

Centre Armand Frappier Santé Biotechnologie

À LA RECHERCHE DE MODULATEURS ALLOSTÉRIQUES DE L'ANGIOGÉNINE

Par

Pinoteau Marie Aude

Mémoire pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Chatenet David
Centre Armand Frappier Santé
Biotechnologie

Examineur externe

Marsault Éric
Institut de Pharmacologie
Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

Doucet Nicolas
Centre Armand Frappier Santé
Biotechnologie

Codirecteur de recherche

Laplante Steven
Centre Armand Frappier Santé
Biotechnologie

REMERCIEMENTS

Je remercie Nicolas et Steven de m'avoir permis de faire ce projet.

Mes remerciements particuliers pour Myriam pour son soutien dans les moments difficiles de ce projet. Merci également pour tous les conseils qu'elle m'a transmis et pour tout ce que j'ai appris grâce à elle.

Je remercie également David, Yossef, Andrès, Carolina et Chitra mes collègues du laboratoire et aussi Maude qui a effectué un stage à l'été 2018. Je remercie Marlène pour sa bonne humeur, les conseils donnés et le soutien apporté.

Je remercie aussi Jacinthe le guide de mes premiers pas dans le laboratoire et Louise pour tous les conseils et son soutien durant le temps que l'on a passé ensemble.

Je remercie aussi mes amis dont j'ai fait la connaissance au cours de ces trois années passées à l'institut : Rose, Livie, Selma, Johanna, Kevin et Sabrina, pour le soutien dans les épreuves et tous les bons moments passés ensemble. Et aussi mon ami Sean qui était au lycée avec moi que j'ai retrouvé à Montréal comme quoi le monde est très petit.

Je remercie tous mes amis que j'ai laissés en France et qui m'ont encouragée à partir à l'aventure au Canada.

Merci à Philippe qui est ma plus belle rencontre canadienne et sans qui je ne serais pas arrivée au bout de ce projet. Merci pour ton soutien dans les épreuves traversées au cours de ces trois années et merci pour les bons moments passés et futurs.

Et un grand merci à toute ma famille pour leur soutien sans faille et de m'avoir laissé partir dans un autre pays pour réaliser mon projet professionnel.

RÉSUMÉ

L'angiogénine (RNase 5) est une ribonucléase impliquée dans plusieurs pathologies telles que le cancer et la maladie de Parkinson. Or, des modulateurs allostériques pourraient offrir de nouvelles approches thérapeutiques et une approche basée sur le *fragment-based drug design* (FBDD) pourrait permettre d'obtenir de telles molécules. Ainsi, une librairie de 1640 fragments a été criblée par RMN et 4 ligands potentiels ont été identifiés. Des titrages RMN ont permis de confirmer la liaison et de déterminer que les sites de fixation sur la structure n'impliquaient probablement pas les résidus catalytiques. Ces 4 fragments n'ont pas engendré de modification de la stabilité thermique de la protéine, étudiée par *thermal shift assay*. De plus, la liaison de ces fragments n'a pas inhibé l'activité ribonucléolytique de la RNase 5 sur l'ARNt, tel que visualisé sur des gels de polyacrylamide/urée. Finalement, la portée de la présence des fragments sur la prolifération cellulaire engendrée par la RNase 5 a été évaluée sur deux lignées cellulaires : HeLa et SH-SY5Y. Les résultats ont démontré que deux des fragments semblent influencer la prolifération cellulaire.

Bref, ces résultats suggèrent que les fragments identifiés pourraient agir de manière allostérique et servir de base à la poursuite d'une approche FBDD.

Mots clés : RMN, RNase5, allostérie, protéines, modulation.

ABSTRACT

Angiogenin (RNase 5) is a ribonuclease involved in several pathologies such as cancer and Parkinson's disease. Allosteric modulators of this protein could offer new therapeutic approaches and a fragment-based drug design (FBDD) approach could make it possible to obtain such molecules. Thus, a library of 1640 fragments was screened by NMR and 4 potential ligands were identified. NMR titrations confirmed the binding and determined that binding sites probably did not involve catalytic residues. These 4 fragments did not generate any modification of the thermal stability of the protein, studied by thermal shift assay. In addition, binding of these fragments did not inhibit RNase 5 ribonucleolytic activity on tRNA, as visualized on polyacrylamide / urea gels. Finally, the effect of the presence of fragments on cell proliferation generated by RNase 5 was evaluated on two cell lines: HeLa and SH-SY5Y. Results demonstrated that two of the fragments appear to influence cell proliferation.

Overall, these results suggest that the identified fragments could act in an allosteric manner and serve as lead compounds for pursuing a FBDD approach.

Keywords : NMR, RNase 5, allosteric, protein, modulation

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	XI
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE DES TABLEAUX	XVII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIX
1 INTRODUCTION	1
1.1 MÉTHODES DE CRIBLAGE MENANT À LA DÉCOUVERTE DE NOUVEAUX MÉDICAMENTS	1
1.2 LES PROTÉINES	6
1.3 LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE :	7
1.4 LA MODULATION DES ENZYMES	9
1.5 LES RIBONUCLÉASES	13
1.6 LA RNASE 5 OU ANGIOGÉNINE	16
1.7 PROJET DE RECHERCHE	21
1.7.1 <i>Problématique</i>	21
1.7.2 <i>Hypothèse et objectifs de recherche</i>	21
2 MÉTHODOLOGIE	23
2.1 EXPRESSION ET PURIFICATION DE L'ANGIOGÉNINE RECOMBINANTE	23
2.1.1 <i>Expression de l'Angiogénine ou RNase 5</i>	23
2.1.2 <i>Repliement in vitro de la RNase 5</i>	23
2.1.3 <i>Purification de la protéine</i>	24
2.2 CRIBLAGE ET EXPÉRIENCES RMN	25
2.2.1 <i>Criblage de la librairie de fragments</i>	25
2.2.2 <i>Titrages HSQC</i>	27
2.3 TESTS CELLULAIRES	28
2.3.1 <i>Cellules Hela et SH-SY5Y</i>	29
2.3.2 <i>Expériences de prolifération des cellules</i>	29
2.4 CARACTÉRISATIONS BIOCHIMIQUES	31
2.4.1 <i>TSA-Thermal Shift Assay</i>	31
2.4.2 <i>Activité ribonucléolytique</i>	32
3 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	35
3.1 PURIFICATION DE LA RNASE 5 (OBJECTIF 1)	35
3.2 CRIBLAGE DE LA LIBRAIRIE DE FRAGMENTS (OBJECTIF 1)	36

3.3	TITRAGES RMN (OBJECTIF 2).....	38
3.4	STABILITÉ THERMIQUE DE LA RNASE 5 (OBJECTIF 3).....	44
3.5	ÉVALUATION DE L'EFFET DES FRAGMENTS SUR L'ACTIVITÉ RIBONUCLÉOLYTIQUE (OBJECTIF 3)....	45
3.6	TESTS DE L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE (OBJECTIF 3)	47
4	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	53
5	BIBLIOGRAPHIE	55

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : ÉTAPES D'UNE STRATÉGIE MENANT À LA DÉCOUVERTE DE NOUVEAUX MÉDICAMENTS.	1
FIGURE 2 : LES DIFFÉRENTES STRATÉGIES D'OPTIMISATION DES FRAGMENTS.	6
FIGURE 3 : VARIATION DE L'ÉNERGIE LIBRE AU COURS D'UNE RÉACTION ENZYMATIQUE (YON-KAHN AND HERVÉ, 2005).	7
FIGURE 4 : APPARITION DU PRODUIT DE RÉACTION EN FONCTION DU TEMPS. (A) PHASE PRÉSTATIONNAIRE (B) PHASE STATIONNAIRE (C) PHASE D'INHIBITION ET (D) PHASE D'ÉQUILIBRE. (YON-KAHN AND HERVÉ, 2005)	8
FIGURE 5 : REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DE HANES-WOOLF. LA REPRÉSENTATION DÉCRIT LA RELATION ENTRE LES PARAMÈTRES D'UNE RÉACTION ENZYMATIQUE.	9
FIGURE 6 : ALIGNEMENT DE STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES OBTENUES GRÂCE AU LOGICIEL PYMOL (FICHIER PDB : 2K11, 1GQV, 1QMT, 1RNF, 1 ANG, 4X09, 2HKY ET 5OLD) QUI CORRESPONDENT RESPECTIVEMENT À LA RNASE 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ET A.	11
FIGURE 7 : SCHÉMA RÉSUMANT LES DIFFÉRENTES STRATÉGIES DE MODULATION DES ENZYMES.	13
FIGURE 8 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE LA RNASE A (EN ROUGE). EN VERT LE DOMAINE V1, EN BLEU LE DOMAINE V2, EN JAUNE LA RÉGION QUI JOINT LES DEUX DOMAINES ET EN BLANC LES TROIS RÉSIDUS CATALYTIQUES. (FICHIER PDB : 5OLD).	14
FIGURE 9 : REPRÉSENTATION DES DIFFÉRENTS SOUS-SITES DE FIXATION DES RIBONUCLÉASES (A) ET REPRÉSENTATION DE LA RÉACTION DE TRANSPHOSPHORYLATION CATALYSÉE PAR L'ENZYME (B). (GAGNÉ AND DOUCET, 2013).....	15
FIGURE 10 : ALIGNEMENT MULTIPLE DES SÉQUENCES DES RNASES 1 À 7 HUMAINES ET LA RNASE A BOVINE. LES RÉSIDUS ENCADRÉS EN ROUGE SONT LES RÉSIDUS DU SITE ACTIF, EN VERT ON RETROUVE LES 6 CYSTÉINES CONSERVÉES POUR TOUTES CES RNASES ET EN BLEU LES CYSTÉINES CONSERVÉES SAUF CHEZ LA RNASE 5.....	16
FIGURE 11 : STRUCTURE DE LA RNASE 5. LES ZONES QUI DIFFÈRENT DE LA RNASE A SONT BLEUES, LES RÉSIDUS CATALYTIQUES SONT EN VERT (RNASE A) OU EN ROUGE (RNASE 5) ET LES RÉSIDUS EN POSITION 117 SONT EN ORANGE (PDB 1ANG RNASE 5 ET 5OLD RNASE A).	17
FIGURE 12 : LES DIFFÉRENTES ACTIONS DE L'ANGIOGÉNINE DANS LA CELLULE. (SHENG AND XU, 2016)	19
FIGURE 13 : RÉSUMÉ DE LA PRODUCTION ET PURIFICATION DE LA RNASE 5.	24
FIGURE 14 : RÉSUMÉ D'UN CRIBLAGE FBDD.....	26
FIGURE 15 : EXEMPLE DES SPECTRES RMN D'UN POOL DE FRAGMENTS LORS DU CRIBLAGE.....	26
FIGURE 16 : EXEMPLE DE DÉCALAGE (A) ET DE DÉCALAGE DES SPECTRES LORS DU CRIBLAGE PAR RMN DES FRAGMENTS POUR LA LIAISON À LA RNASE 5. PROPRIÉTÉ DE NMX.	27

FIGURE 17 : EXEMPLE DE SPECTRES HSQC OBTENUS EN TITRANT LE LIGAND. DANS LE CADRE, ON OBSERVE LES RÉSONANCES DE LA PROTÉINE SE DÉPLACER AVEC L'AJOUT D'ÉQUIVALENTS MOLAIRES DU FRAGMENT (LIGAND).	28
FIGURE 18 : PLAQUE EXEMPLE DE TEST DE PROLIFÉRATION CELLULAIRE.	30
FIGURE 19 : RÉSUMÉ DU PROTOCOLE POUR LES EXPÉRIENCES EFFECTUÉES SUR LES CELLULES.	31
FIGURE 20 : EXPÉRIENCE DE TSA.	32
FIGURE 21 : CHROMATOGRAMME ET GEL SDS-PAGE ILLUSTRANT LA PURETÉ DES ÉCHANTILLONS OBTENUS APRÈS LE PROTOCOLE DE PURIFICATION.	36
FIGURE 22 : MOLÉCULES LIANTS LA RNASE 5 OBTENUES PAR CRIBLAGE À HAUT DÉBIT (KAO ET AL., 2002)).	37
FIGURE 23 : SPECTRES HSQC OBTENUS LORS DU TITRAGE DE LA RNASE 5 AVEC LE FRAGMENT 5 P.	39
FIGURE 24 : SPECTRES HSQC OBTENUS LORS DU TITRAGE DE LA RNASE 5 AVEC LE FRAGMENT 3H.	39
FIGURE 25 : SPECTRES HSQC OBTENUS LORS DU TITRAGE DE LA RNASE 5 AVEC LE FRAGMENT 6 F.	40
FIGURE 26 : SPECTRES HSQC OBTENUS LORS DU TITRAGE DE LA RNASE 5 AVEC LE FRAGMENT 1R, 2S.	40
FIGURE 27 : VALEURS DE $\Delta\Delta$ TOTAL POUR CHACUN DES RÉSIDUS DE LA RNASE 5 EN PRÉSENCE DE 100 ÉQ DE LIGANDS. LA LIGNE POINTILLÉE ROUGE REPRÉSENTE LE SEUIL DE 0,05 PPM UTILISÉ POUR DÉLIMITER LES VARIATIONS TOTALES CONSIDÉRÉES SIGNIFICATIVES ET NON SIGNIFICATIVES.	41
FIGURE 28 : STRUCTURE 3D DE LA RNASE 5 EN PRÉSENCE DES DIFFÉRENTS FRAGMENTS, AVEC UN GRADIENT ALLANT DU GRIS AU VIOLET POUR LA VALEUR DE VARIATION DE DÉPLACEMENT CHIMIQUE TOTAL. (FICHIER PDB : 1 ANG) .	42
FIGURE 29 : ESSAI DE PROTEIN THERMAL SHIFT™ OBTENU POUR LE FRAGMENT 5 P EN PRÉSENCE ET EN ABSENCE DE RNASE 5.	44
FIGURE 30 : VARIATION DE LA TEMPÉRATURE DE FUSION DE LA RNASE 5 EN PRÉSENCE OU NON DES FRAGMENTS, TEL QU'ÉVALUÉE PAR THERMAL SHIFT ASSAY.	45
FIGURE 31 : TEST DE L'ACTIVITÉ RIBONUCLÉOLYTIQUE DE LA RNASE 5 EN PRÉSENCE DES FRAGMENTS ET DE RI.	46
FIGURE 32 : COURBES DOSE-RÉPONSE AVEC LA RNASE 5 SUR LA PROLIFÉRATION DES CELLULES SH-SY5Y (A) ET HELa (B). (**p<0,001, ***p<0.0001 PAR RAPPORT AU PBS)	48
FIGURE 33 : TEST DE LA TOXICITÉ DES FRAGMENTS SUR LES CELLULES SH-SY5Y (A) ET HELa (B) (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 PAR RAPPORT AU PBS).	50
FIGURE 34 : EFFET DE LA MODULATION DE LA PROLIFÉRATION INDUITE PAR LA RNASE 5 PAR LES FRAGMENTS SUR LES CELLULES SH-SY5Y (A) ET HELa (B) (****p<0.0001 PAR RAPPORT AU PBS; **p<0.01, ***p<0.0001 PAR RAPPORT À R5).	51

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : TABLEAU RÉSUMANT LES DIFFÉRENTS MÉDICAMENTS DÉCOUVERTS GRÂCE AU FBDD.INSPIRÉ DU TABLEAU 1 DU REVIEW « TWENTY YEARS ON : THE IMPACT OF FRAGMENTS ON DRUG DISCOVERY » (ERLANSON ET AL., 2016) (EN BLEU LES FRAGMENTS DE DÉPART OBTENUS PAR CRIBLAGE).	2
TABLEAU 2 : TABLEAU RÉSUMANT LES ACTIONS BIOLOGIQUES DE 5 RNASES HUMAINES ET LEUR PRÉFÉRENCE DE SUBSTRATS. (SORRENTINO, 2010)	15
TABLEAU 3 : FRAGMENTS OBTENUS APRÈS LE CRIBLAGE FBDD.	37
TABLEAU 4 : LES DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE FRAGMENTS UTILISÉES POUR LES TITRAGES HSQC.	38
TABLEAU 5 : CROISSANCE RELATIVE ÉVALUÉE SUR LES CELLULES SH-SY5Y EN PRÉSENCE DE CONCENTRATION CROISSANTE DE R5. LA NORMALISATION A ÉTÉ EFFECTUÉE SUR LA MOYENNE DES VALEURS OBTENUES AVEC AJOUT DE PBS.	47
TABLEAU 6 : CROISSANCE RELATIVE ÉVALUÉE SUR LES CELLULES HeLa EN PRÉSENCE DE CONCENTRATION CROISSANTE DE R5. LA NORMALISATION A ÉTÉ EFFECTUÉE SUR LA MOYENNE DES VALEURS OBTENUES AVEC AJOUT DE PBS.	48
TABLEAU 7 : EFFET SUR LA SURVIE RELATIVE DES CELLULES SH-SY5Y EN PRÉSENCE DE 25 μ M DES DIFFÉRENTS COMPOSÉS. LA NORMALISATION A ÉTÉ EFFECTUÉE SUR LA MOYENNE DES VALEURS OBTENUES AVEC AJOUT DE PBS. LA CONDITION EXPÉRIMENTALE UTILISANT 5% DMSO A ÉTÉ UTILISÉE COMME CONTRÔLE DE MORT CELLULAIRE.	49
TABLEAU 8 : . EFFET SUR LA SURVIE RELATIVE DES CELLULES HeLa EN PRÉSENCE DE 100 μ M DES DIFFÉRENTS COMPOSÉS. LA NORMALISATION A ÉTÉ EFFECTUÉE SUR LA MOYENNE DES VALEURS OBTENUES AVEC AJOUT DE PBS. LA CONDITION EXPÉRIMENTALE UTILISANT 5% DMSO A ÉTÉ UTILISÉE COMME CONTRÔLE DE MORT CELLULAIRE.	49
TABLEAU 9 : PROLIFÉRATION RELATIVE ÉVALUÉE SUR LES CELLULES SH-SY5Y EN PRÉSENCE DE 25 nM DE R5 ET DE 25 μ M DES DIFFÉRENTS COMPOSÉS. LA NORMALISATION A ÉTÉ EFFECTUÉE SUR LA MOYENNE DES VALEURS OBTENUES AVEC AJOUT DE PBS.	50
TABLEAU 10 : PROLIFÉRATION RELATIVE ÉVALUÉE SUR LES CELLULES HeLa EN PRÉSENCE DE 100 nM DE R5 ET DE 100 μ M DES DIFFÉRENTS COMPOSÉS. LA NORMALISATION A ÉTÉ EFFECTUÉE SUR LA MOYENNE DES VALEURS OBTENUES AVEC AJOUT DE PBS.	50

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ARN : Acide ribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

CPMG : *Carr-Purcell-Meiboom-Gill*

Da : Dalton

DMSO : Diméthyle sulfoxyde

E : Enzyme

EGF : *Epidermal growth factor*

EGFR : « *endothelial growth factor receptor* » ou récepteur au facteur de croissance endothéliale

ERK½ : « *Extracellular signal-regulated kinase* »

ES : Complexe enzyme/substrat

FBDD : Fragment-based drug design

FBS : Sérum foetal bovin

FDA : Food and Drugs Administration

HSQC : Spectroscopie hétéronucléaire à cohérence quantique unique

HUVEC : Cellules endothéliales humaines de veine ombilicale

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50 %

IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

ITC : Titrage calorimétrique isotherme

K_d : Constante de dissociation

K_i : Constante d'inhibition

K_m : Constance de Michaelis

M : Molaire

MDM2 : *Murine double minute 2*

MWC : Monod-Wyman-Changeux

NLS : *Nuclear localisation signal* ou signal de localisation nucléaire

nm : nanomètre

P : Produit de réaction

pI : Point isoélectrique

R5 : RNase 5 (angiogénine)

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RNase : Ribonucléase

RPS : résonance plasmonique de surface

S : Substrat

SDS : Sodium dodécylsulfate

SLA : Sclérose latérale amyotrophique

STD : *Saturation transfert difference*

TSA : Thermal shift assay

UV : Ultra-violet

VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

V_i : Vitesse initiale

V_{\max} : Vitesse maximale

$\Delta\delta_{\text{tot}}$: Variation de déplacement chimique totale

ΔG : Enthalpie libre

1 INTRODUCTION

Grâce aux travaux de recherches dans différents domaines incluant la génétique, la biologie structurale, la biochimie et la bio-informatique. Il est maintenant possible de mieux comprendre la mise en place et la progression de pathologies et ainsi cibler plus efficacement les facteurs influençant leur genèse et leur évolution. Ces avancées ont également permis d'élucider le mécanisme d'action de plusieurs médicaments sur leur cible (Swinney and Anthony, 2011). Or, les protéines (enzymes et récepteurs membranaires) constituent la majeure portion de ces cibles thérapeutiques (Drews, 2000). Malgré tout, la découverte de nouveaux médicaments subit, depuis plusieurs années, un frein malgré un financement croissant et continu de l'industrie pharmaceutique. De nouvelles stratégies doivent être mises en place. La figure 1 résume une stratégie couramment utilisée pour recherche de nouveaux médicaments.

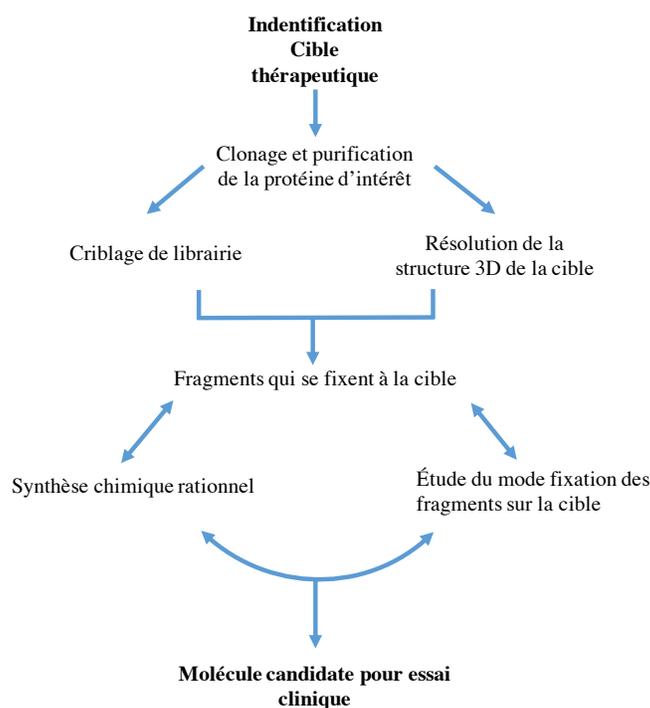


Figure 1 : Étapes d'une stratégie menant à la découverte de nouveaux médicaments.

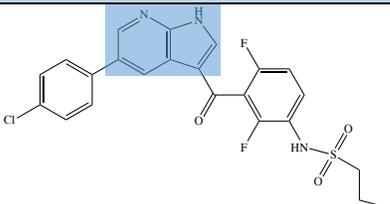
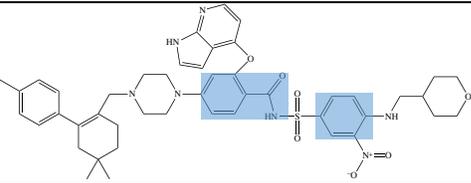
1.1 Méthodes de criblage menant à la découverte de nouveaux médicaments

De manière à augmenter les chances d'obtenir des résultats positifs rapidement, le criblage à haut débit est devenu une approche largement utilisée dans la découverte de nouveaux médicaments. Ainsi, le criblage de bibliothèques avec des millions de grosses molécules (≥ 500 Da) a mené certes à la découverte de

nouveaux médicaments ; mais aussi à beaucoup de faux positifs qui sont des molécules possédant des propriétés moins désirables comme une tendance à agréger (Erlanson et al., 2016).

Au sein de cette approche à haut débit, un criblage utilisant de petits fragments plutôt que de grosses molécules a émergé. Ceci offre une meilleure exploration de l'espace chimique de la cible. En effet, les cibles complexes telles que les interfaces d'interaction entre protéines qui ne comportent pas de cavités dans lesquelles une molécule peut être façonnée pour s'y insérer. Le criblage de plus petits fragments permet d'explorer cette surface quant à sa capacité de liaison pour ensuite modifier le petit fragment dans le but d'augmenter son affinité pour la cible. Cette nouvelle méthodologie est appelée Fragment-Based Drug Discovery (FBDD), désigne la conception médicament à partir de fragments (Erlanson et al., 2016 ; Scott et al., 2012). Cette méthodologie a déjà fait ses preuves avec la mise sur le marché du Vemurafenib (premier médicament obtenu par FBDD) et le Venetoclax ; des dizaines d'autres molécules sont également en essai clinique (Erlanson et al., 2016). Voir le tableau 1 résumant les différentes molécules obtenues par FBDD mises sur le marché ou en essais cliniques.

Tableau 1 : Tableau résumant les différents médicaments découverts grâce au FBDD. Inspiré du tableau 1 du review « Twenty years on : the impact of fragments on drug discovery » (Erlanson et al., 2016) (en bleu les fragments de départ obtenus par criblage).

Médicament	Cible	Situation	Formule chimique
Vemurafenib	BRAF-V600E	Approuvé	
Venetoclax	BCL-2	Approuvé	
PLX3397	FMS, KIT et FLT3-IDT	Phase 3	
Verubecestat	BACE1	Phase 3	
AZD3293	BACE1	Phase 2/3	
AT7519	CDK1, 2, 4, 5 et 9	Phase 2	
AT9283	Aurora et JAK2	Phase 2	

AZD5363	AKT	Phase 2
Erdafitinib	FGFR1-4	Phase 2
Indeglitazar	PPARagonist	Phase 2
LY2886721	BACE1	Phase 2
LY517717	FXA	Phase 2
Navitoclax	BCL-2 et BCL-X _L	Phase 2
NVP- AUY922	HSP90	Phase 2
Onalespib	HSP90	Phase 2
ABL001	BCR-ABL	Phase 1
ABT-518	MMP2 et 9	Phase 1
ABT-737	BCL-2 et BCL-X _L	Phase 1
ASTX660	XIAP et cIAP1	Phase 1
AT13148	AKT, S6K1 et ROCK	Phase 1
AZD3839	BACE 1	Phase 1
AZD5099	Topoisomérase bactérienne 2	Phase 1
BCL201	BCL-2	Phase 1
DG051	LTA4H	Phase 1
IC-776	LFA1	Phase 1
LP-261	Tubuline	Phase 1
LY2811376	BACE 1	Phase 1
PF- 06650833	IRAK4	Phase 1
PLX5568	RAF	Phase 1
SGX393	BCR-ABL	Phase 1
SGX523	MET	Phase 1
SNS-314	Aurora	Phase 1

Le FBDD repose donc sur une solide bibliothèque de fragments, composée en moyenne de 500 à 10 000 fragments (Erlanson et al., 2016; Harner et al., 2013a). Les fragments doivent répondre à la règle de

trois plutôt qu'à la règle de 5 de Lipinski normalement utilisée dans le cadre du criblage à haut débit. Ces règles ont été formulées pour aider à évaluer la prédisposition d'une molécule à avoir des propriétés physicochimiques et physiologiques appropriées pour devenir un médicament (Congreve et al., 2003). Les fragments qui obéissent à la règle de trois sont donc de petites tailles (>300 Da), pas plus de 3 de donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogène et un coefficient de partition entre l'octanol et l'eau (indice d'hydrophobicité) plus petit ou égal à 3 (Congreve et al., 2003 ; Erlanson et al., 2016). Ainsi, les molécules choisies pour élaborer une banque de fragments sont moins complexes du point de vue structural que celles qui composent une librairie pour le criblage à haut débit, ce qui permet une exploration d'un plus grand espace chimique avec moins de molécules à cribler (Scott et al., 2012). Les fragments initialement identifiés en tant que ligands de la cible sont généralement de faible affinité, de l'ordre du millimolaire (mM). Il importe donc d'utiliser une technique de détection de la liaison assez sensible. Plusieurs techniques de biophysique peuvent être utilisées pour cribler les fragments et caractériser la liaison des fragments.

- *Diffraction aux rayons X de cristaux de protéines co-cristallisés avec le fragment liant.*

Avec cette technique, la structure tridimensionnelle de la protéine est obtenue à l'échelle atomique grâce au patron de diffraction des rayons X obtenu en présence d'un cristal protéique. Il est donc possible de connaître les sites de fixation des fragments avec une haute résolution. Par contre, cette technique n'apporte pas d'information sur l'affinité des fragments pour la protéine cible. De plus, déterminer les bonnes conditions de cristallisation pour obtenir des cristaux optimaux pour la diffraction ainsi que l'accès à un synchrotron : se trouvent être des limitations de cette technique.

- *Résonance plasmonique de surface (RPS).*

La RPS nécessite l'immobilisation de la protéine cible sur un biocapteur qui constitue une interface entre deux milieux avec des indices de réfraction différents. Les molécules pouvant potentiellement lier cette protéine sont ensuite diluées dans un tampon circulant à vitesse constante à la surface du biocapteur recouvert de la protéine. Une liaison provoque un changement dans les propriétés physiques de l'interface que constitue le biocapteur ; ces changements se reflètent par une variation de l'angle d'incidence de la lumière réfléchié lorsqu'un faisceau monochromatique illumine la surface du biocapteur. Cette technique présente une grande sensibilité de détection de liaisons et permet de tester plusieurs ligands dans différentes conditions de solvants. Par contre, la protéine doit présenter une certaine stabilité dans le temps et compatible avec les conditions de liaison au biocapteur. Le solvant peut également créer des artefacts (Renaud et al., 2016).

- *La résonance magnétique nucléaire (RMN)*

Certains noyaux d'atomes, comme ^1H , ^{13}C , ^{15}N , possèdent des spins non nuls pouvant être excités par une fréquence donnée lorsque mis en présence d'un champ magnétique externe. Puisque la fréquence

de résonance de chaque atome dépend de son environnement, les données obtenues par RMN permettent d'obtenir des informations sur les liaisons chimiques, la conformation moléculaire et la mobilité (dynamique moléculaire). Ainsi, le spectre RMN unidimensionnel d'une molécule variera suite à une interaction avec une autre molécule. Cette propriété peut être utilisée pour cribler une librairie de composés dont le spectre RMN est connu puisqu'il sera possible de détecter un changement en présence d'une protéine pour les ligands. Donc, avec cette méthode il n'est pas nécessaire d'avoir un échantillon protéines marquées (c'est-à-dire qu'elles possèdent des atomes ^{13}C et/ou ^{15}N). Mais elle n'apporte qu'une indication sur la liaison de certains fragments avec la protéine sans donner d'information sur l'affinité ou sur la localisation du site de fixation. À l'opposé, si une protéine marquée est utilisée, l'effet de la fixation du fragment peut être visualisé lors d'un titrage et l'affinité de la fixation (K_d) peut être déterminée. De plus, si le spectre de la protéine est assigné (chaque signal attribué à un atome de la protéine), il est possible de déterminer où se fixent les fragments sur la structure tridimensionnelle de la protéine cible. (Erlanson et al., 2016 ; Harner et al., 2013 b ; Renaud et al., 2016)

Le criblage de la librairie conduit à l'identification de plusieurs fragments qui se fixent à la cible. Souvent, les fragments ont une faible affinité pour la cible, d'où l'avantage de connaître la localisation du ou des sites de fixation des différents fragments dans le but d'améliorer leurs affinités. Avec cet objectif, certaines démarches peuvent être envisagées pour des fragments (Shuker et al., 1996).

- L'accroissement du fragment par ajout de petits groupements chimiques. (Voir A dans la figure 2)
- Si deux fragments fixent le même site de fixation, ils peuvent être fusionnés. (Voir B dans la figure 2)
- Dans la situation de deux fragments qui fixent des sites proximaux, ces deux fragments peuvent être reliés avec « un linker » (espaceur). (Voir C dans la figure 2) (Harner et al., 2013b)

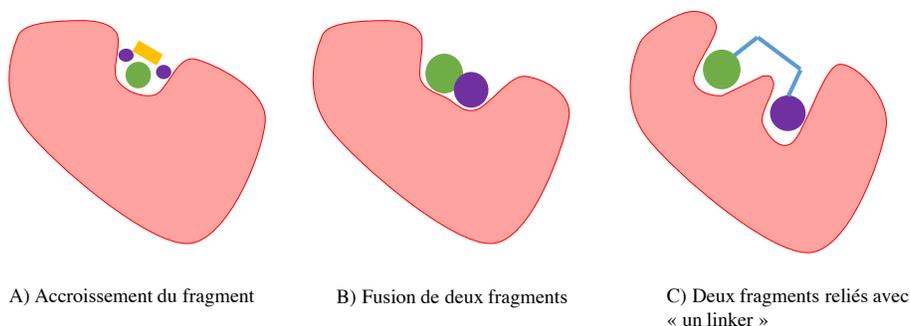


Figure 2 : Les différentes stratégies d'optimisation des fragments.

Le FBDD rend donc possible le criblage de cibles impossibles à cribler auparavant avec les grosses molécules. Il est donc possible avec de petites molécules chimiques ayant peu d'affinité d'obtenir un ligand de très haute affinité. Par exemple avec le premier médicament obtenu par FBDD le vemurafébin. Le premier fragment découvert avec le criblage avait une IC_{50} de $200 \mu M$. Et après optimisation du fragment le produit final avait une IC_{50} de $50 nM$ (Bollag et al., 2010 ; Erlanson et al., 2016).

La découverte de nouveaux médicaments demande dans un premier temps une cible dite thérapeutique. Ici, la cible thérapeutique est une protéine.

1.2 Les protéines

Les protéines font partie des macromolécules biologiques essentielles pour les organismes vivants. En effet, celles-ci permettent le bon fonctionnement de la cellule en assurant un certain nombre de processus biologiques indispensables au vivant. Elles possèdent plusieurs rôles dans la cellule : structure, mobilité, expression génétique, signalisation cellulaire et catalyse de réactions biochimiques nécessaires à la survie des cellules. Les protéines impliquées dans la catalyse sont plus communément appelées des enzymes.

Le rôle des enzymes dans la catalyse est d'abaisser l'énergie d'activation de la réaction biochimique. Une réaction enzymatique permet de passer d'un état initial à un état final avec un état intermédiaire appelé état de transition. Cet état de transition est instable, mais il est nécessaire pour franchir la barrière d'énergie d'activation de la réaction ΔG^* (enthalpie libre) qui représente l'énergie d'activation de la réaction. La figure 3 représente la variation de l'énergie libre au cours d'une réaction enzymatique.

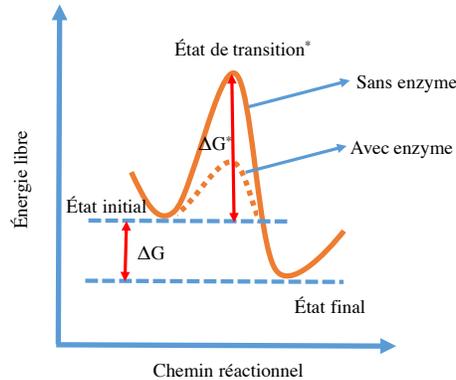
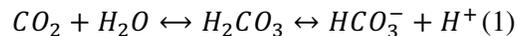


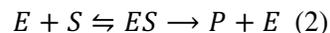
Figure 3 : Variation de l'énergie libre au cours d'une réaction enzymatique (Yon-Kahn and Hervé, 2005).

Les enzymes vont donc diminuer ΔG^* de la réaction. Cette capacité d'abaissement de l'énergie d'activation rend les enzymes indispensables à l'organisme puisqu'elles permettent de catalyser des réactions biochimiques qui, sans elles, ne seraient pas viables, car trop longues (Yon-Kahn and Hervé, 2005). Un exemple de la puissance des enzymes pour catalyser les réactions biochimiques est l'anhydrase carbonique qui accélère la réaction (1) d'un facteur 10^8 comparativement à la réaction sans enzyme (Seibert and Tracy, 2014).



1.3 La cinétique enzymatique :

Considérons la réaction suivante :



Où E représente l'enzyme, S le substrat, ES le complexe enzyme/substrat et P le produit (2).

L'apparition du produit de la réaction (Figure 4) suit une courbe qui peut être divisée en 4 phases. La phase préstationnaire (A) correspond à la formation des premiers complexes ES. Lorsque la concentration du complexe ES se stabilise, la réaction entre dans la phase stationnaire (B). Puis, le produit P voit sa concentration augmentée et la réaction entre en phase d'inhibition (C), c'est-à-dire que la réaction inverse est favorisée. La réaction passe ensuite à la phase d'équilibre de la réaction (D).

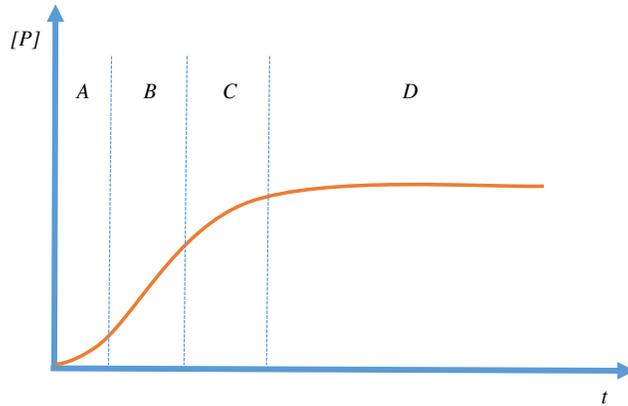


Figure 4 : Apparition du produit de réaction en fonction du temps. (A) phase préstationnaire (B) phase stationnaire (C) phase d'inhibition et (D) phase d'équilibre. (Yon-Kahn and Hervé, 2005)

Michaelis et Menten décrivent mathématiquement le processus enzymatique au cours de la phase stationnaire avec la condition que la concentration d'enzyme soit très inférieure à la concentration de substrat ; on parle ici de conditions saturantes en substrat. Ainsi, l'équation de Michaelis-Menten (3) permet de déterminer les paramètres cinétiques d'une réaction enzymatique.

$$v_i = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

Plus précisément, v_i représente la vitesse initiale de la réaction (avant l'apparition de produits), v_{max} est la vitesse initiale maximale en condition saturante de substrat [S] est la concentration initiale en substrat et K_m est la constante de Michaelis qui correspond à la concentration de substrat pour laquelle v_i est la moitié de v_{max} . Afin de déterminer ces paramètres cinétiques à partir de données expérimentales, plusieurs représentations graphiques ont été développées : semi-logarithmique, Eadie-Hofstee, Lineweaver-Burk ou Hanes-Woolf. En 1964, Dowd et Riggs ont réalisé une étude comparative de ces différentes représentations, il s'est avéré que l'équation de Lineweaver-Burk est la moins fiable (Dowd and Riggs, 1965).

L'approche de Hanes-Woolf est une bonne méthode pour déterminer les paramètres cinétiques et permet, tout comme les autres représentations graphiques, de transformer les données expérimentales de cinétique enzymatique en relation linéaire (Figure 5). Ainsi, à partir de l'équation (3), l'équation (4) peut être obtenue :

$$\frac{[S]}{v_i} = \frac{[S]}{v_{max}} + \frac{K_m}{v_{max}} \quad (4)$$

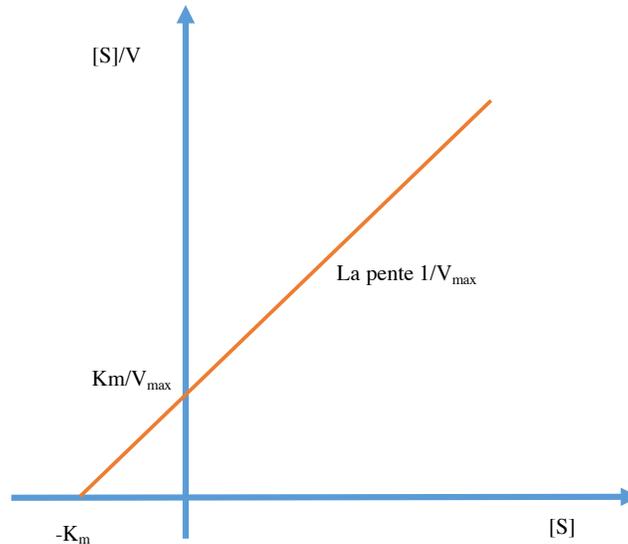


Figure 5 : Représentation graphique de Hanes-Woolf. La représentation décrit la relation entre les paramètres d'une réaction enzymatique.

En construisant un graphique avec la concentration initiale de substrat $[S]$ divisée par la vitesse initiale ($[S]/v_i$), en fonction de $[S]$. On obtient ainsi la relation linéaire où, la pente de la droite correspondant à $1/V_{max}$, l'ordonnée à l'origine est K_m/V_{max} et l'abscisse à l'origine représente $-K_m$.

Les différentes représentations linéaires permettent d'obtenir les paramètres cinétiques, mais complexifient les analyses statistiques des données. Aujourd'hui, avec l'aide de différents logiciels, la relation non linéaire de Michaelis-Menten n'est plus un problème à résoudre.

1.4 La modulation des enzymes

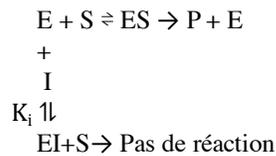
Comme mentionné précédemment, les enzymes jouent un rôle essentiel chez tous les êtres vivants. Leur importance (Drews, 1996) pour l'organisme fait qu'elles sont d'excellentes cibles thérapeutiques. En effet, un dysfonctionnement enzymatique peut avoir des conséquences très néfastes pour l'organisme. Par exemple, la maladie de Tay-Sachs, causée par un déficit en hexosaminidase, est une maladie neurodégénérative.

Les enzymes présentent une grande spécificité pour leur substrat. Fischer expliquait cette spécificité en utilisant l'image clefs/serrures (Fischer, 1894) qui est aujourd'hui obsolète. Il postulait que la structure tridimensionnelle du substrat devait s'adapter au site actif de l'enzyme. La structure 3D de l'enzyme et du substrat serait donc complémentaire et ceci permettrait à l'enzyme de reconnaître son substrat (Fischer, 1894). L'essor de la biologie structurale a permis de démontrer que les protéines ne sont pas des entités

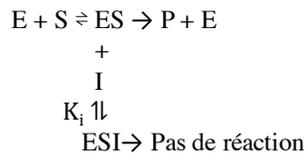
rigides, mais qu'elles possèdent une certaine flexibilité. Koshland a remis en question le modèle de Fischer et l'a adapté pour prendre en compte la flexibilité des enzymes ; en expliquant ainsi la spécificité des enzymes par rapport à leurs substrats avec le modèle de l'ajustement induit « *induced-fit* » (D. E. Koshland, 1958). Ce modèle suggère que l'enzyme va voir sa structure changée avec la fixation de son substrat pour ensuite retrouver sa structure originale après la réaction (Koshland, 1959). Ce modèle est maintenant celui qui est utilisé pour expliquer la liaison et la spécificité de substrats.

Différents types d'inhibition existent : l'inhibition compétitive, incompétitive, non compétitive et la modulation allostérique.

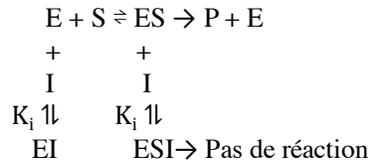
L'inhibition compétitive met en jeu un inhibiteur qui s'insère au site catalytique de l'enzyme et qui souvent ressemblera au substrat de l'enzyme. Il va donc entrer en compétition avec celui-ci pour la fixation à l'enzyme et ainsi limiter l'accessibilité de l'enzyme pour le substrat ; la concentration en enzyme libre va diminuer et la conséquence sera une diminution de la réaction enzymatique (Voet et al., 2010). L'inhibition compétitive est résumée avec le schéma réactionnel suivant où E représente l'enzyme, S est le substrat, P est le produit de la réaction et I est l'inhibiteur compétitif :



Dans le cas d'inhibition incompétitive, l'inhibiteur va venir se fixer sur le complexe enzyme/substrat, empêchant la réaction enzymatique de se produire. Voici le schéma réactionnel résumant l'inhibition incompétitive (Voet et al., 2010) :



Dans le cas de l'inhibition non compétitive ou mixte, l'inhibiteur peut se fixer au complexe enzyme/substrat ou à l'enzyme seule. Voici le schéma réactionnel résumant ce type inhibition (Voet et al., 2010) :



La modulation allostérique est basée sur un changement de conformation de l'enzyme engendré par la présence d'un ligand qui modifie son activité. Ce type d'inhibition sera expliqué plus en détail dans la suite du mémoire.

Comme mentionné précédemment, les enzymes sont des cibles thérapeutiques intéressantes en raison de leurs rôles biologiques importants. C'est pourquoi de nombreuses études se sont intéressées à la façon de contrôler l'activité des enzymes. La stratégie la plus utilisée pour moduler leur activité est de cibler le site actif ou orthostérique dans le but de rendre impossible la liaison du substrat. Cette stratégie montre un certain nombre de limites, notamment au niveau de la spécificité de l'interaction cible/médicament.

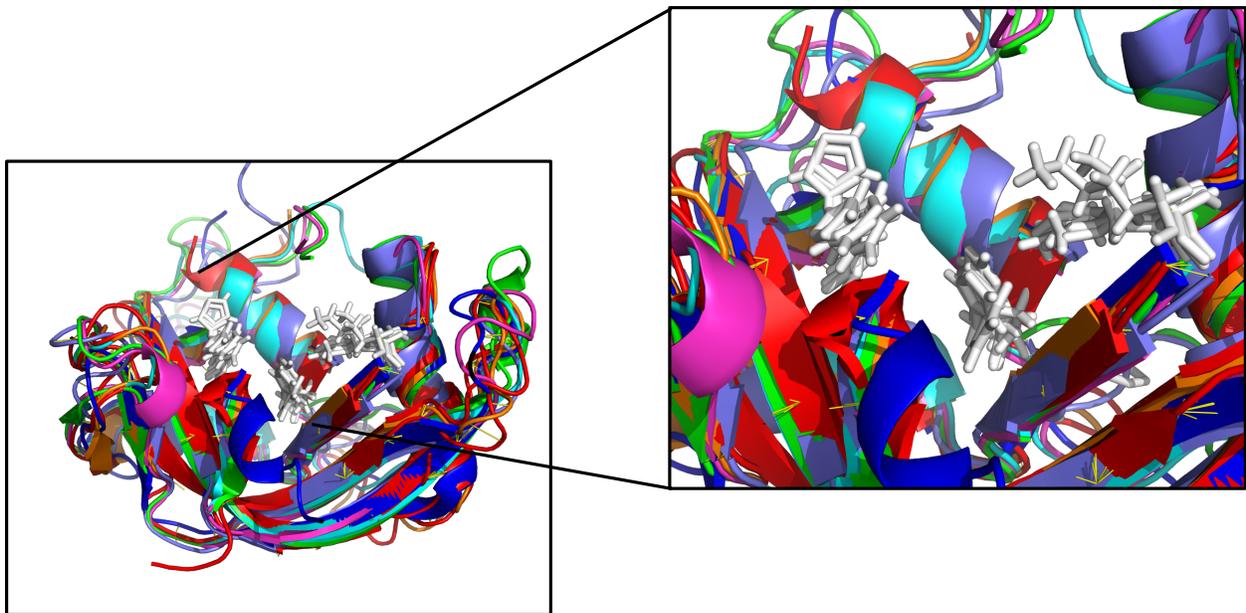


Figure 6 : Alignement de structures tridimensionnelles obtenues grâce au logiciel Pymol (fichier PDB : 2K11, 1GQV, 1QMT, 1RNF, 1 ANG, 4X09, 2HKY et 5OLD) qui correspondent respectivement à la RNase 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et A.

En effet, le site actif d'une enzyme est la partie la plus conservée au cours de l'évolution. La figure 6 illustre ce phénomène à partir d'un alignement des structures tridimensionnelles de 7 RNases humaines et de la RNase A bovine. La structure tridimensionnelle dans son ensemble montre des similitudes, mais le zoom sur le site catalytique démontre que celui-ci est globalement conservé (en blanc : les résidus catalytiques). Ceci implique qu'au sein des superfamilles de protéines telles que les ribonucléases (RNases), un inhibiteur

orthostérique risque de toucher d'autres membres de la superfamille et non pas seulement le membre ciblé (Nussinov et al., 2011). D'autres méthodes de modulation de l'activité des enzymes peuvent être utilisées, notamment des anticorps dirigés contre l'enzyme d'intérêt. En effet, la liaison à un anticorps peut empêcher l'accès au site catalytique de l'enzyme et même prévenir des interactions avec d'autres protéines essentielles à certaines réponses biologiques. Bien que les anticorps aient une excellente affinité pour leur cible, leur biodistribution limitée et la réponse immunitaire qui leur est associée sont des freins à leur utilisation en tant que médicaments (Chames et al., 2009). Des modulateurs allostériques, dont il est question dans ce mémoire, peuvent offrir une alternative intéressante. Dans la section RNase 5, différentes approches pour inhiber cette enzyme sont résumées.

L'inhibition orthostérique n'est pas la seule façon de moduler l'activité des enzymes. Il a été mis en évidence qu'il existait des sites de fixation distants du site actif de la protéine ayant une influence sur l'activité de la protéine ; on parle ainsi de sites allostériques. La notion d'allostérie a été décrite pour la première fois par le modèle de Monod-Wyman-Changeux (MWC) dans les années 60, en prenant en compte les protéines multimériques. Le principe d'allostérie amené par ce modèle permet d'expliquer certains mécanismes de rétro-inhibition dans les voies métaboliques bactériennes ; c'est-à-dire comment le produit final de la voie métabolique rétro-inhibe les enzymes situées en amont de la voie catalytique. Il permet aussi de comprendre comment une molécule de O_2 se fixant à une des sous-unités de l'hémoglobine va augmenter l'affinité d'une autre sous-unité et ainsi de suite (Changeux, 2012). Avec l'appui de la théorie de l'ajustement induit de Koshland, le modèle MWC propose que le site actif de la protéine soit affecté par la fixation d'une molécule effectrice. Cette fixation va entraîner un changement conformationnel de la protéine qui peut être à l'origine d'un effet modulateur ayant pour conséquence d'augmenter, d'inhiber ou de diminuer l'activité de l'enzyme (voir la figure 7).

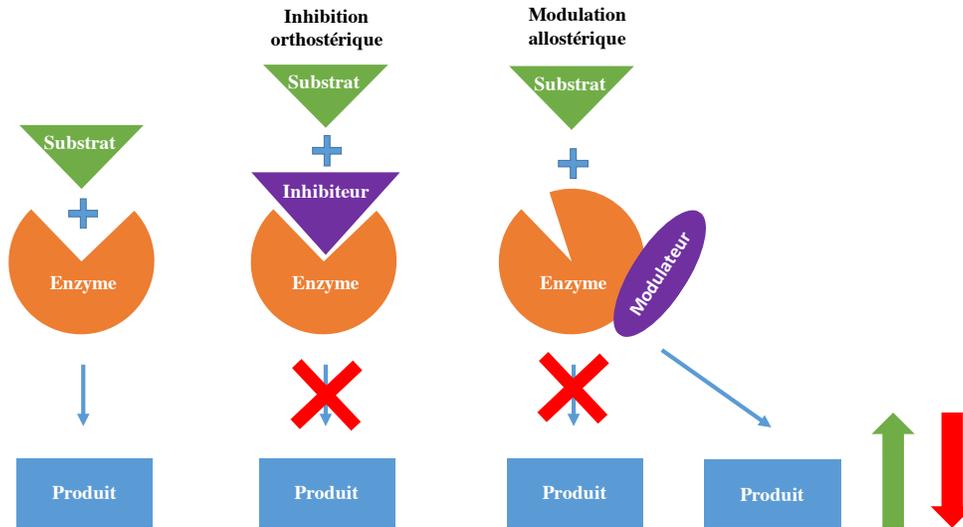


Figure 7 : Schéma résumant les différentes stratégies de modulation des enzymes.

La fixation d'un modulateur allostérique peut induire un changement de conformation de la structure tridimensionnelle de la protéine, mais également une perturbation de la dynamique de la protéine. Cooper et Dryden ont été les premiers à introduire la dynamique (Cooper and Dryden, 1984) dans le phénomène allostérique, jusqu'alors très centré sur l'aspect conformationnel selon le point de vue de Koshland. Depuis, la notion d'allostérie s'est étendue aux réseaux allostériques, dans lesquels des sites sont dynamiquement couplés à d'autres sites distincts. Ainsi la perturbation d'un des sites par un modulateur affectera la dynamique de l'autre site (Dokholyan, 2016).

En résumé, les inhibiteurs orthostériques sont généralement très spécifiques pour leur cible, mais peuvent présenter une sélectivité faible en raison de l'homologie du site de liaison avec une protéine de la même famille. Ceci peut donner lieu à des effets secondaires non désirés dans le cas d'une molécule thérapeutique. L'allostérie apporte une nouvelle option à la conception d'inhibiteurs en ciblant un site autre que le site orthostérique qui est hautement conservé au sein d'une famille de protéines. La conception de modulateur allostérique permet ainsi de diminuer la fixation potentielle du modulateur sur une autre protéine que la protéine cible (Grover, 2013).

1.5 Les ribonucléases

La ribonucléase A ou RNase A est une enzyme d'origine bovine retrouvée en concentration très élevée au niveau du pancréas. Elle est la protéine la plus étudiée à ce jour. D'ailleurs, plusieurs études récompensées par le prix Nobel avaient pour sujet la RNase A, dont les travaux d'Anfinsen sur le repliement de la RNase A qui lui valurent le prix Nobel de chimie en 1972. De ces travaux découlent les principes suivants : la

structure tridimensionnelle d'une protéine est encodée dans sa séquence en acides aminés. Et que la forme dite native de la protéine correspond à la forme ayant le moins d'énergie, donc la plus stable (Anfinsen, 1973). La RNase A fut la première enzyme dont la structure tridimensionnelle fut résolue par diffraction aux rayons X (Raines, 1998). La structure de cette protéine a une forme de rein avec deux domaines nommés V1 et V2. Et avec le site actif dans le creux formé par ces deux domaines, le tout stabilisé par 4 ponts disulfures (Gagné and Doucet, 2013). (Voir figure 8). C'est une protéine sécrétée de 124 acides aminés.

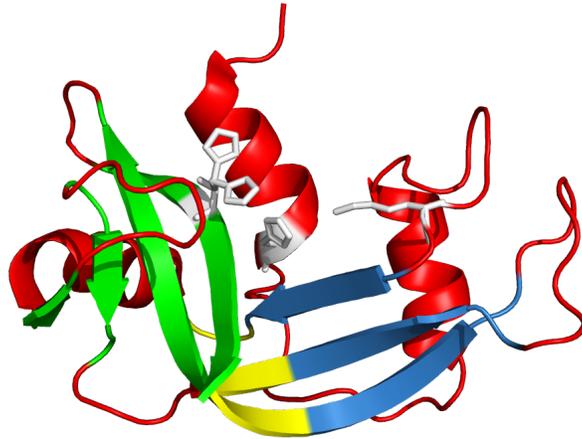


Figure 8 : Structure tridimensionnelle de la RNase A (en rouge). En vert le domaine V1, en bleu le domaine V2, en jaune la région qui joint les deux domaines et en blanc les trois résidus catalytiques. (fichier PDB : 5OLD).

Les RNases sont spécialisées dans la dégradation des acides ribonucléiques (ARN). Dans le cas de la RNase A, le mécanisme enzymatique a été caractérisé (Moussaoui et al., 2006), et le clivage de la liaison phosphodiester se fait selon un mécanisme acido-basique. Cette réaction de clivage a lieu grâce aux trois résidus qui forment une triade catalytique. Dans le cas de la RNase A, les trois résidus sont la lysine 41 et les histidines 12 et 119. L'histidine 12 capte un hydrogène du ribose (rôle de base) alors que l'histidine 119 cède un hydrogène (rôle d'acide). Cela conduit à la formation d'un intermédiaire 2', 3' — monophosphodiester cyclique stabilisé par la lysine 41 (Gagné and Doucet, 2013). (Voir la figure 9).

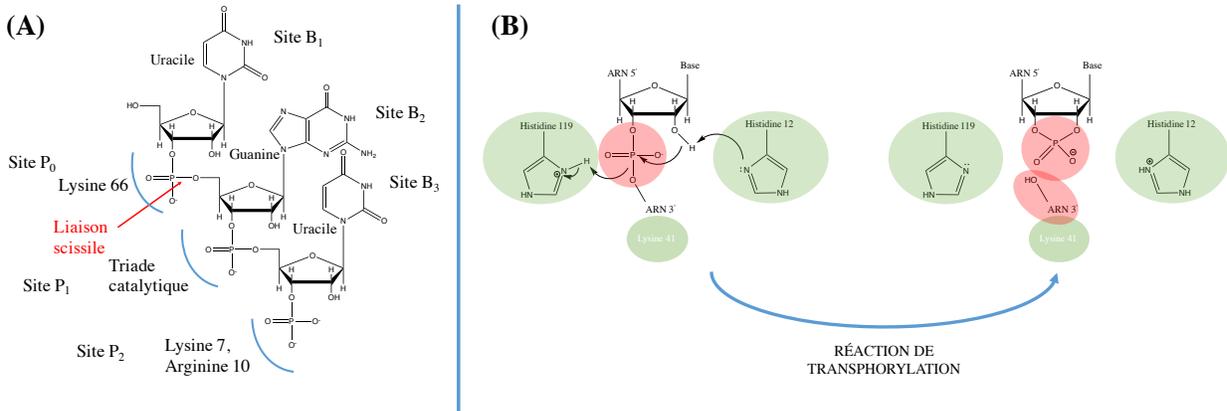


Figure 9 : Représentation des différents sous-sites de fixation des ribonucléases (A) et représentation de la réaction de transphosphorylation catalysée par l'enzyme (B). (Gagné and Doucet, 2013)

Les ribonucléases (RNases) humaines forment une superfamille de protéines. C'est-à-dire des protéines ayant un repliement tridimensionnel et une fonction similaire, mais ayant acquis au cours de leur évolution propre une diversité dans leurs activités ou une diversité au niveau des substrats acceptés. Comme la RNase A, ce sont des protéines sécrétées qui sont composées en moyenne de 130 résidus (Figure 10). La structure tridimensionnelle de ces RNases est similaire, mais chacune présente des particularités acquises durant leur évolution propre. En effet, les RNases possèdent différentes activités biologiques. Certaines sont impliquées dans la neuroprotection, l'angiogénèse, d'autres ont des activités antibactériennes, antiparasitaires, cytotoxiques, neurotoxiques, etc. (voir tableau 2 pour les 5 RNases les plus étudiées). Depuis le séquençage complet du génome humain, 8 isoformes humaines catalytiquement actives ont été identifiées (S. Sorrentino, 1998).

Tableau 2 : Tableau résumant les actions biologiques de 5 RNases humaines et leur préférence de substrats. (Sorrentino, 2010)

Ribonucléase	Actions	Substrats
1	Pancréatique	Poly (C) et ARN double brins
2 ou EDN	Neurotoxique et antiviral	Poly (U)
3 ou ECP	Cytotoxique, antiviral, antibactérienne, neurotoxique et antiparasitaire	Poly (U)
4	angiogénèse	Poly (U)
5 ou Angiogénine	angiogénèse	ARNr et ARNt

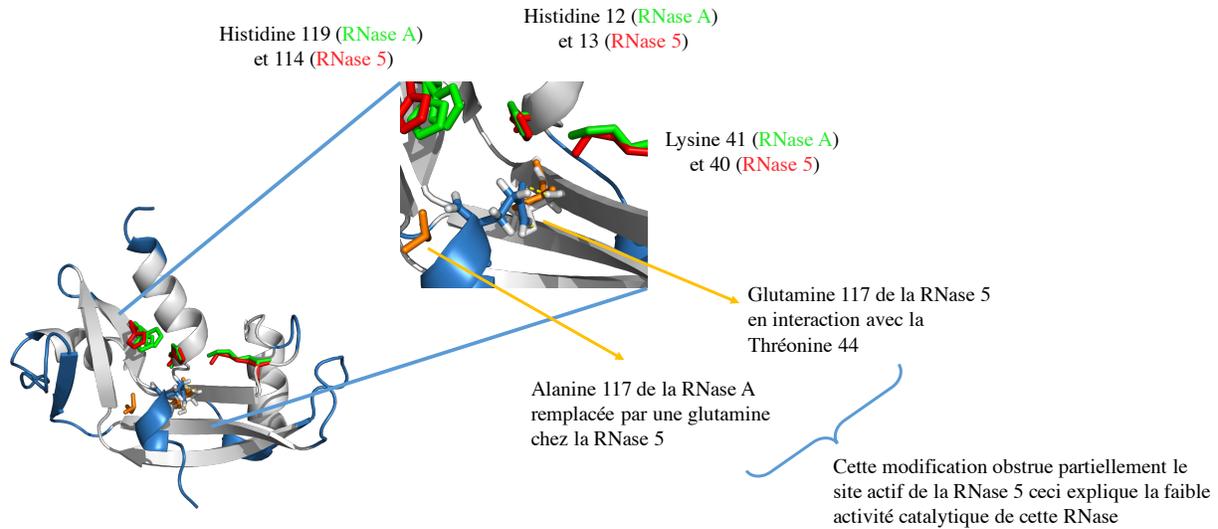


Figure 11 : Structure de la RNase 5. Les zones qui diffèrent de la RNase A sont bleues, les résidus catalytiques sont en vert (RNase A) ou en rouge (RNase 5) et les résidus en position 117 sont en orange (PDB 1ANG RNase 5 et 5OLD RNase A).

Donc, l'obstruction partielle du site actif par le résidu glutamine 117, maintenue grâce à des liaisons hydrogène entre ce résidu et la thréonine 44, explique cette faible activité ribonucléolytique. (Voir figure 11). Il est donc logique que la substitution de cet acide aminé par une alanine ou une glycine ; qui sont des résidus de petite taille et avec une pauvre capacité à créer des liaisons hydrogène conduit à une augmentation de l'activité catalytique de la RNase 5. L'obstruction partielle du site actif de la RNase 5 n'est pas la seule différence structurale entre cette RNase et d'autres membres de la superfamille. En effet, les RNases possèdent 8 cystéines conservées (Figure 10) formant 4 ponts disulfures. Dans le cas de la structure tridimensionnelle de la RNase 5, seuls 6 résidus cystéines sont engagés dans 3 ponts disulfures.

Cette protéine est sécrétée comme tous les autres membres de cette superfamille, elle est présente dans différents sites de l'organisme. Elle est retrouvée dans le plasma, le liquide amniotique, le liquide cébrospinal et dans le cas de cancer au niveau de la tumeur. Cette multitude de localisations montre que cette protéine n'est pas seulement impliquée dans la néovascularisation.

La figure 12 montre les différentes actions de la RNase 5 au niveau de la cellule. Cette protéine, mise en évidence en 1997, fixe un récepteur à la surface de la membrane des cellules, sa taille est de 170 kDa (GUO-FU HU et al., 1997). Puis en 2018 le récepteur a été identifié comme étant EGFR (*endothelial growth factor receptor* ou récepteur au facteur de croissance endothéliale) (Wang et al., 2018). La région B2 semble être chez la RNase 5 le site de fixation avec le récepteur membranaire. Lorsque la région B2 de la RNase 5 est remplacée par la même région de la RNase A, l'activité ribonucléolytique est retrouvée, mais l'activité angiogénique est perdue (F. Riordan, 2001). La fixation à ce récepteur va donc déclencher l'activation de plusieurs voies de signalisation cellulaire. Il a été démontré que l'angiogénine est capable d'activer la voie

Erk $\frac{1}{2}$ (*Extracellular signal-regulated kinase*) chez les cellules HUVEC (cellules endothéliales humaines de veine ombilicale) (Liu et al., 2001) par phosphorylation transitoire de celle-ci. La fixation au récepteur déclenche aussi l'endocytose de la RNase 5. En effet, la RNase 5 cytosolique peut agir à différents niveaux dans les cellules (Lyons et al., 2017) ; en particulier, la protéine va interagir avec la protéine p53, qui est une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et notamment l'apoptose. Dans les conditions normales, une cellule va avoir très peu de protéine p53, car la protéine MDM2 (*murine double minute 2*) fait que la protéine p53 est continuellement ubiquitinilée et donc éliminée. Lorsque la cellule doit entrer en apoptose, la liaison entre les protéines p53 et MDM2 est abolie, donc la protéine p53 s'accumule dans la cellule et déclenche le processus d'apoptose (Kubbutat et al., 1997). Mais l'angiogénine va interagir avec la p53 et va empêcher la phosphorylation de la sérine 15 de p53 et ainsi favoriser la fixation de la protéine MDM2. La liaison continue entre les protéines p53 et MDM2 empêche donc la cellule de rentrer en apoptose (Sadagopan et al., 2012). La RNase 5 va être aussi capable de cliver l'ARNt, ce qui va participer au processus de survie cellulaire. Elle est aussi capable de fixer l'actine, qui participe à la migration cellulaire (Hu et al., 1993). La RNase 5 est la seule des RNases humaines à être transloquée dans le noyau grâce à NLS (*nuclear localisation signal* ou signal de localisation nucléaire) et cette translocation est nécessaire pour l'activité angiogénique. Lorsqu'elle rentre dans le noyau des cellules, elle va stimuler la production d'ARN ribosomique (Moroianu and Riordan, 1994). L'augmentation d'ARNr va entraîner la formation de nouveaux ribosomes, ce qui va permettre à la cellule d'augmenter la production de protéines nécessaires pour la croissance cellulaire (Xu et al., 2002).

de cette protéine d'un point de vue thérapeutique. Les études qui ont essayé de moduler l'activité de la RNase 5 se sont focalisées sur l'aspect de l'angiogénèse, car l'implication de la RNase 5 dans les maladies neurodégénératives est une découverte récente. Une étude a mis en évidence que le sulfate d'ammonium inhibait la RNase 5, la RNase A et la RNase 2 avec des IC_{50} de l'ordre du mM. Dans le cas des RNases A et 2, le site de fixation est le sous-site de fixation P1, alors que pour la RNase 5 se sont les sous-sites P0 et P2 qui sont affectés. Ceci démontre que cette molécule interfère ainsi avec le site actif de la protéine. Cette étude montre la possibilité d'inhiber la RNase 5 avec de petites molécules, mais la spécificité du sulfate d'ammonium pour une RNase en particulier n'est pas présentée (Chatzileontiadou et al., 2016). Une autre étude a regardé l'effet d'un antibiotique (la néomycine) sur l'activité angiogénique de la RNase 5. La RNase 5 en présence de néomycine n'est plus transloquée au noyau, la prolifération des cellules est inhibée en présence de l'antibiotique. En revanche, la néomycine n'a aucun effet sur l'activité ribonucléolytique (Hu, 1998). La néomycine a aussi une influence sur d'autres facteurs angiogéniques tels que EGF (*epidermal growth factor*) et VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Là aussi, leur translocation au noyau est rendue impossible dû à la présence de néomycine (Hu, 2001). D'autres études utilisant un métabolite du champignon *Aspergillus terreus* ont démontré une activité anti-angiogénique pour des cancers de la tête et du cou en empêchant la production de la RNase 5 (Arakawa et al., 2008 ; Shibata et al., 2016). De plus, une étude basée sur un criblage à haut débit sur la RNase5 (18 310 composés) a identifié un composé liant le site actif de la protéine et ayant un effet antitumoral (Kao et al., 2002). L'utilisation d'un anticorps murin 26-2F a démontré la capacité à neutraliser les activités ribonucléolytique et angiogénique de l'angiogénine avec un IC_{50} de 1,6 nM. Par contre, l'utilisation de cet anticorps déclenche une réaction immunitaire indésirable. Dans l'optique de réduire la réponse immunitaire contre cet anticorps, les auteurs ont développé un anticorps dérivé humanisé (13 % murin au final). Une structure tridimensionnelle du complexe avec une résolution de 2 Å a été obtenue et l'anticorps permettait d'abolir les activités biologiques de l'enzyme, ce qui justifiait selon les auteurs l'intérêt thérapeutique de cet anticorps, mais aucune autre publication n'a suivie (Chavali et al., 2003).

Le nombre d'études visant à moduler la RNase 5 semble montrer que cette protéine constitue une cible thérapeutique potentiellement intéressante. Une cinquantaine d'études visant à inhiber ou moduler l'activité de la RNase 5 ont été entreprises depuis la publication par Vallee et al en 1985 de la séquence en acides aminés de la protéine. Parmi ces études, beaucoup d'approches différentes ont été utilisées : un criblage à haut débit avec de petites molécules (Kao et al., 2002), la technique du *phage display* a été utilisée sur la RNase 5 dans le but d'obtenir des peptides inhibiteurs (Choi et al., 1997), un criblage bio-informatique (Jenkins and Shapiro, 2003), plusieurs études sur le RI (*ribonuclease inhibitor*) ayant une $IC_{50} < 1fM$ (Papageorgiou, 1997; Shapiro and Vallee, 1987), l'utilisation de molécules naturelles (Arakawa et al.,

2008), d'antibiotiques (Hu, 2001, 1998) et d'anticorps anti RNase 5 ont été réalisées (Olson et al., 1994). Ces études ont été effectuées *in vitro* et *in vivo*.

Bien qu'un criblage de molécules a déjà été entrepris sur cette protéine, un criblage avec de petits fragments pourrait permettre d'explorer d'avantage l'espace chimique pour trouver un ligand qui pourrait possiblement induire une inhibition ou une modulation de l'activité de la protéine. Le rôle clé de la RNase 5 dans plusieurs pathologies supporte l'idée que cette protéine puisse être une cible thérapeutique.

1.7 Projet de recherche

1.7.1 Problématique

La recherche de nouveaux médicaments est constamment à l'affût de nouvelles stratégies pour combler les besoins thérapeutiques. Le cancer est une maladie qui touche une vaste population et qui se présente sous de multiples facettes, ce qui nécessite une grande variété de traitements disponibles. De même, les maladies neurodégénératives, incluant les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, demeurent toujours des défis pour la médecine malgré de nombreuses recherches. L'angiogénèse, la prolifération et la survie cellulaire sont des processus biologiques jouant des rôles importants dans la progression du cancer et des maladies neurodégénératives. Or, l'angiogénine module ces processus biologiques cellulaires. De fait, plusieurs travaux de recherche ont associé l'angiogénine à la progression de cancers ainsi qu'à la neuroprotection, ce qui fait de cette protéine une cible thérapeutique (Bradshaw et al., 2017 ; Lyons et al., 2017 ; Steidinger et al., 2013 ; Wang et al., 2018). D'ailleurs, déjà en 2002 une étude par criblage d'une banque de molécules avait identifié un inhibiteur de l'angiogénine ayant des propriétés antitumorales. En effet, une étude *in vivo* chez la souris a été effectuée dans laquelle la croissance d'une tumeur de cellules de prostate était ralentie en présence de l'inhibiteur (Kao et al., 2002). Même si cette molécule semblait prometteuse, il est étonnant que des publications sur l'utilisation de cet inhibiteur, ou une molécule dérivée, n'aient pas succédé. Puisque ce criblage cherchait à identifier un inhibiteur du site catalytique de l'enzyme, il est possible que cette molécule inhibait également d'autres RNases, diminuant ainsi son intérêt thérapeutique. L'angiogénine reste toujours une cible thérapeutique d'importance et de multiples études continuent d'approfondir nos connaissances sur ses interactions et activités biologiques. En revanche, des modulateurs allostériques n'ont pas encore été identifiés pour moduler l'activité de cette enzyme.

1.7.2 Hypothèse et objectifs de recherche

D'un point de vue thérapeutique, la RNase 5 présente un certain intérêt. Depuis sa découverte en 1985, plusieurs études ont cherché à moduler ses activités biologiques. Cette protéine a fait l'objet de deux

campagnes de criblage, *in silico* et à haut débit, mais il semble qu'une poursuite du travail vers l'élaboration d'un ligand thérapeutique efficace n'a pas eu lieu. L'approche du FBDD semble prometteuse avec 2 médicaments actuellement sur le marché et plusieurs molécules thérapeutiques en phase expérimentale clinique. Puisque la RNase 5 fait partie d'une superfamille de protéines, il serait souhaitable d'obtenir un modulateur de type allostérique plutôt qu'un inhibiteur du site catalytique afin d'envisager une meilleure spécificité. De plus, puisqu'il existe un réseau allostérique contrôlant la dynamique moléculaire des protéines, une modulation allostérique des enzymes peut offrir un nouvel angle pour le contrôle de l'activité. D'ailleurs, des études récentes ont mis en lumière le fait que les RNases sont des protéines dynamiques, c'est-à-dire qu'elles possèdent des mouvements structuraux internes à l'échelle de la milliseconde, nécessaires à leur activité enzymatique (Doucet et al., 2009, 2011). L'existence de tels mouvements ayant une influence sur l'activité catalytique de l'enzyme au sein de la structure laisse entrevoir la possibilité d'une potentielle modulation allostérique pour les membres de cette famille de protéines.

L'hypothèse de cette étude est qu'un criblage de petits fragments chimiques au sein d'une approche FBDD permettrait d'identifier des molécules capables de fixer la RNase 5 de manière à affecter la structure et/ou la dynamique de l'enzyme et ainsi engendrer une modulation d'au moins une facette de ses activités biologiques.

Dans ce projet, le criblage FBDD d'une librairie de fragments avec la RNase 5 sera réalisé. Suite à ce criblage des fragments, les candidats potentiels en tant que « *leads* » pour un futur ligand de la protéine subiront une caractérisation biochimique, structurale et biologique dans le but de démontrer une modulation de la RNase 5.

Pour répondre à cette question, cette étude se divisera en 3 objectifs :

- ✓ Objectif 1 : Production de la RNase 5 et criblage de la librairie de fragments ;

- ✓ Objectif 2 : Caractérisation structurale de la liaison des fragments à la RNase 5 ;

- ✓ Objectif 3 : Caractérisation biochimique et biologique de l'effet des fragments sur la RNase 5 (effet sur la prolifération cellulaire induite par la RNase 5 et sur la catalyse enzymatique).

2 Méthodologie

2.1 Expression et purification de l'angiogénine recombinante

2.1.1 Expression de l'Angiogénine ou RNase 5

Le système d'expression de la RNase 5 recombinante utilisé est la bactérie *E. coli* BL21 (DE3). Les bactéries sont transformées avec un vecteur plasmidique. Le vecteur contient la séquence codante pour la protéine recombinante avec des codons optimisés pour l'expression chez *E. coli*. Ce système est dit inductible, c'est-à-dire que l'expression de la protéine est induite par la présence d'une molécule inductrice. Dans ce système d'expression, l'opérateur *lacO* est sous le contrôle du promoteur T7 et le répresseur *LacI* réprime l'expression induite par la T7 polymérase, qui est présente dans le chromosome bactérien. Après l'ajout d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), un analogue non métabolisable du lactose qui est l'inducteur de l'opéron lactose, le répresseur *lacI* est piégé par l'IPTG et la T7 ARN polymérase peut se lier à la séquence promotrice et ainsi transcrire le gène codant pour la RNase 5. Les ARN messagers générés lors de la transcription sont ensuite traduits en protéine. La RNase 5 possède trois ponts disulfures ; ceux-ci ne peuvent se former dans le milieu cytoplasmique de la bactérie *E. coli* qui est un milieu réducteur. Le non-repliement tridimensionnel des protéines conduit à la formation de corps d'inclusion. Bien que la protéine désirée ne soit pas obtenue dans sa structure biologiquement active, la fraction contenant la protéine (les corps d'inclusion) sera composée pratiquement uniquement de cette protéine. La figure 13 résume les étapes menant à la production de la RNase 5.

2.1.2 Repliement *in vitro* de la RNase 5

Les bactéries sont ensuite lysées par sonication pour briser les membranes cellulaires. Après centrifugation, le culot contient les corps d'inclusion et les débris cellulaires tels que les membranes des bactéries. Cette fraction insoluble est solubilisée dans une solution contenant de l'hydrochlorure de guanidine (6M), un agent chaotrope permettant la solubilisation des corps d'inclusion et donc de la protéine recombinante. Bien que les protéines soient dénaturées à ce stade du protocole, du glutathion réduit est ajouté afin de s'assurer que toutes les cystéines des protéines sont réduites et qu'aucun pont disulfure n'est formé.

L'étape limitante de ce processus de production de protéines est la renaturation *in vitro* des protéines. En effet, à cette étape la solution contenant les protéines solubilisées et réduites (environ 20 mL) est ajoutée progressivement (goutte à goutte, 2-3 mL/h) dans un bain de repliement (environ 2 L). Le bain de repliement contient de la glutathion oxydé (rapport oxydé : réduite = 1 : 40) et la présence du couple oxydoréducteur de la glutathione va permettre la formation des ponts disulfures. La dissolution de petites quantités de

manières progressives favorise le bon repliement de la protéine, mais la protéine est laissée pendant 3 jours dans le bain de repliement afin de maximiser l'obtention de protéines bien repliées. De plus, les RNases humaines sont connues pour avoir une tendance à agréger (Yan et al., 2006). Ainsi le bain de repliement contient de l'arginine à une concentration de 0,5 M ; des études précédentes ayant montré que l'arginine peut limiter l'agrégation des protéines (Baynes et al., 2005). Malgré tout, c'est à ce moment que la perte de protéines est la plus importante. Après cette étape, les 2 L du bain de repliement contenant la protéine repliée sont ensuite concentrés jusqu'à environ 200 mL. Ces 200 mL sont ensuite dialysés pour changer le tampon de repliement contre le tampon de purification et surtout éliminer l'arginine, qui peut nuire à la purification. Selon le protocole précédemment établi dans le laboratoire, le tampon de purification ne contenait pas d'arginine. Mais pour limiter le risque de précipitation de la protéine, l'arginine a été conservée à une concentration de 0,2 M. Cette modification a permis l'obtention de meilleurs rendements de purification pour la RNase 5 en comparaison avec l'ancien protocole, qui supprimait l'arginine à l'étape de dialyse. (Figure 13)

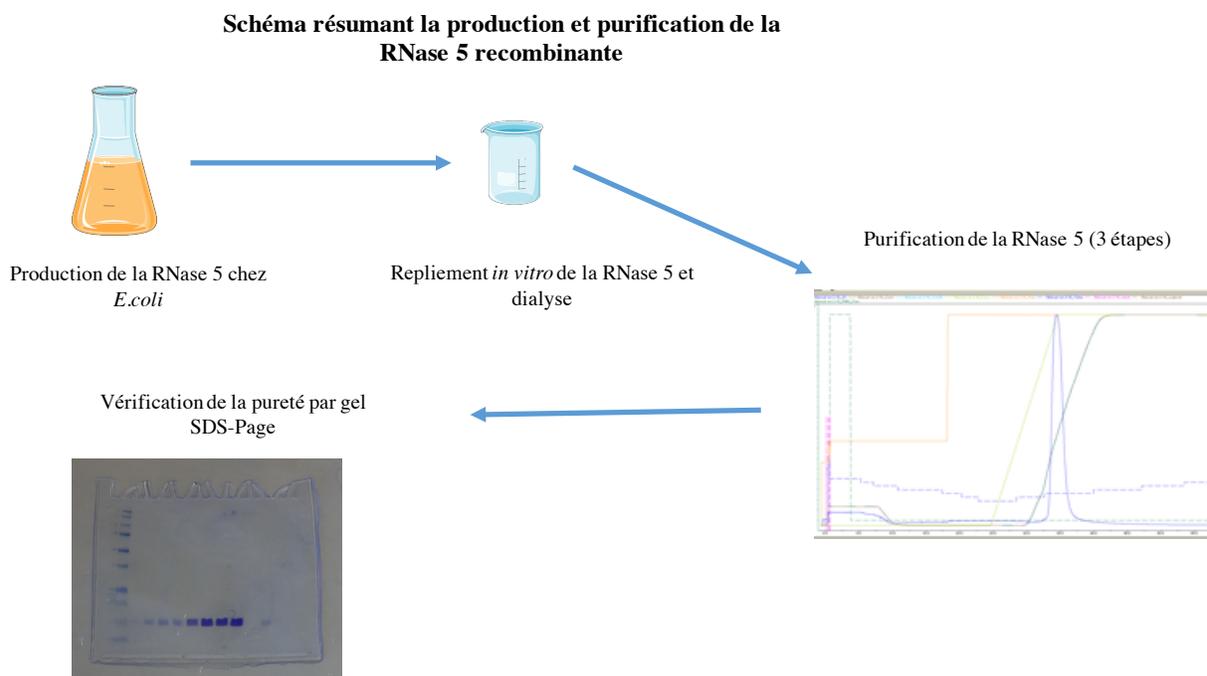


Figure 13 : Résumé de la production et purification de la RNase 5.

2.1.3 Purification de la protéine

Pour purifier la protéine, des colonnes d'échanges ioniques sont utilisées. La RNase 5 est une protéine avec un pI (point isoélectrique) de 9,73, justifiant l'utilisation d'un tampon de purification à pH 5. Dans ces conditions, la protéine est globalement chargée positivement. La première étape de purification utilise une colonne échangeuse d'anions (Hitrap Q de GE Healthcare). À pH 5, une grande quantité de protéines qui

sont chargées négativement et sont donc retenues par la colonne, alors que la RNase 5 ne l'est pas. La fraction non retenue sur la colonne, qui contient la protéine et d'autres protéines ayant des pI proches de celui de la RNase 5, est purifiée sur une nouvelle colonne. La deuxième étape de purification s'effectue avec une colonne échangeuse de cations (Hitrap SPHP de GE Healthcare) et cette fois, la protéine va interagir avec la colonne. Pour éluer la protéine de la colonne et donc ainsi la séparer des autres protéines chargées positivement, un gradient de tampon contenant une concentration de NaCl élevée (2 M) est utilisé. En augmentant progressivement la force ionique dans la colonne, les différentes protéines sont éluées à différents pourcentages de tampon d'élution, ce qui permet la séparation des différentes protéines. La RNase 5 est éluee autour de 40-55 % de tampon d'élution. L'élution des protéines est suivie par l'absorption à 280 nm, les fractions où l'on observe une augmentation de l'absorbance dans l'UV étant conservées. Pour vérifier la pureté des fractions et aussi réunir les fractions contenant la RNase 5, une analyse par électrophorèse sur gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) est effectuée. La migration sur gels électrophorétiques permet de séparer les protéines suivant leur taille puisque la présence du détergeant SDS (sodium dodécylsulfate) enrobe toutes les protéines dénaturées, leur conférant ainsi une charge négative, pour ensuite forcer la migration dans le gel grâce à un champ électrique. Le déplacement dans la matrice suivra ainsi un seul paramètre, la taille. Les protéines sont visualisées par coloration du gel au bleu de Coomassie et les fractions ne présentant qu'une seule bande au poids moléculaire correspondant à la RNase 5 sont pures et donc conservées. Le regroupement des fractions pures est ensuite concentré jusqu'à l'obtention de la concentration souhaitée en utilisant des concentrateurs centrifuges ayant un seuil de séparation à 3 kDa. (Figure 13)

2.2 Criblage et expériences RMN

2.2.1 Criblage de la librairie de fragments

La librairie de fragments utilisée provient du laboratoire du professeur LaPlante (INRS, Centre Armand Frappier Santé Biotechnologie). Cette librairie est constituée de 1640 fragments, organisés en 169 groupes, chacun composé de 7 à 10 fragments. L'organisation de la librairie est faite de telle manière que les spectres RMN 1D du proton de chaque fragment d'un groupe soient les plus différents les uns des autres (Figure 14).

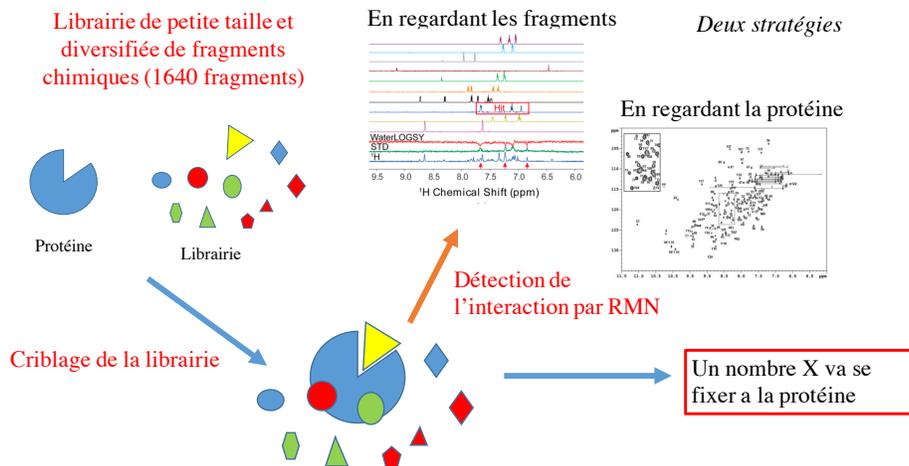


Figure 14 : Résumé d'un criblage FBDD.

Avant de réaliser un criblage complet de la librairie, la protéine est d'abord testée dans le but d'évaluer la faisabilité du criblage. Ainsi, la stabilité de la protéine est vérifiée en présence de diméthyle sulfoxyde (DMSO) puisqu'il s'agit du solvant dans lequel les fragments sont dissous et 3 groupes de fragments sont d'abord criblés dans le but de voir si la protéine fixe quelques fragments et non tous les fragments d'un groupe.

La préparation des tubes RMN pour le criblage est entreprise avec un robot pour limiter les biais dus au pipetage, 169 pools doivent être testés avec et sans protéine, donc un total de 338 tubes. Chaque tube subira plusieurs expériences RMN, spectre 1D, STD et CPMG. En comparant les spectres obtenus avec et sans protéine, il est possible de déterminer de potentiels ligands dans la librairie de fragments. La figure 15 montre le type de résultats obtenus après le criblage d'un pool.

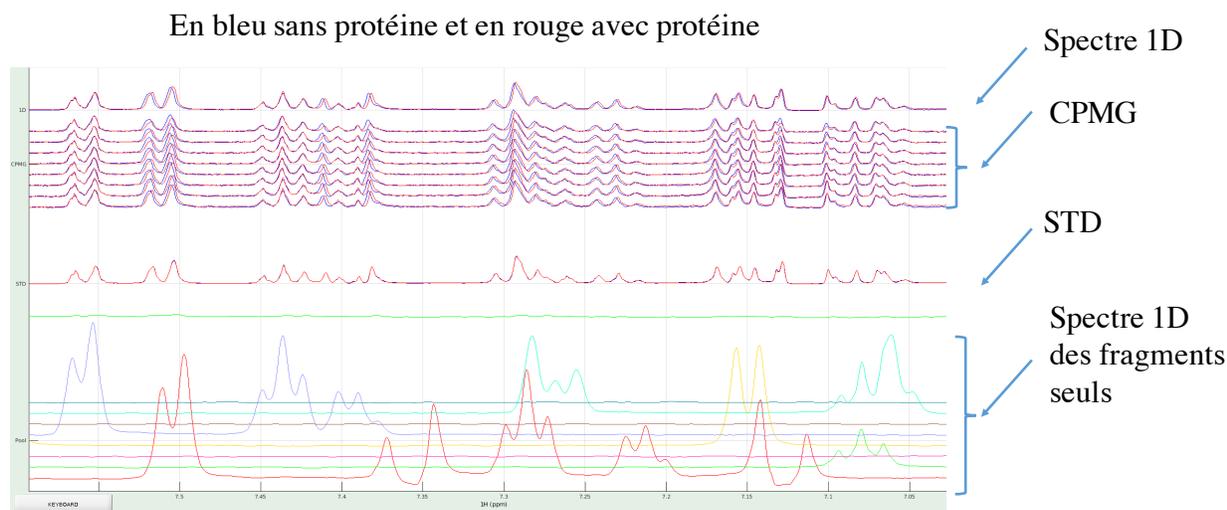


Figure 15 : Exemple des spectres RMN d'un pool de fragments lors du criblage.

L'observation de divers effets dans les spectres 1D et avec les expériences de CPMG effectuées lors du criblage va nous permettre de visualiser si certains fragments se lient à la protéine testée.

Les fragments peuvent notamment agréger. Dans ce cas de figure, le signal en CPMG va disparaître très rapidement au cours du temps (dans ce cas, le fragment n'est pas retenu).

Pour les spectres 1D, un décalage (*shift*) peut être observé ; un exemple est donné à la figure 16 (A). Un décalage dans les expériences de CPMG peut être aussi observé (Figure 16 (A)). Ces décalages sont des indices d'une interaction entre un ou des fragments et la protéine. L'élargissement d'un pic (*broadening*) dans le cas des expériences de CPMG démontre également une liaison (Figure 14 (B)). L'analyse des données du criblage consiste donc à rechercher ces événements dans les spectres et en se référant au spectre 1D de chacun des fragments, il est possible d'identifier lequel des fragments semble se lier à la protéine cible. À ce stade de l'étude, on parle de liaison potentielle ; des expériences supplémentaires pour confirmer la liaison du fragment sont nécessaires. Bien sûr après le criblage, un certain nombre de fragments se lient potentiellement à la protéine. Par exemple, dans le cas de cette étude, 120 fragments semblent démontrer une liaison potentielle. Afin de diminuer l'ampleur de la tâche d'évaluer individuellement un grand nombre de fragments, il est possible de hiérarchiser les fragments pour la suite de l'étude. Ainsi, une hiérarchisation des fragments qui se lient éventuellement à la protéine est effectuée en fonction du nombre d'observations qui démontre une potentielle liaison.

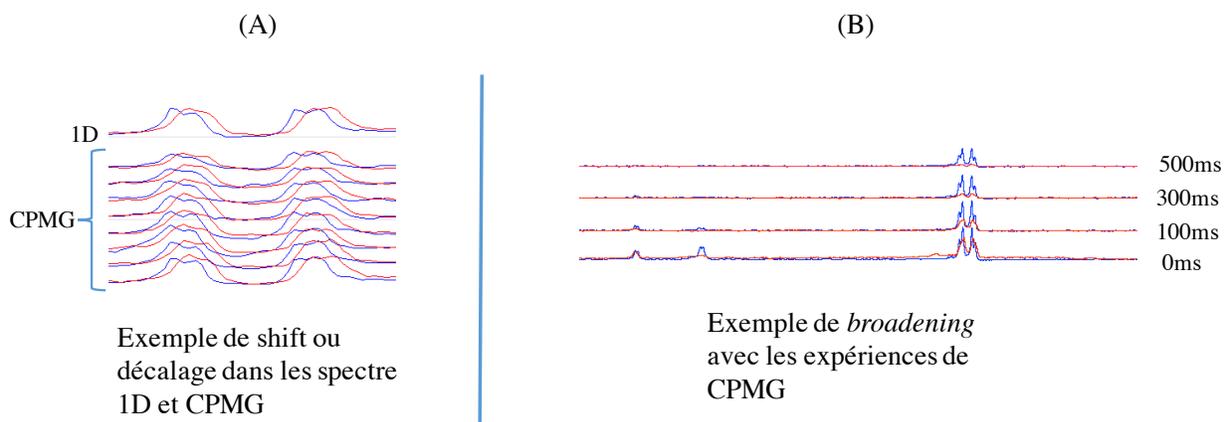


Figure 16 : Exemple de décalage (A) et de décalage des spectres lors du criblage par RMN des fragments pour la liaison à la RNase 5. Propriété de NMX.

2.2.2 Titrages HSQC

Dans le but de confirmer la liaison des potentiels ligands, des titrages HSQC (ou spectroscopie hétéronucléaire à cohérence quantique unique) ont été réalisés. Ce type d'expérience RMN requiert d'avoir de la protéine marquée avec un atome lourd tel que l'azote 15 (le milieu de culture des bactéries est un

milieu minimum avec comme source d'azote le chlorure d'ammonium (^{15}N). Les expériences HSQC sont des expériences en deux dimensions, c'est-à-dire qu'en plus de voir le signal du proton, le signal de l'azote est visible. Avec ces expériences, c'est le comportement de la protéine qui est visualisé. La protéine va donc être titrée avec les fragments qui ont été retenus, c'est-à-dire que des concentrations croissantes de fragments vont être ajoutées à la protéine (Figure 17). À chaque ajout de fragment, un spectre HSQC est enregistré. Les fragments d'intérêts ont été dissous dans du DMSO, j'ai donc pris un spectre HSQC avec la concentration finale de DMSO comme condition apo de mon titrage. Les titrages ont été réalisés à l'Université McGill sur un spectromètre Bruker 500 MHz.

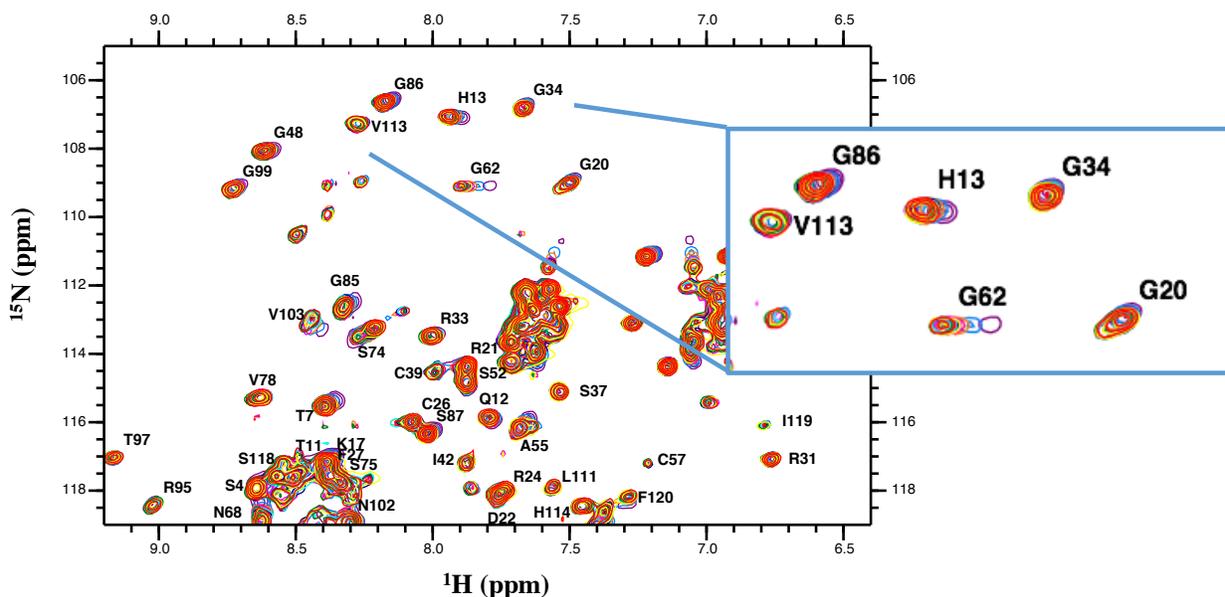


Figure 17 : Exemple de spectres HSQC obtenus en titrant le ligand. Dans le cadre, on observe les résonances de la protéine se déplacer avec l'ajout d'équivalents molaires du fragment (ligand).

Une fois les titrages effectués, les spectres ont été transformés et traités grâce aux logiciels NMRpipe et CCPNMR. La RNase 5 ayant été attribuée, j'ai pu identifier les différentes résonances du spectre apo de la protéine. Avec ceux-ci, les déplacements chimiques de chaque résidu peuvent être visualisés, à partir desquels l'affinité (ou K_d) de fixation des fragments peut être calculée avec l'aide des équations de l'article de Williamson (Williamson, 2013).

2.3 Tests cellulaires

Deux lignées cellulaires ont été utilisées : les lignées humaines HeLa et SH-SY5Y provenant de la collection ATCC (American Type Culture Collection). Le choix des cellules a été basé sur le fait que la RNase 5 joue un rôle dans le cancer et possède des propriétés neuroprotectrices, puisque ces lignées sont des cellules épithéliales cancéreuses et des cellules du système nerveux, respectivement. Les essais cellulaires ont été

entrepris afin de vérifier la possible toxicité des fragments ainsi que la modulation induite par leur présence sur l'activité biologique de la RNase 5 dans ces lignées cellulaires.

2.3.1 Cellules HeLa et SH-SY5Y

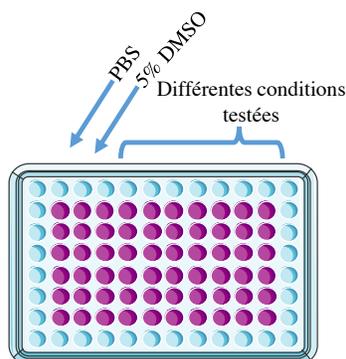
Les cellules HeLa sont des cellules dérivant d'un adénocarcinome cervical ; ce sont des cellules épithéliales. Elles sont cultivées dans des flacons pour la culture de cellules eucaryotes adhérentes (flacons Cell+ de Sarstedt) dans le milieu de culture EMEM (*Essential Minimum Eagle Medium*) recommandé par le fournisseur des cellules et supplémenté avec 10 % de sérum bovin fœtal (FBS). Les cellules SH-SY5Y sont des cellules épithéliales qui proviennent de neuroblastomes et qui expriment la dopamine β -hydroxylase, ce qui fait qu'elles sont particulièrement utilisées comme modèle pour la maladie de Parkinson. Elles sont cultivées dans les mêmes flacons que les cellules HeLa, mais avec un milieu composé de 50 % EMEM et 50 % de mélange nutritif F-12, supplémenté de 15%FBS selon les recommandations du fournisseur.

Les cellules sont cultivées dans une atmosphère de 95 % air et 5 % CO₂ à 37 °C jusqu'à ce qu'elles recouvrent environ 80-90 % de la surface du flacon. À ce moment, les cellules sont récupérées et une partie des cellules est utilisée pour poursuivre la culture (passage) alors que le reste est utilisé pour les différentes expériences. Pour détacher les cellules de la paroi du flacon, un traitement à la trypsine est effectué. La trypsine est neutralisée par ajout de milieu avec du FBS et les cellules récupérées par centrifugation puis suspendues dans le volume de milieu nécessaire pour obtenir le nombre de cellules désiré.

2.3.2 Expériences de prolifération des cellules

Afin d'évaluer la prolifération cellulaire, les cellules sont mises dans des plaques de 96 puits (10 000 cellules/puit pour les HeLa et 5 000 cellules/puit les SH-SY5Y) où 6 puits sont traités dans les mêmes conditions (Figure 14).

Plaque exemple d'une expérience de test cellulaire



Chaque colonne correspond à une condition

Figure 18 : Plaque exemple de test de prolifération cellulaire.

Suite à la mise en plaque des cellules suivie d'une incubation à 37 °C pendant une nuit, les cellules sont synchronisées, c'est-à-dire forcées à entrer dans le stade G₀/G₁ du cycle cellulaire, grâce au remplacement du milieu de culture complet par du milieu sans sérum. Les cellules sont ainsi laissées dans un milieu dépourvu de sérum pendant 2 h avant d'effectuer le traitement avec les différentes conditions que l'on souhaite réaliser. Une fois la durée du traitement atteinte, le réactif Cell Titer Blue® de Promega permet d'évaluer la viabilité des cellules. Ce réactif à base de résazurine est métabolisé par les mitochondries des cellules vivantes en résosurine par une réaction oxydoréductrice (incubation à 37 °C pendant 1 h-4 h), ce qui émet une fluorescence qui peut être quantifiée. L'émission de la fluorescence a été évaluée grâce à un lecteur de plaque TECAN M1000 de BioTek avec une excitation à 560 nm et une lecture d'émission à 590 nm. La figure 19 résume le protocole utilisé. Les expériences sont répétées au minimum 3 fois et les résultats sont ensuite analysés statistiquement grâce au logiciel GraphPad Prism 6.0. Les résultats ont été normalisés en fonction de la croissance obtenue sans l'addition de la protéine (PBS) et sont représentés par la moyenne ± l'erreur standard sur la moyenne (SEM). Une incubation avec 5 % DMSO a été utilisée comme contrôle de mort cellulaire. Une différence significative a été considérée pour des valeurs de p<0.05 suivant un test de t non-pairé et corrigé selon la méthode Welch.

Les conditions expérimentales évaluées sont les suivantes :

- ✓ Effet des fragments seuls (toxicité) à une concentration de 100 µM sur les cellules HeLa et 25µM pour les cellules SH-SY5Y pendant 5 jours.

- ✓ Courbes concentration-réponse de la RNase 5 sur les cellules HeLa et SH-SY5Y avec une gamme de concentration allant de 25 nM à 500 nM.
- ✓ Effet sur la prolifération induite par la RNase 5 à une concentration induisant une réponse significative et en présence des fragments à une concentration 1000 fois plus élevée que celle de la RNase 5. Le traitement dure 5 jours à 37 °C.

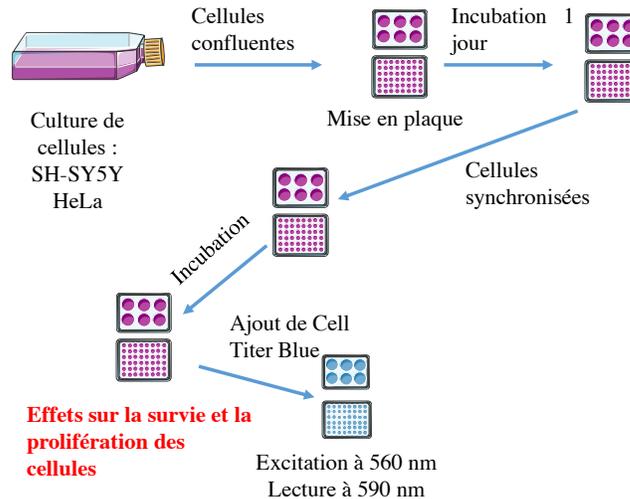


Figure 19 : Résumé du protocole pour les expériences effectuées sur les cellules.

2.4 Caractérisations biochimiques

Pour cette partie expérimentale, le fait que les fragments soient dissous dans du DMSO a posé un problème quant à l'utilisation de certaines techniques. Dans un premier temps, pour évaluer la stabilité thermique de la RNase 5 en présence et en absence de fragments, la technique de dichroïsme circulaire ou CD devait être utilisée, mais le DMSO saturait le signal. Pour les cinétiques de l'activité ribonucléolytique, le dosage par absorbance (260 nm) des ARNt clivés est impossible du fait que le DMSO absorbe à cette longueur d'onde. J'ai donc recherché d'autres manières d'évaluer l'effet des fragments sur la stabilité thermique et sur l'activité enzymatique. La technique du « thermal shift assay » ou TSA reposant sur la fluorescence a permis d'évaluer la stabilité thermique de la protéine et l'effet sur l'activité ribonucléolytique a été évalué grâce à des gels polyacrylamide/urée.

2.4.1 TSA-Thermal Shift Assay

Cette technique est basée sur le fait que la dénaturation d'une protéine va entraîner l'exposition de ses régions hydrophobes. Un colorant qui se lie de manière non spécifique aux segments hydrophobes des protéines est ajouté. La fluorescence de ce colorant est augmentée avec la fixation à la protéine. Il est donc

possible de suivre la réaction de dénaturation d'une protéine avec l'augmentation de la température avec un thermocycleur puisque cet instrument permet de faire varier la température en fonction du temps et d'enregistrer la fluorescence. L'analyse des variations de fluorescence en fonction de la température va permettre d'évaluer une température de fusion qui correspond au point d'inflexion de la courbe de fluorescence obtenue. La trousse commerciale Protein Thermal Shift™ Dye Kit de Thermo Fisher a été utilisée. Dans une plaque de 96 puits pour PCR en temps réel, les fragments seuls avec le colorant ont été testés afin d'évaluer s'ils interagissaient avec le colorant. Puis, la RNase 5 seule (50 µM) est incubée 1 h à température pièce avec les différents fragments à 2 concentrations différentes [0,5 mM (10X) et 5 mM (100X)]. Ces analyses ont été effectuées en triplicata et en 3 expériences indépendantes. Une analyse statistique classique ANOVA One-Way par le logiciel GraphPad Prism 6.0 a permis de déterminer si les valeurs calculées de température de fusion étaient significativement différentes ($p < 0.05$). La figure 20 schématise l'expérience réalisée.

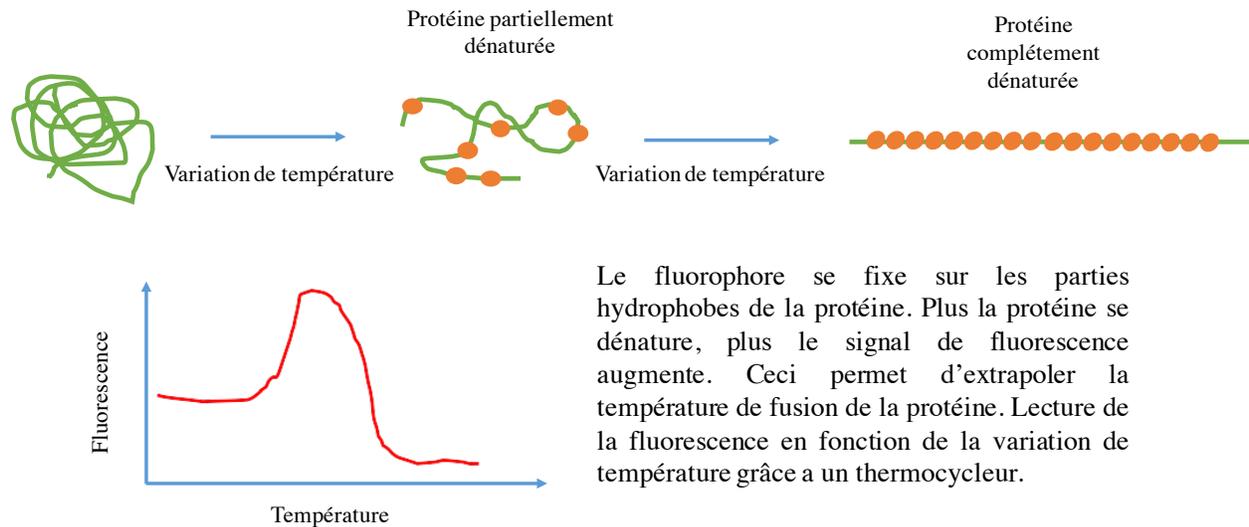


Figure 20 : Expérience de TSA.

2.4.2 Activité ribonucléolytique

Les conditions expérimentales ont été inspirées de (Bradshaw et al., 2017 ; Chatzileontiadou et al., 2016). Les réactions enzymatiques ont été effectuées à 37 °C pour la RNase 5 (contre 30 °C pour les autres RNases). Le milieu réactif est composé d'ARNt de levures (2 mg/mL), d'albumine de sérum bovin (BSA) à 0,1 mg/mL dans un tampon 33 mM Hepes, 33 mM NaCl à pH 7. En raison de sa faible activité ribonucléolytique, des temps de réaction variant de 0 min à 240 mins ont été évalués. De plus, une courbe dose-réponse faisant varier la concentration de RNase 5 (0,3 µM, 0,4 µM et 0,5 µM) a été réalisée dans un premier temps pour déterminer la concentration optimale de protéine afin de réaliser les autres cinétiques.

Pour la dose-réponse, le clivage de l'ARNt en fonction de la concentration de RNase 5 a pu être suivi par absorbance à 260 nm. De fait, la réaction est lancée puis stoppée à chaque temps désiré par ajout d'une solution-stop (3,4 % acide perchlorique), laissée sur glace (15 mins) et ensuite centrifugée à 10 000 g pendant 15mins. La partie soluble contient les ARNt clivés et la concentration relative est déterminée par une lecture d'absorbance à 260 nm. Cette expérience a permis de constater qu'une concentration de 0,3 μ M de RNase 5 était adéquate pour les expériences suivantes. Par contre, une lecture d'absorbance pour suivre la réaction ne peut être utilisée pour les expériences en présence des fragments puisque ceux-ci sont dissous dans le DMSO. Ainsi, la fragmentation de l'ARNt a plutôt été suivie par migration sur gels polyacrylamide/urée. La quantification de l'intensité des bandes du gel grâce au logiciel ImageJ va permettre d'obtenir une activité relative pour chacune des conditions évaluées. Pour chaque condition expérimentale, une solution 0,3 μ M de RNase 5 est incubée avec une concentration 1000X plus élevée de fragments (300 μ M) pendant 1 h à 37 °C. Des échantillons ont été prélevés à 0 h, 2 h et 3 h et la réaction enzymatique fut stoppée en plongeant les tubes dans l'azote liquide. Les échantillons ont été conservés à -80 °C en attendant l'analyse par électrophorèse sur un gel polyacrylamide/urée de 10 %. Une étape de prémigration est nécessaire, c'est-à-dire appliquer un courant électrique au gel (1 h à 2 h), afin d'éliminer l'excès d'urée et amener le gel à une température entre 45 °C -55 °C, ce qui permet une meilleure résolution. Les échantillons ont été préparés avec du bleu de charge et chauffés à 90 °C afin de s'assurer que la protéine soit dénaturée et donc que le clivage ne se fasse plus. La migration se fait sur un intervalle de temps allant de 1 h 30 à 2 h suivant la taille du gel. Après la migration, le gel a été incubé 10mins avec du GelRed™, un composé s'intercalant aux brins d'acides nucléiques et qui va permettre de révéler leur présence grâce à ses propriétés fluorescentes. Les gels de polyacrylamide/urée préparés (10 %) permettent de séparer des fragments d'ARN compris entre 2 à 500 paires de bases, ce à quoi l'on s'attend après une réaction de clivage avec les RNases. Les intensités des bandes obtenues après clivage déterminées par le logiciel ImageJ ont été exprimées en pourcentage de la valeur obtenue pour l'incubation effectuée sans enzyme. Les valeurs relatives d'intensité obtenues pour 2 expériences indépendantes ont été soumises à une analyse statistique ANOVA One-Way par le logiciel GraphPad Prism 6.0 ; une différence significative a été considérée pour $p < 0.05$.

3 Résultats et discussions

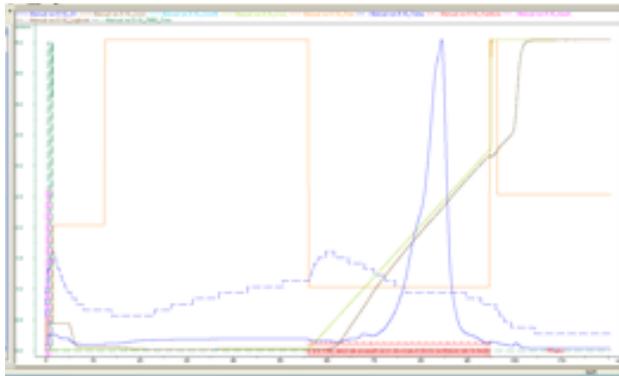
3.1 Purification de la RNase 5 (objectif 1)

La purification de l'enzyme n'est pas un résultat en soi, mais a tout de même nécessité une optimisation du protocole d'expression et de purification qui avait été établi au laboratoire pour les RNases. Ce protocole est un processus long puisqu'il faut compter jusqu'à 3 semaines du début de la culture à l'échantillon pur de protéine. De plus, la longueur du protocole participe aux faibles rendements observés.

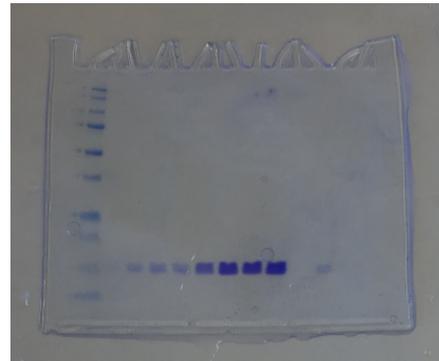
Les RNases sont des protéines possédant 4 ponts disulfures participant à la stabilité de leur structure tridimensionnelle ou tertiaire. En utilisant *E. coli* comme système d'expression, les ponts disulfures ne peuvent être mis en place, ce qui écarte la possibilité de replier de manière adéquate la protéine et elle finit donc en corps d'inclusion dans les bactéries. Les RNases doivent être repliées *in vitro*, un processus qui participe aussi aux faibles rendements du protocole.

Dans un premier temps, j'ai remarqué que les bactéries transformées avec le plasmide codant pour la RNase 5 ne surexprimaient plus la protéine. Afin de m'assurer de travailler dans les meilleures conditions, j'ai donc cloné de nouvelles bactéries avec le plasmide et effectué des tests d'induction pour vérifier que les bactéries surexprimaient bien la protéine. Mais malheureusement et malgré l'utilisation de la nouvelle souche, chaque purification se couronnait par un rendement pratiquement nul ou très faible (environ 1 μ M pour 4 L de culture bactérienne). Après vérification des étapes de purification, j'ai constaté que deux étapes contribuaient majoritairement à la perte de protéines, soit l'étape de concentration suite au repliement et la dialyse de changement de tampon avant la purification. Pour remédier à cette situation, j'ai testé différentes variations du protocole, incluant un repliement avec une dialyse plutôt que par ajout goutte à goutte dans un bain. Aussi une purification de la RNase 5 dénaturée par HPLC préalable au repliement pour suivre le protocole de La Vallee et collaborateurs (1985) et le fait de conserver l'arginine dans les solutions jusqu'à la purification. Cette dernière solution s'est montrée plus efficace, car la perte de protéines lors des dialyses avant purification était diminuée. De plus, cette modification au protocole n'allongeait pas le temps nécessaire à la production de la protéine. Néanmoins, la conservation de l'arginine jusqu'à la purification augmente les chances de contaminer le spectre RMN 1D de la protéine avec cet acide aminé. Enfin, étant donné les faibles rendements de protéines purifiées, de larges volumes de culture (8L) ont été préparés. Or, le rendement final de tels volumes de culture s'est avéré quasi identique à celui obtenu pour une culture de 2 L. La perte additionnelle associée à de larges volumes de culture est probablement causée par la gestion de volumes plus importants qui entraînent des délais supplémentaires pour accomplir chaque étape et qui contribuent à une diminution de rendement. Bref, l'optimisation du protocole a été longue, mais nécessaire puisque le criblage de la librairie demande une quantité importante de protéines. Avec ce protocole

optimisé, il est possible d'obtenir 16 mg de protéine pour 2L de culture bactérienne. La figure 21 montre la pureté de l'échantillon de protéines obtenu après purification.



Chromatogramme obtenu lors de la dernière étape de purification de la RNase 5



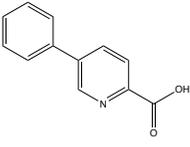
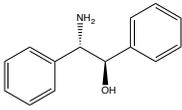
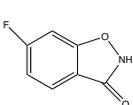
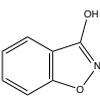
Gel SDS Page obtenu après migration des fractions correspondants au pic du chromatogramme

Figure 21 : Chromatogramme et gel SDS-Page illustrant la pureté des échantillons obtenus après le protocole de purification.

3.2 Criblage de la librairie de fragments (objectif 1)

Après avoir analysé les résultats du criblage grâce au logiciel Matlab, 38 fragments parmi les 1640 composant la librairie ont démontré une potentielle liaison avec la RNase 5. Au sein de ces 38 fragments, 4 se sont avérés prioritaires puisque la liaison potentielle était appuyée par la modification de plusieurs spectres RMN de ces composés (1H, STD, CPMG) (Tableau 3).

Tableau 3 : Fragments obtenus après le criblage FBDD.

Structure chimique	NOM	Abréviation
	5-PHENYLPYRIDINE-2-CARBOXYLIC ACID	5 P
	(1R,2S)-2-AMINO-1,2-DIPHENYL-ETHANOL	1R,2S
	6-FLUOROBENZO[D]ISOXAZOL-3(2H)-ONE	6 F
	3-HYDROXY-1,2-BENZISOXAZOLE	3 H

65 fragments de la librairie se sont associés à l'agrégation, ils ont donc été mis de côté pour éviter d'obtenir de faux négatifs. Les 4 composés ne semblent pas trop proches des fragments mis en évidence dans le cadre du criblage à haut débit réalisé avec la RNase 5 (Kao et al., 2002). La figure 22 montre les molécules obtenues par criblage à haut débit par Kao et collaborateurs (Kao et al., 2002).

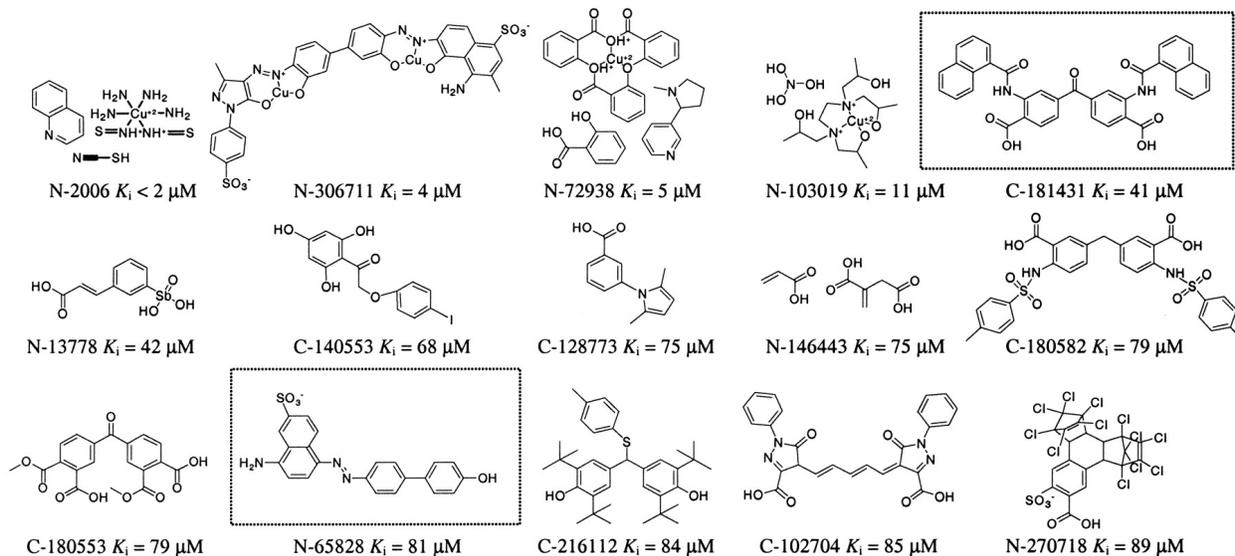


Figure 22 : Molécules liants la RNase 5 obtenues par criblage à haut débit (Kao et al., 2002)).

La grande taille des molécules obtenues lors de leur criblage est la grande différence avec les fragments obtenus pour cette étude. La présence de fonction aromatique dans quasiment toutes les structures, peu importe la méthode de criblage, semble être un point commun pour une liaison à la RNase 5.

L'obtention de 38 fragments positifs pour une librairie de 1640 fragments (2,3 % de fragments positifs) semble normale. En effet, lors du criblage FBDD réalisé pour obtenir le vemurafébin, une librairie de 20 000 fragments a été utilisée et 230 fragments ont été retenus, soit 1,15 % (Krimm, 2015).

Pour confirmer la liaison de ces 4 fragments, d'autres expériences doivent être entreprises. J'ai privilégié la réalisation de titrages RMN plutôt que de m'orienter vers la cristallographie pour des raisons de temps, car les conditions de cristallographie de cette protéine peuvent facilement varier en présence des fragments. Les 34 autres fragments pourraient être étudiés plus tard ; ici, seuls les 4 fragments qui semblent les plus prometteurs du point de vue de la liaison avec la protéine ont été étudiés afin de mieux évaluer leur potentiel en tant que modulateur de la RNase 5.

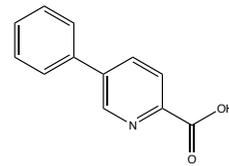
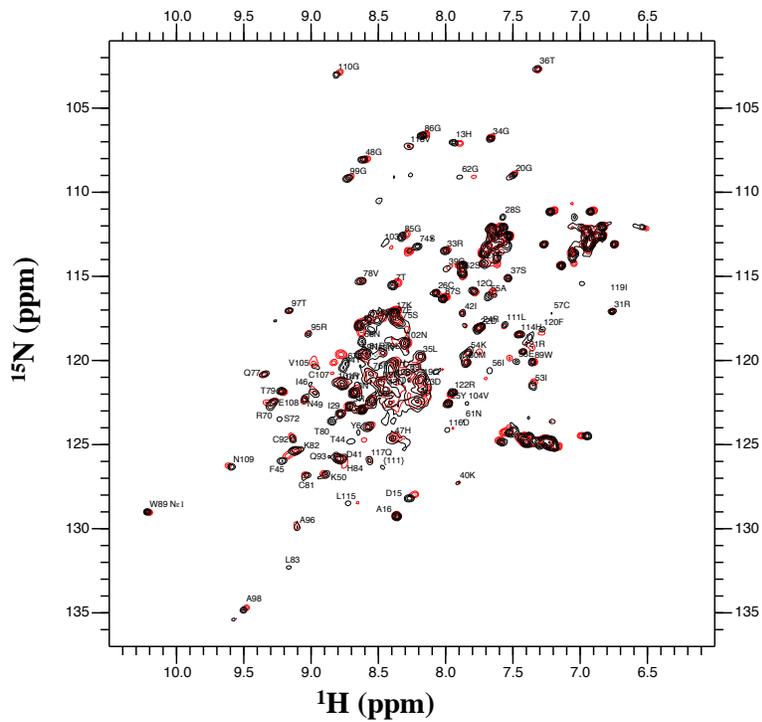
3.3 Titrages RMN (objectif 2)

Les titrages sont effectués avec la protéine marquée à l'azote 15 et avec une gamme de 11 différentes concentrations de fragments (Tableau 4).

Tableau 4 : Concentrations de fragments utilisées pour les titrages HSQC.

Tableau titrage												
équivalent	0	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2	2,5	5	10	20	100
concentration	0	75 μ M	150 μ M	225 μ M	300 μ M	450 μ M	600 μ M	750 μ M	1,5mM	3mM	6mM	30mM

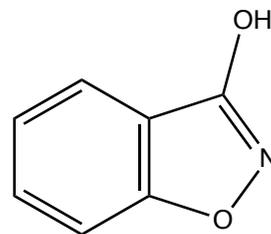
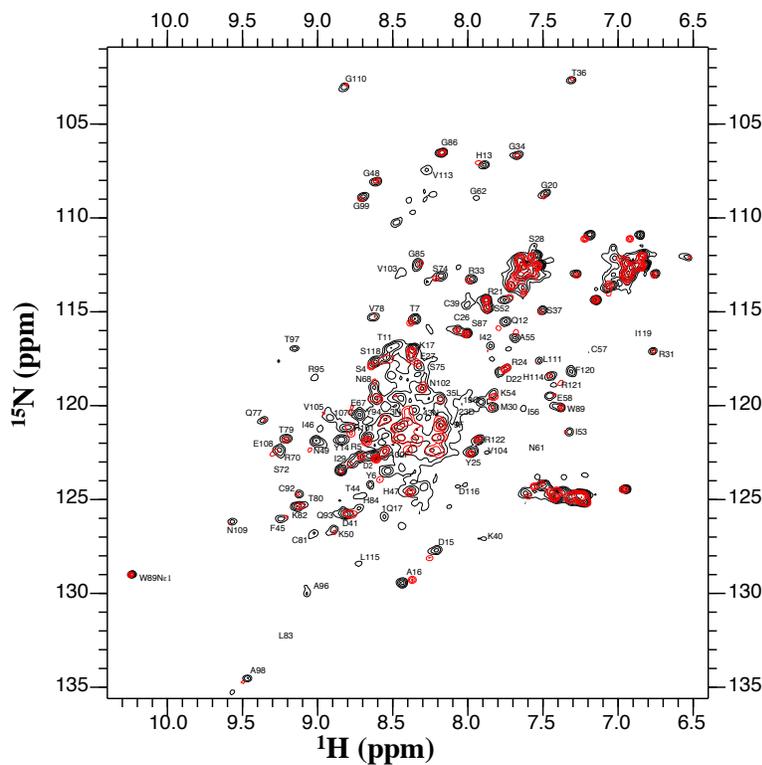
Les titrages HSQC ont été réalisés entre 0 et 100 équivalents molaires de fragments, mais malgré les 100 équivalents molaires, l'analyse des résultats indique que la saturation de la protéine n'a pas été atteinte. Le nombre d'équivalents n'a pas été poussé plus loin puisque la présence du DMSO dans les solutions stocks des ligands pourrait affecter la stabilité de la protéine. Les figures 23 à 26 montrent les spectres HSQC obtenus lors des titrages de la RNase 5 avec les différents fragments. Dans un souci de clarté, seuls les spectres en condition apo, c'est-à-dire sans fragment, et à 100 équivalents molaires de fragment sont présentés.



Fragment 5 P

Spectres HSQC apo et
100 équivalents

Figure 23 : Spectres HSQC obtenus lors du titrage de la RNase 5 avec le fragment 5 P.



Fragment 3 H

Spectres HSQC apo et
100 équivalents

Figure 24 : Spectres HSQC obtenus lors du titrage de la RNase 5 avec le fragment 3H.

La présence du ligand à différentes concentrations engendre une variation du déplacement chimique des résidus de la protéine à proximité du ligand, ce qui permet de calculer une constante d'affinité tel que décrit à la section 2.2.2 et les variations de déplacements chimiques totales ou $\Delta\delta_{\text{total}}$ en ppm (partie par millions) pour chacun des résidus (Figure 27). Cependant, des valeurs de K_d ont pu être calculées (figure 28). Les valeurs de K_d oscillent entre $42,4 \pm 6,9$ mM et $6,04 \pm 6,8$ mM. À cette étape du processus de FBDD, il n'est pas rare que le K_d n'indique pas une grande affinité entre le fragment et la protéine ; une preuve que le fragment fixe la protéine et une évaluation de la localisation du site de liaison sont les paramètres principalement recherchés (Price et al., 2017). Toutefois, pour confirmer l'ordre de grandeur des K_d , d'autres techniques peuvent être utilisées telles que l'ITC (titrage calorimétrique isotherme). Cette technique demande une quantité très importante de protéines, une condition difficile à atteindre dans le cas présent, ce qui a privilégié l'exploration d'expériences apportant de nouvelles informations, mais pouvant être effectuées avec de plus petites quantités de protéines.

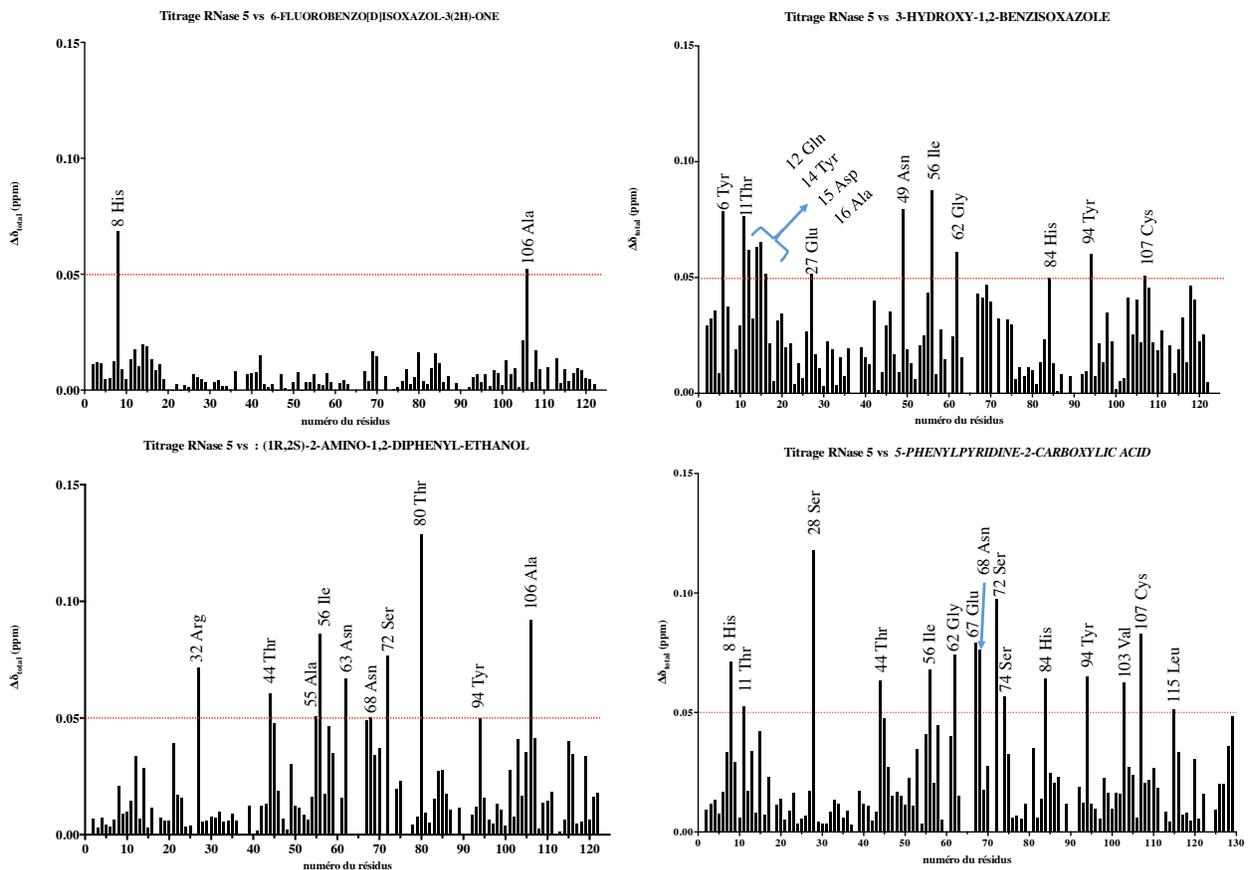


Figure 27 : Valeurs de $\Delta\delta_{\text{total}}$ pour chacun des résidus de la RNase 5 en présence de 100 μg de ligands. La ligne pointillée rouge représente le seuil de 0,05 ppm utilisé pour délimiter les variations totales considérées significatives et non significatives.

Lors de l'analyse des $\Delta\delta_{\text{total}}$, une variation de déplacement chimique totale supérieure à 0,05 a été considérée significative. Cette valeur de 0,05 n'est pas une valeur arbitraire : elle correspond à la largeur à mi-hauteur des résonances (incertitude des pics). Ces variations par résidus peuvent ensuite être visualisées sur la structure protéique pour déterminer les résidus et/ou les régions les plus affectées par la fixation des différents fragments (Figure 28).

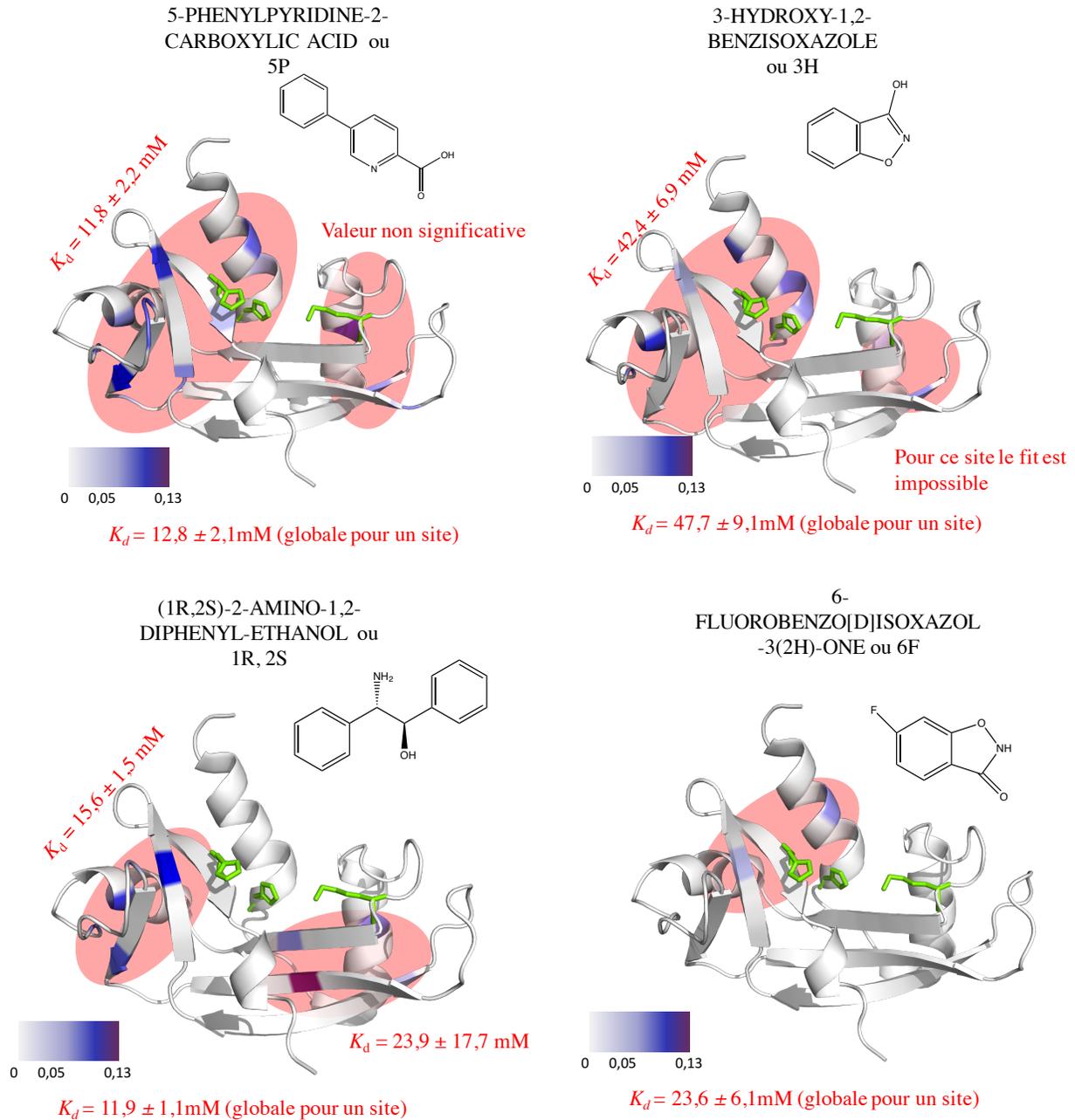


Figure 28 : Structure 3D de la RNase 5 en présence des différents fragments, avec un gradient allant du gris au violet pour la valeur de variation de déplacement chimique total. (Fichier PDB : 1 ANG)

En observant les résidus qui sont affectés par la fixation des fragments, deux régions ressortent. En regardant la figure 16, il semble que les deux régions V1 et V2 soient affectées. Ces deux régions semblent être potentiellement des poches de fixation ou elles sont peut-être dynamiquement reliées avec un réseau allostérique (Dokholyan, 2016) ; il serait donc possible de combiner des fragments dans le futur dans le but d'obtenir un ligand de meilleure affinité puisque les mêmes régions semblent participer à la liaison de plus d'un ligand. Dans le cadre de l'optimisation du fragment, le mode de fixation des fragments doit être résolu notamment où se fixe le fragment. Pour cela, une étude par cristallisation pourrait permettre éventuellement d'obtenir ces informations. Mais dans un but de prioriser un fragment par rapport à un autre, des tests biologiques ont été entamés afin d'évaluer l'influence des fragments sur les actions biologiques de la RNase 5, notamment sur la prolifération des cellules.

Il est intéressant de constater que les titrages par RMN ne démontrent pas de changements dans l'environnement chimique des 3 résidus catalytiques. Donc, ces 4 fragments peuvent être potentiellement des modulateurs allostériques de la RNase 5 si leur liaison perturbe l'activité de la protéine telle qu'évaluée au cours des expériences suivantes.

Les valeurs de K_d obtenues sont faibles, mais cela est attendu dans le cadre d'une approche de criblage par FBDD. En effet, le principe sur lequel repose cette approche de criblage vise l'utilisation de petites molécules qui vont pouvoir se fixer sur différents sites de la cible, mais fort possiblement avec moins d'affinité qu'une molécule parfaitement adaptée à une pochette de liaison précise (Erlanson et al., 2016). Les K_d obtenus sont de l'ordre du mM, alors que l'anticorps murin 26-2F possède une IC_{50} de 1,6 nM et que les petites molécules identifiées par Kao et collaborateurs ont des K_i de l'ordre du μ M. Il faut d'abord considérer que ces constantes ne représentent pas la même chose. Le K_i est la constante d'inhibition qui est obtenue avec une compétition entre l'inhibiteur et le substrat. L' IC_{50} est la concentration nécessaire pour obtenir 50 % d'inhibition. Et enfin, les K_d déterminés dans cette étude représentent la constante de dissociation de la fixation entre la protéine et le fragment. Bien que ces différentes données reflètent une idée de l'affinité des différents inhibiteurs potentiels de la RNase 5, l'anticorps demeure la molécule la plus affine. Ceci est logique puisque l'affinité des anticorps pour leur cible est normalement importante. Les petites molécules obtenues par Kao et ses collaborateurs sont probablement un peu plus affines que les fragments. Toutefois, les étapes subséquentes de l'approche par FBDD menant à une optimisation de la structure pour une meilleure liaison pourraient certainement amener les fragments identifiés à une affinité du même ordre de grandeur. L'absence d'études subséquentes sur les petites molécules obtenues par Kao et collaborateurs est peut-être attribuable à un manque de spécificité puisque ces molécules semblaient cibler le site catalytique de l'enzyme.

La suite de cette étude va tenter de caractériser la stabilité de la protéine en présence des fragments, l'effet des fragments sur l'activité ribonucléolytique et sur la prolifération de deux lignées cellulaires.

3.4 Stabilité thermique de la RNase 5 (objectif 3)

L'aspect de la stabilité de la protéine en présence des fragments est un paramètre important. En effet, si la fixation des fragments entraîne une perte de stabilité, les variations observées dans les résultats des différents tests prévus pourraient ne pas forcément être dues à une modulation de l'activité de la protéine ; mais plutôt à la perte de la protéine dans sa structure fonctionnelle ou par précipitation.

Dans un premier temps, des expériences avec le dichroïsme circulaire pour déterminer la température de dénaturation en présence et en absence des fragments étaient envisagées. Toutefois, les fragments sont dissous dans le DMSO et ce solvant possède une forte absorbance dans le spectre UV utilisé lors d'une telle analyse par dichroïsme circulaire, ce qui rend ininterprétables les résultats. En fait, la présence de DMSO est souvent un problème pour les techniques spectroscopiques. Heureusement, il est possible d'évaluer la stabilité d'une protéine grâce à des molécules fluorescentes qui vont émettre à une longueur d'onde différente de celles du spectre d'absorption du DMSO.

Il existe plusieurs molécules fluorescentes capables de se fixer aux régions hydrophobes des protéines (Bis-ANS, ThermoFluor...); dans le cadre des travaux présentés ici, la trousse Protein Thermal Shift™ de ThermoFisher a été utilisée. Dans un premier temps, je me suis assurée que mes fragments seuls en présence du fluorophore ne donnaient pas un signal laissant croire à une interaction. (voir l'exemple de la figure 29 pour le fragment 5 P)

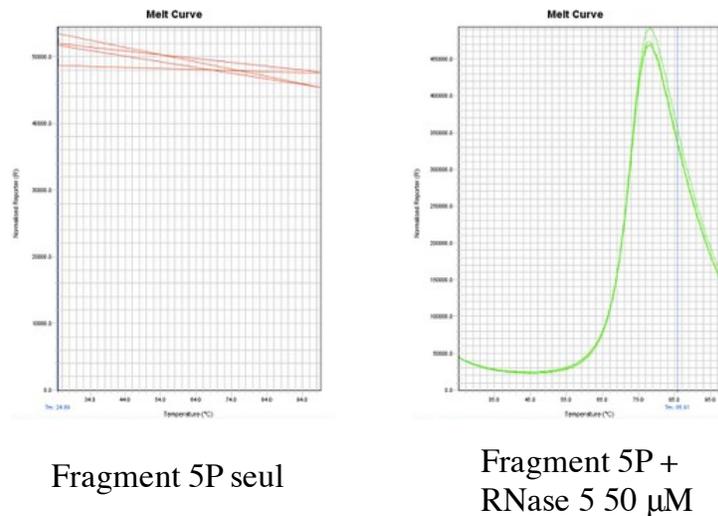


Figure 29 : Essai de Protein Thermal Shift™ obtenu pour le fragment 5 P en présence et en absence de RNase 5.

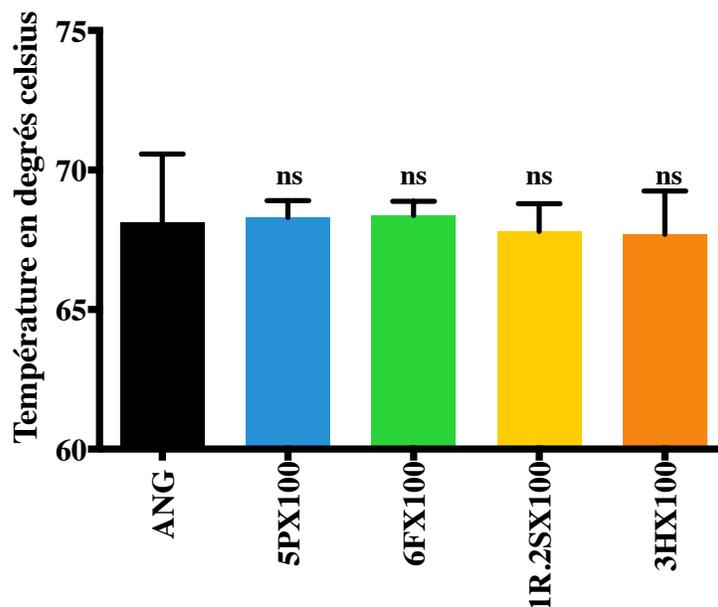


Figure 30 : Variation de la température de fusion de la RNase 5 en présence ou non des fragments, tel qu'évaluée par Thermal Shift Assay.

Puis, l'évaluation de la température de fusion de la RNase 5 a été effectuée en présence ou en absence des fragments, et pour des ratios molaires protéine : fragment de 1 : 100. Les résultats obtenus ne démontrent pas de variation significative dans les températures de fusion (Figure 30), ce qui suggère que les fragments n'ont pas d'influence sur la stabilité thermique de la RNase 5.

3.5 Évaluation de l'effet des fragments sur l'activité ribonucléolytique (objectif 3)

Il a été démontré que l'activité ribonucléolytique est souvent indispensable pour les différentes activités biologiques de la RNase 5 ; l'évaluation de l'effet des fragments sur cette activité est donc indispensable. À nouveau, la présence du DMSO a été une embête pour l'évaluation de l'activité. En effet, l'évaluation de l'activité ribonucléolytique la plus couramment utilisée dans les articles traitant de la RNase 5 est basée sur une lecture d'absorbance à 260 nm. Or, le DMSO absorbe à cette longueur d'onde. C'est pourquoi j'ai opté d'utiliser un gel de polyacrylamide urée (10 %) pour visualiser la dégradation des ARNt de levure.

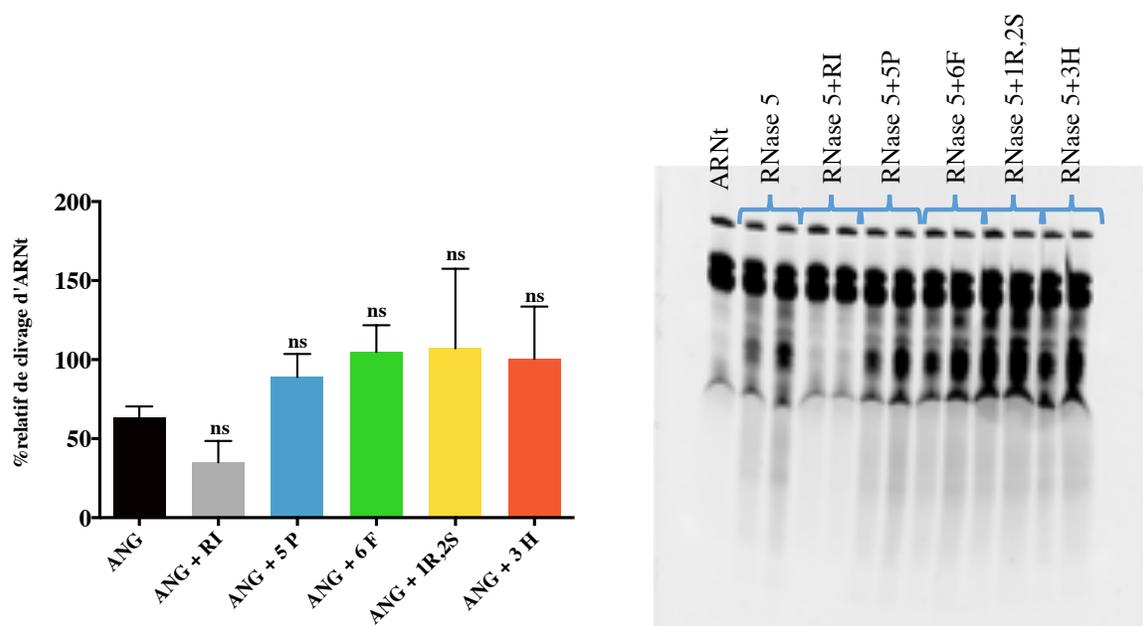


Figure 31 : Test de l'activité ribonucléolytique de la RNase 5 en présence des fragments et de RI.

À la lumière des résultats obtenus après 2 h de clivage de l'ARNt par la RNase5 avec ou sans les fragments et aussi avec la présence d'un inhibiteur connu des RNases, le RI (*ribonuclease inhibitor*), il apparaît que ces derniers ne provoquent pas une modulation significative de l'activité ribonucléolytique de la protéine (Figure 31). Toutefois, la variation des résultats entre les différents essais est importante ; l'accumulation de données supplémentaires ainsi que l'optimisation des conditions de réactions (temps et concentration) permettraient possiblement d'obtenir des résultats plus probants. Néanmoins, il est possible d'observer des tendances dans les résultats : le RI semble inhiber l'action ribonucléolytique de la RNase 5 tel qu'il est attendu et la présence des fragments n'abolit pas l'activité catalytique de l'enzyme. Ceci appuie les résultats de titrage par RMN qui n'indiquaient pas de variation de déplacement chimique pour la triade de résidus catalytiques en présence des fragments.

Il serait judicieux d'utiliser d'autres techniques pour confirmer ces résultats. Il existe des substrats fluorescents tels que la trousse commerciale « *RNaseAlert™ substrat* » qui permet de visualiser un clivage par les RNases. Dans une étude, une équipe travaillant sur la RNase E a utilisé des oligonucléotides qui émettent une fluorescence lorsqu'ils sont clivés. Ils ont pu ainsi suivre le clivage effectué par cette RNase (Jiang and Belasco, 2004). L'utilisation de tels substrats qui sont homogènes contrairement aux ARNt permettrait de déterminer les constantes enzymatiques (K_m , V_{max}) avec des unités molaires et ainsi mieux comparer l'effet des fragments sur l'activité catalytique de la RNase 5. Par contre, étant donné que ces substrats sont coûteux et que l'exploration de modulateurs allostériques de la RNase 5 par une approche de

FBDD n'est qu'à sa première étape. Il a été jugé qu'une telle caractérisation enzymatique serait plutôt à envisager avec des modulateurs plus affins obtenus après des étapes ultérieures du design de molécule.

3.6 Tests de l'activité biologique (objectif 3)

Parmi les activités biologiques connues de la RNase 5, son activité prolifératrice a été considérée dans le cadre de cette étude pour évaluer l'effet des fragments. J'ai choisi deux lignées cellulaires différentes : HeLa et SH-SY5Y. La lignée cellulaire HeLa provient d'un adénocarcinome cervical humain et plusieurs études démontrent que la RNase 5 est impliquée dans les cancers de type cervical (Landt et al., 2011). Les cellules SH-SY5Y sont des cellules dérivant d'un neuroblastome humain et des études ont associé une perte d'activité de la RNase 5 au développement de maladies neurodégénératives (Bradshaw et al., 2017). Ainsi, ces deux lignées semblaient bien adaptées à cette étude qui visait à évaluer le potentiel des fragments en tant que modulateurs allostériques des activités biologiques de la RNase 5.

Dans un premier temps, il a fallu déterminer quelle concentration de RNase 5 à utiliser. Il est à noter que les deux lignées cellulaires utilisées expriment la protéine de manière endogène et l'effet de la RNase 5 exogène est donc toujours comparé à la condition PBS, qui prend donc compte des effets endogènes de la RNase 5 ou d'autres facteurs proliférateurs exprimés par les cellules. L'effet de la RNase 5 a été évalué après une période d'incubation de 5 jours.

Dans le cas des cellules SH-SY5Y, l'effet prolifératif de la RNase 5 se fait sentir à partir d'une concentration de 25 nM et la réponse suit une courbe dose-réponse (Figure 32). Pour les cellules HeLa, il faut atteindre 100 nM de RNase 5 pour avoir une réponse biologique significativement différente. L'ajout de RNase 5 stimule la prolifération des cellules HeLa également de manière dose croissante, quoique l'effet semble atteindre un plateau plus rapidement qu'avec les cellules SH-SY5Y. Il est possible que le nombre de sites de liaison de la RNase 5 avec un partenaire à la surface des cellules varie d'une lignée cellulaire à l'autre, ce qui pourrait se traduire par une réponse biologique distincte.

Tableau 5 : Croissance relative évaluée sur les cellules SH-SY5Y en présence de concentration croissante de RNase 5. La normalisation a été effectuée sur la moyenne des valeurs obtenues avec ajout de PBS.

Conditions expérimentales	Valeur moyenne ± Erreur	n (normalisation)
PBS	1,000 ± 0,029	20
5 % DMSO	0,451 ± 0,047	6

25 nM R5	1,435 ± 0,073	17
50 nM R5	1,404 ± 0,089	18
100 nM R5	1,676 ± 0,141	31
200 nM R5	2,055 ± 0,242	27
300 nM R5	4,621 ± 0,401	12

Tableau 6 : Croissance relative évaluée sur les cellules HeLa en présence de concentration croissante de RNase 5. La normalisation a été effectuée sur la moyenne des valeurs obtenues avec ajout de PBS.

Conditions expérimentales	Valeur moyenne ± Erreur	n (normalisation)
PBS	1,000 ± 0,020	29
5 % DMSO	0,190 ± 0,029	21
50 nM R5	0,930 ± 0,030	12
100 nM R5	1,229 ± 0,045	38
200 nM R5	1,275 ± 0,048	40
300 nM R5	1,286 ± 0,053	40
400 nM R5	1,354 ± 0,051	10
500 nM R5	1,397 ± 0,067	10

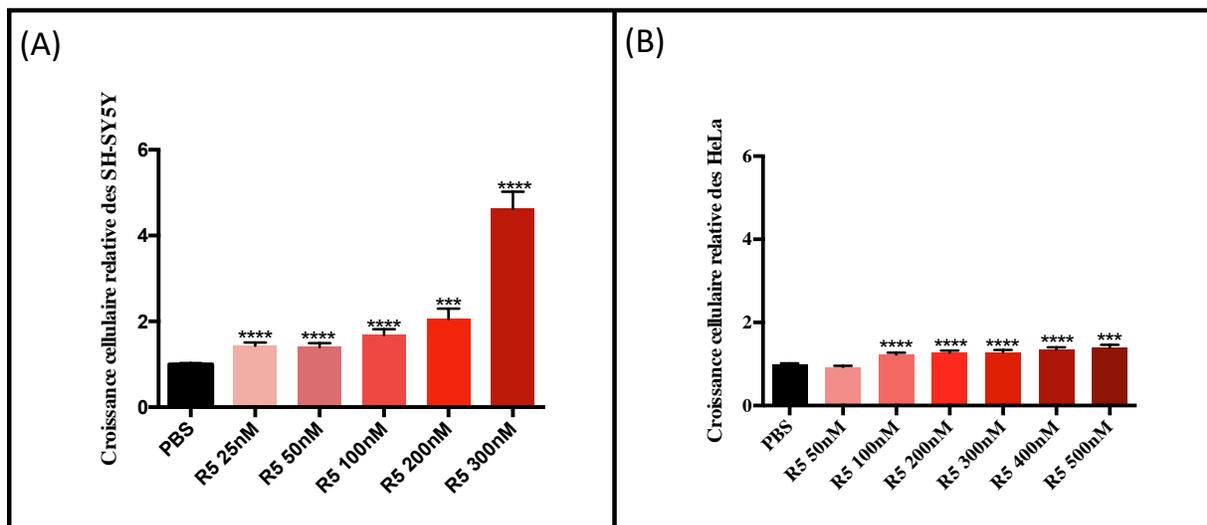


Figure 32 : Courbes dose-réponse avec la RNase 5 sur la prolifération des cellules SH-SY5Y (A) et HeLa (B). (***) $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ par rapport au PBS)

Avant d'établir l'effet des fragments sur la prolifération induite par la RNase 5, il est essentiel d'évaluer la toxicité des fragments sur les lignées cellulaires à l'étude. De plus, la concentration de fragments à utiliser doit être déterminée. Lors du titrage par RMN de la RNase 5 par les fragments, une concentration de 300 μM de protéine a été utilisée et des valeurs de K_d de l'ordre du mM ont été calculées, soit une concentration environ 1000 fois plus élevée. Il a donc été convenu d'utiliser une concentration de fragment 1000 fois plus élevée que la concentration provoquant une augmentation significative de la prolifération. Ainsi, aux concentrations évaluées, soit 25 μM pour les cellules SH-SY5Y et 100 μM pour les cellules HeLa, les fragments ne démontrent pas de toxicité sur les cellules (Figure 33). Par contre, les fragments 6F et 1R, 2S pour les cellules SH-SY5Y et 3H, 6F et 1R, 2S pour les cellules HeLa induisent seuls une activité prolifératrice. Ces fragments ont donc été mis de côté pour la suite des tests sur les cellules.

Tableau 7 : Effet sur la survie relative des cellules SH-SY5Y en présence de 25 μM des différents composés. La normalisation a été effectuée sur la moyenne des valeurs obtenues avec ajout de PBS. La condition expérimentale utilisant 5 % DMSO a été utilisée comme contrôle de mort cellulaire.

Conditions expérimentales	Valeur moyenne \pm Erreur	n (normalisation)
PBS	1,000 \pm 0,033	16
5 % DMSO	0,443 \pm 0,035	20
5 P 25 μM	1,115 \pm 0,080	5
3 H 25 μM	0,988 \pm 0,052	5
6 F 25 μM	1,195 \pm 0,047	5
1R, 2S 25 μM	1,390 \pm 0,011	5

Tableau 8 : Effet sur la survie relative des cellules HeLa en présence de 100 μM des différents composés. La normalisation a été effectuée sur la moyenne des valeurs obtenues avec ajout de PBS. La condition expérimentale utilisant 5 % DMSO a été utilisée comme contrôle de mort cellulaire.

Conditions expérimentales	Valeur moyenne \pm Erreur	n (normalisation)
PBS	1,000 \pm 0,052	10
5 % DMSO	0,082 \pm 0,002	10
5 P 100 μM	0,957 \pm 0,036	10
3 H 100 μM	1,710 \pm 0,041	10
6 F 100 μM	1,349 \pm 0,056	10
1R, 2S 100 μM	1,239 \pm 0,096	10

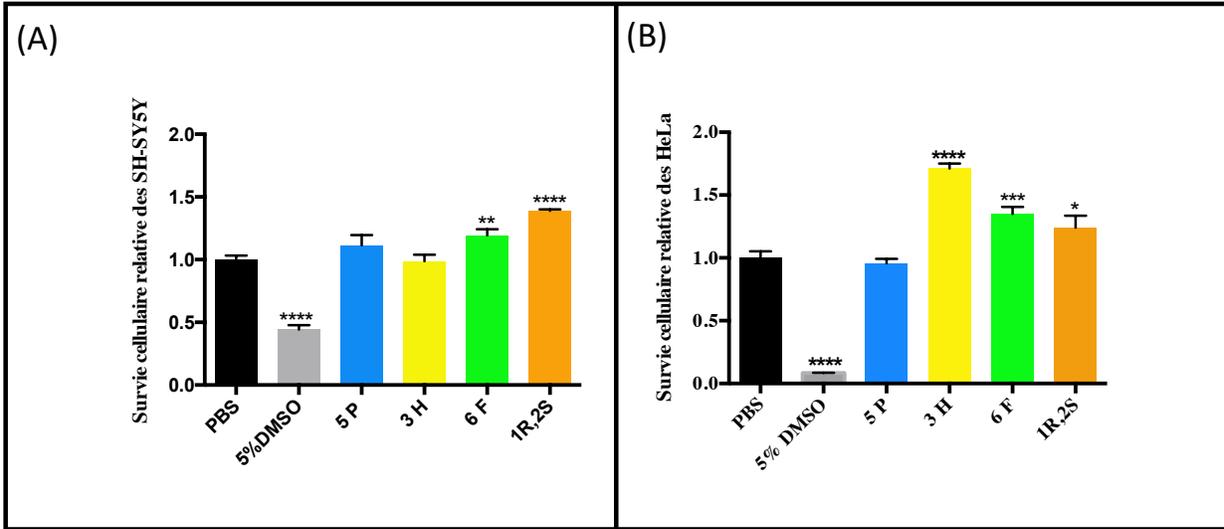


Figure 33 : Test de la toxicité des fragments sur les cellules SH-SY5Y (A) et HeLa (B) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ par rapport au PBS).

En considérant les résultats précédents, la modulation de l'activité prolifératrice de la RNase 5 par les fragments a été évaluée avec une concentration de protéine de 25 nM et 100 nM pour les cellules SH-SY5Y et HeLa, respectivement, en présence d'une concentration 1000 fois plus élevée de chacun des fragments. Avant de soumettre les cellules aux traitements, la RNase 5 et un fragment ont été préalablement incubés dans le but de saturer la protéine avec les fragments.

Tableau 9 : Prolifération relative évaluée sur les cellules SH-SY5Y en présence de 25 nM de RNase 5 et de 25 μ M des différents composés. La normalisation a été effectuée sur la moyenne des valeurs obtenues avec ajout de PBS.

Conditions expérimentales	Valeur moyenne \pm Erreur	n (normalisation)
PBS	1,000 \pm 0,029	20
25 nM R5	1,435 \pm 0,073	17
25 nM R5 + 5 P 25 μ M	0,953 \pm 0,099	4
25 nM R5 + 3 H 25 μ M	0,989 \pm 0,035	4

Tableau 10 : Prolifération relative évaluée sur les cellules HeLa en présence de 100 nM de RNase 5 et de 100 μ M des différents composés. La normalisation a été effectuée sur la moyenne des valeurs obtenues avec ajout de PBS.

Conditions expérimentales	Valeur moyenne \pm Erreur	n (normalisation)
PBS	1,000 \pm 0,020	29
100 nM R5	1,229 \pm 0,045	38
100 nM R5 + 5 P 100 μ M	0,530 \pm 0,080	12

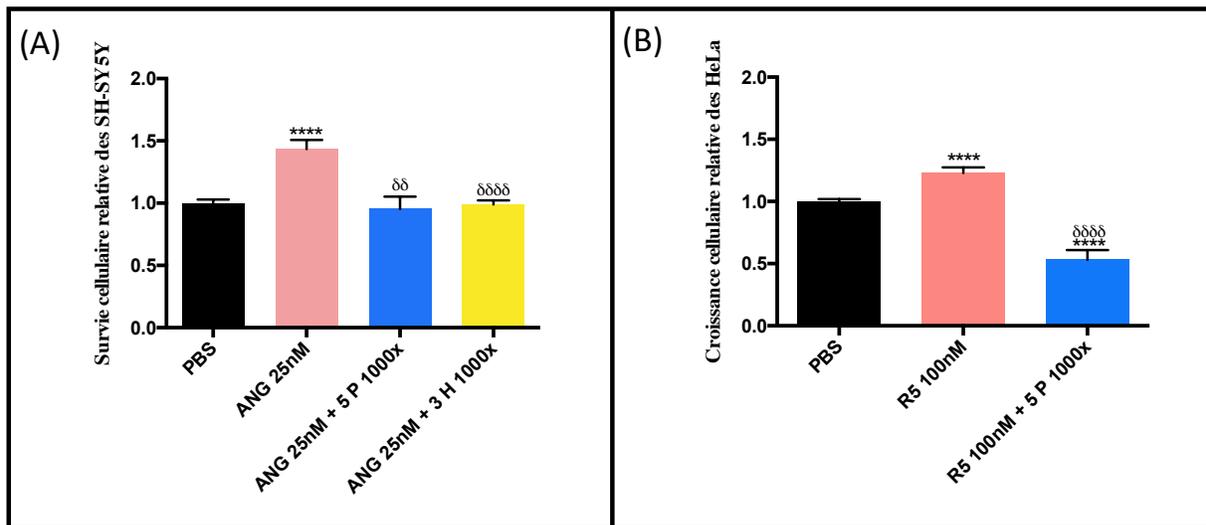


Figure 34 : Effet de la modulation de la prolifération induite par la RNase 5 par les fragments sur les cellules SH-SY5Y (A) et HeLa (B) (**** $p < 0.0001$ par rapport au PBS; $\delta\delta p < 0.01$, $\delta\delta\delta\delta p < 0.0001$ par rapport à R5).

Sur les cellules SH-SY5Y, tous les fragments bloquent l'effet antiprolifératif de la RNase 5 alors que pour les cellules HeLa, le fragment 5-phenylpyridine-2-carboxylic acid (5P) démontre une modulation de la prolifération induite par la RNase 5. En observant la figure 34, on remarque que le fragment 5P ne fait pas que bloquer l'effet de la RNase 5 en ramenant la réponse cellulaire à l'état basal comme ce qui est observé avec les cellules SH-SY5Y, mais il engendre une modulation inverse de la réponse biologique attendue pour la RNase 5.

À la lumière de ces résultats, il est possible que la liaison des fragments sur la RNase 5, et plus particulièrement 5P, module la transmission du signal menant à la prolifération suite à l'interaction de la protéine avec son partenaire à la surface des cellules. Toutefois, cette modulation se traduit différemment en fonction de la lignée cellulaire. Pour un même récepteur cellulaire, les partenaires protéiques intracellulaires qui composent la cascade de signalisation peuvent varier en fonction de la conformation du complexe formé, un principe connu sous le terme de réponse biaisée (Wisler et al., 2014). Ainsi, il est possible que la liaison entre le fragment et la RNase 5 engendre une perte de liaison avec le partenaire à la surface des cellules, mais également qu'une interaction ait lieu à la surface des cellules qui provoque une cascade intracellulaire totalement différente de celle normalement associée à la présence de la RNase 5 seule. Pour confirmer ces hypothèses, d'autres expériences doivent être entreprises, notamment une étude des voies de signalisation cellulaire où la RNase 5 est impliquée.

4 Conclusion et perspectives

Ce projet de recherche a permis d'identifier un fragment, PHENYLPYRIDINE-2-CARBOXYLIC ACID (5P), qui démontre une modulation de la prolifération des cellules engendrée par la RNase 5 sur deux lignées cellulaires différentes. Puisque les résultats des titrages ^{15}N -HSQC n'ont pas indiqué une variation de déplacements chimiques pour les résidus de la triade catalytique (les histidines 13 et 114 ainsi que la lysine 40), et que l'activité ribonucléolytique n'était pas abolie en présence du fragment, il est possible qu'il s'agisse d'une modulation de type allostérique. De plus, ce fragment n'est pas toxique pour les cellules aux concentrations où l'effet modulateur est observé et il ne semble pas influencer la stabilité de la protéine. Ce fragment apparaît comme un candidat pour poursuivre l'étude FBDD sur la RNase 5, à savoir une étape de synthèse chimique rationnelle dans le but d'améliorer son affinité. En effet, les titrages des 4 fragments avec la RNase 5 ont confirmé une interaction avec la RNase 5 et pour des sites de fixation potentiels souvent dans les mêmes régions de la protéine. Ainsi, les autres fragments pourraient être greffés au fragment 5P dans l'étape de synthèse rationnelle. Avec un ligand de plus haute affinité, d'autres expériences pourraient être envisagées pour mieux comprendre la modulation des activités biologiques de la protéine. En plus des effets sur certaines voies de signalisation qui sont sous l'influence de la RNase 5, des expériences sur des modèles cellulaires de maladies neurodégénératives ou des études sur l'angiogenèse, utilisant un modèle animal tel que le poisson-zèbre ou une lignée cellulaire telle que les cellules HUVEC, peuvent être envisagés. De plus, puisqu'il s'agit possiblement d'un modulateur allostérique, il serait aussi intéressant d'évaluer l'effet de ce ligand de plus haute affinité sur la dynamique interne de la protéine malgré le fait que la RNase 5 ne possède pas de dynamique à l'échelle de temps de la milliseconde. Les changements de conformation associés à la présence d'un modulateur allostérique peuvent engendrer un changement de dynamique moléculaire.

Cette étude est la première exploration d'une approche de type FBDD sur les RNases humaines. Les résultats présentés ici confortent l'utilisation de cette technique de criblage pour la découverte de modulateurs allostériques. Ce premier criblage prometteur d'une RNase humaine ouvre la possibilité de futurs criblages sûrs d'autres RNases ayant des intérêts thérapeutiques. Il est évident que la spécificité pour la cible du ligand de haute affinité doit être testée pour confirmer l'intérêt thérapeutique de la molécule. Jusqu'à présent, des études de criblage à haut débit avaient été réalisées sur la RNase 5 dans le but de cibler le site orthostérique. Cette étude est donc la première à suggérer des ligands de sites allostériques et à utiliser la RMN comme technique de criblage pour la RNase 5. Enfin, étant donné que la RNase 5 partage le même promoteur et est co-exprimée avec la RNase 4, en plus de posséder également des activités neuro-

protectives et angiogéniques, il serait intéressant d'envisager le développement de modulateurs allostériques spécifiques et d'étudier l'effet de la modulation individuelle de ces deux protéines sur leurs activités biologiques.

5 BIBLIOGRAPHIE

- Anfinsen, C.B. (1973). Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science* *181*, 223–230.
- Arakawa, M., Someno, T., Kawada, M., and Ikeda, D. (2008). A New Terrein Glucoside, a Novel Inhibitor of Angiogenin Secretion in Tumor Angiogenesis. *The Journal of Antibiotics* *61*, 442–448.
- Baynes, B.M., Wang, D.I.C., and Trout, B.L. (2005). Role of Arginine in the Stabilization of Proteins against Aggregation †. *Biochemistry* *44*, 4919–4925.
- Bollag, G., Hirth, P., Tsai, J., Zhang, J., Ibrahim, P.N., Cho, H., Spevak, W., Zhang, C., Zhang, Y., Habets, G., et al. (2010). Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* *467*, 596–599.
- Bradshaw, W.J., Rehman, S., Pham, T.T.K., Thiagarajan, N., Lee, R.L., Subramanian, V., and Acharya, K.R. (2017). Structural insights into human angiogenin variants implicated in Parkinson’s disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Scientific Reports* *7*.
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., and Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future: Therapeutic antibodies: an update. *British Journal of Pharmacology* *157*, 220–233.
- Changeux, J.-P. (2012). Allostery and the Monod-Wyman-Changeux Model After 50 Years. *Annual Review of Biophysics* *41*, 103–133.
- Chatzileontiadou, D.S.M., Tsirkone, V.G., Dossi, K., Kassouni, A.G., Liggri, P.G.V., Kantsadi, A.L., Stravodimos, G.A., Balatsos, N.A.A., Skamnaki, V.T., and Leonidas, D.D. (2016). The ammonium sulfate inhibition of human angiogenin. *FEBS Letters* *590*, 3005–3018.
- Chavali, G.B., Papageorgiou, A.C., Olson, K.A., Fett, J.W., Hu, G., Shapiro, R., and Acharya, K.R. (2003). The Crystal Structure of Human Angiogenin in Complex with an Antitumor Neutralizing Antibody. *Structure* *11*, 875–885.
- Choi, S.J., Ahn, M., Lee, J.S., and Jung, W.J. (1997). Selection of a high affinity angiogenin-binding peptide from a peptide library displayed on phage coat protein. *Mol. Cells* *7*, 575–581.
- Congreve, M., Carr, R., Murray, C., and Jhoti, H. (2003). A ‘Rule of Three’ for fragment-based lead discovery? *Drug Discovery Today* *8*, 876–877.
- Cooper, A., and Dryden, D.T. (1984). Allostery without conformational change. A plausible model. *Eur. Biophys. J.* *11*, 103–109.

- D. E. Koshland (1958). Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *PNAS* *44*, 98–104.
- Dokholyan, N.V. (2016). Controlling Allosteric Networks in Proteins. *Chemical Reviews* *116*, 6463–6487.
- Doucet, N., Watt, E.D., and Loria, J.P. (2009). The Flexibility of a Distant Loop Modulates Active Site Motion and Product Release in Ribonuclease A. *Biochemistry* *48*, 7160–7168.
- Doucet, N., Khirich, G., Kovrigin, E.L., and Loria, J.P. (2011). Alteration of Hydrogen Bonding in the Vicinity of Histidine 48 Disrupts Millisecond Motions in RNase A. *Biochemistry* *50*, 1723–1730.
- Dowd, J.E., and Riggs, D.S. (1965). A COMPARISON OF ESTIMATES OF MICHAELIS-MENTEN KINETIC CONSTANTS FROM VARIOUS LINEAR TRANSFORMATIONS. *J. Biol. Chem.* *240*, 863–869.
- Drews, J. (1996). Genomic sciences and the medicine of tomorrow. *Nature Biotechnology* *14*, 1516–1518.
- Drews, J. (2000). Drug Discovery: A Historical Perspective. *Science* *287*, 1960–1964.
- Erlanson, D.A., Fesik, S.W., Hubbard, R.E., Jahnke, W., and Jhoti, H. (2016). Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*.
- F. Riordan, J. (2001). Angiogenin. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 263–273.
- Fischer, E. (1894). Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* *27*, 2985–2993.
- Gagné, D., and Doucet, N. (2013). Structural and functional importance of local and global conformational fluctuations in the RNase A superfamily. *FEBS Journal* *280*, 5596–5607.
- Grover, A.K. (2013). Use of Allosteric Targets in the Discovery of Safer Drugs. *Medical Principles and Practice* *22*, 418–426.
- GUO-FU HU, JAMES F. RIORDAN, and BERT L. VALLEE (1997). A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Biochemistry* *94*, 2204–2209.
- Harner, M.J., Frank, A.O., and Fesik, S.W. (2013a). Fragment-based drug discovery using NMR spectroscopy. *Journal of Biomolecular NMR* *56*, 65–75.
- Harner, M.J., Frank, A.O., and Fesik, S.W. (2013 b). Fragment-based drug discovery using NMR spectroscopy. *Journal of Biomolecular NMR* *56*, 65–75.
- Hu, G. (2001). Neomycin Inhibits the Angiogenic Activity of Fibroblast and Epidermal Growth Factors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *287*, 870–874.

- Hu, G. -f. (1998). Neomycin inhibits angiogenin-induced angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *95*, 9791–9795.
- Hu, G.F., Strydom, D.J., Fett, J.W., Riordan, J.F., and Vallee, B.L. (1993). Actin is a binding protein for angiogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *90*, 1217–1221.
- James W. Fett, Daniel J. Strydom, Roy R. Lobb, Edward M. Alderman, J. Lemuel Bethune, James F. Riordan, and Bert L. Vallee (1985). Isolation and Characterization of Angiogenin, an Angiogenic Protein from Human Carcinoma Cells. *Biochemistry* *54*, 5480–5484.
- Jenkins, J.L., and Shapiro, R. (2003). Identification of Small-Molecule Inhibitors of Human Angiogenin and Characterization of Their Binding Interactions Guided by Computational Docking [†]. *Biochemistry* *42*, 6674–6687.
- Jiang, X., and Belasco, J.G. (2004). Catalytic activation of multimeric RNase E and RNase G by 5'-monophosphorylated RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *101*, 9211–9216.
- Kao, R.Y.T., Jenkins, J.L., Olson, K.A., Key, M.E., Fett, J.W., and Shapiro, R. (2002). A small-molecule inhibitor of the ribonucleolytic activity of human angiogenin that possesses antitumor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *99*, 10066–10071.
- Koshland, D.E. (1959). Enzyme flexibility and enzyme action. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* *54*, 245–258.
- Krimm, I. (2015). Le criblage de fragments : Une voie prometteuse pour la conception de médicaments. *Médecine/Sciences* *31*, 197–202.
- Kubbutat, M.H.G., Jones, S.N., and Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* *387*, 299–303.
- Landt, S., Mordelt, K., Schwidde, I., Barinoff, J., Korlach, S., Stöblen, F., Lichtenegger, W., Sehouli, J., and Kümmel, S. (2011). Prognostic significance of the angiogenic factors angiogenin, endoglin and endostatin in cervical cancer. *Anticancer Res.* *31*, 2651–2655.
- Leland, P.A., Staniszewski, K.E., Park, C., Kelemen, B.R., and Raines, R.T. (2002). The Ribonucleolytic Activity of Angiogenin [†]. *Biochemistry* *41*, 1343–1350.
- Liu, S., Yu, D., Xu, Z., Riordan, J.F., and Hu, G. (2001). Angiogenin Activates Erk1/2 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *287*, 305–310.
- Lyons, S.M., Fay, M.M., Akiyama, Y., Anderson, P.J., and Ivanov, P. (2017). RNA biology of angiogenin: Current state and perspectives. *RNA Biology* *14*, 171–178.

- Moroianu, J., and Riordan, J.F. (1994). Identification of the Nucleolar Targeting Signal of Human Angiogenin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 203, 1765–1772.
- Moussaoui, M., Cuchillo, C.M., and Nogues, M.V. (2006). A phosphate-binding subsite in bovine pancreatic ribonuclease A can be converted into a very efficient catalytic site.
- Nussinov, R., Tsai, C.-J., and Csermely, P. (2011). Allo-network drugs : harnessing allostery in cellular networks. *Trends in Pharmacological Sciences* 32, 686–693.
- Olson, K.A., French, T.C., Vallee, B.L., and Fett, J.W. (1994). A monoclonal antibody to human angiogenin suppresses tumor growth in athymic mice. *Cancer Res.* 54, 4576–4579.
- Papageorgiou, A.C. (1997). Molecular recognition of human angiogenin by placental ribonuclease inhibitor—an X-ray crystallographic study at 2.0 Å resolution. *The EMBO Journal* 16, 5162–5177.
- Price, A.J., Howard, S., and Cons, B.D. (2017). Fragment-based drug discovery and its application to challenging drug targets. *Essays In Biochemistry* 61, 475–484.
- Raines, R. T. (1998). Ribonuclease A. *Chemical Reviews* 98, 1045–1066.
- Renaud, J.-P., Chung, C., Danielson, U.H., Egner, U., Hennig, M., Hubbard, R.E., and Nar, H. (2016). Biophysics in drug discovery: impact, challenges and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 15, 679–698.
- Russo, N., Shapiro, R., Acharya, K.R., Riordan, J.F., and Vallee, B.L. (1994). Role of glutamine-117 in the ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 2920–2924.
- Sadagopan, S., Veetil, M.V., Chakraborty, S., Sharma-Walia, N., Paudel, N., Bottero, V., and Chandran, B. (2012). Angiogenin functionally interacts with p53 and regulates p53-mediated apoptosis and cell survival. *Oncogene* 31, 4835–4847.
- Scott, D.E., Coyne, A.G., Hudson, S.A., and Abell, C. (2012). Fragment-Based Approaches in Drug Discovery and Chemical Biology. *Biochemistry* 51, 4990–5003.
- Seibert, E., and Tracy, T.S. (2014). Fundamentals of Enzyme Kinetics. In *Enzyme Kinetics in Drug Metabolism*, S. Nagar, U.A. Argikar, and D.J. Tweedie, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 9–22.
- Shapiro, R., and Vallee, B.L. (1987). Human placental ribonuclease inhibitor abolishes both angiogenic and ribonucleolytic activities of angiogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84, 2238–2241.
- Shapiro, R., Riordan, J.F., and Vallee, B.L. (1986). Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Biochemistry* 25, 3527–3532.

Shibata, A., Ibaragi, S., Mandai, H., Tsumura, T., Kishimoto, K., Okui, T., Hassan, N.M.M., Shimo, T., Omori, K., Hu, G.-F., et al. (2016). Synthetic Terrein Inhibits Progression of Head and Neck Cancer by Suppressing Angiogenin Production. *Anticancer Res.* *36*, 2161–2168.

Shuker, S.B., Hajduk, P.J., Meadows, R.P., and Fesik, S.W. (1996). Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR. *Science* *274*, 1531–1534.

Sorrentino, S. (2010). The eight human “canonical” ribonucleases: Molecular diversity, catalytic properties, and special biological actions of the enzyme proteins. *FEBS Letters* *584*, 2194–2200.

S.Sorrentino (1998). Human extracellular ribonucleases: multiplicity, molecular diversity and catalytic properties of the major RNase types. *CMLS*.

Steidinger, T.U., Slone, S.R., Ding, H., Standaert, D.G., and Yacoubian, T.A. (2013). Angiogenin in Parkinson Disease Models: Role of Akt Phosphorylation and Evaluation of AAV-Mediated Angiogenin Expression in MPTP Treated Mice. *PLoS ONE* *8*, e56092.

Subramanian, V., Crabtree, B., and Acharya, K.R. (2007). Human angiogenin is a neuroprotective factor and amyotrophic lateral sclerosis associated angiogenin variants affect neurite extension/pathfinding and survival of motor neurons. *Human Molecular Genetics* *17*, 130–149.

Swinney, D.C., and Anthony, J. (2011). How were new medicines discovered? *Nature Reviews Drug Discovery* *10*, 507–519.

Voet, D., Rousseau, G., and Voet, J.G. (2010). *Biochimie*.

Wang, Y.-N., Lee, H.-H., Chou, C.-K., Yang, W.-H., Wei, Y., Chen, C.-T., Yao, J., Hsu, J.L., Zhu, C., Ying, H., et al. (2018). Angiogenin/Ribonuclease 5 Is an EGFR Ligand and a Serum Biomarker for Erlotinib Sensitivity in Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* *33*, 752-769.e8.

Williamson, M.P. (2013). Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* *73*, 1–16.

Wisler, J.W., Xiao, K., Thomsen, A.R.B., and Lefkowitz, R.J. (2014). Recent developments in biased agonism. *Curr. Opin. Cell Biol.* *27*, 18–24.

Xu, Z., Tsuji, T., Riordan, J.F., and Hu, G. (2002). The nuclear function of angiogenin in endothelial cells is related to rRNA production. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *294*, 287–292.

Yan, Y.-B., Zhang, J., He, H.-W., and Zhou, H.-M. (2006). Oligomerization and Aggregation of Bovine Pancreatic Ribonuclease A: Characteristic Events Observed by FTIR Spectroscopy. *Biophysical Journal* *90*, 2525–2533.

Yon-Kahn, J., and Hervé, G. (2005). Enzymologie moléculaire et cellulaire (Les Ulis, France : EDP Sciences).

