakthrough time difference. To maximize this difference in reduced breakthrough times for weak affinity interactions (the most challenging to detect), the two ligand concentrations have to be carefully chosen. With two experiments carried out at 10 and 1000 μM , the difference in reduced breakthrough time is 10 % (for a K_d value = 250 μM) and considered as the minimum significant difference. For lower K_d values ($K_d < 250 \mu\text{M}$ i.e higher affinity) the difference in reduced breakthrough time is higher (for example the difference reaches 30 % for a K_d value of 100 μM). If non-specific interactions increase the reduced breakthrough time at a given concentration, the difference in reduced breakthrough time measured at two different ligand concentrations is not affected (provided that non-specific interactions are weak).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] V. Katritch, V. Cherezov, R.C. Stevens, Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53 (2013) 531–556. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923>.
- [2] B.C. Heng, D. Aubel, M. Fusenegger, An overview of the diverse roles of G-protein coupled receptors (GPCRs) in the pathophysiology of various human diseases, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 1676–1694. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.017>.
- [3] J.U. Bowie, Stabilizing membrane proteins, *Current Opinion in Structural Biology*. 11 (2001) 397–402. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00223-2](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00223-2).
- [4] C. Ma, F.M. Marassi, D.H. Jones, S.K. Straus, S. Bour, K. Strebler, U. Schubert, M. Oblatt-Montal, M. Montal, S.J. Opella, Expression, purification, and activities of full-length and truncated versions of the integral membrane protein Vpu from HIV-1, *Protein Sci.* 11 (2002) 546–557.
- [5] N. Vaidehi, R. Grisshammer, C.G. Tate, How Can Mutations Thermostabilize G-Protein-Coupled Receptors?, *Trends Pharmacol. Sci.* 37 (2016) 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.09.005>.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le Fragment-Based Drug Discovery est une approche utilisée pour développer de nouveaux médicaments à partir de petites molécules appelées fragments, qui n'ont pour la plupart qu'une faible affinité pour la protéine cible. La combinaison et/ou l'évolution de fragments affins permet ensuite d'obtenir un candidat médicament de forte affinité et spécificité pour la cible thérapeutique. L'objectif de ces travaux de thèse était de **développer une nouvelle technique de criblage de fragments, capable de détecter des interactions de faible affinité et applicable aux protéines membranaires**. En effet, l'implication de ces protéines dans de nombreux processus physiologiques en fait des cibles à fort potentiel pour de nouveaux médicaments. C'est dans ce contexte que nous avons décidé de proposer la chromatographie de faible affinité à échelle miniaturisée comme nouvelle approche de criblage de fragments sur protéine membranaire.

Dans ce manuscrit, nous avons dans un premier temps présenté le contexte général de ce projet, en détaillant notamment l'approche FBDD et plus précisément l'étape de criblage et les principales techniques biophysiques utilisées. Cette étude nous a permis de déterminer les paramètres critiques pour une méthode de criblage, d'évaluer les points forts et les limitations des méthodes existantes pour ainsi fixer nos objectifs quant au développement de la chromatographie de faible affinité.

Ensuite, nous avons présenté la chromatographie de faible affinité et ses deux modes d'élution, l'analyse zonale et l'analyse frontale. L'analyse frontale est souvent utilisée pour caractériser les colonnes et les interactions ligand-protéine (quantité de sites actifs sur la colonne, constante d'affinité et mode d'interaction) tandis que l'analyse zonale permet d'évaluer rapidement la constante d'affinité d'un ligand sur une colonne précédemment caractérisée ainsi que de déterminer les paramètres thermodynamiques et cinétiques de l'interaction. Dans les deux cas, des essais de compétition permettent d'obtenir des informations sur le site d'interaction du ligand sur la protéine. Grâce à cette partie, nous avons pu situer la chromatographie de faible affinité par rapport aux autres techniques de criblage en se basant sur les critères primordiaux propres à cette application. La chromatographie de faible affinité permet de détecter de faibles affinités (K_d de l'ordre du μM au mM) et la consommation en protéine cible est réduite par son immobilisation ainsi que par la réutilisation des colonnes, suffisamment stables pour réaliser une campagne de criblage. La rapidité des analyses et la possibilité d'étudier les fragments en mélange permettent d'atteindre un débit de criblage intéressant avec quelques centaines voire milliers de fragments par jour. Il existe de nombreux autres avantages, propres à cette technique : la mise en œuvre est simple avec l'utilisation d'un équipement classique (HPLC ou nano-LC), les fragments sont étudiés à

faible concentration ce qui limite les problèmes de solubilité ainsi que leur consommation et les tests sont réalisés en conditions physiologiques, favorables à la stabilité de la protéine. Enfin, le pouvoir séparatif de la chromatographie permet d'envisager l'étude de matrices complexes (produits naturels, mélanges réactionnels non-purifiés, etc...). *Tous ces arguments permettent de mettre en avant le fait que la chromatographie de faible affinité apparaît comme une technique attrayante pour le drug discovery, notamment pour le criblage de fragments.*

Dans le chapitre suivant, nous avons présenté le développement de colonnes d'affinité miniaturisées. Une étude bibliographique sur les différents types de colonnes, de phases stationnaires et voies de biofonctionnalisation nous a guidés pour mettre en place notre stratégie. L'objectif était alors de développer des colonnes capillaires, avec une phase stationnaire monolithique, bien adaptée à cette échelle puisque le monolithe est synthétisé, greffé et caractérisé *in-situ*. Nous avons alors exploré deux types de monolithes (le premier à base de silice et le second à base d'un co-polymère organique GMA-co-EDMA) ainsi que trois voies de biofonctionnalisation (le greffage direct époxy-amine, la méthode de la base de Schiff et l'utilisation de l'interaction streptavidine biotine). Ces premiers essais ont été réalisés sur une protéine soluble considérée comme modèle dans la littérature : l'albumine de sérum humain ou HSA. Le monolithe de silice a été rapidement écarté car il ne permet pas de greffer davantage de protéine que dans la littérature malgré une surface spécifique beaucoup plus élevée et il génère d'importantes interactions non-spécifiques. Les monolithes organiques biofonctionnalisés par les méthodes de la base de Schiff et streptavidine-biotine ont quant à eux donné les meilleurs résultats : des interactions non-spécifiques négligeables, une quantité de protéine immobilisée par unité de volume importante (environ 100 pmol/ μ L) et des taux d'activité élevés (80%). *In fine* l'approche streptavidine-biotine a été retenue car le greffage de la protéine cible sur les colonnes streptavidine est rapide (quelques dizaines de minutes contre une douzaine d'heures par la méthode de la base de Schiff) et peut être suivi par détection UV en sortie de colonne, permettant d'évaluer en temps réel la quantité de protéine capturée et de ne consommer aucun excès. Quelques μ g de protéine suffisent alors à préparer une colonne d'affinité. Ces spécificités rendent cette voie de greffage envisageable pour des protéines peu stables et disponibles en faible quantité comme les protéines membranaires. De plus, les colonnes streptavidine sont des colonnes génériques qui peuvent être fonctionnalisées par n'importe quelle protéine biotinylée et sont suffisamment stables pour être préparées à l'avance et stockées plusieurs mois à +4°C. Nous avons ainsi été en mesure de greffer une autre protéine soluble, le domaine N-terminal de la HSP90, et de mesurer les constantes d'affinité de différents ligands, de la dizaine à la centaine de μ M. Ainsi, *nous avons développé une approche à échelle ultra miniaturisée (colonnes de moins de 1 μ L de volume) permettant la détection de faibles affinités. Une voie de greffage innovante permet d'appliquer cette technique à n'importe quelle protéine biotinylée sans aucune modification et procure également un contrôle qualité*

sur les colonnes ainsi préparées, ce qui représente un atout majeur dans le milieu pharmaceutique. Enfin, une campagne de criblage pourrait être réalisée avec seulement 1 µg de protéine, ouvrant la possibilité d'étudier des protéines extrêmement délicates à produire comme les protéines membranaires, actuellement au cœur des programmes de recherche.

La dernière partie de ce travail de thèse a porté sur l'ouverture de la méthodologie développée aux protéines membranaires. Dans un premier temps, une étude bibliographique nous a permis d'appréhender l'intérêt mais aussi la complexité de ces cibles spécifiques : les protéines membranaires sont délicates à produire et à purifier et doivent être stabilisées dans un milieu similaire à leur environnement naturel, c'est-à-dire la bicouche lipidique de la membrane cellulaire. Ce sont également des protéines dynamiques qui ont besoin d'une certaine liberté conformationnelle pour conserver leurs propriétés. À travers cette étude nous avons pu également recenser les précédents travaux en chromatographie d'affinité sur protéines membranaires, avec différents types de colonnes et conditions de stabilisation des protéines. Les premières stratégies ont consisté à conserver la protéine dans son environnement lipidique naturel, à travers l'immobilisation de cellules entières ou de fragments de cellule mais la consommation cellulaire est alors très élevée et la complexité de ce milieu induit d'importantes interactions secondaires non-spécifiques. Par la suite, des structures biomimétiques (protéoliposome, lipodisque, nanodisque) ont été développées pour mimer les propriétés de la membrane tout en travaillant avec la protéine native et purifiée. Dans l'objectif de développer des colonnes biofonctionnalisées avec une protéine membranaire native et purifiée, stable en utilisation dynamique et générant un minimum d'interactions non-spécifiques, nous avons décidé de travailler avec une protéine insérée dans un nanodisque. La protéine se trouve alors au centre d'un assemblage de phospholipides, maintenu par une protéine amphiphile (MSP). L'accès au site actif de la protéine est assuré et le greffage sur la colonne streptavidine se fait via un tag biotine sur la MSP. Notre choix s'est ensuite porté sur le récepteur A_{2A} de l'adénosine (AA_{2A}R), protéine largement étudiée qui reste néanmoins une cible thérapeutique à fort potentiel. AA_{2A}R insérée en nanodisques a ainsi été immobilisée sur des colonnes capillaires streptavidine : le greffage est réalisé en quelques dizaines de minutes seulement, ne consommant qu'une dizaine de µL d'une solution de protéine au µM, ce qui revient à greffer une dizaine de pmol par colonne, soit moins de 0,5 µg dans le cas d'AA_{2A}R. L'activité de la protéine après immobilisation a été démontrée par analyse frontale avec des ligands connus (les antagonistes théophylline et caféine et l'agoniste adénosine), donnant un taux d'activité d'environ 50 %. Le site actif est donc accessible aux ligands. De plus, le fait que la protéine soit en mesure d'interagir de façon spécifique avec des antagonistes et des agonistes prouve qu'elle dispose d'une liberté conformationnelle suffisante au sein de la structure biomimétique. La modélisation des résultats a permis la détermination de la stoechiométrie des interactions et des expériences de compétition ont confirmé que l'interaction de

la théophylline a lieu au niveau du site orthostérique de la protéine. Enfin, nous avons été en mesure d'étudier des fragments et de discriminer les ligands des non-ligands d'AA_{2A}R. Pour la première fois, l'association de la chromatographie de faible affinité et de nanodisques a été réalisée, permettant l'étude d'interactions entre des ligands et une protéine membranaire native et purifiée. La préparation de colonnes d'affinité requiert moins d'1 µg de protéine cible grâce à l'extrême miniaturisation de la chromatographie. La conservation de l'activité de la protéine immobilisée a été confirmée, avec de surcroît une importante liberté conformationnelle permettant l'interaction à la fois avec des ligands agonistes et antagonistes. Le potentiel considérable de cette approche pour le FBDD a été une fois de plus mis en avant avec l'identification de ligands parmi des fragments.

Pour la suite, si l'on souhaite encore davantage étendre la gamme d'affinité visée et détecter de plus faibles affinités, on peut imaginer d'autres voies de greffage permettant d'amplifier la quantité de protéine greffée. Une stratégie envisageable serait d'éloigner la streptavidine du support monolithique afin de diminuer l'encombrement stérique et ainsi de favoriser la capture de plusieurs nanodisques biotinylés par molécule de streptavidine (la streptavidine étant un tétramère, elle peut capturer jusqu'à quatre biotines). L'idée serait alors de greffer un composé servant de bras espaceur sur le monolithe, portant une biotine à son extrémité. La streptavidine pourrait alors être simplement capturée par infusion et la quantité serait déterminée avant de greffer la protéine cible. Il existe des réactifs commerciaux comme le H₂N-PEG-biotine ou le NHS-PEG-biotine (Figure c-1).

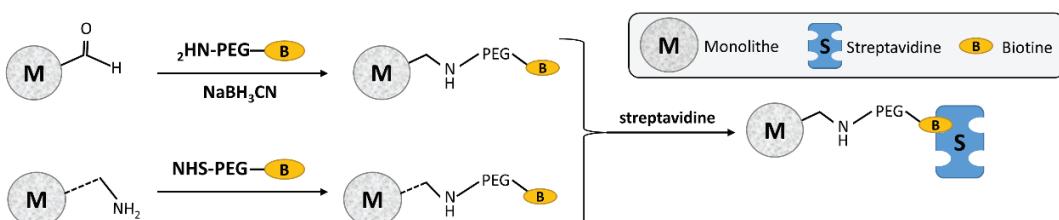


Figure c-1. Alternatives de préparation des colonnes génériques streptavidine.

Concernant le premier réactif, il pourrait être greffé par la méthode de la base de Schiff (aldéhyde-amine) directement avec le protocole déjà mis en place pour la streptavidine, ce serait donc le plus simple à tester. Cependant, le second réactif pourrait être plus intéressant. En préparant un monolithe portant des amines primaires en surface, le greffage du réactif NHS-PEG-biotine se ferait rapidement (entre 30 min et 4 h habituellement [1]), en évitant les étapes de réaction aldéhyde-amine (12 h minimum) et la réduction des aldéhydes résiduels (2h au NaBH₄). Il faudrait alors évaluer pour les deux approches la quantité de nanodisques immobilisée et la comparer à la quantité obtenue avec le protocole actuel.

Concernant les applications, la suite du projet vise à développer le couplage à la spectrométrie de masse afin de réaliser du criblage de fragments à haut débit. Une source nanospray sera adaptée à l'échelle de travail tandis qu'un analyseur à temps de vol (TOF) offrira une résolution élevée, indispensable pour différencier les fragments de masses proches (Figure c-2).

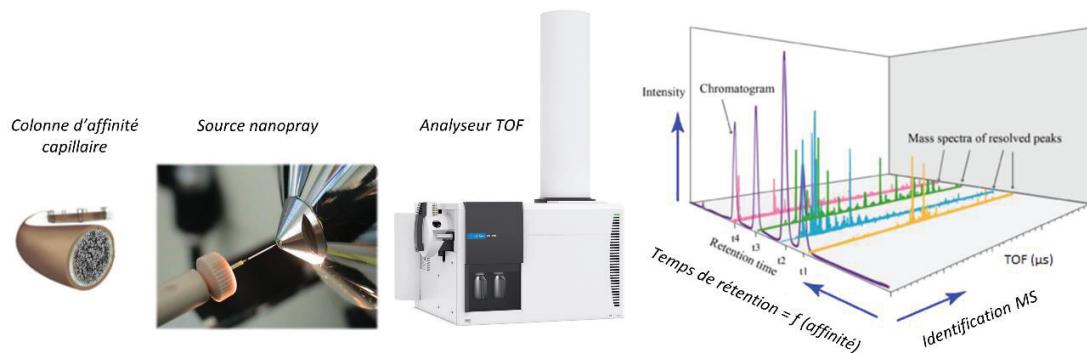


Figure c-2. Représentation du couplage de la chromatographie de faible 'affinité avec la spectrométrie de masse, avec l'utilisation d'une source nanospray et d'un analyseur à temps de vol (TOF) et résultat 2D de l'analyse d'un mélange de composés.

La composition des mélanges de fragments doit être bien réfléchie (masses, mode d'ionisation, concentrations, ...) afin d'optimiser le criblage. L'analyse zonale est le mode d'élution le plus approprié au criblage avec l'injection d'un créneau d'échantillon, permettant une analyse rapide de plusieurs fragments. Il est nécessaire de disposer d'une colonne contrôle pour corriger la rétention due aux interactions non-spécifiques. Le modèle des nanodisques vides ne semble pas représenter un contrôle négatif satisfaisant, comme il a déjà été souligné dans la littérature [2]. Il serait alors intéressant de préparer des colonnes sur lesquelles la protéine serait désactivée, ou dont le site actif serait bloqué par un ligand très affin (sous réserve de disposer d'un tel composé). Dans le cas contraire, il serait possible de travailler avec des nanodisques contenant une autre protéine que la protéine cible d'intérêt, au risque que certains fragments interagissent avec cette autre protéine. Si la protéine étudiée possède déjà au moins un ligand connu, des expériences de compétition permettraient de confirmer la spécificité des interactions avec les fragments identifiés comme hits lors d'un premier criblage.

Enfin, la chromatographie de faible affinité pourrait être utilisée pour une variété d'applications, en plus du criblage de fragments. En restant dans le processus FBDD, l'évolution des fragments hits en composés plus affins implique des étapes de synthèse et de caractérisation. Les méthodes de référence actuelles (RMN et SPR principalement) nécessitent de travailler avec des produits purifiés, impliquant de longues étapes dont il serait possible de s'affranchir grâce au pouvoir séparatif de la chromatographie de faible affinité en analyse zonale. Ensuite, outre les différents exemples présentés dans ce manuscrit (détermination de constantes d'affinité, des paramètres cinétiques et thermodynamiques, ...), l'étude de

potentiels effets allostériques pourrait également être réalisée par chromatographie de faible affinité, comme par exemple l'influence des ions sodium sur les interactions des ligands agonistes et des antagonistes de AA_{2A}R [3]. Les applications peuvent même aller au-delà de la faible affinité. En effet, cet outil pourrait servir à étudier des mélanges complexes de chimie combinatoire afin d'identifier les molécules affines grâce encore une fois à son avantage singulier qui permet d'analyser des mélanges complexes non-purifiés. L'étude de produits naturels serait également intéressante, on trouve déjà quelques exemples dans la littérature notamment en médecine traditionnelle chinoise (TCM) [4,5]. Nous pourrions également évaluer la possibilité de réaliser les analyses en milieux complexes comme le sang pour une meilleure représentation des phénomènes biologiques [6].

À terme, si le large potentiel de cet outil est avéré, on pourrait alors imaginer le développement d'un système d'analyse intégré (appelé Micro Total Analytical System (μ TAS) ou Laboratoire sur puce (Lab-on-chip)), comprenant à la fois colonne(s) et source nanospray.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Thermo Fisher Scientific, Amine-Reactive Crosslinker Chemistry, (n.d.). <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/amine-reactive-crosslinker-chemistry.html> (accessed October 4, 2019).
- [2] M.-D. Duong-Thi, M. Bergström, K. Edwards, J. Eriksson, S. Ohlson, J.T.Y. Ying, J. Torres, V.A. Hernández, Lipodisks integrated with weak affinity chromatography enable fragment screening of integral membrane proteins, *Analyst.* 141 (2016) 981–988. doi:10.1039/C5AN02105G.
- [3] H. Gutiérrez-de-Terán, A. Massink, D. Rodríguez, W. Liu, G.W. Han, J.S. Joseph, I. Katritch, L.H. Heitman, L. Xia, A.P. IJzerman, V. Cherezov, V. Katritch, R.C. Stevens, The Role of a Sodium Ion Binding Site in the Allosteric Modulation of the A_{2A} Adenosine G Protein-Coupled Receptor, *Structure.* 21 (2013) 2175–2185. doi:10.1016/j.str.2013.09.020.
- [4] Q. Jiao, R. Wang, Y. Jiang, B. Liu, Study on the interaction between active components from traditional Chinese medicine and plasma proteins, *Chemistry Central Journal.* 12 (2018) 48. doi:10.1186/s13065-018-0417-2.
- [5] X. Yuan, D. Hu, W. Zhu, X. Xu, C. Lu, Application of frontal affinity chromatography combined on-line with mass spectrometry to screening PAI-1 inhibitors from traditional Chinese medicine, *Anal. Methods.* 4 (2012) 3744–3747. doi:10.1039/C2AY25696G.
- [6] D.S. Hage, A. Jackson, M.R. Sobansky, J.E. Schiel, M.J. Yoo, K.S. Joseph, Characterization of drug-protein interactions in blood using high-performance affinity chromatography, *J Sep Sci.* 32 (2009) 835–853. doi:10.1002/jssc.200800640.

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXE 1 : ÉTUDE DE L'OXYDATION DES DIOLS EN ALDÉHYDES SUR MONOLithe ORGANIQUE GMA-CO-EDMA

1. OBJECTIFS

L'objectif de cette partie est d'étudier la cinétique d'oxydation par l'acide périodique des fonctions diols du monolithe en aldéhydes. Le suivi de la transformation des ions IO_4^- en IO_3^- permet de suivre l'avancement de la réaction tandis que la quantification des ions IO_3^- permet d'accéder à la quantité de fonctions aldéhyde formées. Dans un premier temps, un étalonnage des ions IO_3^- a été réalisé pour définir la gamme de linéarité. Ensuite, la cinétique de réaction a été suivie par électrophorèse capillaire pour déterminer la quantité de réactif nécessaire, le temps idéal de réaction ainsi que pour quantifier les fonctions aldéhyde formées.

2. RÉACTIFS

2.1. Monolithe organique à base de glycidylacrylate

Synthèse en batch, puis ouverture des fonctions époxyde par l'acide sulfurique (H_2SO_4 1 M, sur une nuit, puis rinçage à l'eau jusqu'à pH neutre), échantillon d'environ exactement 100 mg.

2.2. Solution d'acide périodique

Solution à ~ 120 mM en périodate de sodium :

NaIO_4 : 512 mg

HNO_3 : 600 μL

Eau : 16 mL

Puis le pH est ajusté à 5,5 avec une solution de LiOH saturée (~ 5 mL ajoutés)

2.3. Standards IO_3^-

Étalons préparés à partir d'iodate de potassium KIO_3 , solution mère à 30 mM

2.4. Électrolyte

Tampon acétate 78 mM, pH 4,5

CH_3COONa : 212,28 mg

Eau : 20 mL

Le pH est ajusté à l'acide acétique.

3. ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

Électrophorèse Agilent G1600

Tube capillaire vide (diamètre 75 µm, longueur 35 cm)

Injection : 25 mbar, 3s

Tension négative : -12 kV à 0,1 min

Détection : 214 nm

4. ÉTALONNAGE

Dans un premier temps on réalise un étalonnage des ions IO_3^- .

concentration (mM)	tr (min)	Hauteur du pic	Surface du pic	Surface corrigée
0,15	4,711	1,2	3,7	0,79
0,3	4,853	2,1	6,6	1,36
0,6	5,115	3,8	12,2	2,39
1,5	4,694	10,6	32,6	6,95
3	4,598	21,6	65,9	14,33
3	4,576	22,8	68,3	14,93
4,5	4,641	32,2	101,5	21,87
6	4,607	44,5	134,9	29,28
12	4,563	83,8	255,4	55,97
15	4,554	99,2	314,8	69,13
18	4,477	113,3	373,8	83,49
24	4,468	137,1	486,6	108,91
30	4,708	149,7	593,7	126,10

Tableau 1. Récapitulatif des données d'étalonnage des ions IO_3^-

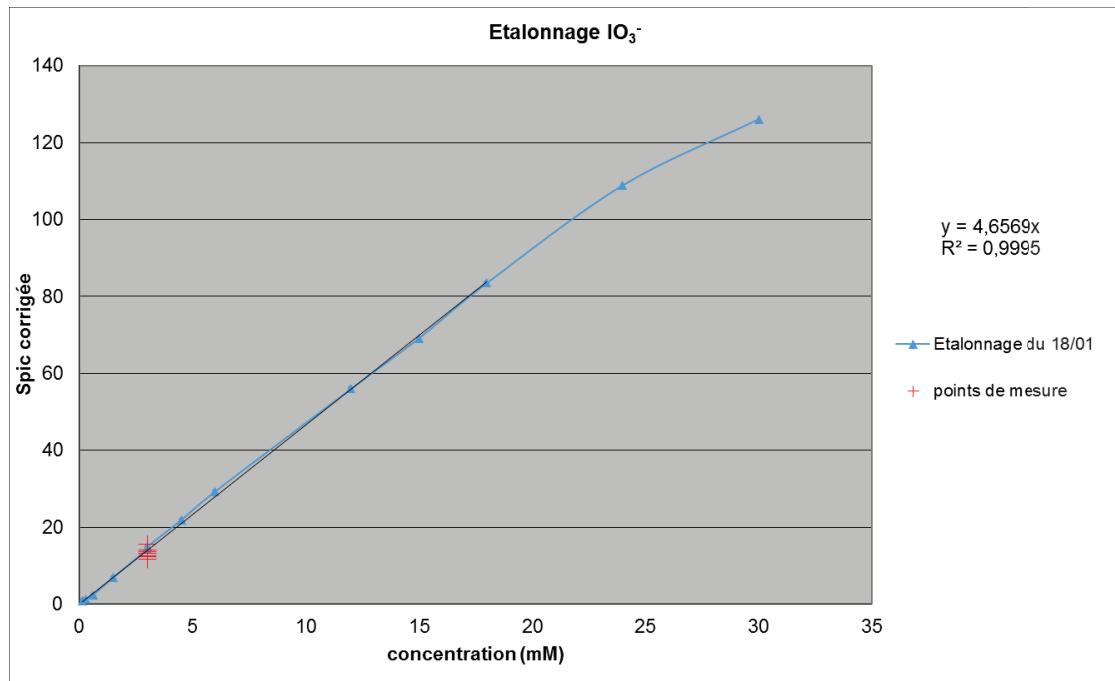


Figure 1. Droite d'étalonnage des ions IO_3^-

La surface corrigée varie de façon linéaire avec la concentration en IO_3^- pour des concentrations inférieures à 18 mM. Des points de vérification sont réalisés ensuite le jour de chaque essai (en rouge).

5. ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE D'OXYDATION SUR UN ÉCHANTILLON DE MONOLITHE

5.1. Préparation

$$m_{\text{monolithe}} = 101,1 \text{ mg}$$

$$V_{\text{acide périodique}} = 1,6 \text{ mL}$$

L'échantillon de monolithe est pesé directement dans un tube eppendorf de 2 mL puis l'acide périodique est ajouté à t_0 . Le tube est ensuite agité au thermomixeur à 900 rpm.

5.2. Prise d'échantillon

A chaque temps de prise d'échantillon, le tube est centrifugé (2 minutes, 13000 rpm) puis 50 μL du surnageant sont prélevés et dilués dans 450 μL d'électrolyte (**dilution 1/10** pour l'analyse).

5.3. Analyse

Chaque échantillon est immédiatement analysé par électrophorèse capillaire, où les ions IO_4^- et IO_3^- sont observés. L'apparition de l'espèce IO_3^- indique la quantité d'aldéhyde formée tandis que le suivi de la quantité d' IO_4^- permet de vérifier l'excès de réactif.

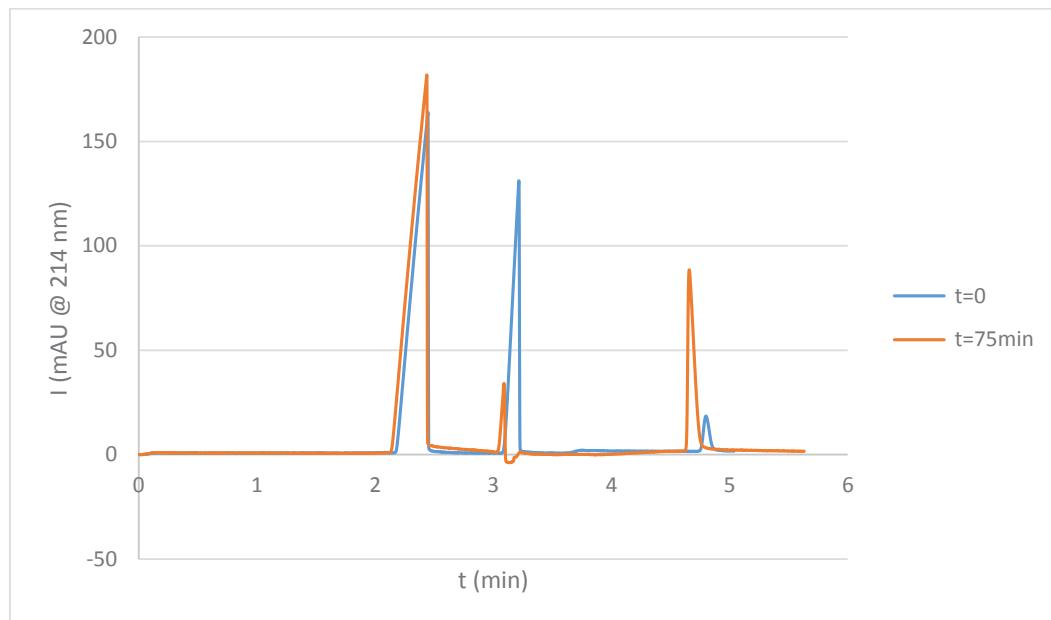


Figure 2. Électrophérogramme du suivi de la transformation des ions IO_4^- en IO_3^- en 75 minutes.

temps (min)	periodate IO_4^-			iodate IO_3^-				
	tr (min)	Spic	Spic corrigée	tr (min)	Spic	Spic corrigée	Spic*10	Spic corrigée
0	3,343	390,6	116,8	4,914	20,6	4,2	206	42
15	3,357	289,4	86,2	5,084	83,2	16,4	832	164
35	3,374	238,6	70,7	5,197	106,8	20,6	1068	206
50	3,344	218,1	65,2	5,083	113,8	22,4	1138	224
75	3,35	193,9	57,9	5,092	121,1	23,8	1211	238
120	3,262	149,6	45,9	4,974	137,2	27,6	1372	276
150	3,269	158,4	48,5	4,976	149,2	30,0	1492	300

Tableau 2. Récapitulatif des données du suivi de l'oxydation des diols par l'acide périodique.

NB : Les surfaces corrigées des pics d' IO_3^- sont bien dans la gamme de linéarité du dosage.

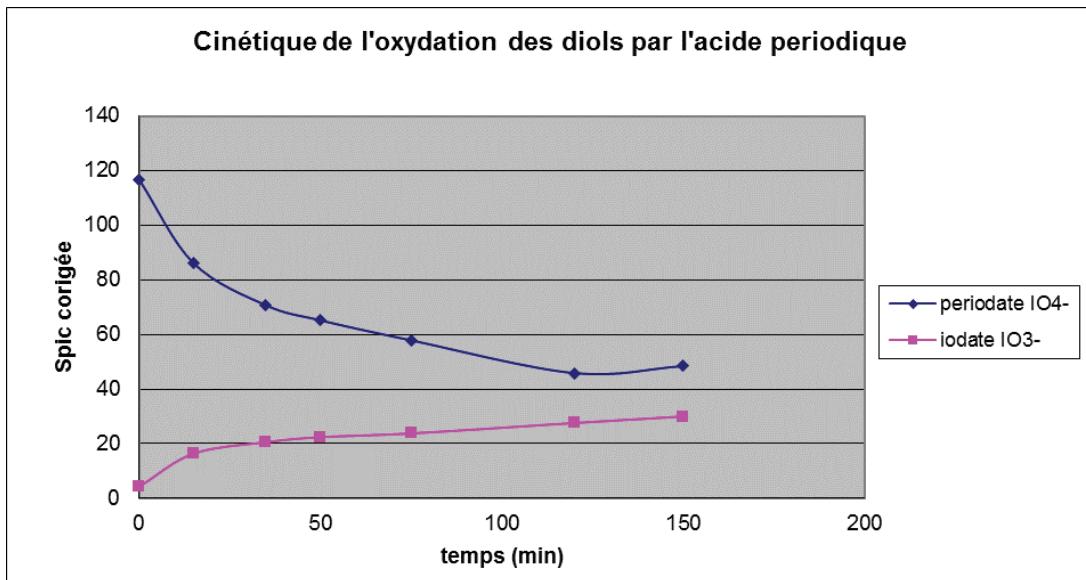


Figure 3. Suivi de la quantité d'ions IO_3^- et IO_4^- en fonction du temps

La majorité des ions IO_3^- se forme en **environ une heure**, la quantité continue cependant d'augmenter lentement ensuite.

5.4. Détermination de la quantité d'aldéhydes formée et de l'excès de réactif

- Quantité d' IO_4^- introduite
Acide périodique

NaIO_4	512,5 mg
HNO_3	0,6 mL
eau	16 mL
LiOH	5,27 mL
V_{tot}	21,87 mL
$V_{\text{utilisé}}$	1,6 mL

$$[\text{NaIO}_4] = \frac{m\text{NaIO}_4}{V_{\text{tot}}} = \frac{512,5}{21,87} = 23,4 \text{ g.L}^{-1} \quad \text{ou encore} \quad [\text{NaIO}_4] = \frac{23,4}{213,89} = 109,6 \text{ mM}$$

et $n\text{IO}_4^- = C \times V = 109,6 \times 1,6 \cdot 10^{-3} = 0,175 \text{ mmol}$ introduites au départ.

- Quantité d' IO_3^- formée
Pente de la droite d'étalonnage : 4,6569
 $S_{\text{pic max}} :$ 300

S_{pic} max normalisée pour 100 mg : 296,6

$[IO_3^-] = \frac{296,6}{4,6569} = 63,7 \text{ mM}$ et $nIO_3^- = [IO_3^-] \times V_{\text{utilisé}} = 63,7 \times 1,6 \cdot 10^{-3} = 0,102 \text{ mmol}$ pour 100 mg de monolithe. La quantité d'acide périodique introduite au départ est donc suffisante pour réaliser l'oxydation.

- Quantité d'aldéhyde formée

$$n_{\text{aldéhyde}} = 1,020 \text{ mmol.g}^{-1} \text{ de monolithe}$$

6. SYNTHÈSE DES RÉSULTATS

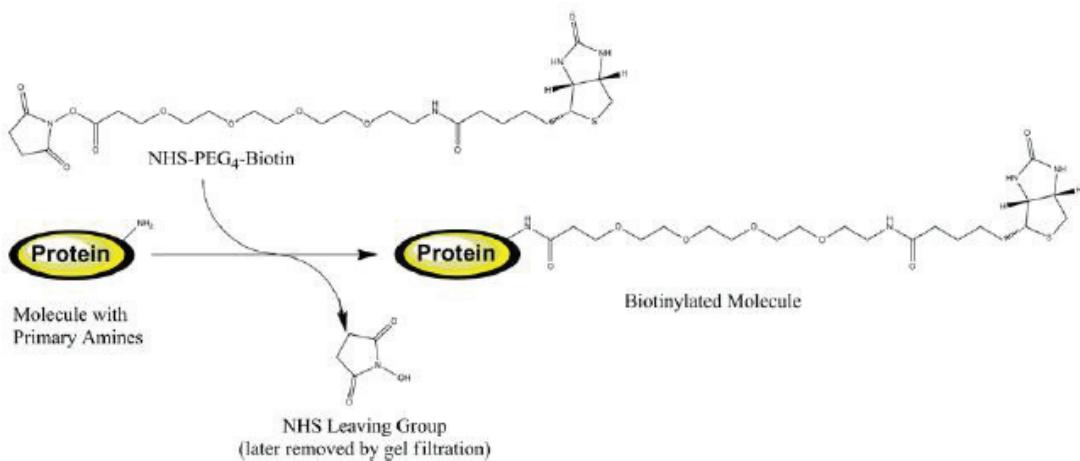
Cette étude a été réalisée sur plusieurs échantillons, voici la synthèse des résultats obtenus :

$n_{\text{aldéhyde moyen pour 1 g de monolithe}}$	1,07 mmol
écart-type	0,08 mmol
n	4

L'étape d'oxydation des fonctions diols en aldéhydes sur les colonnes monolithiques sera donc réalisée en **1 h** à température ambiante sous un flux d'acide périodique à $\sim 120 \text{ mM}$ en périodate de sodium.

ANNEXE 2 : BIOTINYULATION DE LA HSA

Référence : Thermo - EZ-Link NHS-PEG₄-Biotinylation Kit N°21455



1. PROTOCOLE

Cf. Instructions Thermo

1.1. Calculs

- Calcul de la quantité de NHS-PEG₄-biotine à introduire pour avoir un excès de 20 par rapport à la protéine (ratio recommandé) :

$$mL \text{ protein} \times \frac{mg \text{ protein}}{mL \text{ protein}} \times \frac{mmol \text{ protein}}{mg \text{ protein}} \times \frac{20 \text{ mmol biotin}}{mmol \text{ protein}} = mmol \text{ biotin}$$

- Calcul du volume de solution de NHS-PEG₄-biotine à 20 mM à ajouter :

$$mmol \text{ biotin} \times \frac{589 \text{ mg}}{mmol \text{ biotin}} \times \frac{170 \mu L}{2,0 \text{ mg}} = \mu L \text{ biotin solution}$$

- Application numérique :

Pour 1 mL de solution de HSA (66 kDa) à 2 mg/mL :

$$1 \text{ mL HSA} \times \frac{2 \text{ mg HSA}}{1 \text{ mL HSA}} \times \frac{1 \text{ mmol HSA}}{67\,000 \text{ mg HSA}} \times \frac{20 \text{ mmol biotin}}{1 \text{ mmol HSA}} = 5,97 \cdot 10^{-4} \text{ mmol biotin}$$

$$5,97 \cdot 10^{-4} \text{ mmol biotin} \times \frac{589 \text{ mg}}{mmol \text{ biotin}} \times \frac{170 \mu L}{2,0 \text{ mg}} \sim 30 \mu L \text{ de solution de biotine}$$

1.2. Réaction de biotinylation

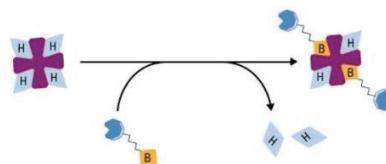
- Préparer une solution de HSA à 2 mg/mL
- Faire le spectre de cette solution

- Ajouter 170 µL d'eau dans un eppendorf contenant 2 mg de NHS-PEG₄-biotine et mélanger avec la pipette par aspiration et refoulement.
- Ajouter 30 µL de la solution de NHS-PEG₄-biotine à 20 mM dans 1 mL
- Laisser incuber pendant 2 h dans la glace (ou entre 30 min et 1 h à température ambiante)

1.3. Eliminer l'excès de biotine

- Préparer une colonne de dessalage : agiter la colonne pour l'homogénéiser puis casser la partie inférieure et la placer dans un tube de récupération de 15mL
- Centrifuger à 1000xg pendant 2 min
- Équilibrer la colonne en ajoutant 2,5 mL de PBS sur la résine puis centrifuger à nouveau à 1000xg pendant 2 min. Jeter ce qui s'est écoulé et recommencer l'opération 2 à 3 fois.
- Placer la colonne dans un nouveau tube de récupération puis déposer l'échantillon de protéine directement au centre de la résine. Laisser l'échantillon s'absorber puis centrifuger à 1000xg pendant 2 min.

1.4. Test HABA – Mesure du niveau d'incorporation de biotine



L'avidine se lie au HABA et forme un complexe de couleur orange. La biotine ayant une affinité plus forte pour l'HABA va casser les complexes HABA-avidine et former de nouveaux complexes HABA-biotine incolores qui vont donc faire diminuer l'absorbance de la solution.

- Préparation du réactif : 2 mg d'avidine + 120 µL de HABA + 3,88 mL de PBS
- Mesurer l'absorbance à 500 nm de 450 µL de ce réactif ($0,9 < A_{500} < 1,3$)
- Ajouter 50 µL de la HSA biotinylée et mélanger
- Mesurer l'absorbance à 500 nm de la solution. (Noter la valeur lorsque la mesure reste stable au moins 15 secondes)

1.5. Calcul de la quantité de biotine par HSA

Calc#1 : concentration de protéine biotinylée en mmol/mL

$$\text{mmol HSA per mL} = \frac{\text{HSA concentration } (\frac{\text{mg}}{\text{mL}})}{\text{MW of HSA } (\frac{\text{mg}}{\text{mmol}})} = \text{Calc#1}$$

Calc#2 : changement d'absorbance à 500nm :

$$\Delta A_{500} = (0,9 \times A_{500} HA) - (A_{500} HAB) = \text{Calc#2}$$

Calc#3 : concentration de biotine en mmol par mL de mélange réactionnel :

$$\frac{\text{mmol biotin}}{\text{mL reaction mixture}} = \frac{\Delta A_{500}}{34\,000} = \frac{\text{Calc#2}}{34\,000} = \text{Calc#3}$$

Calc#4 : mmol de biotine par mmol de HSA :

$$\frac{\text{mmol per mL biotin in reaction mixture} \times 10}{\text{mmol per mL HSA in original sample}} = \frac{\text{Calc#3} \times 10}{\text{Calc#1}} = \text{Calc#4}$$

2. BIOTINYLATIONS & TESTS

Biotinylation #1. 03/05/2017

Biotinylation de 1 mL de HSA à 2 mg/mL avec un excès de 20 en biotine. Réaction : 2 h dans la glace.

Test HABA-Avidine

A₅₀₀ H/A=0,987

A₅₀₀ H/A/B=0,750

$$\text{Calc 4} = \frac{(0,9 \times 0,987 - 0,750) \times 10}{34\,000 \times 2 / 67\,000} = 1,35 \text{ mmol biotine/mmol HSA}$$

Avec un excès de 20 en biotine, le taux de biotinylation de la HSA est de 1,35 mmol de biotine/mmol de HSA, ce qui est satisfaisant.

Biotinylation #2. 08/06/2017

Nouvelle biotinylation (1) de 1 mL de HSA à 2 mg/mL avec un excès de 20 en biotine. Réaction : 2 h dans la glace. Colonne de dessalage neuve.

Test HABA-Avidine

A₅₀₀ H/A=0,909

A₅₀₀ H/A/B=0,800

Calculs

$$\text{Calc#1} = \frac{2}{67\,000} = 3,10^{-5} \text{ mmol/mL}$$

$$\text{Calc#2} = (0,9 \times 0,909) - 0,800 = 0,0181$$

$$\text{Calc#3} = \frac{0,0181}{34\,000} = 5,32 \cdot 10^{-7} \text{ mmol/mL}$$

$$\text{Calc 4} = \frac{5,32 \cdot 10^{-7} \times 10}{3,10^{-5}} = 0,177 \text{ mmol biotine/mmol HSA}$$

Le taux de biotinylation déterminé est très faible. Une nouvelle biotinylation (2) est donc relancée, dans les mêmes conditions, en utilisant la même colonne de dessalage.

Test HABA-Avidine

A₅₀₀ H/A=0,984

A₅₀₀ H/A/B=0,860

$$Calc\#4 = 0,25 \text{ mmol biotine} / \text{mmol HSA}$$

Ici encore le taux de biotinylation est très faible. Les deux solutions de HSA biotinylée sont réunies et 1 mL est prélevé, auquel 30 µL de NHS-PEG₄-biotine sont ajoutés. On laisse cette nouvelle réaction incuber 45 min à température ambiante sous agitation (thermomix 900rpm).

$$Calc\#4 = \frac{(0,9 \times 0,950 - 0,530) \times 10}{34\,000 \times 2 / 67000} = 3,18 \text{ mmol biotine} / \text{mmol HSA}$$

Le taux de biotinylation paraît cette fois très élevé mais lorsqu'on fait le spectre UV de la solution on ne retrouve pas de pic à 280 nm (caractéristique de la HSA). Cette valeur n'est donc pas significative puisque la concentration en protéine est fausse. Le spectre de la solution restante de HSA (résultat des biotinylations (1) et (2) combinés) est aussi réalisé, et cette solution ne semble pas contenir de protéine. Différents tests devront alors être réalisés au niveau de la colonne de dessalage pour résoudre ce problème.

Tests des colonnes

- ♦ Passage de la HSA

On prépare une solution à 2 mg/mL de HSA (utilisation de la HSA essentially FA free) dans le PBS.

Solution mesurée (09/06/17 Test colonne HSA1)	Absorbance	
	230nm	280nm
HSA 2mg/mL	>2,50	1,03
HSA 2mg/mL (dilué 1/10)	1,04	0,15
HSA après passage sur la colonne de dessalage (centrifugation 2 min à 1000xg)	0,81	0,12
Rinçage 1 (2,5 mL de PBS)	2,02	0,39

Il semblerait que la HSA reste piégée dans la colonne mais qu'elle est récupérée lors du premier rinçage au PBS. Le même test est effectué avec la HSA pure (FA free) :

Solution mesurée (09/06/17 Test colonne HSA2)	Absorbance	
	230nm	280nm
HSA 2 mg/mL	2,35	0,916
HSA après passage sur la colonne de dessalage (centrifugation 2 min à 1000xg)	1,72	0,35
Rinçage 1 (2,5 mL de PBS)	2,11	0,57
Rinçage 2 (2,5 mL de PBS)	0,20	0,01
Rinçage 3 (2,5 mL de PBS)	0,05	0,02

A nouveau la HSA est majoritairement restée dans la colonne lors de la centrifugation, mais en prenant en compte la dilution, la majorité de la protéine est récupérée après un rinçage de 2,5mL de PBS. Les rinçages suivants ne semblent plus contenir de protéine. On vérifie alors si un volume de rinçage plus faible suffirait à récupérer la HSA :

Solution mesurée (19/06/17 Test colonne HSA3)	Absorbance	
	230nm	280nm
HSA 2 mg/mL	2,39	1,03
HSA après passage sur la colonne de dessalage (centrifugation 2 min à 1000xg)	1,15	0,11
Rinçage 1 (1 mL de PBS)	2,35	0,76
Rinçage 2 (2,5 mL de PBS)	0,29	0,02

Un rinçage de **1 mL** semble suffire pour récupérer la HSA dans la colonne.

- ♦ Rétention de la biotine

Il faut aussi vérifier que la biotine reste piégée dans la colonne lorsqu'on récupère la HSA (centrifugation et premier rinçage).

Solution mesurée (13/06/17 Test colonne HSA3)	Absorbance
	260nm
NHS-PEG ₄ -biotine (30 µL+1 mL PBS)	>2,5
NHS-PEG ₄ -biotine (dilution 1/10)	0,55
NHS-PEG ₄ -biotine après passage sur la colonne de dessalage (centrifugation 2min à 1000xg)	< 0,01
Rinçage 1 (1 mL de PBS)	< 0,01
Rinçage 2 (2,5 mL de PBS)	1,71
Rinçage 3 (2,5 mL de PBS)	0,38

Test HABA-Avidine sur le rinçage 1 (1mL) :

A₅₀₀ H/A=0,933

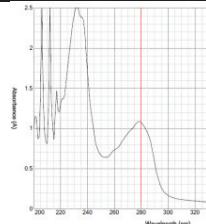
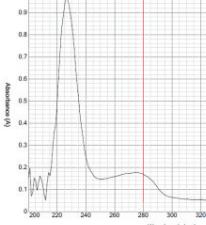
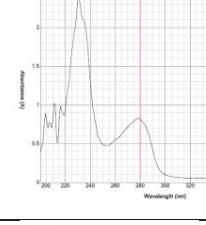
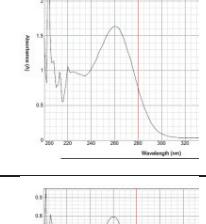
A₅₀₀ H/A/B=0,833

$$Calc\#2 = (0,9 \times 0,933) - 0,833 = 0,0067$$

Cette valeur est négligeable devant celle calculée lors de la biotinylation de HSA (environ 0,1 pour un taux de biotinylation d'environ 1). La biotine reste bien dans la colonne lors de la centrifugation et du premier rinçage. On la retrouve ensuite si on continue à rincer la colonne au PBS (3x2,5 mL suffisent à récupérer toute la biotine).

Biotinylation #3. 09/06/2017

Biotinylation de 1 mL de HSA à 2 mg/mL avec un excès de 20 en biotine. Réaction : 2 h dans la glace. Un suivi UV est réalisé à chaque étape et les concentrations en protéine sont déterminées grâce à l'absorbance à 280 nm ($\epsilon_{HSA}=0,5982 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Solution mesurée	Absorbance UV			[HSA] (mg/mL)	Spectre UV (entre 200 et 330 nm)
	260nm	280nm	Ratio 280/260		
HSA 2 mg/mL	0,75	1,08	1,47	1,80	
HSA après passage sur la colonne de dessalage (centrifugation 2min à 1000xg)	0,16	0,17	1,05	0,28	
Rinçage 1 (1 mL de PBS)	0,55	0,81	1,48	1,38	
Rinçage 2 (2,5 mL de PBS)	1,64	0,75			
Rinçage 3 (2,5 mL de PBS)	0,80	0,38			

Très peu de protéine est récupérée en sortie de colonne et la majorité de la HSA biotinylée se trouve dans le rinçage 1. Le ratio d'absorbance 280 nm/260 nm étant similaire pour le rinçage 1 que pour la solution de HSA de départ, on peut être confiant quant à l'**absence de biotine libre** dans cette solution de HSA biotinylée. Le taux de biotinylation est alors calculé grâce au test HABA-Avidine.

Test HABA-Avidine sur le rinçage 1 (1mL) :

$$A_{500} \text{ H/A}=0,957$$

$$Calc\#2 = (0,9 \times 0,957) - 0,743 = 0,1183$$

$$A_{500} \text{ H/A/B}=0,743$$

$$Calc\#4 = \frac{0,1183 \times 10}{34\ 000 \times 1,38 / 67000} = 1,7 \text{ mmol Biotine/mmol HSA}$$

Le taux de biotinylation est satisfaisant et la HSA biotinylée peut être greffée sur des colonnes streptavidine.

Biotinylations suivantes

Solution mesurée	Absorbance UV			[HSA] (mg/mL)
	260nm	280nm	Ratio 280/260	
<i>Biotinylation #4. 14/09/2017</i>				
HSA 2 mg/mL	0,55	0,89	1,45	1,48
HSA après passage sur la colonne de dessalage	0,45	0,61	1,43	1,03
Rinçage 1 (1 mL de PBS)	0,19	0,19	1,02	0,32
Solution récupérée et taux de biotinylation	HSA après colonne avec 2,7 mmol biotine/mmol HSA			
<i>Biotinylation #5. 04/04/2018</i>				
HSA 2 mg/mL	0,46	0,70	1,53	1,17
HSA après passage sur la colonne de dessalage	0,17	0,22	1,32	0,37
Rinçage 1 (1 mL de PBS)	0,45	0,68	1,52	1,16
Solution récupérée et taux de biotinylation	Rinçage 1 avec 2,3 mmol biotine/mmol HSA			
<i>Biotinylation #6. 21/06/2018</i>				
HSA 2 mg/mL	0,59	0,87	1,47	1,45
HSA après passage sur la colonne de dessalage	0,36	0,53	1,49	0,89
Rinçage 1 (1 mL de PBS)	0,20	0,18	0,92	0,30
Solution récupérée et taux de biotinylation	HSA après colonne avec 2,0 mmol biotine/mmol HSA			

3. STABILITÉ

Utilisation pendant 3 mois, stockée à +4°C sans dégradation notable.

Après 5 mois, la concentration semble être changée : formation d'agrégats possible.

4. RECOMMANDATIONS

Il est nécessaire de faire un suivi d'absorbance à chaque étape. La HSA biotinylée semble être retrouvée soit directement à la sortie de la colonne de dessalage soit dans le premier rinçage au PBS (voire dans les deux). Il est important d'éviter la présence de biotine libre dans la solution récupérée, le ratio d'absorbance $A_{280\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ permet de vérifier les quantités respectives de HSA (à 280 nm) et de biotine (à 260 nm). Le suivi UV permet donc d'identifier la présence de la protéine et de conserver le filtrat qui en contient le plus tout en vérifiant l'absence de biotine libre. Enfin, le volume récupéré étant également variable, pour davantage de précision il est préférable de calculer la concentration de la protéine directement à partir de son absorbance à 280 nm.

En fonction du volume de solution de protéine disponible et de la taille de celle-ci il est également possible d'utiliser des centricon à la place de la colonne de dessalage pour récupérer la protéine biotinylée et retirer l'excès de biotine libre.

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure I-1. Déroulement des deux approches en pharmacologie	11
Figure I-1. Processus de développement d'un nouveau médicament.....	16
Figure I-2. Schéma de l'approche de novo.....	18
Figure I-3. Résumé des étapes du procédé HTS	20
Figure I-4. Exemple de développement par FBDD	21
Figure I-5. Comparaison de l'interaction d'une molécule HTS (à gauche) et de fragments (à droite) avec une protéine cible	22
Figure I-6. Processus classique d'une campagne FBDD	24
Figure I-7. Pourcentage d'utilisation des différentes méthodes de criblages en recherche pharmaceutique	25
Figure I-8. Description schématique des différentes approches pour optimiser les hits en leads	27
Figure I-9. Exemples d'évolution de fragments en FBDD.....	27
Figure I-10. Les étapes de criblage par DRX	29
Figure I-11. Spectres RMN en protein-observed.....	30
Figure I-12. Principe du STD en RMN ligand-observed	31
Figure I-13. Principe du waterLOGSY en RMN ligand-observed.....	32
Figure I-14. Principe de mesure en SPR	33
Figure I-15. Montage et données obtenues par titrage calorimétrique isotherme.....	34
Figure I-16. Suivi de la dénaturation d'une protéine par DSF en présence et en absence de ligand	35
Figure I-17. Allure d'un signal classique en MST et mesure d'affinité d'un ligand pour une protéine cible	37
Figure I-18. Schéma du fonctionnement de la chromatographie de faible affinité en mode zonal pour un mélange de fragments.....	40
Figure II-1. Représentation schématique des deux grandes applications de la chromatographie d'affinité : la purification (A) et l'étude d'interactions entre deux molécules (B)	46
Figure II-2. Exemple d'expérience de compétition	49
Figure II-3. Schéma des différents types d'interactions entre un ligand A et un compétiteur C et allure des graphes associés ($1/k_{\text{ligand A}} = f([C])$)	50
Figure II-4. Courbe de Van't Hoff pour l'interaction de la carbamazepine avec la HSA.....	53
Figure II-5. Tracé de la hauteur de plateau H_s en fonction de $uk/(1+k)^2$	54
Figure II-6. Tracé du volume percolé en fonction de la concentration du ligand en sortie de colonne $[A]_{\text{sortie}}$	59
Figure II-7. Représentation de la quantité de ligand capturée en fonction de la concentration percolée $[A]$	61
Figure II-8. Allure théorique des paliers en analyse frontale (intensité du signal en fonction du temps)	61
Figure II-9. Représentation de l'évolution du volume d'élution en fonction de la concentration de l'analyte percolé $[A]$	62
Figure II-10. Allure des paliers en analyse frontale « classique » (a) et « staircase » (b).....	65

Figure II-11. Exemple d'expériences de déplacement en analyse frontale	67
Figure II-12. Analyse par WAC-MS d'un mélange de 17 fragments sur une colonne HSP90	70
Figure II-13. WAC-MS d'un mélange de 100 composés sur une colonne greffée hER β	71
Figure II-14. Criblage de 111 fragments sur le domaine N-terminal de la HSP90 en chromatographie de faible affinité, RMN, et SPR	72
Figure III-1. Les différentes voies de greffage principalement utilisées en chromatographie d'affinité pour l'immobilisation de biomolécules.	79
Figure c-1. Alternatives de préparation des colonnes génériques streptavidine.	183
Figure c-2. Représentation du couplage de la chromatographie d'affinité avec la spectrométrie de masse, avec l'utilisation d'une source nanospray et d'un analyseur à temps de vol (TOF) et résultat 2D de l'analyse d'un mélange de composés.	184
 Tableau I-1. Exemples de valeurs de LE pour différentes affinités et tailles de molécules	23
Tableau I-2 Comparaison des principales méthodes de criblage pour le FBDD.....	38
Tableau II-1 Allures de la double réciproque de la quantité capturée en fonction de la concentration de l'analyte pour différents types d'interactions ainsi que les équations correspondantes.	64
Tableau II-2. Constantes de dissociation de différents ligands de la HSA (Human Serum Albumin) et de AGP (alpha-1-acid glycoprotein) mesurées par analyse frontale et par l'analyse en « staircase », comparaison à la littérature....	66
Tableau III-1. Récapitulatif des différents types de colonnes utilisés en chromatographie de faible affinité avec leurs principales caractéristiques	81
Tableau IV-1. Représentation des différentes structures biomimétiques stabilisant les protéines membranaires..	115

RÉSUMÉS

Développement d'une nouvelle approche de criblage et de caractérisation d'interactions ligand-protéine membranaire par chromatographie de faible affinité miniaturisée

Le Fragment-Based Drug Discovery consiste à développer de nouveaux médicaments à partir de fragments (petites molécules organiques de faible affinité pour une cible thérapeutique) et requiert des méthodes de criblage capables de détecter de faibles affinités (μM - mM). Récemment, la Chromatographie de Faible Affinité s'est avérée être une alternative intéressante aux méthodes de criblage de référence et consiste à immobiliser la protéine cible sur un support chromatographique puis à mesurer la rétention des fragments, directement liée à leur affinité pour la cible. Pour limiter au maximum la consommation en protéine et permettre l'étude de cibles difficiles à produire, nous avons décidé de développer cette approche à échelle miniaturisée. En pratique, un monolithe est synthétisé in-situ dans un capillaire de 75 μm et la protéine est également greffée in-situ. Les colonnes sont évaluées par analyse frontale avec des ligands d'affinité connue pour une protéine modèle. Parmi les différentes combinaisons testées, les meilleurs résultats ont été obtenus avec un monolith organique fonctionnalisé streptavidine, permettant l'immobilisation rapide de la protéine cible biotinylée (interaction streptavidine-biotine). Nous avons alors travaillé sur une protéine membranaire, le récepteur $\text{A}_{2\text{A}}$ de l'adénosine, inséré dans un nanodisque biotinylé puis greffé sur des colonnes streptavidine en consommant moins d'1 μg de protéine/colonne. Des affinités jusqu'à quelques centaines de μM ont pu être détectées et quantifiées, confirmant l'activité de la protéine après immobilisation. L'identification de ligands parmi des fragments a permis d'illustrer le potentiel de cette technique pour le FBDD.

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

Development of a new approach for the screening and characterization of ligand-membrane protein interactions by miniaturized weak affinity chromatography

Fragment-Based Drug Discovery consist of the development of new drugs from fragments (small organic molecules of weak affinity for the target protein) and requires screening methods suitable for the detection of weak affinities (μM - mM). Recently, Weak Affinity Chromatography has been shown to be an interesting alternative approach for fragment screening and consists of immobilizing the target protein on a chromatographic support and then measuring the fragments retention, directly linked to their affinity for the target. To minimize the protein consumption and allow the study of targets difficult to produce, we decided to develop this approach at a miniaturized scale. In practice, monoliths were in-situ synthesized in 75 μm i.d. capillaries and the target model protein was in-situ grafted. Columns were evaluated using frontal analysis with ligands of known affinity for a model protein. Among different combinations, best results were achieved with a streptavidin modified organic monolith which allows the fast immobilization of biotinylated target protein (through the strong streptavidin-biotin interaction). We then focused on a membrane protein, the adenosine $\text{A}_{2\text{A}}$ receptor ($\text{AA}_{2\text{A}}\text{R}$), embedded in a biotinylated nanodiscs then grafted on streptavidin columns, consuming less than 1 μg of protein per column. Affinities down to hundreds of μM were quantified, confirming protein activity after immobilization. Ligand identification among fragments illustrates the full potential of ultra-miniaturized weak affinity chromatography for Fragment-Based Drug Discovery towards membrane proteins.

Keywords: weak affinity chromatography; miniaturization; monolithic stationary phase; frontal analysis; zonal analysis; membrane proteins; nanodisc