

DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **11 mars 2025**

Nom de famille et prénom de l'auteur. e : **Monsieur François-Xavier VIDAL**

Titre de la thèse : Nano-chromatographie de faible affinité couplée à la spectrométrie de masse : un nouvel outil de criblage des protéines membranaires dans un contexte de Fragment Based Drug Discovery (FBDD)

Résumé



Depuis une vingtaine d'années, le Fragment Based Drug Discovery (FBDD) s'est imposé, comme une nouvelle approche pour le développement de médicaments. Le FBDD repose sur le criblage de petites molécules, appelées fragments, ciblant une protéine d'intérêt thérapeutique. De par leur petite taille, ces fragments ne possèdent qu'une faible affinité pour la cible (K_d de l'ordre du mM- μ M) et les plus affins d'entre eux, identifiés comme hits lors de l'étape de criblage, doivent ensuite être optimisés pour améliorer leur affinité et leur activité pour la cible. Si cette approche est largement répandue dans l'industrie pharmaceutique et dans les laboratoires académiques, elle ne cible à l'heure actuelle que les protéines solubles, excluant les protéines membranaires qui constituent pourtant des cibles thérapeutiques de tout premier plan compte tenu de leur implication dans de nombreux processus biologiques et physiologiques. L'étude des protéines membranaires reste un challenge en raison de leur coût de production élevé, de leur disponibilité en très faible quantité et de leur faible stabilité en dehors de leur membrane cellulaire d'origine. Pour élargir le champ d'application du FBDD aux protéines membranaires un nouvel outil de criblage est proposé : la chromatographie de faible affinité miniaturisée couplée à la spectrométrie de masse (nano-WAC-MS). Pour garantir leur stabilité en dehors de la membrane cellulaire, les protéines membranaires sont stabilisées dans des structures biomimétiques (appelées nanodiscs) qui sont immobilisées sur la phase chromatographique. Ce travail présente dans un premier temps l'optimisation de la préparation des colonnes d'affinité afin de maximiser la gamme d'affinité accessible et de réduire au maximum les interactions non spécifiques susceptibles de conduire à des faux positifs. Une méthodologie basée sur l'utilisation de colonnes contrôle est ensuite proposée pour prendre en compte les interactions non spécifiques lors du criblage. Le couplage à la spectrométrie de masse est ensuite optimisé afin d'augmenter le débit de criblage. La preuve de concept du couplage nano-WAC-MS est proposée sur le récepteur de l'adénosine (AA2AR) pour lequel un mélange de 120 fragments est criblé en une seule injection (50min) et les résultats de ce criblage comparés à ceux obtenus en

RMN pour le récepteur stabilisé en détergents. La miniaturisation des colonnes d'affinité permet de réduire la quantité de protéine cible au microgramme par criblage et le couplage à la spectrométrie de masse permet d'atteindre un potentiel de criblage élevé (3400 fragments/jour).

Mots-clés : Chromatographie de faible affinité, Interactions non-spécifiques, Protéine membranaire, Nanodisc, Criblage, fragment based drug discovery