

# UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

## ÉCOLE DOCTORALE

**SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT (SSBCV)**

**INSTITUT DE CHIMIE ORGANIQUE ET ANALYTIQUE**

# THÈSE présentée par :

**Solweig CHARTIER**

soutenue le : 22 juillet 2024

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Chimie analytique

## Combiner la MST à la CE : une stratégie d'intérêt pour l'évaluation des interactions enzyme/ligand de petite taille dans des lysats cellulaires

### THÈSE dirigée par :

Mme NEHME Reine

Mme CLAUDE Bérengère

Professeur, Université d'Orléans

Maître de conférences, Université d'Orléans

### RAPPORTEURS :

M. LADNER Yoann

Mme SMADJA Claire

Maître de conférences, Université de Montpellier

Professeur, Université Paris-Saclay

### JURY :

Mme CLAUDE Bérengère

M. HAMACEK Josef

M. LADNER Yoann

Mme NEHME Reine

Mme SEBBAN Muriel

Mme SMADJA Claire

M. SOULE Pierre

Maître de conférences, Université d'Orléans

Professeur, Université d'Orléans, **Président du jury**

Maître de conférences, Université de Montpellier

Professeur, Université d'Orléans

Maître de conférences, Université de Rouen

Professeur, Université Paris-Saclay

Senior Application Scientist, NanoTemper technologies





## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les différents membres du jury qui ont accepté d'évaluer ces travaux de thèse. Merci au Pr. Claire Smadja et au Dr. Yoann Ladner, rapporteurs de la thèse, ainsi qu'au Pr. Josef Hamacek, au Dr. Muriel Sebban et au Dr. Pierre Soule, membres du jury. Merci à tous d'avoir pris le temps d'examiner et de juger ce travail de thèse.

Je tiens à remercier mes directrices de thèse, le Pr. Reine Nehmé et le Dr. Bérengère Claude, pour leur encadrement et la confiance qu'elles ont placée en moi en me donnant la possibilité de mener ma thèse dans de bonnes conditions. Merci également au Dr. Muriel Sebban, au Dr. Gaël Coadou et au Dr. Béatrice Vallée pour leur implication dans les parties inhérentes à la modélisation moléculaire et à la biologie de ma thèse. Je les remercie pour le suivi scientifique du projet au cours des quatre années.

Merci au Pr. Pierre Lafite et au Pr. Franck Suzenet pour leur soutien en tant que membres du comité de suivi de thèse.

Je souhaite aussi remercier le Pr. Sylvain Routier, directeur de l'ICOA (Institut de Chimie Organique et Analytique), laboratoire dans lequel ma thèse s'est déroulée. Je remercie tous les membres de l'équipe SAAB : le Dr. Pierre-Eric Campos, le Dr. Agnès Chartier, le Dr. David Da Silva, le Dr. Christelle Dufresne, le Pr. Emilie Destandau, le Dr. Laëtitia Fougère, le Dr. Eric Lesellier, le Dr. Clément de Saint Jores et le Pr. Caroline West, pour les échanges scientifiques que nous avons eus.

J'adresse des remerciements plus particuliers au Dr. Rouba Nasreddine qui a participé avec le Pr. Reine Nehmé à mon initiation à la MST ainsi qu'à Alexandra Launay qui a apporté un soutien technique précieux à différentes étapes de ma thèse.

Je remercie le Labex Synorg et à la région Centre Val de Loire d'avoir financé cette thèse.

Je souhaite aussi vivement remercier la communauté NanoTemper, et plus particulièrement Pierre Soule, pour le support technique en MST et pour les échanges scientifiques autour des résultats obtenus.

Merci au personnel administratif et technique de l'ICOA, Sophie Nicourt, Christophe Dubois, Cédric Maffre et Stéphane Rétif, pour leur accompagnement.

Je souhaite également remercier mes collègues doctorants, post-doctorants, assistants techniques et stagiaires de l'équipe SAAB de l'ICOA : Alexander, Angéline, Audrey, Benjamain, Camille, Cécile, Elise, Jeremy, Laurine, Lucie, Lydie, Marine, Mélanie, Marion, Mathilde, Nadine, Océane, Quentin, Roba, Sirine, Wiktorja et Zahia. Merci pour ces quatre années.

Sandrine et Florian, merci pour votre disponibilité et votre patience.

Merci à Hassan Oulyadi et à l'équipe Analyse et modélisation du COBRA pour leur accueil.

Merci au Pr. Hélène Benedetti et au Dr. Béatrice Vallée de m'avoir accueillie dans leur équipe Signalisation cellulaire et neurofibromatose au CBM. J'associe à ces remerciements les membres de leur équipe qui m'ont conseillée et aidée sur le plan expérimental.

Je tiens à remercier toute l'équipe du service de chimie analytique de l'IUT d'Orléans pour leur aide et leurs conseils lors des séances d'enseignement en travaux pratiques de techniques séparatives que j'ai pu dispenser auprès des étudiants de 2<sup>ème</sup> année de BUT Chimie.

En dehors du travail, je suis particulièrement reconnaissante envers Lucile, Quentin, Ménehould, Noëlie, Noémie, Pearl et Luna pour leur soutien indéfectible.

Je tiens à remercier ma famille : merci à mes grands-parents, mes parents, mon frère et ma sœur pour leur réconfort et encouragements. Théo, merci d'exister.



## **Table des matières**

|                                                                                                                                                                          |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Introduction .....</b>                                                                                                                                                | <b>1</b>   |
| <b>Chapitre I : Introduction bibliographique .....</b>                                                                                                                   | <b>7</b>   |
| <b>Partie expérimentale .....</b>                                                                                                                                        | <b>107</b> |
| <b>Chapitre II : Étude de l'interaction LIM Kinase/inhibiteur dans des lysats<br/>cellulaires utilisant la thermophorèse à micro-échelle dans le spectre rouge. ....</b> | <b>113</b> |
| <b>Chapitre III : L'activité de miRFP670-LIMK1 dans les lysats cellulaires<br/>contrôlée par électrophorèse capillaire .....</b>                                         | <b>143</b> |
| <b>Chapitre IV : Caractérisation thermodynamique des interactions LIMK/ligand de<br/>petite taille dans les lysats cellulaires.....</b>                                  | <b>167</b> |
| <b>Conclusions &amp; perspectives .....</b>                                                                                                                              | <b>197</b> |



## Abbreviations

|        |                                          |
|--------|------------------------------------------|
| ADP    | Adenosine diphosphate                    |
| AMP    | Adenosine monophosphate                  |
| ATP    | Adenosine triphosphate                   |
| CE     | Capillary electrophoresis                |
| DAD    | Diode-array detector                     |
| DMSO   | Dimethyl sulfoxide                       |
| EDTA   | Ethylenediaminetetraacetic acid          |
| EMMA   | Electromigration microanalysis           |
| EOF    | Electroosmotic flow                      |
| ESI    | Electrospray ionization                  |
| EtOH   | Ethanol                                  |
| FRET   | Förster resonance energy transfer        |
| GFP    | Green fluorescent protein                |
| HEK293 | Human Embryonic Kidney 293 cells         |
| HPAC   | High-performance affinity chromatography |
| HPLC   | High-performance liquid chromatography   |
| HRMS   | High-resolution mass spectrometry        |
| HTS    | High throughput screening                |
| IB     | Incubation buffer                        |
| IR     | Infrared                                 |
| ITC    | Isothermal calorimetry                   |

|         |                                        |
|---------|----------------------------------------|
| Kin     | Kinase domain of LIM Kinases           |
| LC      | Liquid chromatography                  |
| LED     | Light emitting diode                   |
| LIF     | Laser induced fluorescence             |
| LIMK    | LIM Kinase                             |
| LOD     | Limit of detection                     |
| MST     | Microscale thermophoresis              |
| NMR     | Nuclear magnetic resonance             |
| PDADMAC | Poly(diallyldimethylammonium chloride) |
| PMT     | photon-multiplier-tube                 |
| PSS     | poly(sodium 4-styrenesulfonate)        |
| RFP     | Red fluorescent protein                |
| ROCK    | Rho-associated protein kinase          |
| Tris    | Tris (hydroxymethyl) aminomethane      |
| UV      | Ultra-violet                           |
| YFP     | Yellow fluorescent protein             |

## Constants and symbols

|                  |                                           |
|------------------|-------------------------------------------|
| ‰                | Parts per thousand                        |
| AU               | Absorbance units                          |
| CPA              | Corrected peak area                       |
| Da               | Dalton                                    |
| E                | Enzyme                                    |
| I                | Inhibitor                                 |
| I%               | Percentage of inhibition                  |
| i.d.             | Inner diameter                            |
| IC <sub>50</sub> | Half maximal inhibitory concentration     |
| K <sub>d</sub>   | Equilibrium dissociation constant         |
| pI               | Isoelectric point                         |
| pKa              | Cologarithm of acid dissociation constant |
| RSD              | Relative standard deviation               |
| S/N              | Signal to noise ratio                     |
| ST               | Soret coefficient                         |
| $\lambda$        | Wavelength                                |
| $\mu_{app}$      | Apparent mobility                         |
| $\mu_{eff}$      | Effective electrophoretic mobility        |
| $\mu_{EOF}$      | Electroosmotic flow mobility              |



# Introduction

La reconnaissance moléculaire est le processus par lequel des macromolécules biologiques interagissent entre elles ou avec diverses petites molécules avec une spécificité et une affinité élevées pour former un complexe spécifique. Elle constitue la base de tous les processus biologiques dans les organismes vivants. Les protéines, une classe importante de macromolécules biologiques, remplissent leurs fonctions en se liant à elles-mêmes (dimérisation par exemple) ou à d'autres molécules. Une description détaillée des interactions protéine-ligand est donc essentielle pour comprendre la biologie au niveau moléculaire et, par conséquent, favoriser ou empêcher ces interactions selon leur impact physiologique. Dans ce travail de thèse, nous nous intéressons à l'interaction enzyme/inhibiteur de petite taille.

Les enzymes<sup>1</sup> sont une famille de protéines qui catalysent presque toutes les réactions du métabolisme cellulaire. La dérégulation des enzymes peut entraîner des maladies dont certaines sont très graves telles que cancers, maladies neurodégénératives (Alzheimer, maladie de Parkinson, maladie de Charcot, etc.), maladies génétiques (Maladie de Menière, neurofibromatose, etc.). Il est donc crucial de pouvoir caractériser les enzymes et leur bon ou mauvais fonctionnement. Cependant, leur quantification directe est difficile car elles se trouvent à de faibles concentrations (quelques nM) dans des milieux complexes riches en diverses molécules (protéines, nucléotides...). Ainsi, l'enzyme peut être étudiée d'une part en suivant le produit de la réaction qu'elle catalyse et d'autre part par la caractérisation de la cinétique d'interaction avec des ligands. Toutes ces données sont complémentaires et permettent de mieux comprendre le mécanisme d'action et de détecter tout dysfonctionnement pour pouvoir établir des diagnostics précoces. Ces études permettent aussi de développer des modulateurs importants de l'activité enzymatique notamment dans le domaine thérapeutique. Grâce aux données obtenues, des relations structure-activité (RSA) par modélisation informatique peuvent être établies et la pharmacomodulation<sup>2</sup> permet ensuite d'élaborer des pharmacophores fonctionnalisés plus efficaces. Une réaction enzymatique est caractérisée par des constantes cinétiques telles que la vitesse maximale ( $V_{\max}$ ), la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) représentative de l'affinité d'un substrat et la constante d'inhibition à 50 % ( $IC_{50}$ ) représentative de l'affinité d'un inhibiteur pour l'enzyme. La détermination de la constante d'association ( $K_a$ ) permet de prédire la force de la liaison entre l'enzyme et l'inhibiteur.

---

<sup>1</sup> Enzyme : nom féminin ou parfois nom masculin (Larousse). Dans ce document, l'enzyme est considérée comme étant un nom féminin.

<sup>2</sup> Modification au cours d'opérations de chimie de synthèse des molécules pharmacologiquement actives par l'introduction de substituants à effet supposé favorable, par le retrait de groupes à effet défavorable ainsi que par des changements dans l'agencement spatial de la molécule en vue d'améliorer son activité ou de faire apparaître de nouvelles propriétés. Cette discipline fait appel au drug design et à la modélisation moléculaire (Bulletin de l'Académie nationale de médecine, décembre, N°9, 2010).

Pour ces études, plusieurs techniques peuvent être utilisées. La plupart des études d'interaction cible/ligand réalisées de nos jours se font sur des cibles purifiées et/ou tronquées. La conservation de l'activité catalytique de l'enzyme - qui n'est pas garantie lors de la purification, de la modification, ou de la troncature d'une enzyme - n'est souvent pas vérifiée. Cela peut poser problème car, lors de l'étude des interactions biomoléculaires, l'objectif est de se placer dans les conditions les plus proches possibles de celles *in vivo*.

La Résonance Plasmonique de Surface (SPR) est parmi les techniques les plus répandue pour évaluer les cinétiques d'association ( $K_a$ ) et de dissociation ( $K_d$ ) d'une interaction. Elle requiert l'immobilisation de l'enzyme à la surface d'un support solide, ce qui peut altérer sa conformation 3D et aussi son activité. La Calorimétrie de Titrage Isotherme (ITC) permet en plus une détermination précise de la stœchiométrie ( $n$ ), de l'enthalpie ( $\Delta H$ ) et de l'entropie ( $\Delta S$ ) de liaison cible-ligand. Ceci fournit alors un profil thermodynamique complet des paramètres de l'interaction moléculaire. Toutefois, l'ITC nécessite l'utilisation de cibles purifiées et ne permet donc pas de travailler directement dans des échantillons biologiques complexes (cellules, fluides ou tissus). Des techniques radiométriques sont aussi fréquemment employées de part leur sensibilité importante. Cependant, la manipulation de la radioactivité nécessite de respecter une réglementation très stricte et ces tests sont onéreux.

A la fin des années 2000, Philipp Baaske et Stefan Duhr, doctorants à l'Université Ludwig Maximilian de Munich, ont trouvé un moyen d'appliquer la théorie de la thermophorèse, expliquée au milieu des années 1800, pour les mesures d'interactions biologiques. Ils développent la technologie « thermophorèse à micro-échelle (MST) » qui a conduit à créer l'entreprise NanoTemper. La MST mesure l'interaction entre molécules en utilisant des principes définis par Carl Ludwig et Charles Soret il y a plus d'un siècle et demi. Plus précisément, la MST est un puissant outil analytique permettant de caractériser, par la détermination de la constante de dissociation  $K_d$ , les interactions entre des macromolécules biologiques et d'autres macromolécules, de petits ligands ou des ions. Par extension, elle permet également de déterminer les paramètres thermodynamiques de ces interactions. Ces essais requièrent que l'un des deux partenaires soit fluorescent, ils se font sans immobilisation d'un des deux partenaires de l'interaction et les constantes d'affinité déterminées sont pour une large gamme d'affinités (entre le pM et le mM).

Par ailleurs, l'électrophorèse capillaire (CE) est une technique analytique reconnue pour ses atouts : faible consommation de réactifs, rapidité et automatisation des analyses, sensibilité satisfaisante et compatibilité avec de nombreux modes de détection (spectrophotométrie d'absorption UV-visible, spectrométrie de masse, fluorescence induite par laser...). La CE s'est montrée être un outil de

miniaturisation efficace des essais biochimiques puisque la plupart des enzymes intéressantes, notamment d'un point de vue médical, sont peu accessibles et onéreuses.

L'objectif de ce travail de thèse était de développer des méthodes de caractérisation de l'interaction protéine/petite molécule par MST et CE, simples, économiques, fiables et rapides, car elles seront réalisées directement dans les lysats cellulaires sans nécessiter de purification de la cible. L'inhibition des enzymes LIM kinases sera étudiée comme une preuve de concept en évaluant les affinités d'interaction LIMK-inhibiteur ( $K_d$ ). Ces kinases catalysent la phosphorylation de leur substrat la cofiline, et sont devenues des cibles thérapeutiques attractives pour le traitement de la neurofibromatose de type 1, de certains cancers et maladies neurologiques. Toutefois, bien que des centaines de molécules aient été identifiées comme inhibitrices des LIMKs *in vitro*, avec des valeurs de  $K_d$  de l'ordre du nM, aucune d'entre elles n'a encore atteint la phase clinique. Cela indique une certaine incompréhension de l'interaction entre les LIMK et leurs inhibiteurs.

Pour travailler dans des lysats cellulaires, la fluorescence dans le domaine du rouge est un choix adéquat pour garantir une sélectivité et une sensibilité suffisantes. Pour cela, les protéines entières, LIMK1 et LIMK2, ainsi que sur leurs domaines catalytiques (*i.e.* les protéines tronquées), Kin1 et Kin2, ont été produites directement fluorescentes dans des cellules HEK293 en les fusionnant avec le tag mRFP670 ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 650/670$  nm).

Ce mémoire de thèse comprend quatre chapitres. Le **Chapitre I** fait état des techniques courantes permettant l'étude de l'affinité entre une cible et son ligand, avec un accent sur la MST (thermophorèse à micro échelle), qui est la technique utilisée dans cette thèse. L'analyse des réactions enzymatiques, centrée sur celles impliquant les kinases, est ensuite discutée. Puis les méthodes de détermination et de prévision des paramètres thermodynamiques des interactions protéine/ligand sont exposées. Une présentation de la famille d'enzyme modèle choisie pour cette thèse, les LIM Kinases, est faite.

La partie expérimentale de cette thèse est divisée en trois parties, les **Chapitres II, III et IV**.

Le **Chapitre II** présente la production et l'étude d'affinité avec leurs inhibiteurs des deux protéines constituant la famille des LIM Kinases, LIMK1 et LIMK2, ainsi que de leurs domaines catalytiques, Kin1 et Kin2. Les LIMKs ont été produites fusionnées à une protéine fluorescente, mRFP670, afin de déterminer les constantes de dissociation ( $K_d$ ) directement dans le lysat cellulaire, sans purification, avec leurs inhibiteurs de référence, LX7101, BMS-5, T56-LIMKi et TH-257 par MST. Lorsque cela est possible, les résultats obtenus seront comparés à ceux des techniques conventionnelles afin de

valider les méthodes développées. Des analyses par modélisation moléculaire (*docking*) permettront une meilleure connaissance des sites d'interaction entre les kinases LIM et leurs inhibiteurs.

Le **Chapitre III** montre le développement d'une méthode basée sur la CE permettant de vérifier que les LIMKs fusionnées à la protéine fluorescente mRFP670 à leur extrémité C-terminale ont conservé leur activité. La capacité de mRFP670-LIMK1 à garder sa fonction enzymatique *i.e.* à transférer un groupement phosphate de l'ATP à la cofiline, générant de l'ADP, et à être inhibée par un inhibiteur de référence (TH-257 dans ce cas) a été mise en évidence.

Le **Chapitre IV** propose d'aller au-delà de la détermination de  $K_d$  par MST afin de caractériser les interactions protéine/ligand : ce chapitre présente la détermination des paramètres thermodynamiques ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$  et  $\Delta G$ ) des interactions entre les LIM Kinases et leurs inhibiteurs, toujours dans le lysat cellulaire sans purification. Une étude thermodynamique sur le lysat cellulaire contenant mRFP670-LIMK est mise en place. Ces déterminations expérimentales sont complétées par une étude théorique pour estimer la valeur de la variation de l'énergie libre de Gibbs ou  $\Delta G$  par docking moléculaire.

Ce mémoire se termine par une conclusion générale (**Conclusions et perspectives**) sur l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce projet de thèse ainsi que sur quelques perspectives futures de ces recherches afin d'élargir leur champ d'application.



# **Chapitre I :**

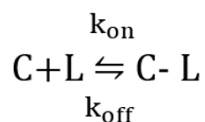
## **Introduction bibliographique**

## 1. Introduction

Afin de trouver de nouveaux médicaments ou de comprendre le fonctionnement des enzymes, leur étude se fait généralement par l'évaluation de leur activité et de leur affinité avec d'autres espèces (autre enzyme ou ligand).

L'activité enzymatique peut être mesurée en présence et en l'absence de ligands afin d'évaluer le type et le degré de modulation exercés par ces molécules. La concentration inhibitrice semi-maximale ( $IC_{50}$ ) est la quantité de ligand nécessaire pour réduire de moitié l'activité de l'enzyme [1]. L' $IC_{50}$  peut être utilisée pour classer les ligands en fonction de leur capacité à moduler l'activité d'une cible. Toutefois, la valeur de cette constante dépend des paramètres expérimentaux, en particulier de la concentration de la cible étudiée [1], [2]. Une autre approche consiste à élucider la formation de complexes moléculaires entre la cible et d'autres molécules. Les constantes de vitesse d'association ( $k_{on}$ ) et de dissociation ( $k_{off}$ ) peuvent être utilisées pour évaluer la constante de dissociation à l'équilibre,  $K_d$ , entre les partenaires d'interaction [1].

Pour une association entre une cible (C) et un ligand (L), l'équation s'écrit de la façon suivante :



Le  $K_d$  est alors calculé de la manière suivante :

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[C][L]}{[C - L]} = \frac{1}{K_a} \quad (1)$$

Avec :

$K_d$  : constante de dissociation;  $K_a$  : constante d'association ;  $k_{on}$  : constante de vitesse d'association ;  $k_{off}$  : constante de vitesse de dissociation ; et  $[C-L]$ ,  $[C]$  et  $[L]$  : respectivement, la concentration molaire du complexe cible-ligand, celle de la cible et celle du ligand. L'évaluation de  $K_d$  permet de prédire les affinités de liaison entre les ligands potentiels et les enzymes cibles et constitue une étape préliminaire importante pour le criblage d'inhibiteurs [3].

La formation d'un complexe cible-ligand se produit parce que le complexe est thermodynamiquement plus stable que le ligand et la cible libres ou non liés : la thermodynamique constitue donc la force motrice de la liaison cible-ligand. Cependant, la valeur de la constante d'équilibre qui décrit

l'interaction ne fournit aucune information sur la vitesse à laquelle le complexe se forme et se décompose. Au contraire, les constantes de vitesse d'association ( $k_{on}$ ) et de dissociation ( $k_{off}$ ) de la liaison du ligand à sa cible sont contrôlées par la différence d'énergie libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) entre l'état fondamental et l'état de transition sur la coordonnée de la réaction de liaison (Figure 1).

La liaison entre la cible (C) et le ligand (L) conduit au complexe cible-ligand (C-L). La force motrice de la liaison est donnée par la différence d'énergie libre de Gibbs entre C+L et C-L. Les mesures expérimentales de la constante de dissociation à l'équilibre  $K_d$ , ou des paramètres tels que les valeurs  $IC_{50}$ , fournissent une estimation quantitative de la thermodynamique de la liaison.  $\Delta G$  est lié à  $K_d$  par la relation  $\Delta G^\circ = -RT \ln K$ . La durée de vie du complexe cible-ligand est souvent quantifiée par le temps de résidence,  $t_R$ , où  $t_R = 1/k_{off}$  [4]. La Figure 1 montre un mécanisme simple, en une étape, sachant que les inhibiteurs à vitesse de liaison lente peuvent fonctionner selon un mécanisme en deux étapes, dans lequel le ligand induit un changement de conformation de la protéine avant de pouvoir s'y lier [5].

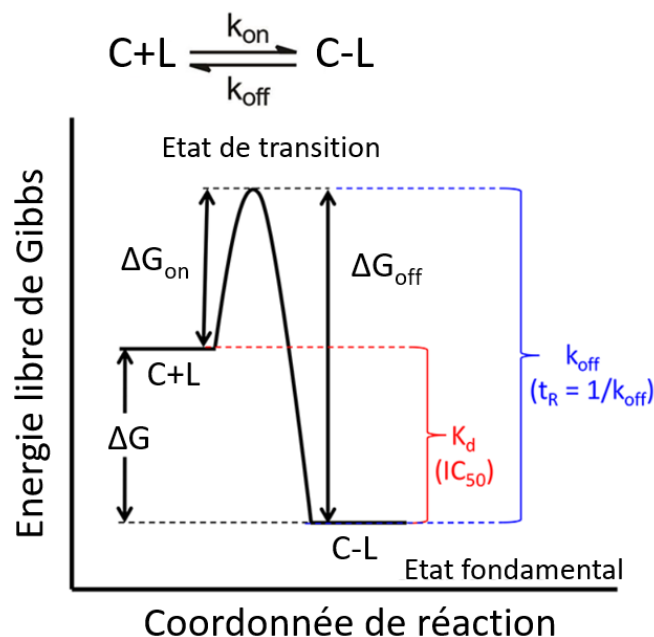


Figure 1 : Coordonnée de réaction<sup>3</sup> pour une liaison en une étape. [6]

De nombreux facteurs influent sur les enzymes, sur leur conformation tridimensionnelle, et par conséquent sur leur potentiel de liaison avec un ligand. Dans les prochains paragraphes, les techniques

<sup>3</sup> Coordonnée qui représente l'évolution d'un processus chimique le long d'un chemin de réaction.

permettant d'évaluer l'affinité enzyme-ligand seront passées en revue, suivies de celles dédiées aux mesures d'activité des réactions enzymatiques. Puis, l'aspect thermodynamique des interactions enzyme/ligand sera développé avec les méthodes mises en place pour la détermination des paramètres clés. La présentation des LIM Kinases et leur inhibition clôturera ce premier chapitre. Ces enzymes ont été choisies comme modèles pour ce projet de thèse ayant comme objectif le développement, par MST et CE, d'essais d'interactions enzyme/ligand dans un lysat cellulaire non purifié.

## **2. Analyse d'affinité enzyme/ligand nécessitant l'immobilisation d'un des deux partenaires**

Les interactions enzyme/ligand jouent un rôle important dans de nombreux processus biologiques. La constante de dissociation ( $K_d$ ) est le paramètre de choix pour évaluer la capacité de liaison du ligand à son récepteur (enzyme). En effet, elle permet de comparer les ligands entre eux en présentant une mesure quantitative de l'affinité entre le ligand et la cible. L'expansion de nouvelles technologies et méthodes d'analyse permettent une exploration et une compréhension approfondies de l'interaction cible (ex : enzyme)/ligand. Dans cette partie, plusieurs méthodes biophysiques et analytiques conduisant à la détermination des valeurs de  $K_d$  sont présentées avec leurs caractéristiques et leurs domaines d'application.

Pour les besoins de certaines techniques analytiques, notamment la résonance plasmon de surface et l'interférométrie à couche biologique, les enzymes cibles doivent être immobilisées sur une surface.

### **2.1. Résonance plasmon de surface ou SPR**

La SPR (*Surface plasmon resonance*) est une technique analytique en flux utilisant des capteurs optiques qui détectent le changement d'indice de réfraction lors d'une interaction moléculaire. La SPR est une technique sans marquage, à la fois sensible et spécifique et, par conséquent, adaptée à l'analyse d'interactions biomoléculaires [7], [8]. Elle repose sur le principe selon lequel, lorsqu'un photon d'une lumière incidente frappe une surface métallique (généralement en or) à un certain angle, une partie de l'énergie lumineuse se couple à travers le revêtement métallique avec les électrons de la couche superficielle du métal, qui se déplacent alors sous l'effet de l'excitation. Lors de l'interaction entre le ligand et la cible, la réfractivité de la surface change, ce qui entraîne des modifications de l'angle de réflexion, angle  $\alpha$  (Figure 2a) [9]. La courbe d'interaction en temps réel, appelée sensorgramme,

représente une description précise de l'interaction entre la cible fixée et le ligand qui s'écoule librement. L'analyse de régression non linéaire des formes des sensorgrammes peut être utilisée pour extrapoler les constantes de vitesse d'association ( $k_{on}$ ) et de dissociation ( $k_{off}$ ) de l'interaction. Les réponses, exprimées en unités de réponse ou RU, atteintes à l'état d'équilibre, peuvent être utilisées pour construire l'isotherme de liaison et déterminer la constante de dissociation à l'équilibre  $K_d$  du complexe cible-ligand (Figure 2b).

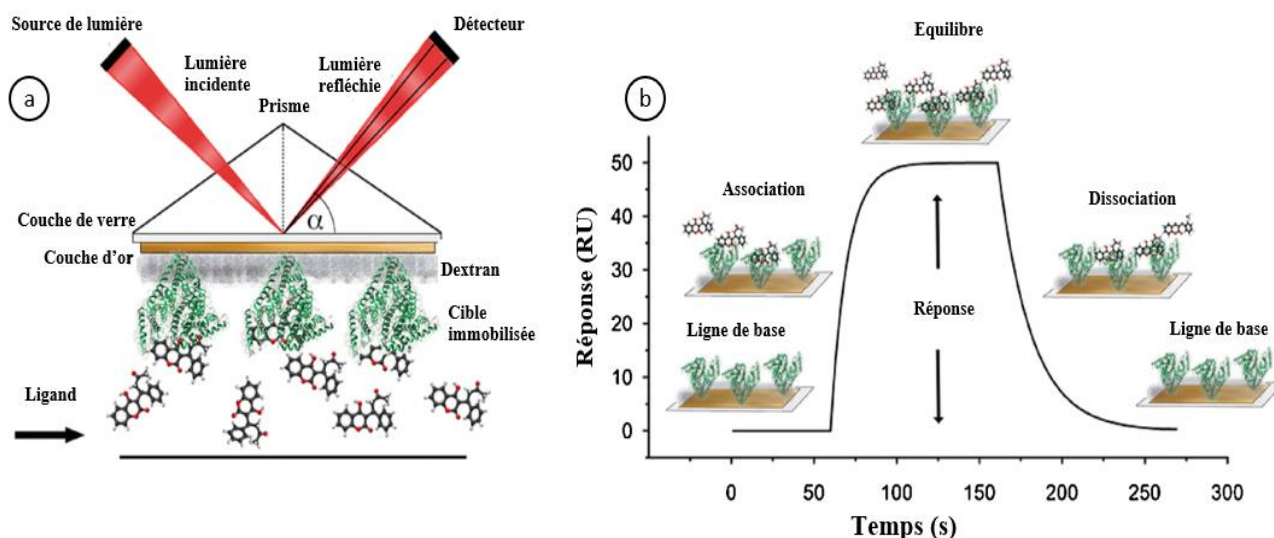


Figure 2 : (a) Représentation schématique du principe de détection SPR. L'angle  $\alpha$ , lorsque tous les autres paramètres sont maintenus constants, dépend uniquement de l'indice de réfraction de la solution à proximité de la surface fonctionnalisée. (b) Données typiques d'une expérience SPR (sensorgramme). Plusieurs sensorgrammes à différentes concentrations de ligand permettent de déterminer le  $K_d$  de l'interaction cible-ligand [9].

La SPR utilisée pour détecter la présence d'interactions entre des molécules biologiques permet ainsi d'évaluer les paramètres cinétiques ( $k_{on}$  et  $k_{off}$ ) de l'interaction et son affinité ( $K_d$ ) [10], [11].

Kitagawa *et al.* [12] ont produit six espèces de kinases spécifiquement biotinylées par voie enzymatique *in vivo* afin de les immobiliser sur des surfaces recouvertes d'avidine grâce à l'interaction bien connue « biotine-avidine », ce qui facilite l'application à des techniques biophysique telles que la SPR. Pour les quatre inhibiteurs de kinases examinés dans ce travail (staurosporine, dasatinib, sunitinib, et lapatinib), les paramètres d'interaction tels que les constantes de vitesse d'association/dissociation ( $k_{on}/k_{off}$ ) et  $K_d$  ont pu être déterminés pour les six kinases grâce à l'utilisation d'un dispositif SPR multicanaux, qui est un système commercial permettant de réaliser des expériences de SPR sur 6 cibles et 6 ligands (donc 36 couples) simultanément. Les  $k_{off}$  faibles (de l'ordre de  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) du dasatinib et du lapatinib par rapport à leurs cibles ont été confirmées.

En raison de ses caractéristiques de criblage à haut débit, la SPR a été largement utilisée pour l'identification de cibles médicamenteuses [13], [14]. Cependant, la nécessité d'immobiliser le ligand ou la cible d'intérêt sur une surface peut entraver leur interaction [15]. Par exemple, la ManDH (*mandelate dehydrogenase*) immobilisée sur des billes d'agarose fonctionnalisées avec des groupes glyoxyles, réduite avec du borohydrure perd presque complètement son activité catalytique (perte de 98.5% de son activité) [16]. De plus, comme toute technique en flux, l'expérience est limitée par le volume de ligand disponible.

## **2.2. Interférométrie à couche biologique ou BLI**

La BLI (*Bio-layer interferometry*) est une technologie optique, sans marquage et nécessitant une immobilisation sur une surface. L'approche BLI présente certaines similitudes conceptuelles avec la SPR dans la mesure où le ligand est immobilisé sur une surface, avec une chimie d'immobilisation similaire, et l'interaction est détectée en temps réel. Contrairement à la SPR, la BLI ne fonctionne pas avec un flux microfluidique, mais par immersion des pointes des capteurs optiques dans des puits contenant l'échantillon/le tampon (Figure 3). La ligne de base est obtenue par immersion de la sonde dans le tampon sans ligand. La phase d'association correspond à la sonde mise en contact de la sonde et du tampon contenant le ligand, et donc à l'interaction du ligand avec la cible fixée sur la sonde. La sonde est ensuite plongée de nouveau dans le tampon sans ligand, et le ligand se détache de la cible : c'est la phase de dissociation. La phase d'association dépend donc principalement de la concentration du ligand dans les puits et de la durée d'exposition de la sonde au ligand.

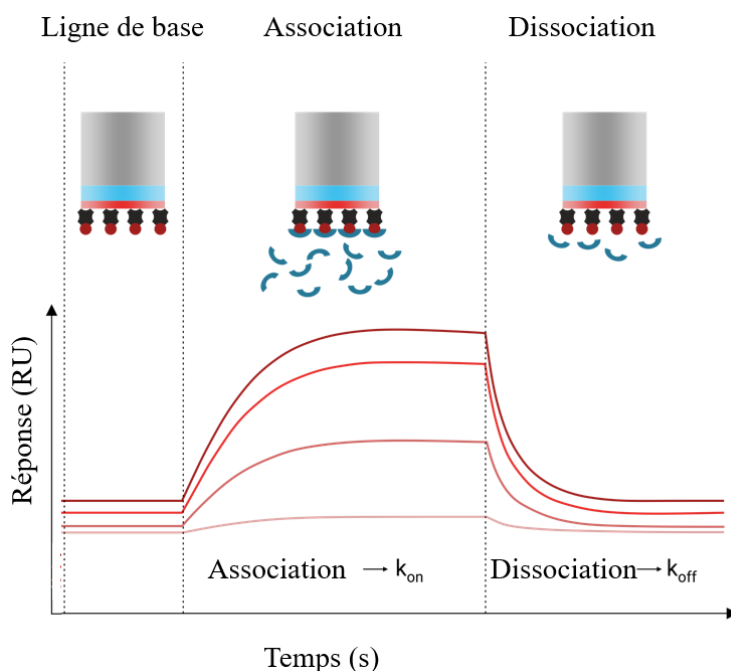


Figure 3 : Données typiques d'une expérience BLI (sensorgramme). Plusieurs sensorgrammes à différentes concentrations de ligand permettent de déterminer le  $K_d$  de l'interaction cible-ligand. Le temps correspond au temps d'immersion des pointes des capteurs dans la solution/le tampon.

La lumière réfléchiée par l'extrémité d'une fibre optique présente un déphasage qui dépend de l'indice de réfraction à proximité de la surface de l'extrémité des pointes des capteurs. En utilisant une lumière blanche comme source, une image d'interférence spectrale qui comprend des informations sur l'indice de réfraction près de la surface de la pointe est enregistrée. Lorsque des biomolécules se lient à la surface de la pointe dans la solution expérimentale (un échantillon, par exemple), le profil de l'indice de réfraction change ainsi que l'empreinte spectrale [17].

Par exemple, Ott *et al.* [18] ont déterminé l'affinité entre LPETGG (un peptide à 6 acides aminés) et LAG9 (un nanocorps) grâce à la BLI. La Figure 4 présente les sensorgrammes associés à différentes concentrations, allant de 25 à 200 nM, de LAG9 en solution. Le  $K_d$  déterminé était de 22,6 nM.

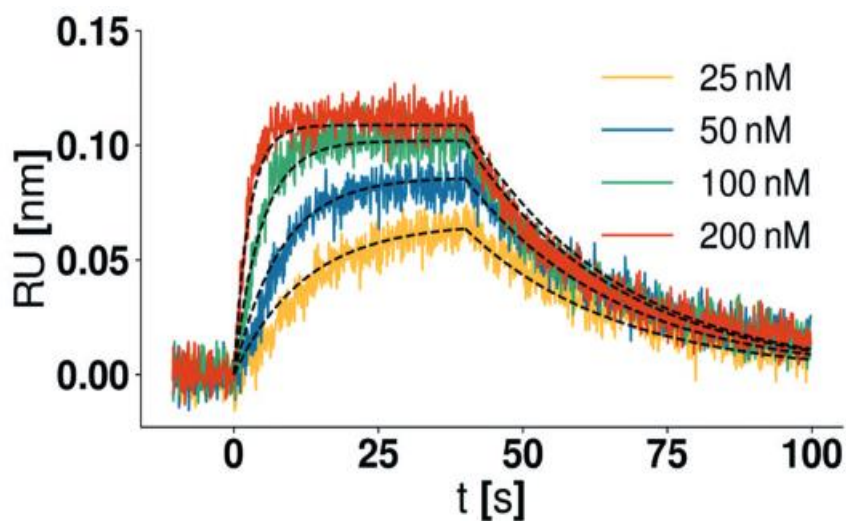


Figure 4 : Sensorgrammes obtenus par BLI pour le suivi de l'interaction entre un peptide (LPETGG) immobilisé et un nanocorps (LaG9) présent en solution à différentes concentrations (25, 50, 100 et 200 nM) permettant l'obtention d'un  $K_d$  de 22,6 nM. [18]

Un avantage significatif de la BLI par rapport à la SPR est l'absence de limite sur les temps de mesure pour l'association ou la dissociation (les pointes des capteurs pouvant être plongées dans la solution aussi longtemps que nécessaire), ceux-ci étant limités en SPR par le volume de ligand disponible, puisque c'est une technique en flux. Cependant, de longues expositions dans les puits de ligands peuvent conduire à l'évaporation du solvant, ce qui dégrade les mesures [19]. D'autres avantages de la BLI incluent la possibilité de mesurer les interactions sur des pointes jetables qui n'ont pas besoin d'être régénérées, ce qui peut être utile si l'enzyme cible est disponible en grande quantité. Cependant, les capteurs en BLI sont moins sensibles que les capteurs SPR et les mesures sont limitées par la diffusion de masse, entravant ainsi la capacité de la BLI à mesurer des  $k_{off}$  élevés [20], [21].

### 2.3. Analyse d'affinité par radioligand ou RBA

La RBA (*Radioligand binding assay*) est basée sur l'étude de l'interaction entre un ligand radiomarqué et sa cible. Elle peut être utilisée pour déterminer la constante de dissociation à l'équilibre ( $K_d$ ) et le nombre de ligands qui se lient à la cible [22], [23]. Les deux méthodes les plus utilisées sont celles de liaison compétitive et celles par saturation de la cible. Les deux techniques nécessitent de séparer le complexe cible-ligand du ligand libre afin de déterminer la quantité/concentration du complexe cible-ligand formé. Cette séparation se fait habituellement par filtration [24], centrifugation [25] ou

chromatographie liquide [26]. Afin de faciliter la séparation entre le complexe cible-ligand et le ligand seul, dans de nombreux cas, la cible est immobilisée sur une surface.

Les essais de compétition sont réalisés en incubant la cible avec le radioligand, tous deux à une concentration fixe, et le ligand dont on souhaite connaître l'affinité (non radioactif) à des concentrations croissantes. Le ligand non radioactif entre en compétition avec le ligand radioactif.

Les études d'interaction par saturation du radioligand permettent de déterminer à la fois le nombre de sites de liaison de la cible et la constante de dissociation,  $K_d$ , du radioligand à la cible. Potalitsyn *et al.* [26] ont évalué la constante de dissociation ( $K_d$ ) pour l'interaction entre [ $^{125}\text{I}$ ]-monoiodotyrosyl-Tyr2-IGF2 et la cible D11, qui un domaine de la protéine IGF2R (*Insulin-like growth factor 2 receptor*) immobilisée au fond des puits. Ils ont conduit des expériences de saturation, où la radioactivité liée à des concentrations croissantes du radioligand avec [ $^{125}\text{I}$ ] est mesurée à l'équilibre. Une courbe représentative de l'interaction à saturation est présentée dans la Figure 5. La courbe d'interaction spécifique (en vert) est obtenue en soustrayant l'interaction totale (en bleu) à l'interaction non spécifique (en rouge), qui est obtenue en faisant l'expérience sans l'ajout du ligand compétiteur. L'analyse statistique des résultats de trois expériences indépendantes a donné la valeur finale de  $K_d$  de  $2,0 \pm 1,0$  nM ( $n = 3$ ).

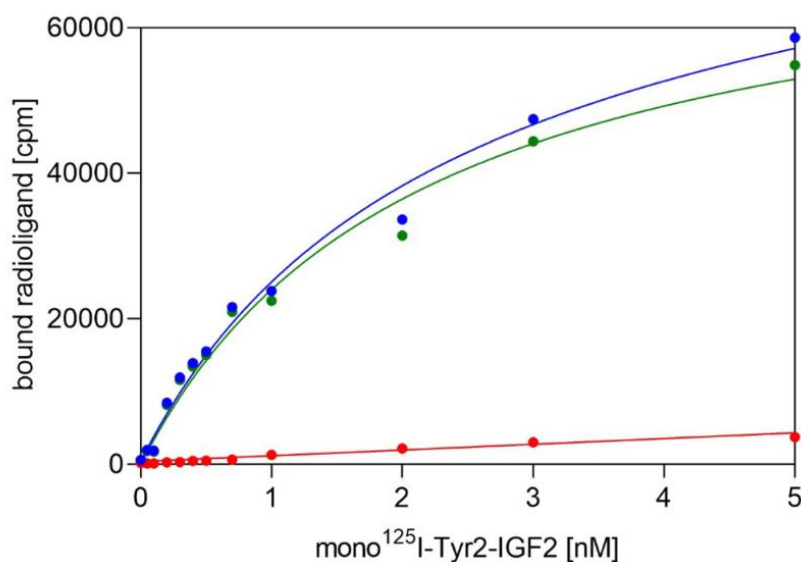


Figure 5 : Courbe de liaison à saturation du [ $^{125}\text{I}$ ]-monoiodotyrosyl-Tyr2-IGF2 au domaine D11 immobilisé de l'IGF2R permettant de déterminer une  $K_d$  de  $2,0 \pm 1,0$  nM ( $n = 3$ ). L'interaction totale est en bleu, l'interaction non spécifique en rouge et l'interaction spécifique en vert. Cpm : counts per minute, qui est le nombre de photons détectés par unité de temps[26]

Cette étude a été menée sur des cibles immobilisées sur une surface de polystyrène, mais l'immobilisation de la cible n'est pas nécessaire pour faire de la RBA. Il est même possible d'effectuer ces études sur des cellules entières. Par exemple, Kim *et al.* [27] ont déterminé le  $K_d$  entre l'insuline et les récepteurs de l'insuline de cellules GN11 (cellules de souris) grâce à une expérience de saturation de radioligand, et ont trouvé un  $K_d$  de 1,5 nM. Ici, la séparation du complexe cible-ligand et du ligand libre a été faite en rinçant les cellules.

Les exigences de base d'un radioligand sont d'être radioactif, et d'avoir une affinité ainsi qu'une spécificité élevées [28], [29]. La RBA est une méthode sensible pour déterminer les valeurs de  $K_d$ . Cependant, il n'est pas aisé de synthétiser les radioligands spécifiques qui sont les éléments essentiels de la méthode RBA, et la contamination radioactive doit être évitée pendant l'expérience. L'application de la RBA est donc fortement limitée [30].

## 2.4. Chromatographie d'affinité ou AC

L'AC (*Affinity Chromatography*) est une méthode de séparation basée sur l'interaction spécifique entre un ligand et sa cible. Les couples les plus étudiés par AC incluent les interactions anticorps/antigène, enzyme/substrat et enzyme/inhibiteur [31], [32]. L'AC utilise la chromatographie liquide pour étudier l'interaction entre des ligands et des cibles biologiques [33], [34], [35].

L'AC peut être utilisée pour déterminer des valeurs de  $K_d$  grâce à l'analyse frontale ou à la méthode d'élution zonale. L'analyse frontale (Figure 6) est réalisée en ajoutant les ligands dans la phase mobile, sans injection de la solution à analyser. Chaque solution de ligand à différentes concentrations est introduite en continu dans la colonne jusqu'à ce qu'une courbe de percée ou en forme de "S" avec un plateau soit produite [36]. Les valeurs de  $K_d$  peuvent être déterminées en analysant les courbes de percée [37], [38], [39].

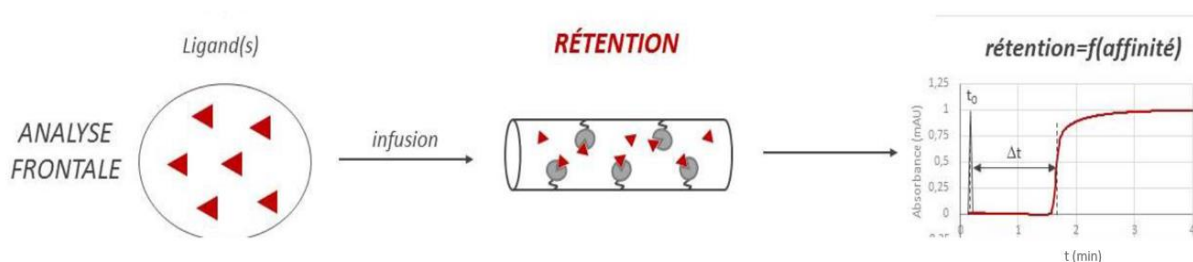


Figure 6: Principe de l'analyse frontale en chromatographie [36].

Le groupe de Wainer et Hage a réalisé de nombreux travaux en utilisant cette approche pour caractériser l'affinité de divers médicaments avec certaines biomolécules [37], [40], [41], [42], notamment concernant le criblage de ligands potentiels de récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2, dont l'affinité avec des composés synthétiques et naturels (extraits de plante) a été déterminée.

Pour la méthode d'analyse zonale (Figure 7), une injection de faible volume de solution contenant un ou plusieurs ligands de concentration connue est réalisée. Les valeurs de  $K_d$  des ligands à un site spécifique de la cible sont calculées en étudiant le facteur de rétention des ligands avec l'augmentation de la concentration du ligand dans l'échantillon injecté [43], [44].

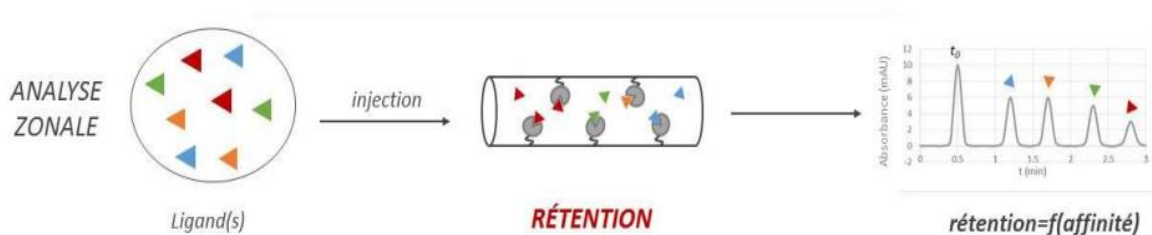


Figure 7: Principe de l'analyse zonale en chromatographie [36]

Parmi les méthodes d'AC, il existe la chromatographie sur membrane cellulaire (CMC) dans laquelle des récepteurs membranaires sont préparés en tant que phase stationnaire. La CMC est utilisée pour déterminer l'interaction entre le ligand et les récepteurs membranaires [45], [46], [47], [48]. Avec le développement de la biologie moléculaire, il est possible de construire des lignées cellulaires avec une forte expression de récepteurs spécifiques, ce qui renforce la spécificité et la sélectivité de la méthode CMC. Sur la base du développement de la CMC, une variété de modèles de membranes cellulaires tels que le canal calcique de type L, le récepteur adrénergique  $\alpha 1A$ , le récepteur H1 de l'histamine et le récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire sont établis afin de déterminer des valeurs  $K_d$  [49], [50], [51], [52].

L'AC joue un rôle important dans les études des interactions cible-ligand. Les méthodes de fixation de la cible à la surface du support chromatographique se divisent en deux catégories : la liaison chimique covalente et l'adsorption physique. Cependant, après l'immobilisation des macromolécules biologiques par liaison chimique, leurs configurations originales et même leurs fonctions peuvent être altérées [53]. En revanche, l'adsorption physique peut conserver les configurations tridimensionnelles. Cette approche d'immobilisation permet par exemple de préserver l'activité biologique des récepteurs membranaires ce qui permet de révéler avec précision le processus

d'interaction ligand-récepteur membranaire *in vivo* [54]. Toutefois, l'immobilisation des enzymes par adsorption présente des inconvénients tels qu'une fixation sur le support souvent plus faible qu'en utilisant la liaison covalente, ceci entraînant la libération de la cible dans la phase mobile en cours des essais [55].

Ce type de méthodes présente de nombreux avantages, notamment la séparation facilitée de la cible et du ligand après l'expérience et le recyclage qui en découle, l'absence de nécessité de marquer la cible ou le ligand (par un marqueur fluorescent, par exemple) et une meilleure stabilité, en particulier *vis-à-vis* des solvants organiques et des températures élevées. Ces avantages sont contrebalancés par des inconvénients tels qu'une activité réduite comparée à celle d'une enzyme non immobilisée, un coût supplémentaire pour l'immobilisation et la susceptibilité à l'encrassement [56], [15], [16].

### **3. Analyse d'affinité enzyme/ligand en solution**

Par opposition avec la partie précédente concernant les études d'affinité nécessitant l'immobilisation de l'un des deux partenaires, cette partie traite des études d'affinité sans immobilisation, en solution.

#### **3.1. Electrophorèse capillaire d'affinité ou ACE**

L'ACE (*Affinity Capillary Electrophoresis*) utilise le changement des mobilités électrophorétiques ( $\mu_{ep}$ ) pour étudier les interactions non covalentes possibles entre des macromolécules et différents ligands [57]. Le changement de la mobilité électrophorétique d'une cible peut être observé en présence d'un ligand interagissant avec elle [58]. L'ACE peut être utilisée pour caractériser les interactions en déterminant des grandeurs telles que les constantes d'affinité, le nombre de sites de liaison et la stœchiométrie.

Il existe de nombreux modes d'ACE, certains sont désignés dans la littérature par différentes appellations [59]. Ils permettent de déterminer non seulement l'affinité mais aussi les constantes cinétiques,  $k_{on}$  et  $k_{off}$ , d'une interaction. Les modes les plus courants d'ACE sont l'ACE par déplacement de mobilité (ms-ACE, *Mobility shift affinity capillary electrophoresis*) et l'analyse frontale par l'électrophorèse capillaire (CE-FA, *Capillary electrophoresis frontal analysis*).

L'ACE par déplacement de mobilité (ms-ACE, *Mobility shift affinity capillary electrophoresis*) est le mode le plus souvent utilisé et est communément appelé ACE [60]. Pour la ms-ACE, le ligand est

introduit dans le capillaire en même temps qu'un marqueur neutre de flux électroosmotique (EOF), n'ayant ainsi pas de  $\mu_{ep}$ . Le décalage du temps de migration est relevé en fonction de la concentration des partenaires d'interaction présents dans le tampon de séparation. Cette méthode permet l'étude d'interactions ayant une cinétique rapide.

L'analyse frontale par l'électrophorèse capillaire (CE-FA), quant à elle, diffère des autres méthodes ACE par la quantité d'échantillon injectée dans le capillaire, qui est généralement entre 5 et 20% du volume total du capillaire [60]. En raison du grand volume d'échantillon injecté, l'électrophérogramme CE-FA ne présente pas de pics classiques de forme gaussienne, mais des plateaux rectangulaires. Toutes les méthodes de CE-FA nécessitent deux séries de mesures. Une série de mélanges contenant une quantité constante de cible et différentes concentrations de ligand. L'autre série avec le ligand seul à différentes concentrations pour établir une courbe d'étalonnage. Contrairement à la méthode ms-ACE, la stœchiométrie de liaison peut également être déterminée [61], [62].

D'autres modes d'ACE sont également rapportés dans la littérature : l'ACE par remplissage partiel (PF-ACE) qui est également appelé *plug-plug kinetic capillary electrophoresis* (pp-KCE) [63], l'ACE assistée par pression (PA-ACE) [64], l'ACE à remplissage partiel assistée par pression (PA-PF-ACE), méthode Hummel-Dreyer [65]. Bruno *et al.* [66] ont déterminé par la méthode pp-KCE les constantes de dissociation des complexes formés entre la cible calmoduline du cerveau bovin (CaM) et des ligands non peptidiques tels que la trifluopérazine. Un tampon glycine/tris (pH 8,35) a été utilisé pour reproduire le pH intracellulaire plus alcalin des tumeurs solides. En outre, une solution saturée en  $\text{CaCl}_2$  a été ajoutée au tampon comme cofacteur pour activer la CaM. Différentes concentrations de CaM ont été appliquées pour étudier les changements de temps de migration de chaque ligand injecté comme échantillon (Figure 8). La mobilité électrophorétique de la trifluopérazine en fonction de la concentration de CaM a été tracée, et l'analyse de Scatchard des changements des temps de migration par rapport à celui de l'EOF, en fonction de la concentration de CaM, donne des valeurs de  $K_d$ . La trifluopérazine s'est liée au CaM avec une  $K_d$  de 3,4  $\mu\text{M}$ .

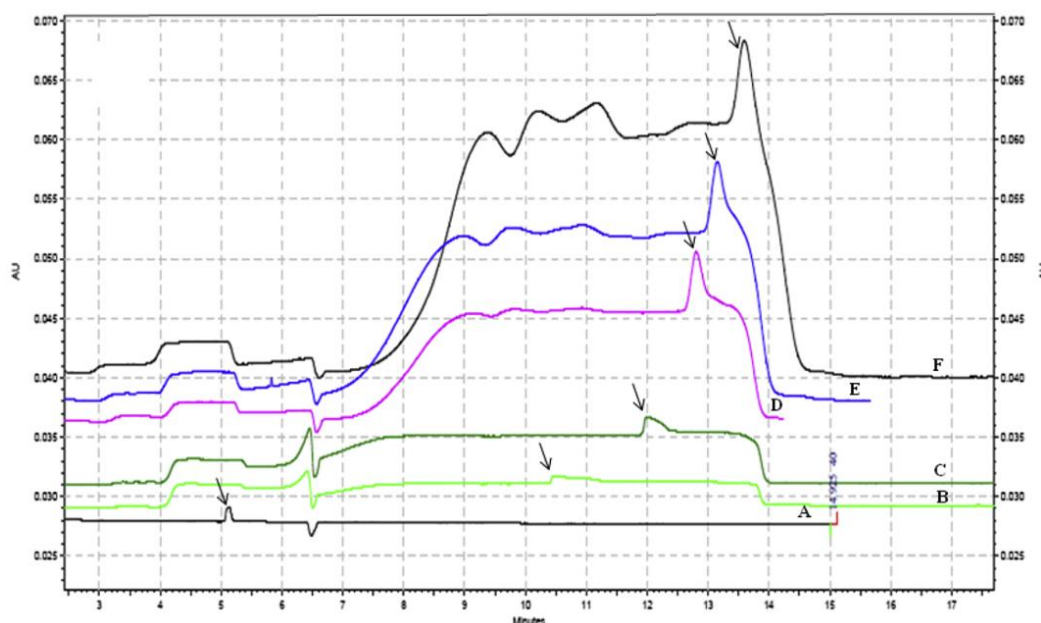


Figure 8 : Superpositions des électrophérogrammes obtenus par pp-KCE pour la trifluopérazine seule (A) et en présence de concentrations croissantes de la cible CaM : (B) 7,5 mM; (C) 15 mM; (D) 30 mM; (E) 45 mM et (F) 60 mM. Les pics correspondant à la trifluopérazine sont indiqués par une flèche. Ceci permet de déterminer une valeur de  $K_d$  de 3,4  $\mu$ M. [66]

D'autre part, Farcaş *et al.* [67] ont rapporté une étude par déplacement de mobilité électrophorétique dans le capillaire, dans des conditions physiologiques, qui peut être utilisé dans le cadre de la découverte de médicaments à partir de fragments pour le criblage des interactions biomoléculaires faibles entre des fragments et une protéine cible. Cette méthode a été établie en mesurant la valeur d' $IC_{50}$  de deux fragments connus inhibant la thrombine, à savoir la benzamidine (BZM) et la 4-aminobenzamidine (PABZM), ainsi qu'un inhibiteur ayant une affinité pour la thrombine relativement faible, le nafamostat (NAFA). La Figure 9 montre les électrophérogrammes de l'analyse du NAPAP (Pefabloc TH® B, un inhibiteur de la thrombine). En noir, le NAPAP seul dans le BGE a un temps de migration de 7,5 minutes. En rouge, le NAPAP avec la thrombine a un temps de migration de 12 minutes. L'ajout d'une quantité croissante de PABZM dans le BGE entraîne un déplacement progressif du temps de migration du NAPAP. Ce "recul de temps de migration" permet de construire une courbe d'affinité dont peut être déduit l' $IC_{50}$ , qui est en l'occurrence 49  $\mu$ M.

Les résultats démontrent le caractère sélectif élevé de la méthode et surtout sa capacité à cribler des molécules neutres, chargées négativement ou positivement. La possibilité d'utiliser différents types de détecteurs<sup>4</sup> (UV, LIF, C<sup>4</sup>D, MS) élargit encore davantage le champ d'application de cette méthode.

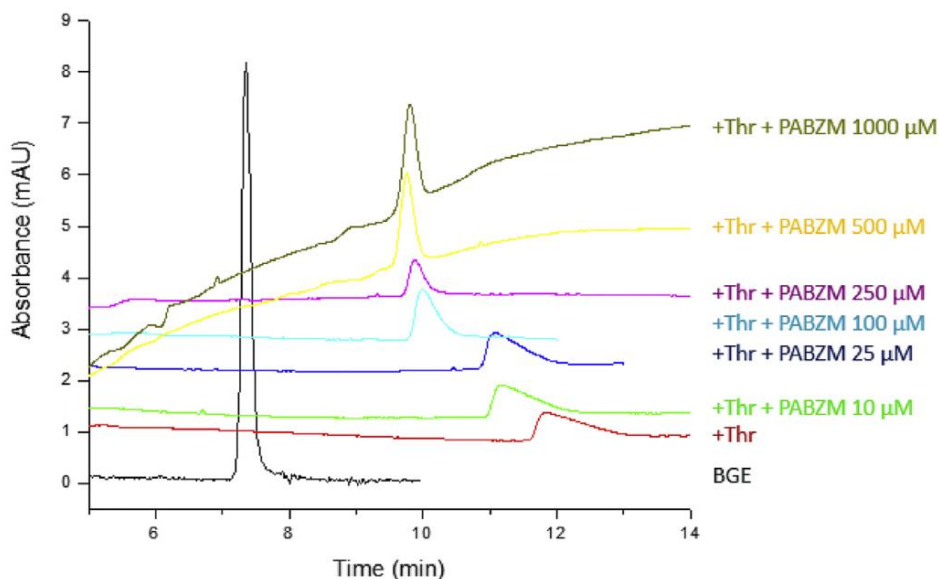


Figure 9: Impact de la concentration de PABZM (ligand) sur le recul du pic de NAPAP (inhibiteur de la thrombine) ; Le temps de migration du NAPAP est observé en ajoutant de la thrombine et des concentrations croissantes de PABZM. Le recul du pic du NAPAP augmente avec la concentration de PABZM jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint. Le temps de migration à différentes concentrations de ligand permet la construction d'une courbe de liaison compétitive et le calcul d'un  $IC_{50}$  de 49  $\mu M$ . [67]

Les principaux avantages de l'ACE sont une très faible consommation d'échantillons (quelques nanolitres par injection) et la possibilité de travailler avec des ligands dans des mélanges complexes. Les liaisons faibles peuvent être caractérisées à l'aide de l'ACE mais elle est moins appropriée si le changement de mobilité est faible dans les conditions choisies. Les liaisons très fortes ne peuvent être caractérisées que par une réponse de type oui/non (*On/Off*). L'ACE peut être limitée par la solubilité des ligands en milieux tamponnés aqueux ou par des interférences dues à une force ionique très élevée, ou encore par des effets d'adsorption des analytes sur les parois du capillaire en silice. Ces interférences doivent être réduites autant que possible par des procédures de rinçage appropriées ou par le revêtement des parois des capillaires [57].

<sup>4</sup> UV : Ultraviolet ; LIF : Laser Induced Fluorescence ; C<sup>4</sup>D : Contactless conductivity ; MS : Mass Spectrometry

### 3.2. Déplacement thermique ou TSA/DSF

Les essais de TSA (*thermal shift assay*) sont conduits par DSF (*differential scanning fluorimetry*) [68], [69] ou ThermoFluor [70], et se basent sur le fait que les protéines subissent une dénaturation à température élevée. Le déplacement thermique ou TSA est une technique basée sur la stabilisation de la structure native d'une protéine contre la dénaturation thermique induite par un ligand [71]. Le déplacement thermique est devenu une technique courante pour évaluer les interactions cible-ligand en raison de sa facilité d'exécution et de son haut débit. Les protéines se replient de manière à minimiser l'énergie libre de Gibbs. A température ambiante, les résidus hydrophobes se regroupent à l'intérieur de la structure de la protéine et les résidus hydrophiles sont exposés à l'extérieur de la protéine [72]. Les structures sont stabilisées par des forces intramoléculaires telles que les attractions électroniques de van der Waals, les interactions dipolaires et les liaisons hydrogène [73]. Lorsque l'énergie thermique augmente, les forces intramoléculaires sont perturbées, ce qui entraîne la déstabilisation de la protéine, sa dénaturation et l'exposition des sites hydrophobes intérieurs.

La dénaturation thermique peut être suivie en temps réel par détection de fluorescence utilisant la fluorescence intrinsèque du tryptophane ou des fluorophores sensibles à l'environnement, c'est-à-dire des fluorophores qui ont un rendement quantique accru lorsqu'ils se lient à des environnements hydrophobes [74]. Une représentation graphique de l'intensité de fluorescence en fonction de la température donne une courbe, appelée « courbe de fusion » (Figure 10), dont le point d'inflexion de la région de transition correspond à la température de dénaturation thermique, ou température de fusion ( $T_f$ ). La  $T_f$  étant influencée par l'environnement de la protéine, la méthode permet d'identifier des liaisons protéine-ligand par le relevé de variations significatives de  $T_f$  [75], [76]. Plus précisément, la méthode consiste à chauffer progressivement une solution aqueuse de protéines et à suivre le signal qui indique le dépliement d'une protéine en présence et en l'absence de ligands. Plus les ligands sont affins et plus les décalages détectés de  $T_f$  sont importants. Le décalage est positif pour les ligands stabilisants et souvent négatif pour les ligands déstabilisants qui se lient préférentiellement à la forme dépliée de la protéine [77]. Lorsque les valeurs de  $T_f$  sont obtenues à diverses concentrations du ligand ajouté, la courbe dose-réponse montrant  $T_f$  en fonction de la concentration totale du ligand ajouté peut être établie et utilisée pour les calculs de constante d'affinité [78].

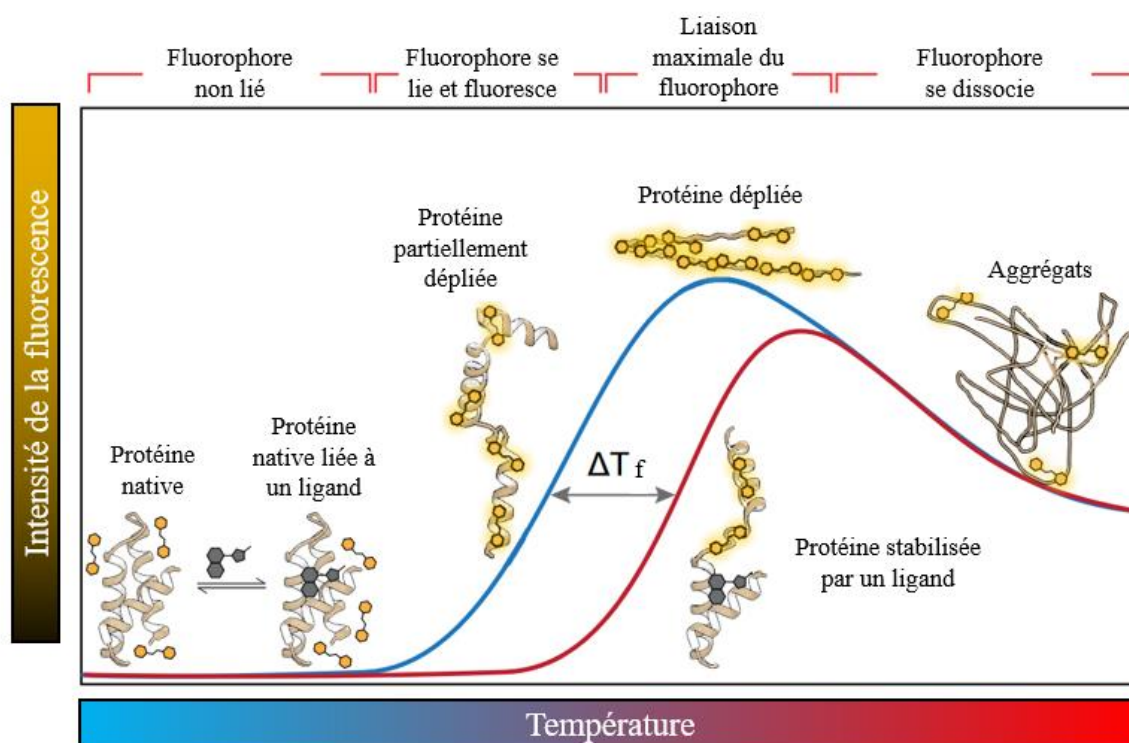


Figure 10 : Exemple de courbe de fusion obtenue par TSA (thermal shift assay) montrant la dénaturation d'une protéine avec l'augmentation de la température. Le point d'inflexion de la courbe de fusion, qui correspond au milieu du processus de dénaturation de la protéine, est la température de fusion ( $T_f$ ). Dans ce cas, lors de la liaison du ligand, la protéine est stabilisée et présente une  $T_f$  plus élevée. [76]

Une utilisation courante de la méthode de déplacement thermique est le criblage de ligands pour trouver des inhibiteurs potentiels de protéines cibles d'intérêt. Lo *et al.* [79] rapportent l'utilisation de la méthode TSA en vue de l'identification d'un composé d'intérêt par rapport à la cible pharmaceutique BACE-1. Treize composés ont été évalués dans des essais de TSA et d'ITC (isothermal titration calorimetry) (voir ci-après, la partie 3.4.). Les résultats démontrent qu'il est possible d'identifier des cibles potentielles sur la base de déplacements thermiques. Les constantes d'affinité déterminées se sont avérées comparables à celles mesurées par ITC. Une revue publiée par Bommarius *et al.* [80] met en lumière quelques exemples de protéines dont la stabilité a été améliorée par ingénierie génétique. Une approche connexe consiste alors à évaluer les conditions les plus favorables pour produire et stocker le type naturel (*wild-type*) d'une protéine, ou une construction protéique choisie, qui présente un comportement indiscernable en termes de caractéristiques de liaison au ligand par rapport au type naturel.

Expérimentalement, la préparation et l'exécution d'un protocole TSA sont simples. Cependant, l'analyse des données, en particulier dans un format à haut débit, est moins intuitive et nécessite une préparation et des manipulations manuelles importantes. Dans certains cas, cette méthode peut être limitée, en raison de phénomènes tels que la précipitation des protéines, le dépliement partiel de la protéine ou la nécessité de travailler avec des protéines purifiées [81], [82], [83]. Il peut également être difficile d'interpréter de faibles changements de  $T_f$  [84]. Ces situations peuvent conduire à une interprétation des résultats erronée et surtout à des faux négatifs.

### 3.3. Spectroscopie de fluorescence ou FRET

La spectroscopie de fluorescence est une technique répandue dans le domaine de la biologie et de la médecine. La méthode FRET est basée sur un transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes situées à proximité l'une de l'autre, moins de 10 nm, et dont les spectres d'émission et d'excitation respectifs se chevauchent partiellement [85], [86], [87]. La Figure 11 représente le principe général de cette technique : lorsqu'elle est excitée, la CyPet émet de la lumière, à moins que cette énergie ne soit transférée à la molécule acceptrice YPet. La YPet émet alors de la lumière à sa longueur d'onde caractéristique (Figure 11a). Si l'interaction est inhibée, par exemple par une petite molécule (étoile rouge), le donneur CyPet et l'accepteur YPet ne sont plus à proximité, et la FRET est réduite (Figure 11b). La FRET peut être utilisée pour étudier de nombreuses interactions comme les interactions cible-ligand, les constantes d'affinité et la dimérisation de récepteurs [88], [89], [90].

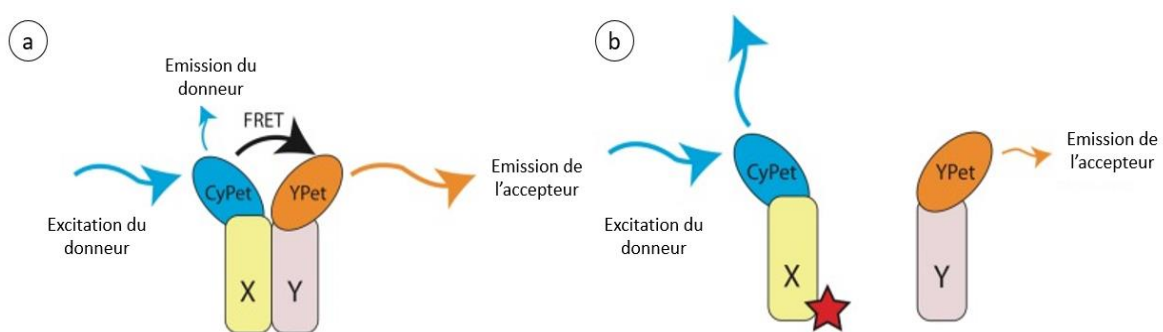


Figure 11 : Représentation schématique de la FRET entre deux protéines (X et Y) fusionnées à des protéines fluorescentes donneuses et acceptrices (CyPet et YPet, respectivement) ; (a) schéma illustrant des conditions favorables à la réalisation du FRET avec une émission importante de l'accepteur ; (b) schéma illustrant l'action d'un inhibiteur sur le FRET et la faible émission de l'accepteur. [91]

Domanov *et al.* [92] ont utilisé la technique FRET pour étudier l'interaction entre le cytochrome c et les membranes phospholipidiques bicouches et ont trouvé une valeur  $K_d$  de 0,2-0,4  $\mu\text{M}$ . De las Heras-Martínez *et al.* [93] ont exploité les propriétés spectroscopiques de la paire eGFP-mCherry afin de décrire quantitativement l'homodimérisation de la 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) dans des cellules entières. Leur étude a montré que la paire eGFP-mCherry peut être utilisée pour évaluer des  $K_d$  entre 1 et 100  $\mu\text{M}$ , et que le  $K_d$  obtenu pour l'homodimérisation de PDK1 est situé entre 11 et 49  $\mu\text{M}$ , selon si une stimulation (11  $\mu\text{M}$ ) avec des facteurs de croissance est réalisée ou non (49  $\mu\text{M}$ ).

La FRET permet d'étudier sélectivement les interactions intermoléculaires dans des conditions physiologiques et dans des cellules vivantes [94], [95]. Un autre avantage est qu'une variété de sondes fluorescentes peut être obtenue dans le commerce. Les sondes fluorescentes peuvent être utilisées pour marquer des molécules dépourvues de propriétés fluorescentes, ce qui élargit considérablement le champ des possibles en recherche. Combinée à sa haute résolution, la FRET est un excellent outil pour étudier les interactions cible-ligand. Cependant, cette méthodologie est associée à plusieurs restrictions inhérentes au processus physique du FRET ainsi qu'aux technologies utilisées pour sa mesure. Par exemple, il est largement reconnu que les propriétés de fluorescence de nombreux marqueurs, en particulier les protéines fluorescentes, sont sensibles aux changements d'environnement, tels que les changements de pH, les concentrations ioniques, l'oxydation et la température pour ne citer qu'eux. Les mesures FRET utilisent deux ou plusieurs étiquettes, ou protéines fluorescentes, chacune d'entre elles pouvant présenter des sensibilités significativement différentes aux changements des facteurs environnementaux. Par ailleurs, la plus grande limitation des mesures FRET est sans doute le faible rapport signal/bruit associé à l'imagerie FRET malgré de nombreuses technologies développées pour augmenter la sensibilité. Les facteurs à la base de la réduction du rapport signal/bruit comprennent la perte d'énergie associée au processus FRET et le fait que, directement ou indirectement, deux molécules fluorescentes contribuent au signal mesuré, ceci induisant un bruit de fond non négligeable [96].

### 3.4. Titrage calorimétrique isotherme ou ITC

L'ITC est une technique basée sur la chaleur dégagée ou consommée par une réaction afin de quantifier les interactions de diverses biomolécules. Un microcalorimètre est utilisé pour mesurer et enregistrer la courbe calorimétrique du processus de réaction en continu (Figure 12). L'ITC, méthode directe, *in situ* et non destructive, fournit des informations thermodynamiques et cinétiques, par exemple, la constante de dissociation ( $K_d$ ), la stœchiométrie de la réaction, l'enthalpie ( $\Delta H$ ) et

l'entropie ( $\Delta S$ ) [97]. L'ITC est rapide et ne nécessitant aucun marquage. Elle peut être utilisée pour étudier les propriétés de l'interaction cible-ligand en détectant directement les changements de chaleur au cours du processus de réaction biochimique [98], [99]. L'ITC est très utilisée dans la recherche en biologie moléculaire pour la conception et l'optimisation de médicaments et de leur structure, ainsi que dans les études sur les mécanismes d'interaction cible-ligand [100], [101].

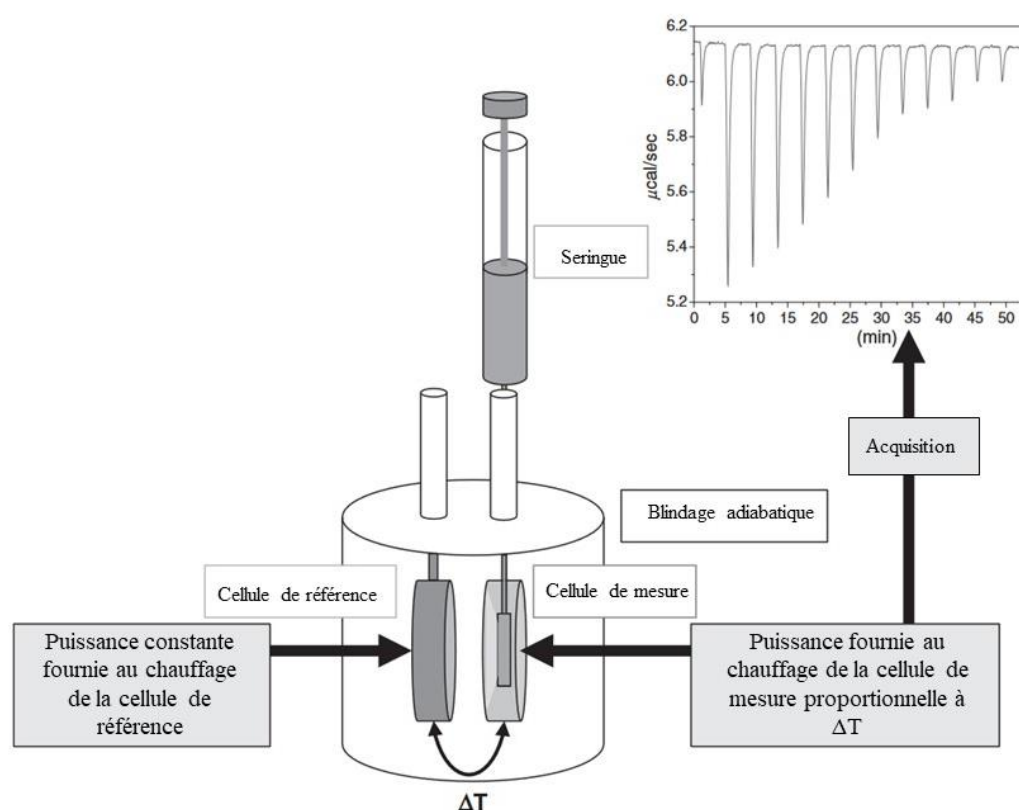


Figure 12 : Schéma représentatif d'un ITC. Les principales caractéristiques de ce type d'instrument, telles que les cellules de référence et de mesure, la seringue pour l'ajout du ligand et le blindage adiabatique, sont indiquées sur la figure. Ce diagramme montre la façon dont la puissance appliquée par l'instrument pour maintenir une température constante entre les cellules de référence et d'échantillonnage est mesurée, ce qui donne le signal [102].

Li *et al.* [103] ont étudié l'interaction de la néomycine et de la tobramycine avec la protéine MLL (mixed lineage leukaemia) et ont trouvé des valeurs de  $K_d$  égales à 18,8  $\mu\text{M}$  pour la néomycine et 59,9  $\mu\text{M}$  pour la tobramycine. Le groupe de Daddaoua a trouvé par ITC que seul le 2-ketoglutarate interagissait avec PtxS (*Pseudomonas aeruginosa* toxA regulatory protein), avec une constante d'affinité de 15  $\mu\text{M}$ , contrairement au glucose, au ketoglucose et au 2-ketoglucose [104]. Hanke *et al.* [105] ont également utilisé l'ITC pour déterminer des  $K_d$ , en particulier celui du domaine kinase

de LIMK1 (Kin1) avec TH-257 [106] qui est un inhibiteur allostérique des LIM Kinases. Ils ont trouvé un  $K_d$  de  $64 \pm 21$  nM.

L'ITC peut non seulement déterminer l'affinité de la liaison, mais contribue également à élucider le mécanisme potentiel des interactions moléculaires. Cependant, les études par ITC sont généralement menées dans des conditions éloignées de celles *in vivo* : sous agitation, avec des cibles purifiées et non dans des matrices biologiques complexes, et nécessite une quantité importante de cibles.

### 3.5. Résonance magnétique nucléaire ou RMN

Les méthodes de spectroscopie RMN constituent un outil particulièrement puissant et informatif pour caractériser les interactions cible-ligand [107], [108], [109]. Les complexes cible-ligand sont analysés à l'aide d'expériences RMN dites "observées par la protéine" (*protein-observed*) ou "observées par le ligand" (*ligand-observed*), dans lesquelles les paramètres RMN de la protéine et du ligand, respectivement, sont comparés à l'état libre et à l'état lié [108]. D'une part, la RMN  $^1\text{H}$  1D STD (*Saturation Transfer Difference*) [110], Water-LOGSY [111], 2D tr-NOESY [112] et/ou DOSY [113], basées sur l'observation des signaux des ligands, permettent de mettre en évidence l'interaction protéine-ligand et d'effectuer une cartographie des sites d'interaction. Ces méthodes permettent d'identifier les protons du ligand proches de la cible et donc impliqués dans l'interaction, et de déterminer la structure 3D du ligand lorsqu'il est lié à sa cible.

D'autre part, les expériences basées sur l'observation du signal de l'enzyme/protéine (2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC) [114], [115] conduisent à l'identification des acides aminés impliqués dans l'interaction avec l'inhibiteur et permettent également d'estimer l'affinité des ligands pour leur cible par une mesure de la valeur de  $K_d$ . Cet ensemble de méthodes nécessite la production préalable de la cible pure et uniformément enrichie en isotopes  $^{15}\text{N}$  et/ou  $^{13}\text{C}$ . Dans la pratique, cela signifie que les méthodes de RMN 2D sont généralement limitées aux protéines qui peuvent être exprimées dans des bactéries. Par exemple, Bourafai-Aziez *et al.* [115] ont exploité la spectroscopie RMN multidimensionnelle afin de caractériser les modes de liaison du ligand pyridoclax à la protéine Mcl-1 (*Myeloid cell leukemia-1*). Cette étude a permis d'élucider les sites de liaisons de ce ligand à la cible en suivant les perturbations du déplacement chimique induites dans les spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de Mcl-1 lors de l'ajout de pyridoclax. Les pics décalés ont montré des changements de déplacement chimique linéaires en fonction de la concentration en pyridoclax (Figure 13A, B &

C). Les différences de déplacements chimiques combinés des amides du squelette ont été affichées en fonction du rapport de la concentration de pyridoclastax par rapport à la protéine pour des résidus isolés sélectionnés présentant des perturbations de déplacement chimique (Figure 13D). Le  $K_d$  pour chaque résidu perturbé a été estimé dans la gamme du micromolaire, avec une valeur moyenne de 15  $\mu$ M.

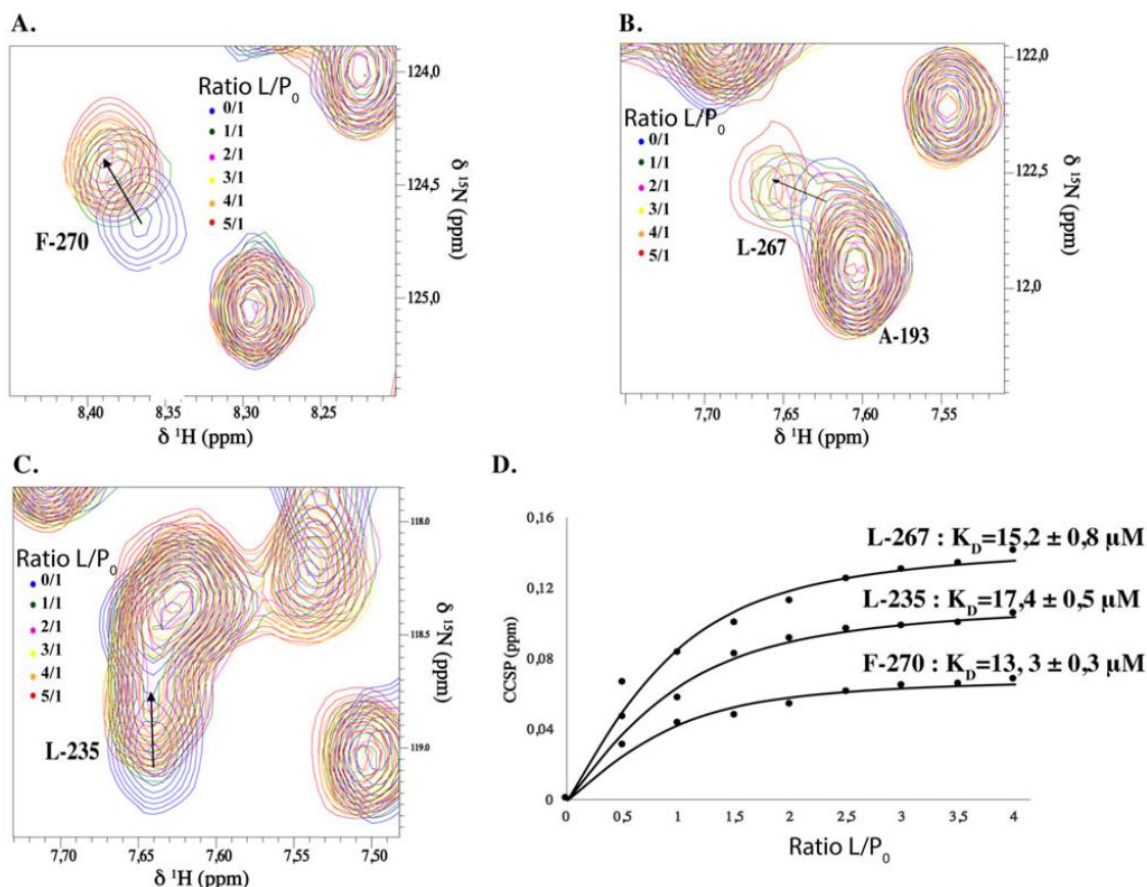


Figure 13 : Superposition des spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC obtenus pour la cible protéique  $^{15}\text{N}$ -Mcl-1 ( $P_0$ ) en absence et en présence de pyridoclastax (ligand L) en quantités croissantes (exprimées en ratio molaire L/ $P_0$ ). Les modifications du déplacement chimique des résidus F270 (A), L267 (B) et L235 (C) sont indiquées par des flèches noires. Les courbes de titrage pour les résidus L235, L267 et F270 (D) permettent une estimation du  $K_d$  de chaque résidu, avec une valeur moyenne de 15  $\mu$ M. [115]

D'autre part, Morton *et al.* [116] ont présenté une étude d'interaction entre trois peptides (ligands potentiels) et le domaine SH3 de la tyrosine kinase Fyn marquée uniformément au  $^{15}\text{N}$ . Les trois peptides sont issus de la protéine PI3' qui a montré des interactions avec Fyn lors de tests *in vivo*. Des courbes d'interaction telles que celles de la Figure 13D ont été tracées en titrant chaque peptide dans des échantillons séparés de  $^{15}\text{N}$  SH3 et en acquérant des spectres  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC. Les

changements de déplacement chimique dans les dimensions  $^1\text{H}$  et  $^{15}\text{N}$  ont été enregistrés et ajustés à un modèle de régression non linéaire. Les valeurs de  $K_d$  mesurées étaient de 3 mM, 50  $\mu\text{M}$  et 300  $\mu\text{M}$  (pour les trois peptides).

La spectroscopie RMN est actuellement utilisée dans les études d'interaction pour l'identification de ligands potentiels, mais son utilisation pour la détermination de constante de dissociation reste plus limitée par rapport à d'autres techniques biophysiques, en particulier pour les ligands à forte affinité ( $K_d$  inférieur à 1  $\mu\text{M}$ ) [117]. En revanche, la spectroscopie RMN s'est avérée être l'outil le plus précieux pour obtenir une vue au niveau atomique des interactions cible-ligand [118]. En effet, contrairement aux autres méthodes expérimentales présentées dans ce manuscrit, c'est la seule qui permette d'identifier les atomes interagissant entre eux, et pas seulement la présence ou l'absence d'interaction avec un ligand sans prendre en compte le site de fixation du ligand. Un autre avantage de la RMN réside aussi dans sa capacité à fournir des informations précieuses sur les changements de conformation des protéines qui se produisent vraisemblablement lors de la liaison avec leur ligand [119].

Les techniques courantes de RMN nécessitent, comme cité ci-dessus, l'usage de protéines cibles purifiées, et de la cible ou du ligand marqués par un isotope spécifique [120]. Néanmoins, les développements menés *in cellulo* des techniques RMN sont prometteurs car ils permettent de s'affranchir de la purification de la cible [121], [122].

### 3.6. Déplacement spectral ou Spectral Shift

Récemment, Langer *et al.* [123] ont présenté une méthode sensible basée sur le déplacement spectral ou *spectral shift* pour caractériser une large gamme d'interactions biomoléculaires à l'aide d'un système optique à double émission. Aussi, au lieu de mesurer le spectre d'émission complet, la fluorescence est enregistrée simultanément à deux longueurs d'onde présélectionnées à l'aide de tubes photomultiplicateurs dédiés. La méthode ne nécessite pas de marquage spécifique du site et n'utilise que quelques microlitres d'échantillon à une concentration de l'ordre du nanomolaire. Une LED orange produit une lumière d'excitation à 592 nm. La lumière d'abord réfléchi sur un séparateur de faisceau ou *beam splitter* (BS) (Figure 14, BS1) est focalisée sur le capillaire contenant l'échantillon. L'émission décalée vers le rouge passe à son tour par BS1 avant d'être divisée par un second séparateur de faisceau (Figure 14, BS2) en une composante de longueur d'onde inférieure et une composante de longueur d'onde supérieure. La lumière d'émission est

filtrée sur les filtres (F) avant qu'elle ne soit collectée par les photomultiplicateurs ou PMT (*photon-multiplier-tube*) (Figure 14A). Les fluorophores rouges qui subissent un décalage spectral induisent une diminution de la fluorescence mesurée à 650 nm et une augmentation de celle mesurée à 670 nm, ou *vice versa* (Figure 14B). La représentation graphique du rapport des fluorescences mesurées à 670 nm et 650 nm (*Ratio 670 nm / 650 nm*) en fonction de la concentration logarithmique d'un ligand non fluorescent permet d'obtenir une courbe de liaison sigmoïdale qui peut être utilisée pour extraire la valeur  $K_d$  de l'interaction (Figure 14C).

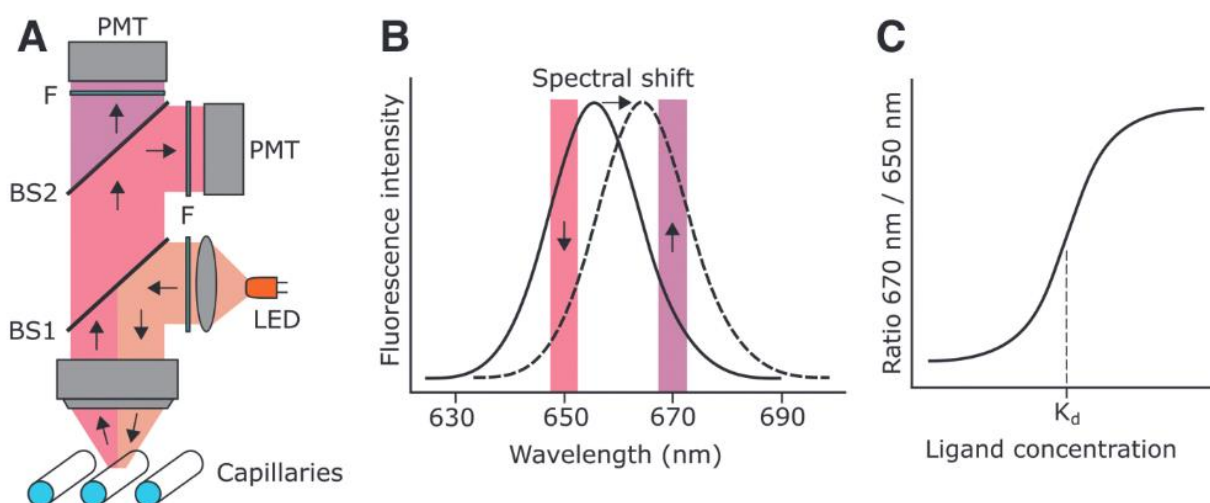


Figure 14 : Dispositif expérimental et signal de décalage spectral permettant de déterminer un  $K_d$ . [123]

Ainsi, Nguyen *et al.* [124] ont étudié l'interaction entre la protéine du SARS-CoV-2 appelée *spike protein* (SP) et le facteur plaquettaire 4 (PF4, *Platelet Factor 4*) qui est une chimiokine exprimée par les plaquettes sanguines. Cette étude de déplacement spectral a permis de trouver que le  $K_d$  du couple SP/PF4 était de 586 nM.

Cette approche permet de contrôler facilement les déplacements spectraux indépendamment des modifications globales de l'intensité de la fluorescence. En effet, des modifications du spectre d'émission peuvent résulter d'un changement de conformation de la cible fluorescente induit par sa liaison avec le ligand ou d'une modification de l'environnement chimique local du fluorophore. Contrairement à la MST (technologie présentée ci-après, paragraphe 1.3.6), l'analyse d'un déplacement spectral ne nécessite pas de gradients de température supposant ainsi une plus grande fiabilité dans l'évaluation des affinités cible/ligand.

Les limitations de la technique de déplacement spectral proviennent de la nécessité de travailler avec la fluorescence de la cible ou du ligand. Cet usage de la fluorescence apporte une grande sensibilité mais introduit en même temps certains inconvénients expérimentaux. Ainsi, le marquage de la protéine cible avec un fluorophore externe est souvent nécessaire même si le marquage en lui-même est une procédure relativement simple et qu'un certain nombre de chimies de couplage et de protéines de fusion fluorescentes sont disponibles. Cependant, l'influence du marquage sur la fonction de la protéine cible est difficile à prévoir et doit être vérifiée expérimentalement. D'autre part, certaines stratégies de marquage entravent les interactions et, par conséquent, des expériences de contrôle pertinentes doivent systématiquement être planifiées. Enfin, dans certains cas, notamment lorsque le marqueur fluorescent est éloigné du site d'interaction du ligand, la liaison du ligand peut n'entraîner que peu ou pas de changements mesurables en terme de déplacement spectral dans l'environnement physique du fluorophore [125].

Les méthodes d'analyse d'affinité enzyme/ligand en solution présentent de nombreux avantages, la principale étant que les cibles libres en solution sont plus proches de l'état natif et ont plus de chances de conserver leur activité. Néanmoins, contrairement aux cibles immobilisées, elles ne peuvent pas être recyclées. Ce sont donc des méthodes à privilégier lors des premières étapes de la recherche, ou lorsque la cible est disponible en grande quantité.

La thermophorèse à micro-échelle ou MST, technique récemment utilisée pour la mesure de l'affinité cible/ligand en solution est décrite dans la prochaine partie. C'est l'outil qui a été choisie pour le développement des essais d'interaction au cours de ce projet de thèse.

## 4. Thermophorèse miniaturisée ou à micro-échelle ou microscale thermophoresis (MST)

### 4.1. Principe général

L'effet thermophorétique a été observé en premier dans un mélange de gaz par John Tyndall en 1870. Ce phénomène a été mieux expliqué par John Strutt en 1882. La thermophorèse dans les mélanges de liquides a été décrite la première fois par Carl Ludwig en 1856 [126] et bien comprise par Charles Soret en 1879. En 1873, James Maxwell écrit : « Ce processus de diffusion [...] s'applique aux gaz et aux liquides et même à quelques solides. [...] La théorie dynamique prévoit aussi ce qui se passe dans le cas de chocs de molécules de différentes masses : une molécule de masse élevée se déplace plus lentement qu'une molécule plus légère ce qui, en moyenne, indique que toutes les molécules, quelle que soit leur taille, possèdent la même énergie cinétique ». L'analyse thermodynamique de la thermophorèse a été conduite par Sydney Chapman.

Plus précisément, la thermophorèse est un phénomène physique qui caractérise le mouvement des molécules dans un gradient de température [127]. En effet, ces molécules vont fuir la zone chaude et se diriger vers la zone froide de ce gradient. Elles se déplacent le long de ce gradient de température par diffusion de masse. Ce phénomène, appelé mouvement thermophorétique [128], est affecté par toute modification des propriétés moléculaires de la cible suivie. Si un ligand est lié à la molécule cible, il induira un changement dans une ou plusieurs des propriétés moléculaires suivantes : la taille lors de l'interaction ou la liaison enzymatique, la charge, la couche de solvation, ou même la conformation. Par conséquent, la vitesse à laquelle ces cibles se meuvent dans le gradient de température change en fonction des nouvelles propriétés moléculaires de leur état une fois liées à un ligand.

### 4.2. Contexte théorique

Les origines physiques et théoriques de la thermophorèse ont déjà été discutées en détail [128], [129], [130] et seront résumées ici. Elle peut être décrite comme un flux de molécules qui est directement proportionnel au gradient de température :

$$j = -c D_T \text{ grad } T \quad (1)$$

$j$  : flux moléculaire ;  $c$  : concentration de la molécule ;  $D_T$  : coefficient de diffusion thermique ;  $T$  : température.

En régime permanent, ce flux thermophorétique est contrebalancé par la diffusion de masse :

$$j = -D \text{ grad } c \quad (2)$$

D : coefficient de diffusion moléculaire

Le changement de concentration induit par la thermophorèse est alors déterminé par le rapport entre D et  $D_T$ , appelé coefficient de Soret  $S_T$  :

$$S_T = \frac{D}{D_T} \quad (3)$$

Pour une différence de température spatiale donnée, la variation de la concentration à l'état stable est donc obtenue par :

$$\frac{C_{\text{hot}}}{C_{\text{cold}}} = e^{-S_T \Delta T} \quad (4)$$

$C_{\text{hot}}$  et  $C_{\text{cold}}$  : concentration de molécules dans la zone chaude et dans la zone froide, respectivement.

L'effet thermophorétique dépendant de l'interface entre la molécule et le solvant, les événements d'interaction biomoléculaire peuvent ainsi être détectés, et l'affinité biomoléculaire quantifiée, par la technique de thermophorèse.

### 4.3. Thermophorèse miniaturisée ou MST

Les instruments de mesure de thermophorèse utilisés de nos jours, ou instrument de thermophorèse miniaturisée (MST) [131], [132] emploie un laser IR ( $\lambda=1475$  nm) qui est focalisé au centre d'un capillaire, de quelques centaines de  $\mu\text{m}$  de diamètre, contenant les molécules fluorescentes à étudier. Ce laser IR, source de chauffage, génère un gradient de température au sein la solution. L'augmentation de température produite n'est que de quelques  $^{\circ}\text{C}$ . Les molécules fluorescentes qui fuient de la zone chaude entraînent une chute de la fluorescence mesurée dans cette même zone. Cette fluorescence est mesurée à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission fixées par l'appareil utilisé. Le système est conçu de telle sorte que le faisceau d'excitation provenant de la LED arrive au centre du capillaire, là-même où le faisceau laser IR est focalisé, et la fluorescence mesurée. Cette fluorescence variant au cours des quelques secondes que dure la mesure MST est aussi nommée signal thermophorétique (Figures 15C et 15D).

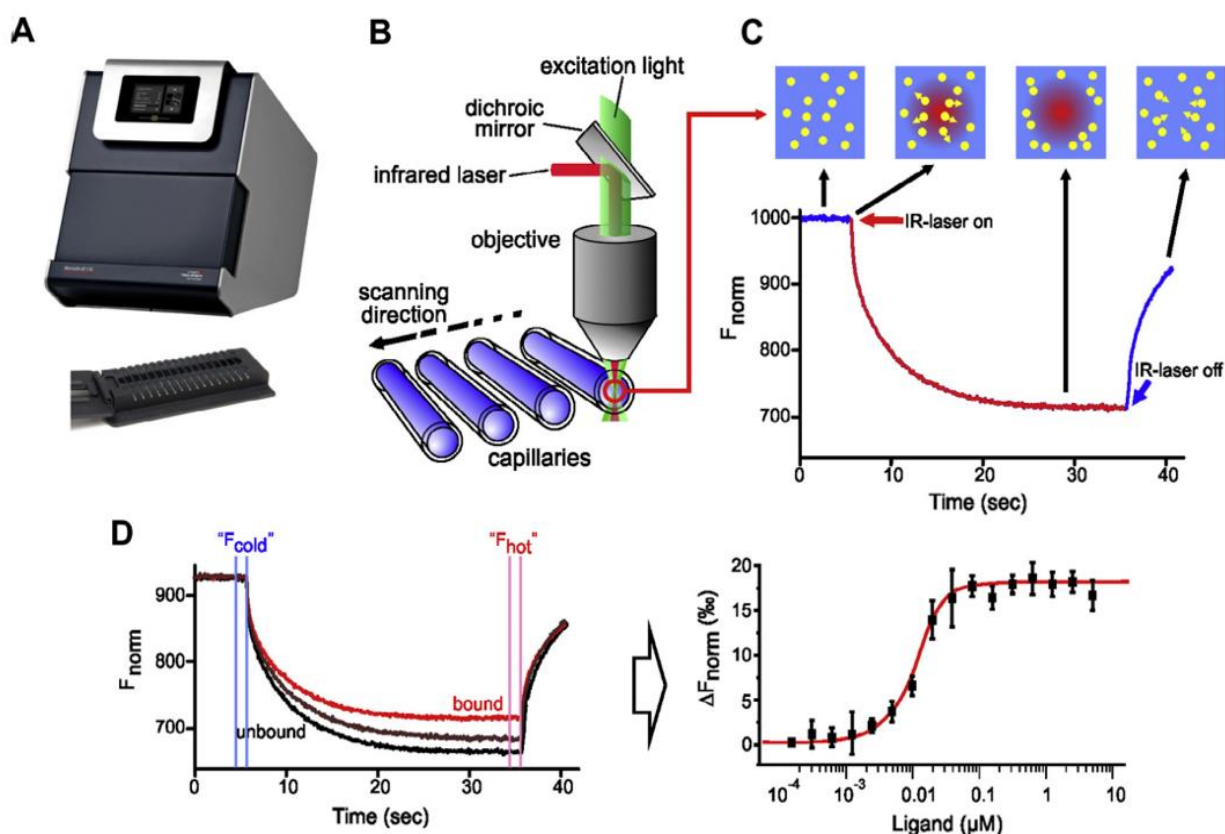


Figure 15 : Expériences de MST. (A) Le Monolith NT.115 de NanoTemper Technologies GmbH. L'image montre un plateau à capillaires pouvant accueillir jusqu'à 16 capillaires. (B) Représentation schématique de l'optique de la MST. La MST est mesurée dans des capillaires d'un volume total de quelques  $\mu\text{L}$ . La fluorescence à l'intérieur du capillaire est excitée et détectée par le même objectif. Un laser IR focalisé est utilisé pour chauffer localement un volume d'échantillon défini. La thermophorèse des molécules fluorescentes à travers le gradient de température est détectée (C) Signal typique d'une expérience MST. Au départ, les molécules sont distribuées de manière homogène et une "fluorescence initiale" constante est détectée. Dès l'activation du laser IR, on observe le "T-jump", qui correspond à un changement des propriétés du fluorophore dû à la variation rapide de la température. Ensuite, le mouvement thermophorétique des molécules marquées de manière fluorescente hors du volume d'échantillon chauffé peut être détecté. En général, le changement de fluorescence est mesuré pendant 20 à 30 secondes. Après désactivation du laser IR, un "T-jump" inverse se produit, suivi par la rétrodiffusion des molécules, qui est uniquement due à la diffusion de masse. MST, Microscale Thermophoresis ; IR, infrarouge ; T-Jump, saut de température. (D) Expérience d'affinité typique. Le mouvement thermophorétique d'une molécule fluorescente (trace noire ; "non liée") change lors de la liaison à un ligand non fluorescent (trace rouge ; "liée"), ce qui donne des traces MST différentes. Pour l'analyse, le changement dans la thermophorèse est exprimé comme le changement dans la fluorescence normalisée ( $\Delta F_{\text{norm}}$ ), qui est défini comme  $F_{\text{hot}}/F_{\text{cold}}$  (les valeurs  $F$  correspondent aux valeurs moyennes de fluorescence entre les zones définies marquées par les curseurs rouge et bleu, respectivement). Le titrage du ligand non fluorescent entraîne un changement progressif de la thermophorèse, qui est représenté sous forme de  $\Delta F_{\text{norm}}$  pour obtenir une courbe d'affinité dont les constantes d'affinité peuvent être déduites. [133]

L'instrument de MST enregistre la fluorescence de la zone focale du laser IR à l'intérieur de l'échantillon avant, pendant et après l'allumage du laser. La thermophorèse étant limitée par la diffusion et la restriction spatiale du gradient de température permet des temps de mesure courts, inférieurs à 30 secondes par échantillon. La trace de la fluorescence,  $F_{\text{norm}}$ , en fonction du temps, représentée schématiquement dans la Figure 15C, montre une série de processus définis et séparables, chacun d'eux contenant des informations différentes sur le phénomène d'interaction. Avant l'allumage du laser, la fluorescence initiale ( $F_{\text{cold}}$  dans la Figure 15D) de chacun des 16 capillaires contenant la cible fluorescente à la même concentration, et le ligand à des concentrations variables, est enregistrée.  $F_{\text{cold}}$  doit être identique pour tous les échantillons. Elle est toutefois normalisée ( $F_{\text{norm}}$ ) de telle sorte à éliminer les faibles variations dues aux erreurs aléatoires issues de la préparation des solutions contenues dans les 16 capillaires. L'allumage du laser IR entraîne un changement brusque et extrêmement rapide (quelques centaines de millisecondes) de l'intensité de la fluorescence. Ce changement de fluorescence en fonction de la température, nommé *T-jump*, est issu de propriétés inhérentes au fluorophore et de son environnement (*TRIC, Temperature-Related Intensity Change*) [134]. Le *T-jump* est influencé par des changements de conformation ou par une liaison à proximité du fluorophore [135] et peut ainsi fournir des informations spatiales sur le site de liaison. Le *T-jump* ayant un temps de vie très court, il est facilement séparé du phénomène de thermophorèse qui suit et qui, en tant que processus lent car limité par la diffusion, dure plusieurs secondes. Le mouvement thermophorétique crée, quant à lui, un gradient de concentration des molécules fluorescentes (Figure 15C). L'intensité de la fluorescence atteint un plateau représentant l'état d'équilibre dans lequel la thermodiffusion est contrebalancée par la diffusion de masse. Immédiatement après l'arrêt du laser IR, la remontée de la fluorescence due à la dépendance du fluorophore *vis-à-vis* de la température, le *T-jump inverse* (juste après  $F_{\text{hot}}$  dans la Figure 15D), indique le refroidissement de l'échantillon. Enfin, la rétrodiffusion, entraînée par la diffusion de masse, conduit à la compensation du gradient de concentration. Une molécule non liée se déplacera plus rapidement qu'une molécule liée dans un gradient de température. Cette réduction de la vitesse de migration sous un gradient de température est proportionnelle à la concentration du ligand disponible pour interagir avec la molécule cible. Plus le ligand est concentré, plus le mouvement de la molécule cible loin du point chauffé est lent [130], [136].

Pour faire des études par MST, l'une des molécules partenaires doit être fluorescente. La fluorescence relative, notée  $\Delta F_{\text{norm}}$ , est utilisée pour mesurer et quantifier la liaison par MST :

$$\Delta F_{\text{norm}} = \frac{F_{\text{hot}}}{F_{\text{cold}}} \quad (5)$$

$\Delta F_{\text{norm}}$  : fluorescence normalisée ;  $F_{\text{hot}}$  : fluorescence après thermodiffusion ;  $F_{\text{cold}}$  : fluorescence initiale.

Dans les expériences de MST, les variations relatives de température et de concentration sont faibles donc l'équation numéro (4) peut être approximée par linéarisation :

$$\frac{C_{\text{hot}}}{C_{\text{cold}}} = e^{-S_T \Delta T} \simeq 1 - S_T \Delta T \quad (6)$$

$F_{\text{norm}}$  dépend de  $S_T$  ainsi que de la contribution supplémentaire du changement de fluorescence dû à la dépendance de la température du fluorophore  $\partial F / \partial T$  :

$$\Delta F_{\text{norm}} = 1 + \left( \frac{\partial F}{\partial T} - S_T \right) \Delta T \quad (7)$$

L'affinité est quantifiée en analysant le changement de  $F_{\text{norm}}$  en fonction de la concentration du ligand titré. Comme  $\Delta F_{\text{norm}}$  dépend de l'ensemble des contributions des mouvements thermophorétiques, celle de l'état lié et celle de l'état non lié, il en découle la relation suivante :

$$\Delta F_{\text{norm}} = (1 - FL) F_{\text{norm, non lié}} + (FL) F_{\text{norm, lié}} \quad (8)$$

FL : fraction de la cible liée ;  $F_{\text{norm, non lié}}$  : fluorescence normalisée de l'état non lié ;  $F_{\text{norm, lié}}$  : fluorescence normalisée de l'état lié.

Dans de nombreux cas, l'interaction peut être décrite par le modèle de la loi d'action de masse. Les modes de liaison plus complexes nécessitent des modèles différents, par exemple l'équation de Hill pour la coopérativité. L'examen détaillé des différents modèles de liaison dépassant le cadre de cette thèse, le modèle souvent appliqué de la loi d'action de masse sera appliqué dans notre cas. Ainsi, le processus de liaison d'un partenaire A et d'un partenaire B conduisant à la formation d'un complexe AB est caractérisé par :



A et B : partenaires de liaisons ; AB : complexe lié de A et B

La constante de dissociation  $K_d$ , qui quantifie l'affinité d'interaction/de liaison, est définie par :

$$K_d = \frac{[A]_{\text{libre}} [B]_{\text{libre}}}{[AB]} \quad (10)$$

$[A]_{\text{libre}}$  : concentration du partenaire A libre ;  $[B]_{\text{libre}}$  : concentration du partenaire B libre.

Les concentrations libres n'étant pas connues, les concentrations totales sont utilisées à la place. Les concentrations totales de A et B sont définies comme suit :

$$[A] = [A]_{\text{libre}} + [AB] \quad \text{et} \quad [B] = [B]_{\text{libre}} + [AB] \quad (11)$$

Donc,

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

Si A représente le partenaire titré (généralement le ligand ou l'inhibiteur) et B le partenaire dont la concentration est maintenue constante et dont la fluorescence est suivie (généralement la cible ou protéine). Pour obtenir le  $K_d$  à partir des données de MST, il faut résoudre l'équation suivante donnant la fraction liée de B, FL :

$$FL = \frac{[AB]}{[B]} = \frac{[A] + [B] + K_d - \sqrt{([A] + [B] + K_d)^2 - 4[AB]}}{2[B]} \quad (13)$$

La FL est maintenant exprimée comme une fonction de la concentration totale de A et B, le  $K_d$  étant le seul paramètre indépendant.  $\Delta F_{\text{norm}}$  provenant de la mesure MST étant une fonction linéaire de FL (équation (8)), elle peut être directement intégrée à l'équation (13).

$\Delta F_{\text{norm}}$  (Figure 15D) est ensuite représenté sur un axe y exprimé en ‰ en fonction de la concentration totale du partenaire (le ligand) reportée sur un axe gradué à l'échelle logarithmique (base 10). L'avantage de ce tracé semi logarithmique est que les données d'affinité peuvent facilement être lues : la courbe présente une forme sigmoïdale caractéristique dans laquelle l'état non lié forme un plateau inférieur et l'état saturé un plateau supérieur. Les graphiques rapportent les valeurs moyennes de  $\Delta F_{\text{norm}}$  résultant de répétitions indépendantes de l'expérience MST. Les barres d'erreur représentent l'écart-type obtenu pour chaque mesure répétée. Les moyennes sont ajustées et les valeurs  $K_d$  résultantes sont données avec une estimation de l'erreur de l'ajustement au modèle (en anglais *fitting*). La procédure d'ajustement suppose une distribution d'erreur gaussienne et symétrique. L'erreur peut donc atteindre des valeurs négatives si la limite de sensibilité déterminée par la plus faible

concentration détectable du partenaire fluorescent est atteinte. Dans ce cas, les valeurs  $K_d$  sont présentées comme une limite supérieure et peuvent également être inférieures.

#### 4.4. Marquage fluorescent pour les études de MST

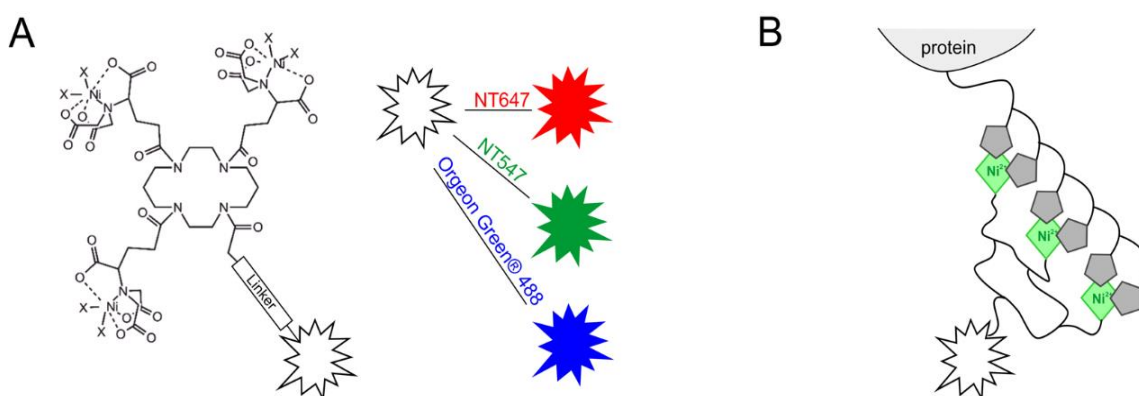
Le mouvement thermophorétique est détecté grâce à la fluorescence de l'un des partenaires de l'interaction, provenant soit d'un marqueur fluorescent soit d'une protéine de fusion fluorescente, soit de la fluorescence intrinsèque de la protéine. Le modèle Monolith NT.115 Pico de chez NanoTemper utilisé dans le cadre de la thèse permet une excitation dans le rouge avec une LED émettant dans l'intervalle allant de 605 à 645 nm. L'émission est quant à elle mesurée dans l'intervalle 680-685 nm.

##### 4.4.1. Marquage par voie chimique

Des groupes réactifs de réticulation (*cross-linker*) sont couramment utilisés pour le marquage des protéines. Le marqueur fluorescent est couplé à l'agent de réticulation, qui se lie de manière covalente donc stable à des groupes fonctionnels spécifiques de la protéine. Par exemple, les esters de N-hydroxysuccinimide (NHS) réagissent avec les amines primaires des chaînes latérales de lysine ou à l'extrémité N-terminale de la protéine. Le couplage avec le groupe guanidino de l'arginine est également possible. Les composés maléimides peuvent également être utilisés pour marquer les groupes sulfhydryles présents dans les résidus de cystéine réduits. Dans les deux cas, le fluorophore qui n'a pas réagi doit être éliminé avant l'analyse de l'interaction par MST. Les biomolécules contiennent généralement plusieurs de ces sites de marquage potentiels. Toutefois, la position exacte de l'étiquette fluorescente n'est importante pour l'analyse thermophorétique que si elle interfère avec l'interaction avec le ligand. En outre, la présence de marqueurs à des positions aléatoires ajoute à la robustesse de la MST, car elle minimise les effets locaux possibles d'une étiquette sur le phénomène d'interaction. Les réactions de couplage nécessitent souvent un pH spécifique, ce qui peut générer de nombreux problèmes (dénaturation, agrégation, etc.). Outre les protéines, d'autres types de molécules peuvent être marquées par fluorescence pour étudier les interactions par MST (par exemple, les acides nucléiques, les sucres, les lipides, etc.) [129].

Par exemple Bartoschik *et al.* [137] ont présenté l'application du marquage à base de tris-NTA (*nitrilotriacetic acid*) de protéines marquées par une étiquette hexahistidine (6-His) pour les mesures de MST. À cette fin, le tris-NTA a été conjugué à trois fluorophores différents de différentes régions spectrales : rouge (NT647), vert (NT547) et bleu (Oregon Green® 488), (Figure 16A). Les fluorophores NT647 et NT547 sont des fluorophores optimisés pour la MST, qui sont disponibles

dans le commerce sous forme de dérivés NHS ou maléimides pour les mesures de MST. Le conjugué RED-tris-NTA (NT647-tris-NTA) s'est avéré être le conjugué de fluorophore optimal pour cette approche. Ce conjugué se caractérise par une forte affinité pour les étiquettes 6-His, un signal de fluorescence élevé et le meilleur rapport signal/bruit de tous les conjugués DYE-tris-NTA étudiés. Grâce à son spectre d'émission rouge, il permet des mesures fiables dans des matrices biologiques complexes telles que les lysats cellulaires, qui présentent une autofluorescence importante dans la partie bleue et verte du spectre [138].



*Figure 16 : Marquage de protéines possédant un tag 6-His via des conjugués tris-NTA. (A) Structure chimique de la partie tris-NTA conjuguée à un fluorophore par l'intermédiaire d'un lien (linker). Les fluorophores sont illustrés à droite : rouge (NT647), vert (NT547) et bleu (Oregon Green® 488). (B) Représentation schématique du fluorophore-tris-NTA lié à une protéine étiquetée 6-His. Le conjugué est chargé d'ions Ni(II) pour le marquage spécifique des protéines marquées à l'histidine. Les deux sites de coordination restants des ions Ni(II) complexés par le NTA interagissent avec les groupements histidines de l'étiquette His de la protéine. [137]*

Afin de marquer spécifiquement la protéine cible et éviter les étapes fastidieuses d'un marquage chimique, d'autres méthodes de marquage fluorescent peuvent être utilisées.

#### 4.4.2. Marquage à l'aide de protéines de fusion

Afin de contourner l'étiquetage chimique, plusieurs groupes ont travaillé avec des protéines de fusion émettant dans le spectre vert (Green Fluorescent Protein, GFP) [132], [139], [140] ou jaune (Yellow Fluorescent Protein, YFP) [129], [141]. Les protéines recombinantes fluorescentes peuvent être utilisées directement dans le lysat cellulaire, sans marquage supplémentaire. On peut utiliser soit des fusions avec une protéine fluorescente, telle que la protéine fluorescente verte (GFP ;  $\lambda_{ex1} = 395 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{ex2} = 475 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{em} = 504 \text{ nm}$ ), soit des étiquettes de séquences peptidiques permettant

un couplage de fluorophore spécifique à un site, par exemple à un tag 6-Histidine. Les volumes et les concentrations d'échantillons obtenus par ces approches sans purification des protéines conviennent généralement très bien aux exigences des expériences de MST [139].

#### 4.4.2.1. GFP : Green Fluorescent protein

Parmi les protéines fluorescentes utilisées par les biologistes cellulaires, la plus utilisée est la protéine fluorescente verte (GFP), isolée de la méduse *Aequorea victoria* [142]. Cette protéine est codée par un seul gène, qui peut être cloné et introduit dans des cellules d'autres espèces. La protéine fraîchement traduite n'est pas fluorescente, mais au bout d'une heure environ, elle subit une modification post-traductionnelle auto-catalysée pour générer un fluorophore efficace, protégé à l'intérieur d'une protéine en forme de tonneau, qui deviendra fluorescente lorsqu'elle sera éclairée de manière appropriée par une lumière bleue (Figure 17).

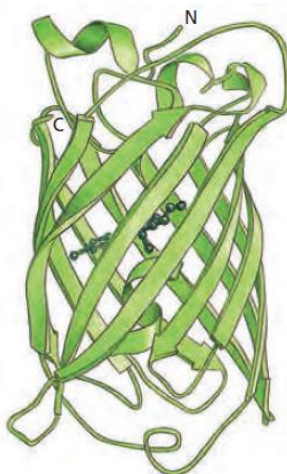
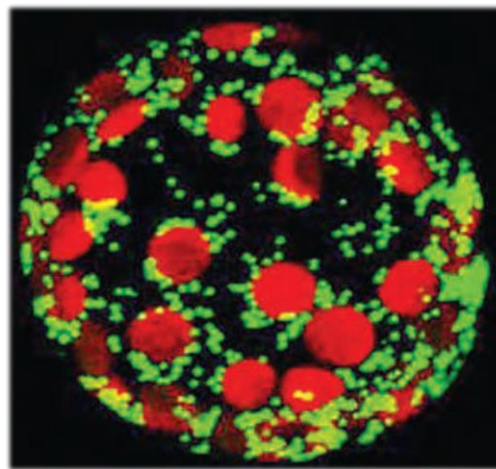


Figure 17 : Protéine fluorescente verte (GFP ;  $\lambda_{ex1} = 395 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{ex2} = 475 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{em} = 504 \text{ nm}$ ). La structure de la GFP, représentée ici de manière schématique, met en évidence les onze feuillets  $\beta$  qui forment un cylindre [142].

Une mutagenèse dirigée sur le site de la séquence génétique de la GFP originale a permis d'obtenir de multiples variants qui peuvent être utilisés dans des organismes allant des animaux et des plantes aux champignons et aux microbes. L'efficacité de la fluorescence a également été améliorée et des variants ont été générés avec des spectres d'absorption et d'émission modifiés allant du bleu-vert, comme la protéine fluorescente bleue ou BFP, au rouge très visible. D'autres protéines fluorescentes apparentées ont depuis été découvertes (par exemple, dans les coraux) qui étendent également la gamme dans la région rouge du spectre, comme la protéine fluorescente rouge ou RFP [143].

La séquence codante de l'ADN de la GFP peut être insérée au début ou à la fin du gène d'une autre protéine par clonage, ce qui donne un produit chimérique composé de cette protéine à laquelle est attaché un domaine GFP. Dans de nombreux cas, cette protéine de fusion GFP se comporte de la même manière que la protéine originale, révélant directement sa localisation et ses activités grâce à sa fluorescence codée génétiquement (Figure 18). Il est souvent possible de prouver que la protéine de fusion GFP est fonctionnellement équivalente à la protéine non marquée. Le marquage GFP est le moyen le plus clair et le moins équivoque de montrer la distribution et la dynamique d'une protéine dans un organisme vivant.



*Figure 18 : Protéines marquées par GFP. Cette cellule vivante d'un plant de tabac exprime des niveaux élevés de protéine fluorescente verte, fusionnée à une protéine ciblant les mitochondries, qui apparaissent donc en vert. Les mitochondries sont regroupées autour des chloroplastes, qui sont marqués en rouge par l'auto fluorescence de la chlorophylle (photographie d'Olivier Grandjean) [143].*

Les marqueurs fluorescents offrent une sensibilité élevée qui permet d'utiliser des concentrations de l'ordre du nanomolaire. Ils garantissent également la sélectivité des mesures dans des fluides complexes ou des mélanges de molécules portant des étiquettes différentes. Khavrutskii *et al.* [140] ont utilisé pour la première fois une protéine fusionnée à la GFP pour déterminer l'affinité de STAT3, un facteur de transcription cytoplasmique, avec différentes séquences d'oligonucléotides sans purification de la protéine cible à partir de lysats cellulaires. Par la suite, ce protocole a été adapté pour évaluer, directement dans des lysats cellulaires, l'affinité du couple PD-1/PD-L1, qui est impliqué dans les processus d'échappement tumoral [139].

#### **4.4.2.2. Création et de production d'une protéine de fusion fluorescente**

Afin de produire une protéine de fusion fluorescente en grande quantité, l'une des contributions les plus importantes du clonage de l'ADN à la biologie cellulaire et moléculaire est la possibilité de produire n'importe quelle protéine, même les plus rares, en quantités pratiquement illimitées, pour autant que le gène codant pour cette protéine soit connu. Cette production est généralement réalisée dans des cellules vivantes à l'aide de vecteurs d'expression (Figure 19). Il s'agit généralement de plasmides conçus pour produire une grande quantité d'ARNm stables qui peut être traduit efficacement en protéine lorsque le plasmide est introduit dans des cellules de bactéries, de levures, d'insectes ou de mammifères. Pour ce faire, un vecteur plasmidique est conçu pour contenir un promoteur très actif, qui entraîne la production de quantités inhabituellement élevées d'ARNm à partir d'un gène codant pour une protéine adjacente inséré dans le vecteur plasmidique. En fonction des caractéristiques du vecteur de clonage, le plasmide est introduit dans des cellules de bactéries, de levures, d'insectes ou de mammifères, où le gène inséré est efficacement transcrit et traduit en protéines. Si le gène à surexprimer ne comporte pas d'introns (ce qui est typique des gènes de bactéries, d'archées et d'eucaryotes simples), il peut simplement être cloné à partir de l'ADN génomique par PCR<sup>5</sup>.

---

<sup>5</sup> PCR signifie « Polymerase Chain reaction ». C'est une technique d'amplification enzymatique permettant d'obtenir un grand nombre de copies identiques d'un fragment d'ADN.

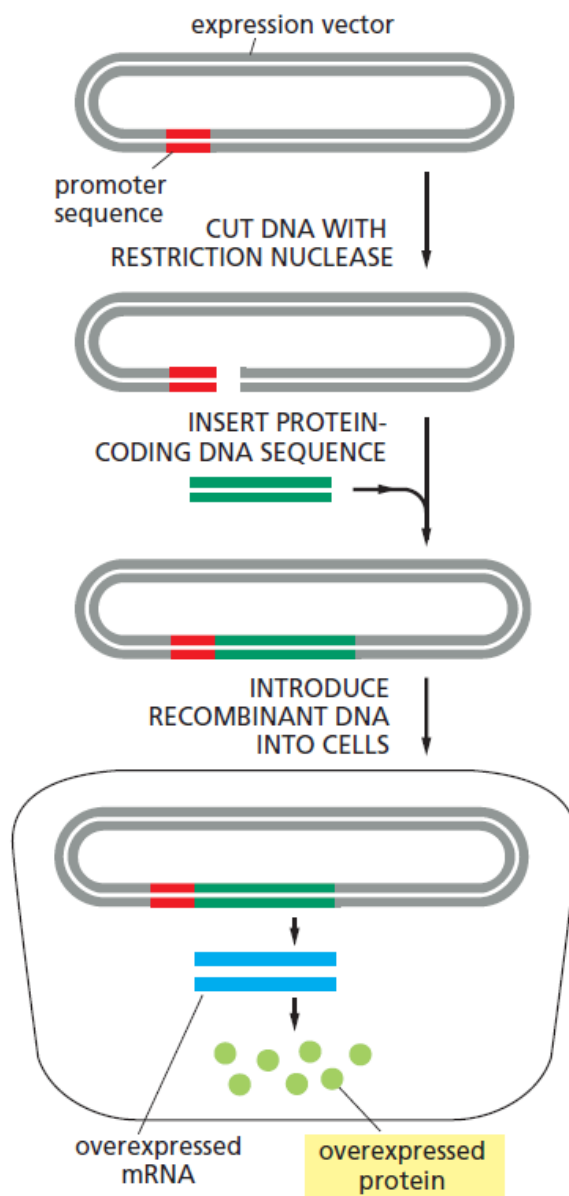


Figure 19 : Production de grandes quantités d'une protéine à partir d'une séquence d'ADN codant pour une protéine, clonée dans un vecteur d'expression et introduite dans des cellules [143].

Bien qu'utilisées pour des études d'affinité par MST, les protéines de fusion de type GFP ou YFP ne sont pas bien adaptées aux mesures de forte affinité avec des  $K_d$  de quelques nM, directement dans les extraits cellulaires, en raison de l'autofluorescence de la matrice générant un fort bruit de fond. Dans cas, la fluorescence dans le spectre rouge peut s'avérer être particulièrement avantageuse.

#### 4.4.3. MST réalisée sans marquage

Il est possible que les étiquettes fluorescentes influencent certaines interactions cible-ligand. Certaines biomolécules, comme la plupart des protéines membranaires (par exemple les récepteurs couplés aux protéines G), sont particulièrement sensibles aux modifications. Une solution à ce problème est d'utiliser la MST qui est basée sur la fluorescence intrinsèque des protéines dans la gamme des UV, provenant des acides aminés aromatiques tyrosine, phénylalanine et tryptophane (Trp), ce dernier étant le fluorophore intrinsèque dominant. Pour obtenir un signal de fluorescence UV mesurable par MST sans marquage, les protéines à teneur moyenne en Trp (2 Trp ou plus) peuvent généralement être utilisées à des concentrations descendant jusqu'à 100 nM. Par ailleurs, si le nombre de résidus Trp incorporés est insuffisant, il est possible d'introduire du Trp par mutation. Un échange d'un autre acide aminé aromatique pour le Trp devrait ne pas affecter les propriétés moléculaires et la fonction de la protéine [144]. Une concentration de protéine de 100 nM permet de quantifier précisément les  $K_d$  de 50 nM ou plus, tandis que les  $K_d$  plus petits ne peuvent pas être quantifiées avec précision [136]. En effet, l'intensité de la fluorescence doit être suffisamment élevée pour que la concentration du partenaire de liaison fluorescent non titré soit de l'ordre du  $K_d$  attendue ou inférieure (d'après les instructions de NanoTemper). Cela permet d'obtenir une résolution maximale et une précision élevée lors de la détermination des  $K_d$ . Le choix de la source de fluorescence doit tenir compte de la nature du liquide dans lequel l'analyse MST sera effectuée. La fluorescence de fond du tampon à la longueur d'onde du fluorophore doit être évitée pour obtenir un bon rapport signal/bruit. Par conséquent, les mesures sans marquage ne peuvent pas être effectuées dans des bioliquides complexes tels que le lysat cellulaire ou le sérum sanguin, car ils présentent une fluorescence UV de fond élevée en raison de leur forte teneur en protéines [145]. Comme déjà précisé, les marqueurs fluorescents rouges sont le meilleur choix pour les mesures dans le sérum, car la fluorescence de fond est très faible à l'extrémité rouge du spectre [146].

Dans ce cadre, Seidel *et al.* [136] ont exploité les propriétés fluorescentes intrinsèques de la phénylalanine, de la tyrosine, et du tryptophane afin d'étudier les interactions entre iGluR2 (*ionotropic glutamate receptors 2*), une protéine membranaire, et différents ligands. Ils ont trouvé un  $K_d$  de 0.84  $\mu$ M pour l'interaction entre iGluR2 et le glutamate (Figure 20), qui est l'agoniste naturel de ce récepteur, ce qui est en accord avec les données de la littérature. Ils ont également déterminé le  $K_d$  entre iGluR2 et l'azobenzène glutamate (glu-azo), également un agoniste de iGluR2, et ont trouvé un  $K_d$  bien plus élevé, de 19  $\mu$ M.

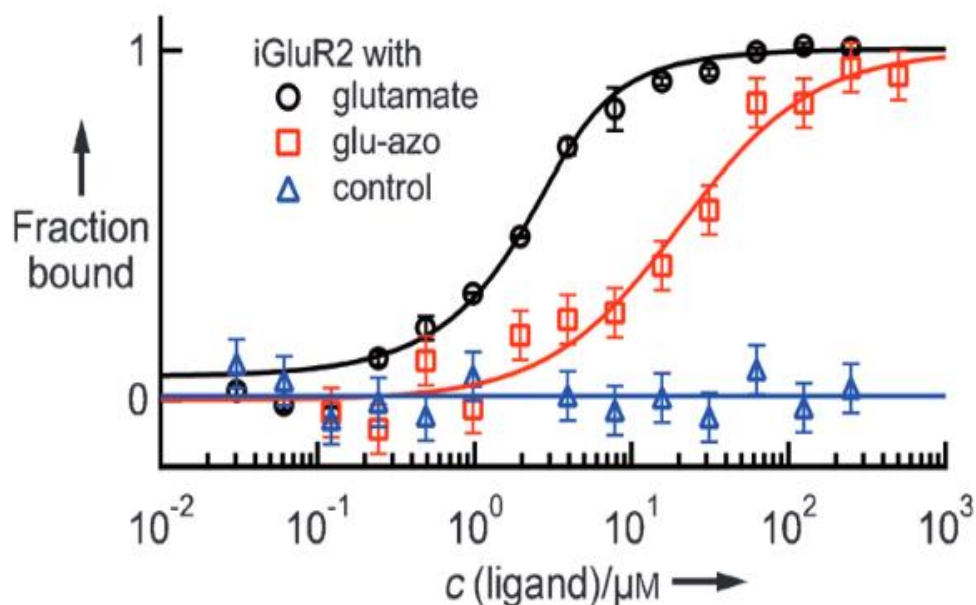


Figure 20 : Courbes d'affinité obtenue par MST sans marquage entre iGluR2, un récepteur membranaire, et le glutamate ou le glu-azo. Détermination de  $K_d$  pour le glutamate (835 nM) et le glu-azo (19  $\mu\text{M}$ ).

Pour le contrôle : préincubation de l'iGluR2 avec une quantité saturante de glutamate empêchant la liaison du glu-azo. [136]

Le contrôle a été obtenu en saturant les récepteurs iGluR2 avec du glutamate et en ajoutant une concentration croissante de glu-azo. Ce travail permet de conclure que le glutamate et le glu-azo se fixent au même endroit sur iGluR2, et que le glu-azo a une affinité moindre à iGluR2 que le glutamate. Le domaine de iGluR2 (LBD, *ligand binding domain*) étudié ici contient naturellement quatre Trp, et présente une fluorescence suffisante à une concentration de 2  $\mu\text{M}$ , ce qui est très élevé comparé aux études par MST avec un marquage par un fluorophore chimique généralement d'une dizaine de nanomolaire.

#### 4.5. MST et Kinases

Au cours de la dernière décennie, la MST a été amplement utilisée dans la conception et la découverte de médicaments. De par son implication importante dans de nombreux processus biologiques, la famille des protéines kinases est l'une des plus ciblée. C'est pour cela que nous avons choisi l'inhibition de la famille des LIM Kinases comme preuve de concept dans ce projet de thèse.

Linke *et al.* [147] ont publié un travail utilisant la MST automatisée pour le criblage de composés pour la découverte d'inhibiteurs potentiels. L'affinité de 193 fragments<sup>6</sup> à MEK1 (mitogen/extracellular signal regulated kinase) qui joue un rôle important dans la signalisation du cancer a été mesurée. 73 fragments se sont liés à MEK1 et 120 fragments n'ont pas montré d'affinité avec MEK1. De plus, les données obtenues ont été comparées à d'autres résultats de techniques biophysiques telles que la SPR et la DSF et ont aussi été confirmées par cristallographie aux rayons X. Les résultats ont confirmé la supériorité de la MST dans le criblage de composés par rapport à la SPR et à la DSF. D'autre part, Bao *et al.* [148] ont testé l'affinité de HK2 (Hexokinase 2) avec 13 inhibiteurs naturels, issus d'un champignon (*Ganoderma sinense*) en utilisant la MST et ont confirmé les résultats obtenus par des essais cellulaires. Plusieurs petites molécules naturelles ont montré un effet inhibiteur prometteur sur différentes protéines kinases en utilisant la MST comme technique analytique [149]. Dans une étude visant à évaluer la liaison de quatre bromobenzotriazoles au site catalytique de la protéine kinase humaine CK2 (Casein kinase 2), la MST a donné des valeurs de  $K_d$  en accord avec celles obtenues par ITC [150].

Une différence entre les interactions évaluées *in vitro* et *in vivo* de cibles protéiques avec les actifs développés a été prouvée à l'aide de la MST. Cette différence est cruciale pour fournir des informations sur les médicaments nouvellement développés. Ce sujet a été exploré par Wienken *et al.* [132] en déterminant l'affinité de la quercétine, une petite molécule inhibitrice, avec la protéine kinase PKA dans un tampon dilué et dans du sérum humain. La réduction, de l'ordre de 400, de l'affinité de la quercétine-kinase dans le sérum humain par rapport au tampon souligne l'effet important des matrices biologiques et l'intérêt d'en prendre compte lors du développement des médicaments. L'étude a mis en évidence les effets de liaison compétitifs significatifs de plusieurs composants présents à l'origine dans les matrices biologiques et absents dans les tampons artificiels *in vitro*, ce qui peut conduire à des conclusions erronées concernant les médicaments candidats.

Cela démontre que l'étude des interactions biomoléculaires dans des conditions proches du *in vivo* est primordial.

---

<sup>6</sup> La découverte de médicaments à partir de fragments ou *fragment-based lead discovery*, est une méthode utilisée pour trouver des composés prometteurs dans le cadre du processus de découverte de médicaments. Les fragments sont de petites molécules organiques de faible poids moléculaire. Cette méthode repose sur l'identification de fragments qui peuvent se lier à la cible, puis sur leur combinaison pour produire un composé ayant une grande affinité pour la cible.

## 4.6. MST pour des essais d'interaction dans des matrices complexes

Comme cela a été expliqué par Jerabek-Willemsen *et al.* [133], traditionnellement, la détermination d'affinité entre biomolécules et petits inhibiteurs est effectuée dans des solutions homogènes hautement diluées, qui sont biochimiquement très différentes des mélanges encombrés de molécules à l'intérieur de la cellule. En général, les concentrations de protéines employées pour les analyses d'affinité sont si faibles qu'elles n'affectent pas les propriétés physiques de la solution. Cependant, l'environnement cellulaire contient des concentrations élevées de nombreuses biomolécules telles que les protéines, les lipides, les petites molécules et les acides nucléiques qui, ensemble, augmentent la viscosité de la solution et modifient la diffusion des biomolécules. Les biomolécules présentes dans ces solutions denses se lient les unes aux autres et affectent également les molécules d'intérêt par le biais d'interactions électrostatiques, hydrophobes et de van der Waals, ainsi que par des interactions stériques non spécifiques ou spécifiques. Il est donc important de mieux comprendre comment les molécules interagissent les unes avec les autres dans des environnements biomoléculaires complexes [151]. Cependant, les techniques les plus courantes telles que la SPR et l'ITC ne peuvent pas être utilisées pour étudier les interactions dans les bioliquides complexes. Généralement, de fortes concentrations de protéines purifiées ou de polymères tels que le dextran, le Ficoll et le PEG sont ajoutés comme agents d'encombrement à des solutions tampons « simples » telles que le PBS, l'HEPES ou le TRIS pour imiter cet encombrement intra- et extra- cellulaire. Les études d'interaction sont alors réalisées avec et sans agents d'encombrement et les effets d'un environnement très encombré peuvent être étudiés [152], [153]. La réalisation d'études avec des solutions encombrées impose différentes difficultés techniques, principalement en raison de la viscosité élevée des solutions et de l'augmentation du bruit de fond. En outre, dans de nombreux systèmes, les réactifs d'encombrement ne peuvent pas refléter l'environnement très complexe des cellules. Ainsi, pour une compréhension véritablement quantitative des interactions moléculaires, les études d'interaction doivent être réalisées dans des conditions proches du *in vivo* (par exemple, dans le lysat de cellules eucaryotes, le plasma ou le sérum). Ces études d'interaction sont réalisées par MST à l'aide de protéines de fusion fluorescentes telles que la GFP ou la mCherry, en raison des avantages suivants :

- (1) La détermination des  $K_d$  est possible sans aucune étape de purification des protéines ; de nombreuses protéines perdant leur activité lors de leur purification.
- (2) Les  $K_d$  peuvent être déterminés dans un environnement protéique très encombré.
- (3) Le marquage chimique avec des fluorophores n'est pas nécessaire.
- (4) L'accès aux paramètres thermodynamiques dans des conditions *in vivo* est possible.

Par exemple, Jerabek-Willemsen *et al.* [133] ont utilisé la protéine de fusion mCherry pour étudier par MST l'interaction de la  $\beta$ -lactamase TEM1 à la BLIP (protéine inhibitrice de la  $\beta$ -lactamase). Dans la première expérience, les auteurs ont étudié la liaison de TEM1 marqué au NT647 (marqué de manière covalente sur les résidus lysine) à BLIP. La concentration de TEM1 marqué au NT647 a été maintenue constante à 5 nM, tandis que la concentration de BLIP variait. Le  $K_d$  calculé pour l'interaction entre TEM1 marqué au NT647 et BLIP était de 4,2 nM (Figure 21A).

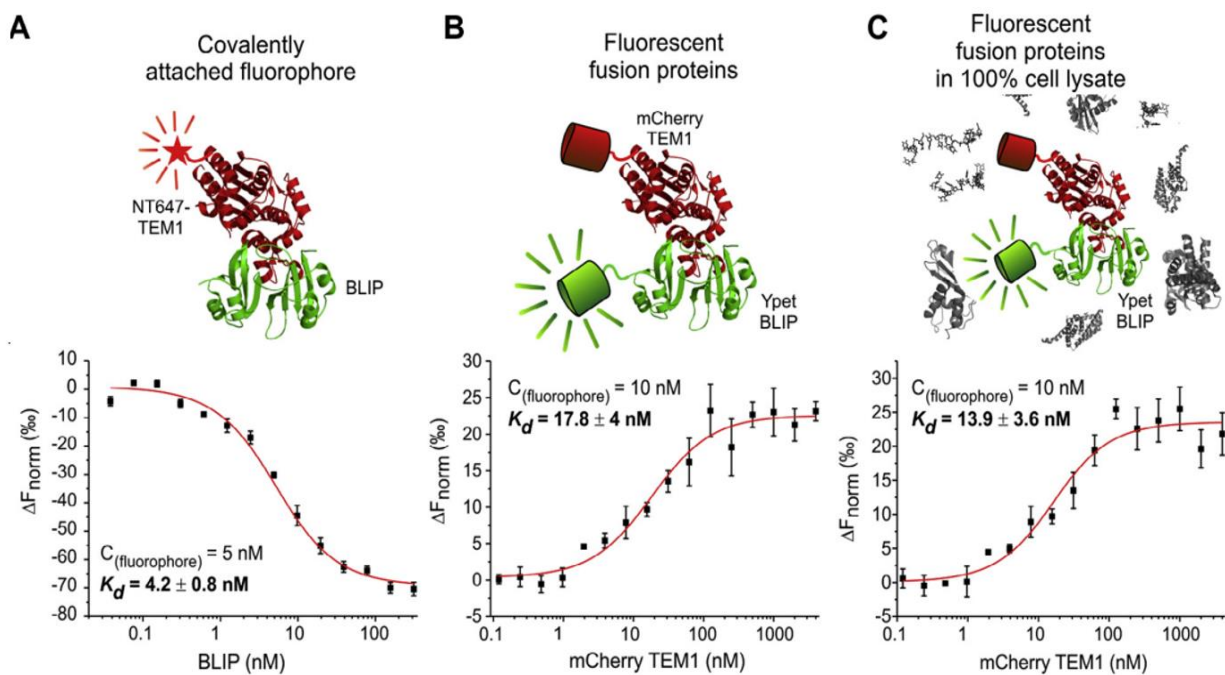


Figure 21 : Analyses thermophorétiques d'interactions protéine-protéine dans un tampon MST et dans un lysat cellulaire. (A) Interaction suivie dans le tampon MST entre TEM1 purifié marqué au NT647 et BLIP purifié. Le  $K_d$  obtenu est de 4,2 nM. (B) Interaction suivie dans le tampon MST de mCherry-TEM1 avec Ypet-BLIP toutes les deux purifiées. Le  $K_d$  obtenu est de 17,8 nM. (C) Interaction suivie dans un lysat cellulaire de mCherry-TEM1 avec Ypet-BLIP. Le  $K_d$  obtenu est de 13,9 nM [133].

L'affinité déterminée était en adéquation avec les données publiées précédemment en utilisant la MST et la SPR [129], [154]. Dans une deuxième série d'expériences, l'affinité de liaison entre Ypet-BLIP purifié et mCherry-TEM1 purifié a été étudiée. La concentration de Ypet-BLIP a été maintenue constante à 10 nM, tandis que la concentration de mCherry-TEM1 a été modifiée. Le  $K_d$  calculé pour l'interaction entre Ypet-BLIP et mCherry-TEM1 était de 17,8 nM (Figure 21B). Ces premiers résultats concordants ont démontré que les protéines de fusion fluorescentes étaient bien adaptées pour déterminer les affinités de liaison par MST. Dans une dernière série d'expériences, les auteurs ont étudié l'affinité de liaison de Ypet-BLIP à mCherry-TEM1 dans un lysat cellulaire de cellules 293T.

Ypet-BLIP a été dilué dans le lysat cellulaire à une concentration finale de 10 nM et mélangé à une série de dilutions de mCherry-TEM1 dans le même lysat de cellules 293T. Le  $K_d$  calculé pour l'interaction entre Ypet-BLIP et mCherry-TEM1 était de 13,9 nM dans les lysats (Figure 21C), valeur du même ordre de grandeur que celles des  $K_d$  déterminées avec les protéines équivalentes dans un tampon aqueux. Dans ce cas précis, le type de milieu (encombré ou non) n'a pas d'influence sur les mesures de MST.

Ces résultats soulignent les performances de la MST dans l'étude des interactions biomoléculaires directement dans des lysats cellulaires très encombrés, en utilisant des protéines de fusion fluorescentes et sans aucune purification. L'expérience MST peut aussi être réalisée avec deux lysats cellulaires différents exprimant des protéines de fusion fluorescentes différentes, sachant que l'excitation des deux protéines fluorescentes doit être différente afin d'éviter les artefacts de fluorescence. La concentration du premier partenaire de liaison est maintenue constante, à de faibles concentrations (nM), tandis que la concentration du second partenaire de liaison varie. La concentration en protéines peut être facilement estimée en préparant des courbes d'étalonnage à l'aide de protéines fluorescentes purifiées comme Ypet/GFP/mCherry ou par western blot quantitatif. Sur la base de cette approche sans purification, un certain nombre d'applications deviennent possibles. Les signaux FRET pour l'interaction protéine-protéine dans les cellules pourraient être analysés, puis les deux lysats pourraient être utilisés pour l'analyse MST. De cette manière, une caractérisation quantitative des interactions protéine-protéine au niveau cellulaire et moléculaire serait accessible dans un court laps de temps. Même sans connaître les concentrations cellulaires des protéines exprimées, les approches par lysat cellulaire peuvent être utilisées pour vérifier rapidement si, et comment, les protéines d'intérêt interagissent dans des conditions proches de l'état natif [139], [155].

#### **4.7. MST et détection d'interactions même sans changement de tailles**

En raison de sa dépendance à des paramètres tels que la charge et l'énergie de solvation, la MST est capable de détecter des changements même infimes dans la structure ou la conformation des protéines, car elle ne repose pas uniquement sur des changements de taille. Ainsi, la MST a été utilisée pour quantifier la liaison d'ions métalliques à la protéine DJ-1 impliquée dans la maladie de Parkinson [156], la liaison d'ions carbonate à l'adénylyl cyclase [157], la liaison d'ions calcium à la synaptotagmine [158], ou encore la liaison d'ions nitrate au canal interne des protéines de transport transmembranaire [159]. Dans cette dernière étude, la MST a permis pour la première fois l'analyse

détaillée du mécanisme moléculaire du transport du nitrate à travers les membranes en utilisant différents mutants ponctuels dont la liaison est altérée.

Pour démontrer la grande sensibilité de la MST face aux changements les plus minimes dans la configuration des protéines, des expériences ont été réalisées avec de la streptavidine marquée par fluorescence en complexe avec des peptides biotinylés, dont la séquence ne diffère que par un seul acide aminé [160]. Cette étude a été faite dans un tampon PBS contenant 0,05% de Tween20. Le Tween est un surfactant couramment utilisé dans les expériences de MST : en effet, l'ajout d'une quantité adéquate de surfactant permet d'éviter l'agrégation des protéines et leur adsorption à la paroi du capillaire. Le choix de la composition du tampon MST est donc primordial. Comme cela est visible sur la Figure 22, la liaison aux peptides biotinylés a entraîné une modification du signal MST de la streptavidine. Le degré de changement du signal MST déclenché par les différents peptides biotinylés dépendait de leur acide aminé terminal, démontrant ainsi que la MST était bien sensible aux changements moléculaires intervenant au niveau atomique.

Les avantages des mesures d'interaction indépendantes de la taille pour les approches de découverte basées sur les fragments (*fragment-based lead discovery*) sont clairs : alors que plusieurs techniques bien établies et largement appliquées telles que la SPR atteignent leurs limites dans le cas de fragments à faible poids moléculaire, ceux-ci conduisant à un rapport signal/bruit réduit et à de potentiels artefacts de mesure, la MST est capable de fournir des données d'affinité de haute qualité, indépendantes des changements de taille, pour des molécules dont la masse est de l'ordre du dalton. Et ceci peut être réalisé directement dans des matrices complexes.

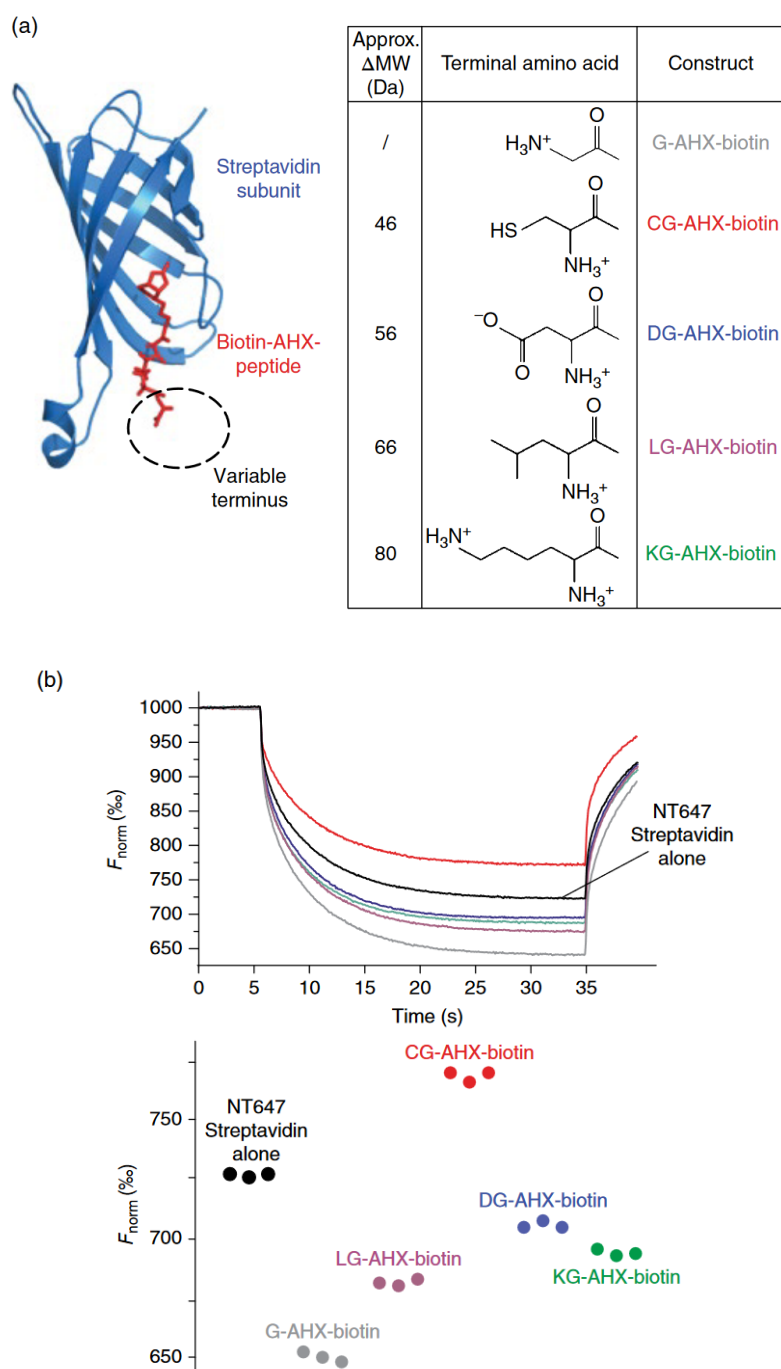


Figure 22 : Indépendance de la MST par rapport au changement de taille. (a) Représentation schématique d'une sous-unité de streptavidine en complexe avec un peptide biotine-AHX-glycine (modifié à partir de la pdb 3RY2) et structures chimiques des peptides biotinylés utilisés pour les études d'interaction.  $\Delta MW$  est la différence de poids moléculaire par rapport au peptide de contrôle avec un seul résidu glycine. (b) Traces MST et valeurs  $F_{norm}$  de la streptavidine marquée au NT647 en complexe avec les peptides biotinylés montrés en (a) dans un tampon PBS + 0,05% Tween20 à une puissance MST moyenne, mesurées sur un Monolith NT.115. [160]

Bien que présentant de nombreux avantages précédemment établis, on ne peut conclure sur la MST sans mentionner que celle-ci peut, dans certains cas, être impactée par la dépendance des affinités à la température, alors même que les changements de température sont inhérents à la MST [125].

Il convient aussi de noter que la MST est soumise aux limitations propres à l'excitation des fluorophores et au suivi de la fluorescence : le photoblanchiment, l'autofluorescence et la phototoxicité. Comme cela a été précisé précédemment, la composition du tampon MST est à choisir de manière scrupuleuse (nature, pH, concentration, présence de surfactant) notamment afin d'éviter adsorptions et agrégats.

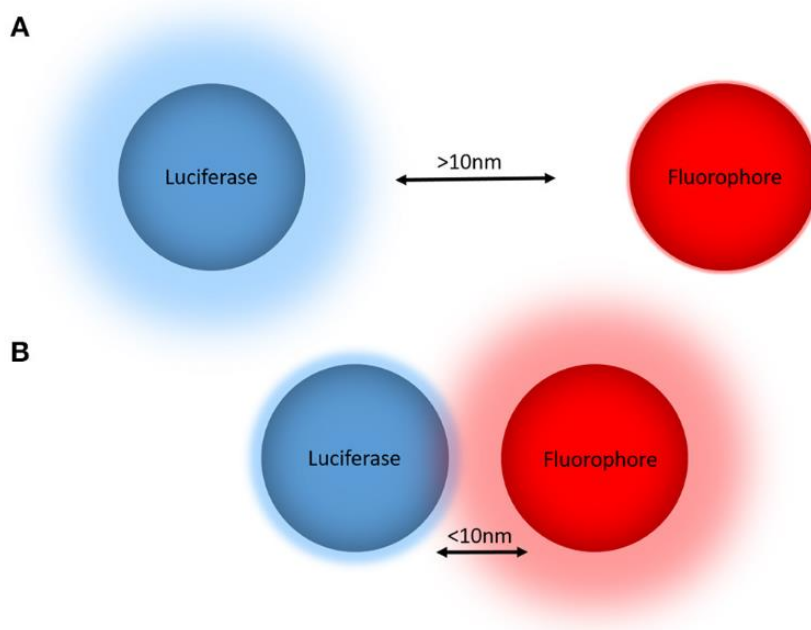
## **5. Analyse de réactions enzymatiques des protéines kinases**

Le nombre croissant de protéines kinases en tant que cibles potentielles de médicaments, associé à la nécessité de cribler de vastes collections de composés, a amené le développement de nombreuses techniques analytiques d'évaluation de l'activité de ces enzymes. Afin d'évaluer l'activité des enzymes, l'IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice médiane) est la mesure de choix. Déterminer l'IC<sub>50</sub> d'une réaction est essentiel dans le domaine de la pharmacologie. En effet, elle permet d'évaluer l'efficacité d'un actif car elle représente la concentration à laquelle un médicament inhibe la moitié de l'activité biologique d'un certain processus. Cela aide à déterminer la dose optimale pour obtenir l'effet thérapeutique souhaité tout en minimisant les effets indésirables. De plus, l'IC<sub>50</sub> permet de comparer l'effet de différents composés. En mesurant l'IC<sub>50</sub> de plusieurs composés, il est possible de déterminer quelles substances sont les plus efficaces pour un processus biologique donné. Déterminer l'IC<sub>50</sub> d'une réaction est crucial pour comprendre l'activité pharmacologique d'une substance et pour guider le développement de médicaments plus sûrs et plus efficaces.

Les protéines kinase sont des enzymes qui phosphorylent leurs partenaires enzymatiques. Elles assurent donc le transfert d'un groupement phosphate, le plus souvent venant de l'ATP (Adénosine triphosphate), vers une autre macromolécule, donnant de l'ADP (Adénosine diphosphate). Cette transformation d'ATP en ADP, ou le transfert d'un groupement phosphate à un substrat, peuvent être suivis grâce à des techniques analytiques, et l'activité des enzymes peut en être déduite.

## 5.1. Transfert d'énergie par résonance de bioluminescence ou BRET

Le transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (*bioluminescence resonance energy transfer*, BRET) est une technique biophysique utilisée pour évaluer la proximité dans les cellules vivantes. Le BRET exploite le phénomène naturel de transfert d'énergie dipôle-dipôle d'une enzyme donneuse (la luciférase) à un fluorophore accepteur à la suite de l'oxydation d'un substrat par l'enzyme. Il en résulte la production d'un signal quantifiable qui dénote la proximité entre des protéines et/ou des molécules marquées avec des partenaires luciférase et fluorophore complémentaires. Les essais BRET ont été utilisés pour observer, en autres, la liaison de ligands, la signalisation intracellulaire et la proximité cible-ligand. Les essais BRET peuvent théoriquement être utilisés pour surveiller la proximité de toute protéine ou molécule pour laquelle des constructions de fusion et/ou des conjugués de fluorophores appropriés peuvent être produits [161]. La *Figure 23* illustre le principe du BRET.



*Figure 23 : Principe du transfert d'énergie par résonance de la bioluminescence (BRET) pour la mesure de la proximité biologique. (A) La luciférase donneuse et le fluorophore accepteur ne sont pas proches (>10 nm), de sorte à ce qu'il n'y ait pas de transfert d'énergie de résonance et qu'il n'y ait pas d'émission du fluorophore. (B) La luciférase donneuse et le fluorophore accepteur sont à proximité (<10 nm), ce qui permet le transfert d'énergie par résonance (BRET) qui réduit l'émission de lumière du donneur et entraîne l'émission de lumière de l'accepteur. Lorsque ces marqueurs BRET sont fusionnés à des protéines ou à des petites molécules d'intérêt, le transfert d'énergie non radiative de la luciférase donneuse au fluorophore accepteur produit un changement dans le rapport BRET qui indique à son tour la proximité des protéines et/ou des petites molécules marquées [161].*

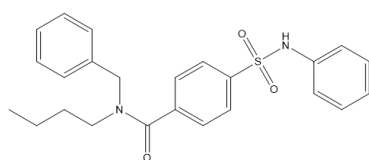
Par exemple, Collins *et al.* [162] ont utilisé le BRET afin de déterminer l'IC<sub>50</sub> de 17 composés commerciaux avec LIMK1/2, ce qui leur a permis de comparer ces composés entre eux et de les classer. Ils ont trouvé des IC<sub>50</sub> de 23 nM et 7 nM pour LIMK1 et LIMK2 respectivement, inhibés par LX7101 (Figure 26). L'inhibition de LIMK1 et LIMK2 dans des cellules HEK293 a été étudiée grâce à la production de protéines de fusion fluorescente NanoLuc-LIMK1/2. NanoLuc est une protéine fluorescente dérivée de la luciférase, optimisée afin d'être plus petite et d'avoir un meilleur signal de fluorescence.

Les méthodes de BRET présentent de nombreux avantages, celui ayant la plus grande importance dans le cadre de notre étude étant la possibilité de détecter des interactions dans des cellules vivantes. Le BRET est facilement adaptable à presque tous les types de cellules qui permettent l'expression des protéines donneuses et acceptrices. De plus, contrairement à la technique similaire du transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET), le BRET ne nécessite pas d'excitation externe, mais repose sur l'ajout du substrat perméable aux cellules pour démarrer l'expérience, ce qui permet à l'expérimentateur de contrôler l'essai dans le temps et d'éviter l'activation involontaire du fluorophore accepteur [163]. Néanmoins, le BRET n'a pas été utilisé pour l'imagerie à haute résolution des cellules et des tissus principalement en raison de l'intensité très faibles des signaux obtenus, ceux-ci ne pouvant pas être améliorés en "augmentant" l'intensité ou la puissance de la lumière d'excitation, comme c'est le cas avec le FRET ou la MST [164].

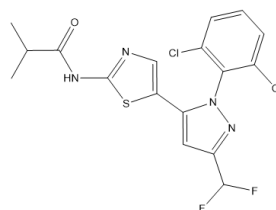
## 5.2. Spectrométrie de masse ou MS

La spectrométrie de masse (MS, *mass spectrometry*) est une technique d'analyse qui permet la détermination des masses moléculaires des composés analysés ainsi que leur structure pour une identification fine et une quantification précise même dans des échantillons très complexes. La MS est fondée sur la séparation et la détection d'ions formés dans une source d'ionisation ou dans une chambre de collision [165]. La MS est très utilisée dans le domaine de la recherche biologique pour identifier et quantifier les métabolites ainsi que les protéines. Cependant, dans les conditions de MS conventionnelle, les substances biologiques se dissocient en molécules individuelles pendant l'ionisation et/ou la désolvatation, par conséquent, les interactions protéine-ligand sont rarement observées [166]. Cependant, les progrès récents réalisés en MS dans des conditions non dénaturantes ont permis de mesurer les masses totales des complexes protéine-ligand, même pour les interactions non covalentes [167]. Un système développé par Agilent, appelé RapidFire, désigne un système automatisé de collecte et de purification d'échantillons par microfluidique qui s'interface directement

avec les instruments de MS équipés d'une source d'ionisation par électrobulbisation ou ESI-MS (*Electrospray Ionisation- Mass Spectrometer*). Ce système utilise une robotique à grande vitesse pour aspirer directement des échantillons à partir de plaques de criblage à 96 ou 384 puits, éliminer rapidement les composants non volatils de l'essai tels que les sels, les tampons et les détergents dans une étape de dessalage et de fractionnement en ligne, et ainsi fournir des analytes purifiés au spectromètre de masse [168]. Hutchinson *et al.* [169] ont criblé une collection de plus de 100 000 composés, hypothétiques inhibiteurs de l'histone lysine déméthylase JMJD2C, en 10 jours à l'aide de deux instruments. RapidFire a également été appliqué au criblage de bibliothèques comptant jusqu'à 500 000 composés, avec des rapports détaillant des campagnes réussies d'identification d'inhibiteurs de la S-adénosylhomocystéine hydrolase (AHCY) [170] et de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP14) [171]. Dans les deux cas, les composés prometteurs identifiés dans les essais préliminaires RapidFire ont été co-cristallisés avec succès et les structures aux rayons X ont été résolues, confirmant des modes d'inhibitions de type substrats-compétitif avec les cibles enzymatiques. Hanke *et al.* [105] ont aussi déterminé, grâce à cette méthode, les  $IC_{50}$  de deux inhibiteurs des LIM Kinases, LIMKi3 et TH-257 (leurs structures sont en Figure 24). Leur étude a été conduite sur les domaines kinases de LIMK1 et LIMK2, avec des  $IC_{50}$  de 16 nM et 12 nM obtenus respectivement pour Kin 1 et Kin 2 purifiés avec LIMKi3, et de 84 nM et 15 nM avec TH-257. Il est important de noter que ces études ont été menées dans des conditions lointaines de celles *in vivo*.



TH-257



LIMKi3 (BMS5)

Figure 24: Structure de deux inhibiteurs de référence de LIMKs : TH-257 et LIMKi3 (aussi appelée BMS5)

Une autre méthode, développée sur la base des travaux de Daub *et al.* [172], est la technologie KinoBeads qui s'est révélée être une approche intéressante pour étudier le kinome<sup>7</sup> [173], [174]. Basée sur le concept de la capture des kinases par des inhibiteurs de kinases immobilisés sur des billes de sépharose, l'inclusion de multiples inhibiteurs de kinases de spécificité et d'affinité différentes permet la capture d'un grand pourcentage du kinome en une seule expérience [175]. Les kinases capturées peuvent ensuite être éluées et identifiées après analyse par spectrométrie de masse ou par Western blot. Les KinoBeads de Cellzome ou les billes KinAffinity développées par Evotec sont des exemples qui fournissent des valeurs de  $K_d$  [176], [177], [178]. Becher *et al.* [179] ont utilisé cette approche pour déterminer les affinités des kinases cellulaires aux cofacteurs nucléotidiques ATP, ADP et GTP. Comme le montre la Figure 25, la valeur de  $K_d$  est obtenue de manière indirecte, à partir de l' $IC_{50}$ .

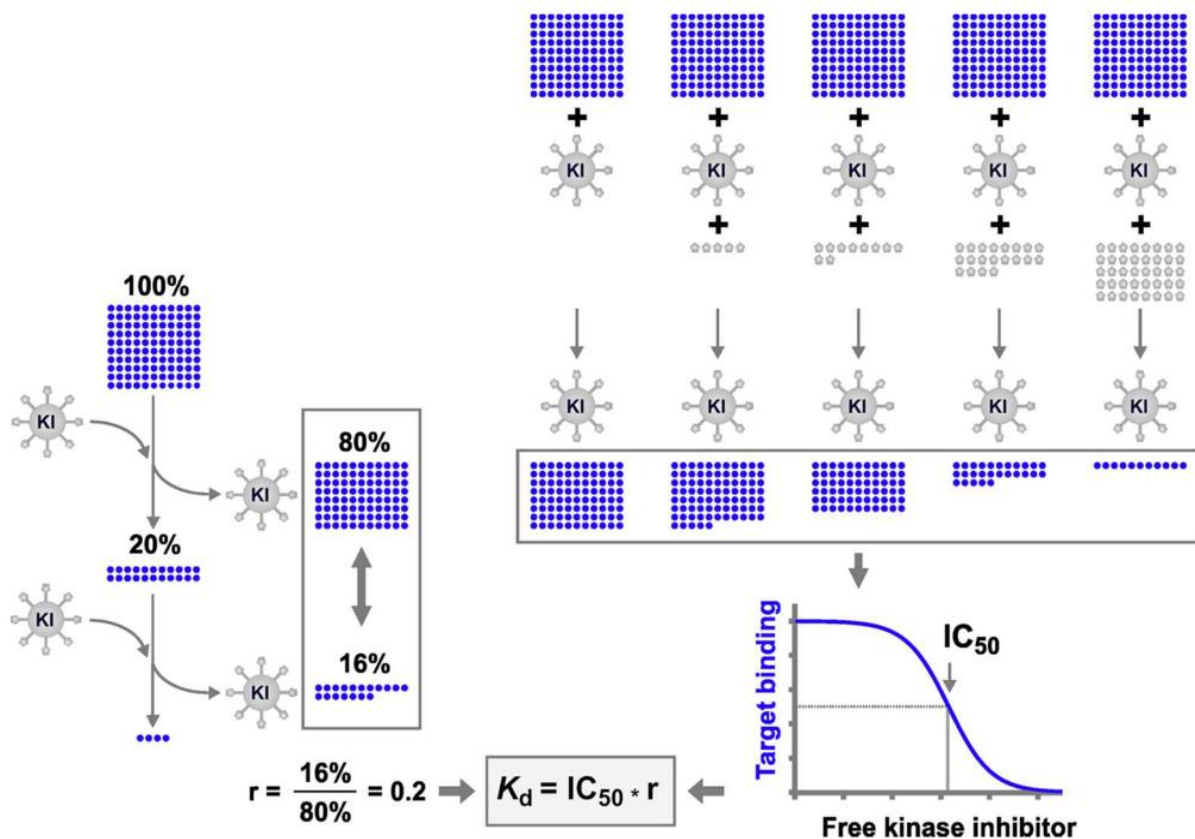


Figure 25 : Illustration schématique du profilage de l'affinité de la cible. Le rapport  $r = 0,2$  indique que 20 % de la cible est restée dans le surnageant après la première série d'incubation avec les billes d'inhibiteur. Le rapport  $r$  corrige l'affinité de la cible pour l'inhibiteur de kinase immobilisé lorsqu'il est multiplié par l' $IC_{50}$  issu des expériences de compétition. Le produit résultant représente la valeur  $K_d$  spécifique à la cible [180].

<sup>7</sup> Le kinome d'un organisme est l'ensemble des protéines kinases exprimées par cet organisme. Le kinome humain est constitué actuellement de 535 protéines kinases.

La distribution d'une cible hypothétique d'inhibiteur de kinase (représentée par les points bleus) est montrée pour une expérience d'affinité consécutive avec des billes d'inhibiteur de kinase (KI) et une expérience de compétition parallèle avec des concentrations croissantes d'inhibiteur de kinase libre. Des comparaisons quantitatives sont effectuées pour les fractions de cible purifiées par affinité et encadrées par les deux rectangles. Le rapport  $r = 0,2$  indique que 20 % de la cible est restée dans le surnageant après la première série d'incubation avec les billes d'inhibiteur. Le rapport  $r$  corrige l'affinité de la cible pour l'inhibiteur de kinase immobilisé lorsqu'il est multiplié par l' $IC_{50}$  issu des expériences de compétition. Le produit résultant représente la valeur  $K_d$  spécifique à la cible. Cette méthode permet donc de déterminer le  $K_d$  de manière indirecte (à partir de l' $IC_{50}$ )

L'un des principaux avantages de la MS est qu'elle permet de réaliser des essais sans marquage radioactif ni fluorescent. Ceci accélère le processus de découverte de médicaments et réduit le temps de recherche lié au marquage de la cible ou du ligand. Cependant, le choix des solutions tampon n'est pas libre et il faut éviter la présence de sels et de co-facteurs ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , etc.) souvent indispensables à l'activité des enzymes. Par ailleurs, la taille des molécules à analyser peut être un frein au développement de ce type de méthodes [168].

### 5.3. Essais radiométriques

Les tests radiométriques sont les tout premiers tests développés pour les kinases et sont généralement considérés comme une référence. Ces tests utilisent de l'ATP radiomarké comme substrat de la réaction ; lors de la réaction avec une kinase, le radio-isotope ( $^{32}P$  ou  $^{33}P$  sur le phosphate  $\gamma$  de l'ATP) est transféré de l'ATP à une molécule réceptrice et la réaction est quantifiée en mesurant l'étendue de l'incorporation de l'isotope [181]. L'activité des kinases peut être estimée par l'intensité de la radioactivité qui est corrélée avec les abondances relatives de la phosphorylation. En général, la protéine marquée au  $^{32}P$  ou  $^{33}P$  est séparée sur un gel de polyacrylamide par électrophorèse [182]. Après transfert sur une membrane de nitrocellulose, la protéine radioactive est visualisée à la surface de la plaque par autoradiographie. [183]

Des essais radiométriques ont été conduits par Harrison *et al.* [184] afin de déterminer l' $IC_{50}$  d'un composé qu'ils ont synthétisé, le LX7101 (Figure 26), afin d'inhiber LIMK1 et LIMK2 dans le cadre d'un traitement contre le glaucome. Ils ont trouvé un  $IC_{50}$  de 32 nM et 4 nM pour Kin1 et LIMK2 purifiées, respectivement.

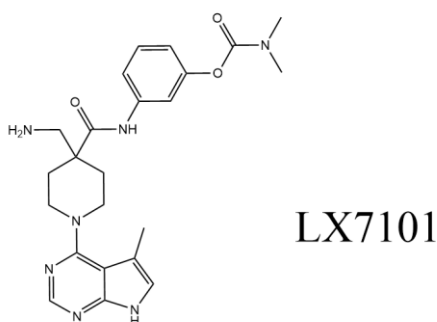


Figure 26 : Structure de LX7101, seul inhibiteur de LIMK à avoir atteint la phase I/IIa.

L'étude du kinome à l'aide d'une puce microfluidique a été conduite afin d'étudier l'activité des kinases dans le lysat cellulaire [185]. Zhu *et al.* [186] ont conçu une puce microfluidique de type micropuits pour le dosage et l'analyse des protéines kinases. Dans leur étude, les kinases de levure ont réagi avec des substrats protéiques et de ( $\gamma$   $^{32}\text{P}$ )ATP dans les micropuits individuels.

Cependant, la longue durée d'exposition à la radioactivité pour l'analyse et les procédures de manipulation délicates de composés radioactifs peuvent limiter les applications à haut débit des méthodes de détection par radiomarquage. Un dosage basé sur la radioactivité n'est pas non plus adapté aux concentrations physiologiques d'ATP et présente un risque avéré pour la santé humaine et pour l'environnement [187].

#### 5.4. Electrophorèse capillaire ou CE

L'électrophorèse capillaire (CE), comme vu précédemment, est une technique séparative qui trouve des applications dans divers domaines, notamment pour la miniaturisation des essais enzymatiques. Le(s) substrat(s) et le(s) produit(s) sont séparés dans un capillaire en fonction de leur rapport charge/taille dans un champ électrique appliqué à travers le capillaire. L'analyse enzymatique par CE présente plusieurs avantages tels qu'une faible consommation d'échantillons et de réactifs, une excellente efficacité de séparation et un potentiel de couplage très large [188]. La CE étant une technique séparative, son usage le plus direct est de séparer et quantifier les produits de réaction afin de caractériser la réaction enzymatique.

Les analyses de réactions enzymatiques basées sur la CE peuvent être divisées en deux catégories : réactions pré-capillaires (hors ligne) et intra-capillaires (en ligne). Dans le premier cas, tous les

réactifs, sauf un (substrat ou enzyme), sont incubés à l'extérieur du capillaire [189]. La réaction est initiée par l'ajout du réactif manquant (enzyme ou substrat). Les essais hors ligne sont faciles à optimiser car la réaction enzymatique et la séparation des analytes (produits formés et substrat) se produisent indépendamment. Les interventions manuelles sont toutefois inévitables lorsque les réactions sont faites hors ligne et que des volumes de réaction relativement importants sont nécessaires (quelques dizaines de  $\mu\text{L}$ ) [190]. Avec le mode de réaction de CE en ligne, le capillaire agit comme un nanoréacteur dans lequel se déroulent les étapes de réaction, de séparation et de détection. Il existe plusieurs méthodologies par lesquelles les réactifs sont mélangés dans le capillaire, comme la microanalyse à médiation électrophorétique (EMMA) [191] ou la diffusion transversale des profils d'écoulement laminaire (TDLFP) [192]. Ce type d'essais est souvent délicat à optimiser car toutes les étapes se déroulent de manière séquentielle dans le capillaire. Néanmoins, les essais en ligne ont un potentiel d'automatisation plus élevé que les essais hors ligne [188].

Par exemple, Tzeng *et al.* [193] ont mis au point un test CE-UV pour mesurer simultanément les activités de la thymidine kinase (TK) et de la thymidine monophosphate kinase (TMPK). La méthode a été optimisée pour la détection de la thymidine monophosphate (TMP) et de la thymidine diphosphate (TDP), les produits de la phosphorylation de la thymidine par la TK et de la phosphorylation de la TMP par la TMPK, respectivement. De l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) a été ajouté afin de chélater les ions cofacteurs  $\text{Mg}^{2+}$  qui étaient censés être à l'origine du manque de symétrie du pic d'ATP dû à la formation de complexes  $\text{ATP-Mg}^{2+}$ . Cela a permis de résoudre les pics d'ATP et de TDP qui migraient proches l'un de l'autre. La méthode optimisée a été appliquée pour détecter simultanément les activités TK et TMPK. Après 10 minutes d'incubation de l'extrait de protéine cellulaire avec le tampon de réaction à 37 °C, la TMP et la TDP ont été détectées, confirmant la présence des activités TK et TMPK. La méthode CE a permis une séparation hautement reproductible, rapide (6 min) et efficace des différents nucléosides dans les cellules lysées.

L'analyse de biomolécules par CE présente néanmoins quelques limitations, auxquelles nous avons dû faire face durant cette thèse. En effet, les biomolécules constituant l'extrait cellulaire, et particulièrement les protéines, ont tendance à s'adsorber sur la paroi du capillaire. Les protéines chargées sont séparées en CE dans un électrolyte support (BGE) ayant un pH qui doit être défini sur la base de leur point isoélectrique [194]. Toutefois, le matériau le plus fréquemment utilisé pour les capillaires, la silice vierge, est chargé négativement lorsqu'il est en contact avec une solution dont le pH est supérieur à 4, ce qui induit un flux électro-osmotique (EOF) lors de l'application d'un champ électrique. Cela peut être un avantage ou un inconvénient pendant la séparation, en fonction de

l'application. L'adsorption des protéines sur la surface de la silice chargée négativement peut par exemple constituer un problème [195]. Le recouvrement du capillaire peut réduire l'adsorption des protéines à sa surface [196]. Les recouvrements de capillaires peuvent être classés en deux types, dynamiques ou permanents, en fonction du mode de fixation du matériau de revêtement [197], [198]. Les approches de recouvrement dynamique utilisent l'ajout d'agents solubles dans le BGE pour couvrir la paroi de capillaire pendant la séparation [199] (Figure 27a). Au contraire, les agents de recouvrement permanents sont irréversiblement attachés à la surface interne de la paroi du capillaire, soit par adsorption physique, soit par liaison covalente ; il n'est donc pas nécessaire d'ajouter ces agents au BGE [200] (Figure 27b).

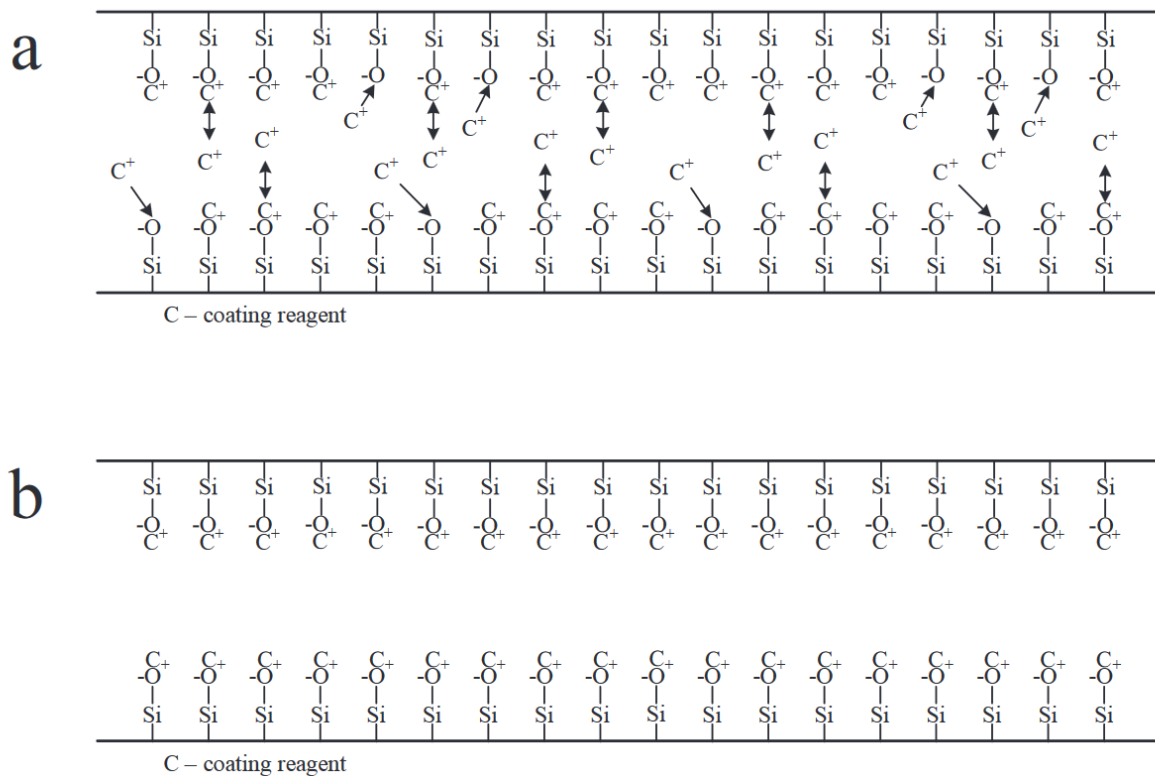


Figure 27: Recouvrement des capillaires en mode dynamique (a) ou permanent par adsorption physique (b) [198]

#### 5.4.1. Revêtement dynamique

Les procédures de recouvrement dynamique du capillaire sont faciles à réaliser dans des conditions de laboratoire standard et constituent un moyen efficace de diminuer l'adsorption des protéines, puisque ces matériaux de recouvrement sont simplement ajoutés au BGE. En raison de leur nature, ces recouvrements doivent être continuellement régénérés en rafraîchissant la couche adsorbée sur la

paroi capillaire [201]. Les matériaux de recouvrement dynamiques s'adsorbent de manière réversible sur la surface du capillaire, avec l'avantage de pouvoir être facilement retirés et régénérés si nécessaire [202]. Les agents les plus couramment utilisés sont soit de petits ions, comme les amines ou les oligoamines, soit des surfactants anioniques et cationiques (dodécyl sulfate de sodium ou SDS, bromure de cetyltriméthylammonium ou CTAB, etc.), soit des polymères hydrophiles neutres, comme l'oxyde de polyéthylène (PEO), l'alcool polyvinylique (PVA), les celluloses, les dextrans et les liquides ioniques [199], [202], [203]. L'un des inconvénients des agents de recouvrement dynamiques est leur possible interférence avec les systèmes de séparation et/ou de détection, en particulier, la spectrométrie de masse (MS) [204].

Wu *et al.* [205] ont utilisé un liquide ionique, le 1-butyl-3-méthylimidazolium tétrafluoroborate, comme matériau de recouvrement dynamique pour la séparation de protéines provenant de blanc d'œuf, dans lequel les principaux composants protéiques sont le lysozyme ( $pI = 11$ ) et l'ovalbumine ( $pI = 5$ ). Les deux protéines étant chargées positivement à un pH de 4,8 et il était donc impossible de les séparer avec un capillaire en silice vierge. De fait, l'usage de liquides ioniques a aidé à la séparation des protéines par rapport à d'autres électrolytes courants.

#### **5.4.2. Revêtement permanent par adsorption physique**

Les recouvrements permanents sont des couches adsorbées de façon définitive ou liées de façon covalente à la surface interne du capillaire [200]. Les revêtements permanents adsorbés physiquement offrent certains avantages par rapport aux revêtements covalents, tels que la simplicité de la procédure de recouvrement, la possibilité de régénérer facilement le revêtement et une dépendance minimale vis-à-vis de la chimie de surface [198]. Dans ce cas, les matériaux de recouvrement sont adsorbés sur la surface de la silice au moyen de forces physiques telles que les interactions électrostatiques, hydrophobes ou la liaison hydrogène [206]. Il est important de noter que les recouvrements physiques permanents, contrairement aux recouvrements dynamiques, sont stables même sans ajout de l'agent de recouvrement dans le BGE.

Nehmé *et al.* [207], [208] ont développé un recouvrement composé d'une ou de multiples couches de polymère en utilisant des polyélectrolytes hautement chargés (par exemple, une multicouche de chlorure de poly(diallyldiméthylammonium) (PDADMAC) / poly(sodium 4-styrenesulfonate) ou PSS comme recouvrement de capillaire physiquement adsorbé pour l'analyse de protéines. Ces recouvrements multicouches sont très stables dans des conditions alcalines et permettaient donc d'excellentes performances de séparation même à un pH de 9,3 avec une efficacité élevée. Ce type de recouvrement est simple à mettre en place et ne demande pas de réaction chimique complexe, ni de

connaissance en chimie de surface. C'est ce type de recouvrement que nous avons employé pour les essais enzymatiques en CE réalisés au cours de ce travail de thèse.

### **5.4.3. Revêtement permanent par liaison covalente**

Les recouvrements de capillaires covalents impliquent généralement la modification des groupes silanols de surface sur la paroi capillaire en silice vierge. Le processus habituel commence par un prétraitement de la surface capillaire par NaOH pour activer les liaisons Si-O-Si en formant des groupes Si-OH, suivi d'une réaction de silanisation avec un réactif alcoxysilane bifonctionnel pour former des liaisons covalentes avec la possibilité d'attacher le matériau de recouvrement final ou, si nécessaire, un matériau intermédiaire (par exemple, un polymère linéaire) [209], [210]. Les recouvrements covalents se caractérisent par une stabilité à long terme et sont compatibles avec la détection par MS [204].

Sola et Chiari [211] ont présenté une approche de recouvrement covalent dans laquelle des groupes chimiquement réactifs tels que le N-acryloyloxysuccinimide (NAS), le méthacrylate de glycidyle (GMA) et le [3(méthacryloyl-oxy)propyl]triméthoxysilane (MAPS) faisaient partie de la chaîne polymère de l'acrylamide de diméthyle (DMA). Les copolymères poly(DMA-co-NAS-co-MAPS) ou poly(DMA-co-GMA-co-MAPS) ont été fixés à la paroi du capillaire. Les groupes réactifs ont renforcé la stabilité du recouvrement en réagissant avec les silanols de surface à côté de la partie alcoxysilane. Le NAS est très réactif vis-à-vis des amines primaires, il doit donc être bloqué après la procédure de recouvrement, par exemple par un rinçage à l'éthanolamine. D'excellentes séparations ont été obtenues pour les protéines acides et basiques avec ces recouvrements hydrophiles.

## **6. Détermination et prévision des paramètres thermodynamiques des interactions protéine/ligand**

La thermodynamique chimique est un domaine de la chimie qui étudie les flux d'énergie au cours des réactions chimiques [212]. Elle peut être appliquée dans de nombreux domaines, dont la biochimie pour la caractérisation des interactions entre biomolécules. L'objectif principal de la thermodynamique chimique est de déterminer la faisabilité et la spontanéité d'une réaction. Pour ce faire, la thermodynamique chimique ne s'intéresse pas à la trajectoire d'une transformation mais aux états initiaux et finaux du système thermodynamique qui sont proches de l'équilibre. Un système

thermodynamique est un volume physique de l'espace qui peut ou non échanger de l'énergie ou de la matière avec le reste de l'univers : un système fermé n'échange que de l'énergie et un système isolé n'échange ni matière ni énergie [213], . Les états thermodynamiques du système peuvent être décrits par des variables d'état telles que la température, la pression et les fonctions d'état. Les fonctions d'état thermodynamiques les plus courantes sont l'enthalpie (H), l'entropie (S) et l'enthalpie libre (G). Ces fonctions d'état sont indépendantes du chemin de réaction et ne dépendent que de l'état initial et de l'état final [214].

Les paramètres thermodynamiques d'une interaction cible-ligand peuvent être déterminées de manière expérimentale ou théorique, notamment par titrage calorimétrique isotherme (ITC), par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et très récemment par MST.

### 6.1. Titrage calorimétrique isotherme ou ITC

Bien que les instruments d'ITC disponibles dans le commerce aient permis à un nombre croissant de laboratoires de mesurer les données calorimétriques des interactions cible-ligand il arrive souvent que la valeur de  $K_d$  dérivée d'une mesure ITC soit le seul paramètre ayant une valeur pour la découverte d'un composé "hit"<sup>8</sup>, alors que d'autres paramètres tels que  $\Delta H$  et  $\Delta S$  sont ignorés, ce qui peut mener à la mise de côté d'un composé qui pourrait devenir un "hit" en étant amélioré. D'autre part, les études ont montré que les composés ayant de meilleures propriétés thermodynamiques sont plus susceptibles de devenir les meilleurs médicaments de leur catégorie [212]. En outre, il existe de nombreux exemples où les données thermodynamiques ont été appliquées avec succès à la découverte de nouveaux médicaments [213], [214].

Le principe général de l'ITC a été détaillé dans la partie 3.4. de ce manuscrit, et ses applications pour la détermination de  $K_d$  y ont été exposées. L'ITC est une technique capable de déterminer à la fois l'enthalpie et l'entropie d'une interaction en une seule expérience [215]. Les données obtenues par ITC sur la liaison de peptides à des domaines uniques d'enzymes suggèrent qu'il y a un manque de spécificité imposé par ces interactions [216]. De nombreuses protéines impliquées dans la signalisation cellulaire possèdent plus d'un domaine. Il a été suggéré que, pour augmenter la spécificité, la liaison de deux domaines pourrait être importante. Par exemple, la liaison de deux domaines à un ligand unique augmenterait potentiellement l'affinité en raison de l'effet coopératif des sites de liaison individuels sur les domaines. Cet effet devrait se manifester par un terme  $\Delta G$  plus

---

<sup>8</sup> Un composé "hit" est une molécule qui présente le type d'activité souhaité vers une cible médicamenteuse lors d'un essai de criblage pour la découverte de médicaments.

favorable que les termes  $\Delta G$  additifs pour les interactions des domaines individuels. L'ITC a été utilisé pour mesurer la liaison de domaines combinés à des ligands peptidiques portant les sites d'interaction appropriés. Dans la plupart des cas, aucune augmentation significative de l'affinité n'a été observée [217]. Un exemple de cette observation provient d'une étude de la liaison de la protéine Fyn (une tyrosine kinase) à la kinase d'adhésion focale (FAK) [218]. Fyn se lie à FAK par l'intermédiaire des interactions de ses domaines SH2 et SH3 (Figure 28).

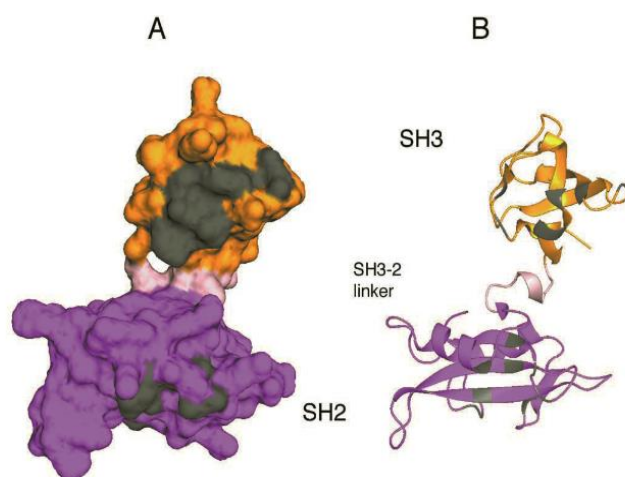


Figure 28: Structure cristalline des domaines SH2 et SH3 de Fyn, montrant sa surface moléculaire (A) et sa structure secondaire (B). Les résidus connus pour interagir avec les peptides (ligands) sont indiqués en gris [218].

L'ITC a été utilisée pour déterminer les paramètres thermodynamiques associés à l'interaction des domaines SH2 et SH3 de Fyn à leurs ligands connus de manière isolée, ainsi qu'à l'interaction des deux domaines à un peptide contenant les deux motifs de reconnaissance. Le niveau de spécificité de la liaison des peptides contenant les motifs de reconnaissance aux domaines individuels, pYEEI et PXXP (Tableau 1) a pu être comparé à celui de la liaison du peptide FAK intact.

Tableau 1: Liaison de peptides aux domaines SH2 et SH3 de Fyn [217]

| Peptide                                | $K_d$<br>( $\mu M$ ) | $\Delta H_{obs}$<br>( $kJ mol^{-1}$ ) | $T\Delta S_{obs}$<br>( $kJ mol^{-1}$ ) | $\Delta G_{obs}$<br>( $kJ mol^{-1}$ ) |
|----------------------------------------|----------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|
| pYEEI                                  | 2.5                  | -45                                   | -13                                    | -32                                   |
| PXXP                                   | 62.0                 | -68                                   | -43                                    | -25                                   |
| <b>Sum of thermodynamic parameters</b> |                      | <b>-113</b>                           |                                        | <b>-57</b>                            |
| FAK peptide                            | 0.19                 | -132                                  | -94                                    | -38                                   |

Les termes  $\Delta H$  et  $\Delta S$  dérivés des expériences ITC révèlent que l'incapacité à produire la valeur  $\Delta G$  supérieure à la valeur additive attendue est en grande partie le résultat d'un effet entropique défavorable. Ainsi, bien que l'interaction du peptide FAK augmente le nombre net/la force des interactions non covalentes dans le complexe, il y a une pénalité entropique importante. Il peut s'agir d'une conséquence d'un changement de conformation nécessaire pour aligner les sites de liaison sur le peptide afin de permettre l'interaction avec le polypeptide contenant le domaine SH2-SH3 [217].

Ce travail souligne l'importance d'étudier les protéines entières, et pas seulement leurs domaines catalytiques, lors des études d'interaction cible-ligand.

Une analyse détaillée de la thermodynamique des interactions entre les petites molécules et les protéines est extrêmement importante pour le développement de médicaments efficaces. Un modèle général dans le développement de médicaments est que la liaison guidée par l'enthalpie produit des médicaments plus efficaces avec des propriétés physicochimiques supérieures à celles de la liaison guidée par l'entropie [212]. La calorimétrie de titrage isotherme (ITC) est largement utilisée pour déterminer ces paramètres, car elle donne un accès direct à  $\Delta H$  et  $K_d$ . Cependant, la solubilité des ligands pose souvent des problèmes lors de la détection des interactions de faible affinité car les ligands doivent être présents à une concentration très élevée, et la technique nécessite des quantités considérables de molécules cibles et de ligands, ainsi que du temps d'expérimentation, car de nombreuses expériences d'équilibrage, de dialyse<sup>9</sup> et de contrôle sont nécessaires pour produire des données de haute qualité.

## 6.2. Calorimétrie différentielle à balayage ou DSC

La DSC (*Differential scanning calorimetry*) est un outil thermodynamique couramment utilisée permettant d'évaluer l'absorption d'énergie thermique qui se produit dans un échantillon lors d'une augmentation ou d'une diminution régulée de la température. Dans une expérience DSC, l'énergie est introduite simultanément dans une cellule échantillon (qui contient une solution avec la molécule d'intérêt) et une cellule de référence (qui contient uniquement le solvant). Les températures des deux cellules sont augmentées de manière identique au fil du temps. La différence d'énergie requise pour

---

<sup>9</sup> Purification fondée sur la propriété que possèdent certains corps de traverser plus facilement que d'autres les membranes poreuses. La dialyse est la méthode la plus utilisée pour changer la concentration en sels d'une solution protéique. Ainsi, les protéines dans une concentration de sels donnée sont séparées d'une solution à la concentration en sels différente par une membrane poreuse. En utilisant un volume de tampon de dialyse beaucoup plus grand que celui de la solution protéique, on changera rapidement la teneur en sels de celle-ci en la même que celle du tampon de dialyse.

faire correspondre la température de l'échantillon à celle de la référence correspond à la quantité de chaleur excédentaire absorbée ou libérée par la molécule dans l'échantillon (au cours d'un processus endothermique ou exothermique respectivement) [219], [220]. En raison de la présence de la molécule d'intérêt, il faut plus d'énergie pour amener l'échantillon à la même température que la référence. La DSC mesure la capacité thermique excédentaire d'une solution ( $C_p$ ) de la molécule d'intérêt en fonction de la température [221].

Par exemple, Kędracka-Krok *et al.* [222] ont mené une étude d'interaction par DSC entre un antibiotique et son enzyme cible. Le répresseur de tétracycline (TetR), qui constitue le mécanisme le plus courant de résistance bactérienne à un antibiotique, est une protéine homodimérique<sup>10</sup>. La fixation de la tétracycline (Tet) dans la poche protéique s'accompagne de changements de conformation de TetR, qui empêchent l'interaction spécifique entre la protéine et l'ADN. Les résultats de la DSC montrent qu'en l'absence de Tet, les transitions thermiquement induites de TetR peuvent être décrites comme un processus irréversible, dépendant fortement de la vitesse de balayage et indiquant que la dénaturation de la protéine est sous contrôle cinétique. D'autre part, en présence de Tet, le dépliage thermique de la protéine peut être décrit par un modèle à deux états. Dans ce modèle, TetR subit un dépliement coopératif avec Tet caractérisé par un  $\Delta H$  et un  $\Delta S$  de 1 067 kJ.mol<sup>-1</sup> et 3,1 kJ.mol<sup>-1</sup>, respectivement.

Bien que principalement utilisée pour des études de matériaux solides, tels que les polymères, les études d'interaction cible-ligand sont possibles par DSC. Cependant, en plus de présenter les mêmes limitations que l'ITC, la DSC est une technique destructive et nécessite plusieurs milligrammes de cible et de ligand pour déterminer les paramètres thermodynamiques de l'interaction.

### 6.3. Thermophorèse à micro-échelle ou MST

Afin d'accélérer le processus de détermination des paramètres thermodynamiques, en n'utilisant qu'une fraction de la cible, du ligand et du temps nécessaires aux études par ITC et DSC, une analyse de Van't Hoff en utilisant MST peut être réalisée [223]. Dans ce cas, l'évolution de  $K_d$  est contrôlée en le mesurant de manière répétée à des températures croissantes. La dépendance de  $K_d$  à la température est ensuite utilisée pour extrapoler les valeurs de  $\Delta H$ ,  $\Delta G$  et  $\Delta S$ , de sorte qu'il soit possible d'effectuer une caractérisation thermodynamique d'une interaction protéine-petite molécule avec

---

<sup>10</sup> Protéine constituée de deux sous-unités identiques.

seulement 1 à 10 pg de protéine en quelques heures. André et Breitsprecher [224] ont rapporté une analyse thermodynamique des interactions biomoléculaires à l'aide de la MST. En utilisant l'hybridation de l'ADN avec des oligonucléotides marqués par fluorescence, les variations de  $K_d$  ont été mesurées sur une gamme de températures, puis l'enthalpie libre ( $\Delta H$ ) et l'entropie ( $\Delta S$ ) de la réaction d'hybridation ont été calculées. Précisément, les courbes d'affinité entre le brin d'ADN et son brin complémentaire (*perfect oligonucleotide match*) ont été obtenues par MST à différentes températures (Figure 29a).

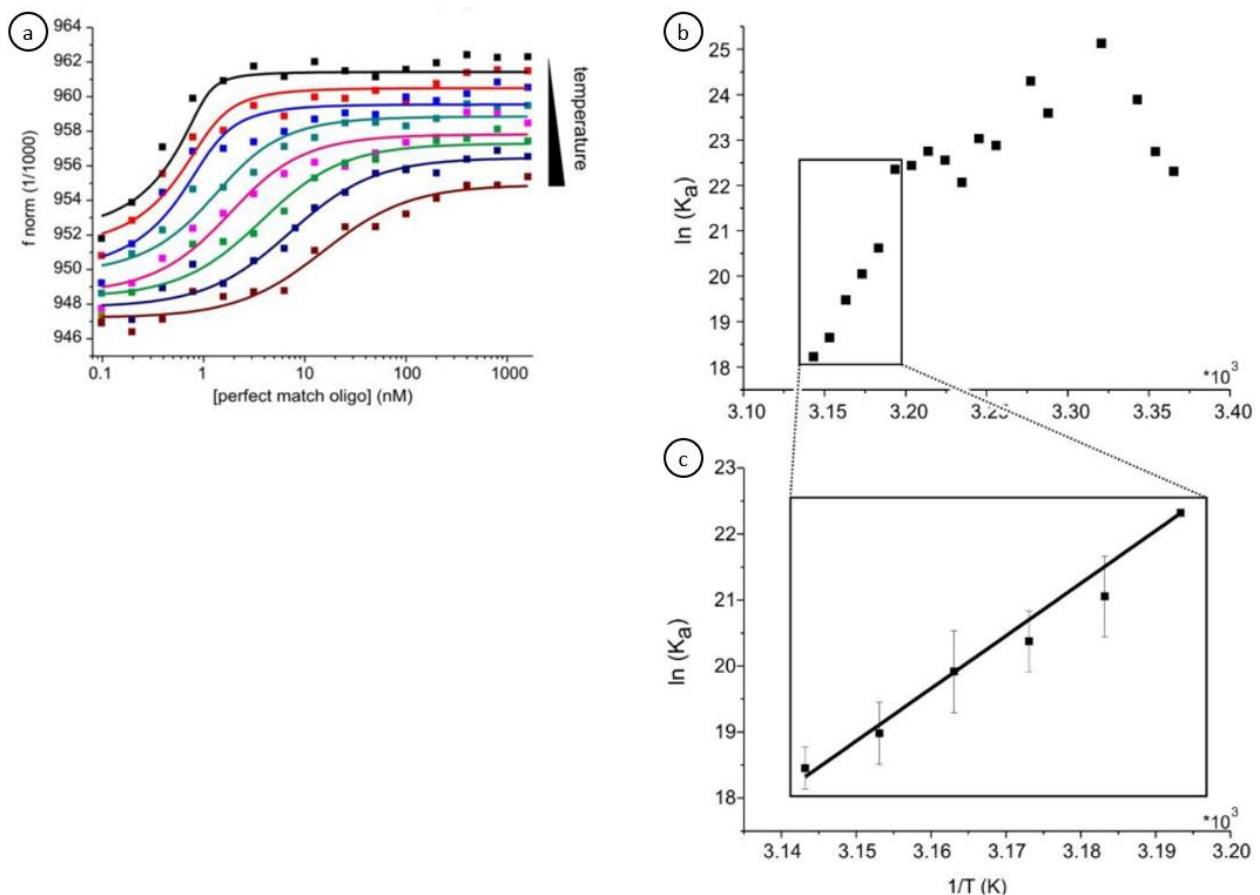


Figure 29: Détermination des paramètres thermodynamique de l'hybridation de l'ADN par MST. (a) Courbes d'affinité sur une plage de température de 38 °C à 45 °C ; incréments de 1 °C. (b) Tracé de Van't Hoff d'un ensemble complet de valeurs de  $K_a$  de de l'hybridation de l'ADN. (c) Tracé de Van't Hoff et régression linéaire correspondante, dont l'équation permet de déterminer les paramètres thermodynamiques de l'interaction.

Les  $K_d$  obtenus à partir des courbes d'affinité ont ensuite été utilisés pour représenter l'équation de Van't Hoff. A savoir, c'est le logarithme népérien de la constante d'affinité  $K_a$  ( $K_a = \frac{1}{K_d}$ ) qui est tracé en fonction de l'inverse de la température de mesure en Kelvin (Figure 29b).

Enfin, les paramètres thermodynamiques de la réaction ( $\Delta S$ ,  $\Delta H$  et  $\Delta G$ ) ont été calculés en exploitant la zone linéaire du tracé de Van't Hoff (Figure 29c). L'enthalpie ( $\Delta H$ ) peut être déterminée à partir de la pente de la courbe, et l'entropie ( $\Delta S$ ) à partir de l'ordonnée à l'origine (équation 14).

$$\ln(K_a) = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (14)$$

Une fois  $\Delta H$  et  $\Delta S$  calculés, la variation de l'énergie libre de Gibbs  $\Delta G$  peut être déterminée à l'aide de l'équation 15 :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (15)$$

La MST se révèle ainsi être une technique prometteuse pour la détermination des paramètres thermodynamiques d'une interaction cible-ligand, mais la littérature ne présente pas encore de résultats concernant les interactions enzyme-ligand.

## 6.4. Docking

Dans le cadre de cette thèse, nous voulons étudier les interactions entre les LIM Kinases et leurs ligands. Le docking moléculaire est un outil clé de la biologie moléculaire structurale et de la conception de médicaments assistée par ordinateur. L'objectif de cette technique est de prédire le(s) mode(s) de liaison prédominant(s) d'un ligand avec une protéine dont la structure tridimensionnelle est connue, le plus souvent grâce à la cristallographie aux rayons X ou à la RMN. Dans cette thèse, nous voulons déterminer les paramètres thermodynamiques des interactions LIMK/ligand mais aussi trouver de nouveaux composés, qui pourraient être des ligands plus affins que ceux disponibles sur le marché. C'est pourquoi le docking est une technique intéressante dans le cadre de cette étude. Les méthodes de docking utilisent une fonction de notation qui classe les composés candidats en fonction de leurs interactions avec la cible. Le docking peut être utilisé pour effectuer un criblage virtuel sur de grandes bibliothèques de composés, classer les résultats et proposer des hypothèses structurales sur la manière dont les ligands se lient à la cible, ce qui est inestimable pour l'optimisation de potentiels médicaments.

AutoDock [225], GOLD [226] et FlexX [227] sont les programmes de docking les plus populaires, mais le nombre de programmes de docking est élevé et ne cesse d'augmenter [228]. AutoDock4 [225] utilise un algorithme génétique lamarckien (LGA). Le programme utilise une fonction basée sur le

champ de force AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*). La licence académique gratuite d'AutoDock ainsi que la précision et la grande polyvalence du programme ont favorisé l'utilisation généralisée d'AutoDock, ce qui explique le nombre très élevé de citations. AutoDock Vina est l'un des programmes *open-source* les plus rapides et les plus utilisés pour le docking moléculaire. Il s'agit d'une version avancée de la suite AutoDock, conçue pour prédire les modes de liaison et les affinités des ligands avec les cibles biologiques. AutoDock Vina présente plusieurs avantages par rapport à AutoDock 4 dont une fonction de notation améliorée, un paramétrage simplifié et un développement open source. C'est donc le programme que nous avons choisi d'utiliser afin de déterminer les énergies libres de Gibbs des interactions entre les LIM Kinases et leurs ligands. Les étapes de docking par AutoDock Vina sont les suivantes :

1. Préparation du ligand et de la cible : Avant d'effectuer des simulations de docking avec AutoDock Vina, les molécules du ligand et de la cible (récepteur) doivent être préparées. Cela implique de convertir les structures moléculaires dans des formats lisibles par AutoDock Vina et de s'assurer que les états de protonation sont corrects, que les types d'atomes sont corrects et que les définitions des sites de liaison sont appropriées.
2. Recherche basée sur une grille : AutoDock Vina utilise un algorithme de recherche basé sur une grille pour explorer l'espace conformationnel des ligands dans le site de liaison de la molécule cible. Cette approche basée sur une grille permet d'échantillonner efficacement les poses d'interactions potentielles.
3. Fonction de notation : AutoDock Vina utilise une fonction de notation empirique pour évaluer les interactions entre le ligand et la cible. La fonction de notation prend en compte différents facteurs, notamment les interactions de van der Waals, la liaison hydrogène, les interactions électrostatiques et les énergies de désolvatation.
4. Optimisation basée sur le gradient : Contrairement à la version originale d'AutoDock qui utilise un algorithme génétique lamarckien pour l'optimisation, AutoDock Vina emploie un algorithme d'optimisation itératif basé sur le gradient. Cette approche permet une exploration plus rapide et plus précise de l'espace conformationnel du ligand.
5. Résultat : Une fois les simulations de docking terminées, AutoDock Vina génère des fichiers de sortie contenant des informations sur les modes de liaison prédits des ligands, ainsi que les affinités de liaison correspondantes. Les utilisateurs peuvent analyser ces résultats pour identifier les interactions cible-ligand potentielles et sélectionner des composés prometteurs pour une étude plus approfondie [229].

Par exemple, Rockey *et al.* [230] ont présenté une approche de la modélisation des énergies d'interaction d'un inhibiteur avec de nombreuses kinases qui peut être utilisée pour distinguer les cibles et les non-cibles de l'inhibiteur. Ils ont utilisé AutoDock avec sa fonction d'énergie plus sophistiquée pour calculer les énergies de liaison inhibiteur-kinase dans le cadre de l'hypothèse de l'inhibiteur fixe (l'inhibiteur a été maintenu dans la position qu'il adopte dans la structure cristalline de l'inhibiteur-kinase). Les énergies de liaison calculées pour le SB203580, le purvalanol B, l'imatinib, le H89 et l'hymenialdisine sont présentées dans le Tableau 2. A l'exception du purvalanol B, les cibles connues ont systématiquement montré des énergies d'interaction plus favorables (plus négatives) que les non-cibles.

Tableau 2 : Énergies de liaison calculées avec AutoDock. Les kinases identifiées comme cibles expérimentales de l'inhibiteur sont indiquées par des cases grisées. La notation  $\Delta E$  correspond au calcul d'énergie libre de Gibbs, notée  $\Delta G$  dans le reste de ce manuscrit. [230]

| SB203580 <sup>1PME</sup> |            | SB203580 <sup>1A9U</sup> |            | Purvalanol B   |            | Imatinib       |            | H89             |            | Hymenialdisine |            |
|--------------------------|------------|--------------------------|------------|----------------|------------|----------------|------------|-----------------|------------|----------------|------------|
| Kinase                   | $\Delta E$ | Kinase                   | $\Delta E$ | Kinase         | $\Delta E$ | Kinase         | $\Delta E$ | Kinase          | $\Delta E$ | Kinase         | $\Delta E$ |
| LCK                      | -11.14     | p38 $\beta$              | -10.28     | CK1 $\alpha$   | -18.02     | PKA            | -20.36     | PKA             | -12.17     | CK1 $\alpha$   | -12.73     |
| p38 $\beta$              | -11.11     | p38 $\alpha$             | -10.26     | cdc2           | -17.57     | ABL            | -20.23     | PKB $\alpha$    | -11.81     | CDK2           | -12.44     |
| p38 $\alpha$             | -10.91     | p38 $\delta$             | -8.89      | CDK4           | -17.46     | PDGFR $\alpha$ | -20.08     | MKK1b           | -11.77     | cdc2           | -12.42     |
| MKK1b                    | -10.58     | p38 $\gamma$             | -8.87      | PKC $\eta$     | -17.15     | PDGFR $\beta$  | -20.04     | MSK1            | -11.76     | CDK3           | -12.42     |
| S6K1                     | -10.56     | ROCK2                    | -8.82      | PKC $\gamma$   | -17.08     | LYN            | -19.91     | S6K1            | -11.69     | CDK5           | -12.38     |
| MSK1                     | -10.54     | AMPK $\alpha$ 1          | -8.76      | PKC $\epsilon$ | -17.03     | KIT            | -19.88     | MKK1            | -11.58     | CDK6           | -12.32     |
| SGK                      | -10.39     | PKA                      | -8.62      | PKC $\delta$   | -16.94     | SRC            | -19.80     | MKK2            | -11.51     | CDK4           | -12.32     |
| CHK1                     | -10.36     | PKC $\alpha$             | -8.51      | DYRK1A         | -16.92     | EGFR           | -19.66     | AMPK $\alpha$ 1 | -11.26     | PKA            | -11.96     |
| GSK3 $\beta$             | -10.25     | PKB $\alpha$             | -8.50      | PKC $\alpha$   | -16.89     | PKC $\alpha$   | -19.51     | CHK1            | -11.25     | SRC            | -11.72     |
| Erk2                     | -10.06     | LCK                      | -7.99      | PKC $\beta$    | -16.87     | PKC $\beta$    | -19.37     | LCK             | -11.20     | ABL            | -11.71     |
| PKA                      | -10.02     | MKK2                     | -6.72      | CDK2           | -16.75     | PKC $\epsilon$ | -19.12     | PKC $\alpha$    | -11.11     | PKC $\delta$   | -11.63     |
| PRAK                     | -9.96      | PRAK                     | -4.94      | CDK5           | -16.68     | PKC $\eta$     | -19.10     | p38 $\delta$    | -9.73      | PKC $\epsilon$ | -11.61     |
| PKB $\alpha$             | -9.94      | JNK1                     | -4.68      | cdc28          | -16.63     | FGFR1          | -18.38     | p38 $\gamma$    | -9.72      | PKC $\eta$     | -11.60     |
| MKK2                     | -9.86      | MKK1                     | -4.22      | ABL            | -16.62     | PKC $\gamma$   | -18.33     | p38 $\beta$     | -9.62      | PKC $\gamma$   | -11.42     |
| AMPK $\alpha$ 1          | -9.65      | S6K1                     | 23.29      | INSR           | -16.53     | CK1 $\alpha$   | -12.33     | p38 $\alpha$    | -8.76      | GSK3 $\beta$   | -11.33     |
| PKC $\alpha$             | -9.46      | MSK1                     | 23.36      | PKA            | -16.36     | cdc2           | 14.71      | SGK             | -8.10      | PKG1           | -11.33     |
| ROCK2                    | -9.38      | GSK3 $\beta$             | 23.45      | Erk1           | -16.11     | CK2 $\alpha$ 1 | 15.40      | Erk2            | -7.53      | Eg2            | -11.18     |
| MKK1                     | -9.12      | SGK                      | 23.45      | JNK1           | -15.29     | PHK $\gamma$ 1 | 17.16      | GSK3 $\beta$    | -7.42      | PKC $\beta$    | -11.13     |
| p38 $\gamma$             | -8.96      | MKK1b                    | 23.48      | PKG1           | -15.13     | PKC $\zeta$    | 34746.38   | ROCK2           | -7.28      | PKC $\alpha$   | -11.12     |
| p38 $\delta$             | -8.92      | CHK1                     | 23.53      | PKC $\zeta$    | -12.97     |                |            | JNK1            | -6.36      | ASK $\gamma$   | -11.11     |
| JNK1                     | -8.72      | Erk2                     | 25.31      | ARAF           | -12.81     |                |            | PRAK            | -5.73      | MKK1           | -11.05     |
| PDK1                     | 1208.85    | PDK1                     | 282.21     | GSK3 $\beta$   | -7.53      |                |            | PHK $\gamma$ 1  | 3.58       | INSR           | -10.70     |
| PHK $\gamma$ 1           | 116105.19  | CK2 $\alpha$ 1           | 49991.23   | CK2 $\alpha$ 1 | -5.44      |                |            | CK2 $\alpha$ 1  | 27.20      | CK2 $\alpha$ 1 | -9.34      |
| CK2 $\alpha$ 1           | 116112.83  | PHK $\gamma$ 1           | 49995.22   |                |            |                |            | PDK1            | 8577.08    | Erk1           | 6.45       |
|                          |            |                          |            |                |            |                |            |                 |            | Erk2           | 6.45       |
|                          |            |                          |            |                |            |                |            |                 |            | JNK1           | 7.38       |
|                          |            |                          |            |                |            |                |            |                 |            | PKC $\zeta$    | 11.48      |
|                          |            |                          |            |                |            |                |            |                 |            | ARAF           | 11.68      |

Cette étude montre que l'outil Autodock peut identifier des cibles communes appartenant à des familles de kinases différentes. Bien que la méthode ne soit pas parfaite, notamment en raison de la rigidité de la cible enzymatique, son efficacité de calcul devrait en faire un complément très utile aux

approches expérimentales bien plus précises mais plus longues, en particulier lorsqu'il s'agit de criblages d'un grand nombre de composés vis-à-vis d'un grand nombre de cibles potentielles.

Les méthodes informatiques, appliquées dès les premières étapes du processus de conception de médicaments, utilisent la technologie actuelle pour fournir des informations précieuses sur la compréhension des systèmes chimiques de manière virtuelle, en complément de l'analyse expérimentale. Le docking est une méthode *in silico* employée pour prévoir les modes de liaison de petits composés ou de macromolécules en contact avec une cible et pour prédire leurs interactions moléculaires. En outre, la méthodologie offre la possibilité de classer ces composés selon une hiérarchie déterminée à l'aide de fonctions de notation particulières. Les protocoles de docking font appel à de nombreuses approximations et la plupart d'entre eux manquent de flexibilité au niveau des cibles. Par conséquent, la fiabilité des complexes protéine-ligand obtenus est incertaine. L'association avec les techniques de dynamique moléculaires, plus coûteuses mais plus précises, apporte un complément significatif au docking.

Les simulations de dynamique moléculaires peuvent être utilisées avant le docking puisqu'une série de conformations protéiques "nouvelles" peuvent être identifiées du traitement des données de dynamique moléculaire et utilisées comme cibles pour le docking. Elles peuvent également être utilisées *a posteriori* pour optimiser les structures des complexes finaux issus de du docking, calculer des énergies d'interaction plus détaillées et fournir des informations sur le mécanisme d'interaction du ligand. La liaison comporte deux étapes, la désolvatation et l'association. L'eau est omniprésente et se trouve à des concentrations élevées, mais elle est généralement ignorée. Les expériences *in vitro* utilisent généralement des conditions de dilution infinie, alors qu'*in vivo*, la concentration d'eau est réduite en raison de la présence de fortes concentrations dans le milieu cellulaire. Toutefois, le docking, même de petits peptides, reste compliqué [231].

## 7. LIM Kinases

La phosphorylation offre un moyen de réguler l'activité des protéines et leur localisation subcellulaire. L'ajout ou le retrait d'un groupe phosphate sur une protéine peut modifier ses propriétés structurales, sa stabilité et sa dynamique. En outre, la majorité des voies de signalisation impliquent un vaste ensemble d'interactions protéine-protéine, et la phosphorylation peut être utilisée pour réguler et moduler la liaison protéine-protéine [232]. Les kinases, enzymes assurant la phosphorylation de leur substrat, représentent une grande famille d'enzyme au vu du grand nombre de gènes (plus de 500) codant pour des protéines kinases, qui représentent près de 2 % des gènes codant pour des protéines humaines [233]. Au sein des kinases, une sous famille appelée LIM Kinases, suscite un grand intérêt dans la recherche de nouveaux médicaments. En raison de leur rôle clé dans la phosphorylation de la cofiline (transfert d'un groupement phosphate de l'ATP à la cofiline, donnant de l'ADP et de la cofiline phosphorylée) et dans la dynamique du cytosquelette, les LIMK sont devenues des cibles prometteuses pour le traitement de ces différentes pathologies. Cependant, depuis la découverte des premiers inhibiteurs de LIMK par Bristol-Myers-Squibb (BMS) en 2008 [234], une seule molécule, LX7101 [184], a atteint les essais cliniques pour le traitement du glaucome sans résultats publiés depuis [235].

Les LIM Kinases s'avèrent donc être des cibles prometteuses, mais malgré le grand nombre d'équipes cherchant un inhibiteur spécifique de LIMK, ce composé n'a pas été trouvé. Cela est probablement dû au fait que la plupart des études de LIMK se déroulent dans des conditions loin des conditions physiologiques. Nous avons choisi LIMK1 et LIMK2 comme preuve de concept afin de développer nos méthodes de MST et de CE dans des conditions proches de l'*in vivo*, à savoir dans le lysat cellulaire non purifié.

### 7.1 Caractéristiques

LIM Kinase 1 (LIMK1) fut découverte en 1994 [236], [237] et nommée ainsi car c'est la première kinase découverte à posséder deux domaines LIM. Une nouvelle LIM Kinase partageant 51% de similarité avec LIMK1, LIMK2, fut découverte un an après [238]. Les LIM kinases présentent une expression spécifique au type de cellule et une localisation cellulaire différente [239]. LIMK1 est particulièrement exprimée dans le cerveau, le cœur, les muscles du squelette, les reins et les poumons [240], [241], tandis que LIMK2 est plus largement exprimée dans les tissus adultes et embryonnaires [239]. Les LIM kinases agissent comme *downstream effectors* des membres de la

famille des GTPases Rho [242]. LIMK1 et LIMK2 sont respectivement activées par une phosphorylation en Thr508 et Thr505 [243], [244]. Les LIM kinases sont impliquées dans la dynamique du cytosquelette en remodelant indépendamment les filaments d'actine et les microtubules. Ce sont des kinases doubles qui phosphorylent les résidus sérine ou thréonine et les résidus tyrosine. Leurs substrats les plus largement étudiés sont les membres de la famille des facteurs de dépolymérisation de l'actine/cofiline (ADF/cofiline) : cofiline1 (cofiline non musculaire, ou n-cofiline), cofiline2 (cofiline musculaire, ou m-cofiline) et destrine (également connue sous le nom de facteur de dépolymérisation de l'actine, ou ADF), généralement regroupés sous le terme de cofiline [245]. Une fois activées, les LIM kinases inactivent les protéines ADF/cofiline en phosphorylant leur Sérine 3, les rendant incapables de sectionner les polymères d'actine et induisant l'accumulation d'actine filamentueuse (F-actine), la formation de fibres de stress d'actine, et impactant la dynamique du cytosquelette [244]. Outre leur activité sur le cytosquelette d'actine, il a été démontré que les LIM kinases jouent un rôle dans le renouvellement des microtubules en favorisant la formation de tubuline libre [246], [247], mais l'implication moléculaire des kinases dans ce processus n'a pas encore été élucidée. LIMK1 et LIMK2 possèdent deux domaines LIM (en N-terminal), un domaine PDZ, une région riche en sérine/proline, et un domaine kinase en C-terminal (Figure 30) [248]. Le motif DFG à la base de la boucle d'activation (Figure 31) peut passer de la conformation DFG-in (vers "l'intérieur" de la cavité de LIMK) à la conformation DFG-out ((vers "l'extérieur" de la cavité de LIMK). Ce n'est que dans la conformation DFG-in que la kinase est capable de se lier à l'ATP et de catalyser la réaction du transfert du groupement phosphate à la cofiline [249].

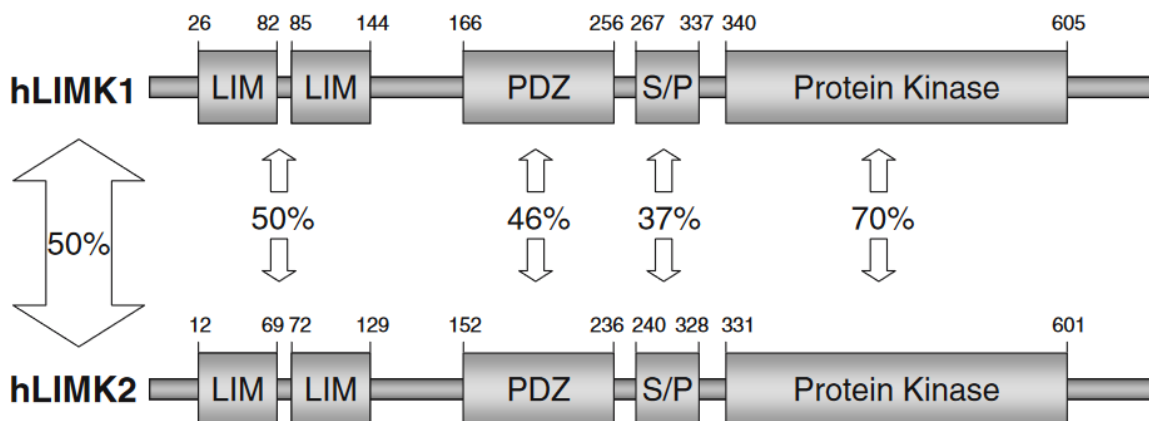


Figure 30: LIMK1 et LIMK2 possèdent deux domaines LIM, un domaine PDZ, une zone riche en sérine et proline et un domaine Kinase [250].

Les deux domaines LIM sont stabilisés par des ions de zinc [249], ce qui rend la purification de ces protéines compliquée et même non souhaitable : afin de conserver leurs structures intact, les LIM Kinases ont intérêt à être étudiée dans une matrice telle que le lysat cellulaire.

En plus d'avoir un site actif proche de celui des autres kinases (puisque'elles ont presque toutes l'ATP comme substrat), LIMK1 et LIMK2 partagent une similarité de séquence globale de 50 %, et de 70 % pour leurs domaines kinases [238], [251]. Il est donc très complexe de développer un inhibiteur spécifique de LIMK1 ou de LIMK2.

Comme cela a été dit précédemment, les LIM Kinases assurent le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP à la cofiline. Lorsque l'ATP- $\gamma$ -S est lié à son site actif, LIMK1 adopte la conformation canonique de la kinase active ( $\alpha$ C-in) (Figure 31).

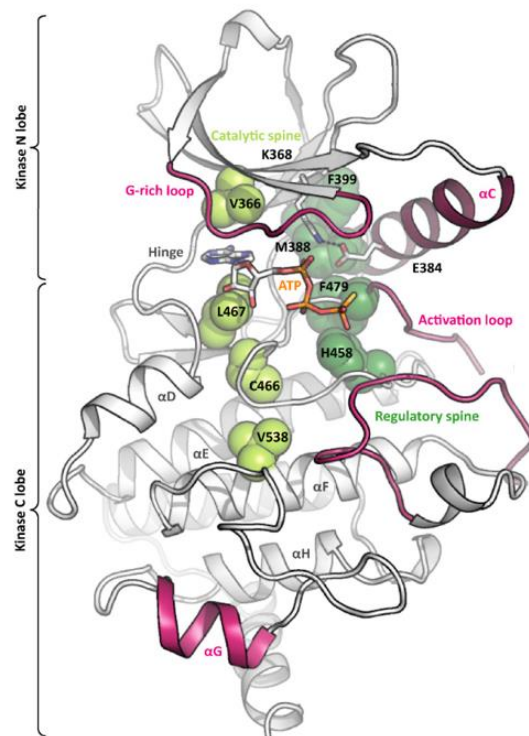


Figure 31: Représentation de l'interaction entre le domaine kinase de LIMK1 et l'ATP- $\gamma$ -S [249].

L'ATP- $\gamma$ -S est une forme modifiée de l'adénosine triphosphate (ATP) dont le groupe phosphate terminal  $\gamma$  est remplacé par un groupe sulfonyl ( $\text{SO}_3$ ) pour former une liaison thiophosphate. Cette modification rend l'ATP- $\gamma$ -S résistant à l'hydrolyse. L'ATP- $\gamma$ -S est utilisée comme un analogue de l'ATP pour étudier les interactions protéine-ATP.

## 7.2 Inhibiteurs des LIM Kinases

Différents inhibiteurs, mimant ou non l'ATP, ont été développés afin d'inhiber les LIM Kinases. Les quelques-uns disponibles dans le commerce ont été utilisés pour les travaux de cette thèse et sont regroupés dans la Figure 32.

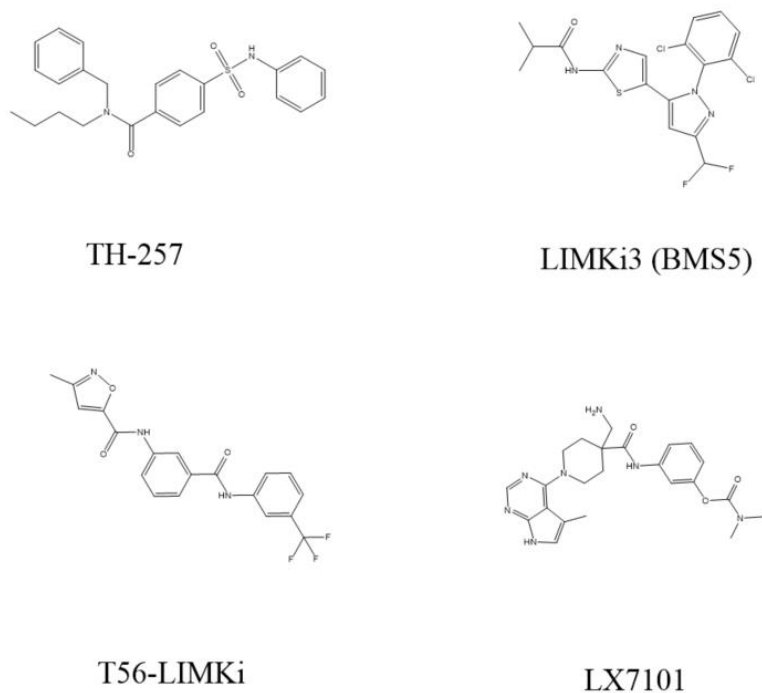


Figure 32 : Structures des inhibiteurs commerciaux de LIMK étudiés dans le cadre de cette thèse.

La liaison des petites molécules inhibitrices déforme souvent la conformation des kinases, stabilisant les conformations inactives de la kinase. Certains inhibiteurs occupent la poche arrière (*back pocket*) vide, stabilisant ainsi les LIMK dans la conformation DFG-out. Notamment, même en l'absence d'inhibiteurs, les domaines kinases des LIMK peuvent adopter les deux conformations DFG-in et DFG-out, ce qui suggère une faible barrière énergétique (le passage continu de DFG-in à DFG-out) entre les deux conformations [252].

Les exemples les plus efficaces d'inhibiteurs de LIMK rapportés à ce jour sont basés sur des structures de pyrrolopyrimidines [184], [254], [255]. Une série d'inhibiteurs de LIMK non compétitifs (type III), c'est-à-dire qui ne se placent pas à la place de l'ATP dans le site actif de LIMK, a également été récemment rapportée [253]. LX71017 (*Lexicon Pharmaceuticals*) est à ce jour le seul inhibiteur de LIMK à avoir atteint les essais cliniques. Le LX7101 [184] a été évalué dans le cadre d'un essai de

phase I en tant qu'agent abaissant la pression intra-oculaire pour le traitement du glaucome. Ce composé conserve cependant une activité non négligeable contre les ROCK [254]. Comme les inhibiteurs de ROCK sont eux-mêmes des agents diminuant pression intra-oculaire [256], il est difficile de déterminer si les effets observés du LX7101 résultent d'une activité envers les LIMK, les ROCK ou les deux cibles.

Les études menées sur l'inhibition des LIM Kinases se concentrent principalement sur la détermination de l' $IC_{50}$  de l'inhibiteur, sauf pour le couple TH-257/Kin1 pour lequel le  $K_d$  a été déterminé (Tableau 3). Or, comme nous l'avons précédemment vu, l' $IC_{50}$  présente certaines limitations (notamment la dépendance aux paramètres expérimentaux, en particulier à la concentration de la cible étudiée) et la mesure des constantes de dissociations de ces inhibiteurs manque à la littérature. Les  $IC_{50}$  des inhibiteurs les plus étudiés ont été rassemblé dans le Tableau 3 et les structures des inhibiteurs correspondants dans la Figure 32.

Tableau 3 :  $IC_{50}$  ou  $K_d$  (nM) de différents inhibiteurs envers LIMK1/2 ou Kin1/2

|                                                                                                                                                                                                                                    | <i>Kin1</i>    <i>Kin2</i> | <i>Méthode, constante</i> | <i>LIMK1</i>    <i>LIMK2</i> | <i>Méthode, constante</i> | <i>Référence</i> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------|
| <b>LX7101</b>                                                                                                                                                                                                                      | 12    11                   | ■ $IC_{50}$               | 23    7                      | ▲ $IC_{50}$               | [162]            |
|                                                                                                                                                                                                                                    | 32    <i>n.d.</i>          | ● $IC_{50}$               | <i>n.d.</i>    4             | ● $IC_{50}$               | [184]            |
|                                                                                                                                                                                                                                    | <i>n.d.</i>    <i>n.d.</i> | <i>n.p.</i>               | 24    2                      | ● $IC_{50}$               | [257]            |
| <b>BMS-5 or LIMKi3</b>                                                                                                                                                                                                             | 7    8                     | ● $IC_{50}$               | <i>n.d.</i>    <i>n.d.</i>   | <i>n.p.</i>               | [234]            |
|                                                                                                                                                                                                                                    | 6    33                    | ■ $IC_{50}$               | 76    26                     | ▲ $IC_{50}$               | [162]            |
|                                                                                                                                                                                                                                    | 16    12                   | ■ $IC_{50}$               | 62    17                     | ▲ $IC_{50}$               | [105]            |
| <b>T56-LIMKi</b>                                                                                                                                                                                                                   | >10 000                    | ■ $IC_{50}$               | >10 000                      | ▲ $IC_{50}$               | [162]            |
| <b>TH-257</b>                                                                                                                                                                                                                      | 200    14                  | ■ $IC_{50}$               | 230    191                   | ▲ $IC_{50}$               | [162]            |
|                                                                                                                                                                                                                                    | 84    15                   | ■ $IC_{50}$               | 238    91                    | ▲ $IC_{50}$               | [105]            |
|                                                                                                                                                                                                                                    | 64    <i>n.d.</i>          | * $K_d$                   | <i>n.d.</i>    <i>n.d.</i>   | <i>n.p.</i>               | [105]            |
| <b>Annotations:</b> ■ RF-MS, RapidFire Mass spectrometry assay; ● Radiometric phosphorylation assay; ▲ Cellular NanoBRET assay; * ITC, Isothermal titration calorimetry; <i>n.d.</i> : non déterminé; <i>n.p.</i> : non pertinent. |                            |                           |                              |                           |                  |

Comme cela est visible dans le Tableau 3, aucune étude complète n'a été faite sur les LIM Kinases : aucun groupe n'a conduit d'étude sur LIMK1, LIMK2, Kin1 et Kin2 afin d'obtenir leurs activités ou leurs affinités pour les inhibiteurs. Cela est problématique à plusieurs niveaux. Tout d'abord, la plupart des études ont été menées sur des protéines purifiées (tous les résultats obtenus par RF-MS). La seule valeur de  $K_d$ , a été obtenue pour le couple TH-257/Kin1 sur des protéines purifiées exprimées dans des cellules d'insectes. C'est pour cela que nous avons décidé pour cette thèse de travailler à partir de protéines provenant de cellules de mammifères et plus précisément de cellules humaines. Dans les résultats présentés dans le Tableau 3 les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues par NanoBRET l'ont été sur des cellules de mammifères entières, ce sont donc les valeurs obtenues le dans les conditions le plus proche de celle *in vivo*. Les essais de radiométrie ont également été fait sur des protéines non purifiées, mais présentent les limitations qui ont été développées précédemment (multiples dangers pour l'environnement et concentration d'ATP beaucoup plus élevée que dans les conditions physiologiques).

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> présentes dans la littérature permettent de couvrir tous les couples LIMK/inhibiteur. Cependant, toutes ces valeurs ont été obtenues dans des conditions différentes (technique analytique, température, pH, purification ou non de LIMK, usage de marqueur ou de radioactivité, provenance des protéines...). Aucune équipe n'a proposé d'analyser, dans les mêmes conditions, les interactions LIMK1, LIMK2, Kin1, Kin2/inhibiteur, ce qui aurait été utile afin de classer les inhibiteurs entre eux.

Toutefois, les valeurs de  $K_d$  concernant l'interaction LIMK/inibiteurs manquent cruellement à la littérature. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier LIMK comme preuve de concept afin de développer une approche d'intérêt, basée sur la MST et le CE, qui permettra de combler d'une façon fiable les lacunes de la littérature.

## 8. Conclusion

L'objectif de ce travail de thèse étant d'étudier les interactions enzyme/ligand ainsi que l'activité enzymatique dans une matrice complexe, les méthodes d'analyse d'affinité enzyme-ligand, d'analyse de réaction enzymatique et de détermination de paramètres thermodynamiques ont été passé en revue. Bien que toutes les méthodes présentent des avantages et des inconvénients, la thermophorèse à micro échelle (MST) semble être un choix judicieux pour déterminer la constante de dissociation,  $K_d$ , dans

le lysat cellulaire. De plus, l'électrophorèse capillaire (CE) présente un réel intérêt pour les études d'activité des kinases dans une matrice complexe. Nous avons voulu évaluer la puissance de la combinaison de ces deux méthodes afin d'étudier des interactions enzyme/petit ligand dans le lysat cellulaire. Les LIM Kinases, impliquées dans de nombreuses maladies et devant être étudiées dans des conditions proches de *in vivo*, se présentent comme la preuve de concept parfaite pour l'étude combinée MST-CE présentée dans ce manuscrit. En outre, au-delà des méthodes permettant la détermination de l'affinité et de l'activité des LIM Kinases, ce chapitre présente les méthodes courantes de détermination des paramètres thermodynamiques d'une interaction, incluant la MST dont un des atouts majeurs consiste à pouvoir mener les études directement dans le lysat cellulaire. Combinée au docking moléculaire, ces méthodes permettent d'obtenir des informations précieuses ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$  et  $\Delta G$ ) sur les interactions enzyme/ligand. C'est donc la MST, combinée à la CE, qui sera présentée dans ce travail de thèse afin d'étudier les interactions LIMK/inhibiteur dans le lysat cellulaire sans purification.

## Références bibliographiques

- [1]D. C. Swinney, « Molecular Mechanism of Action (MMoA) in Drug Discovery », in *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, vol. 46, Elsevier, 2011, p. 301-317. doi: 10.1016/B978-0-12-386009-5.00009-6.
- [2]G. W. Caldwell, Z. Yan, W. Lang, et J. A. Masucci, « The IC50 Concept Revisited », *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 12, n° 11, p. 1282-1290, juin 2012, doi: 10.2174/156802612800672844.
- [3]E. C. Hulme et M. A. Trevethick, « Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation », *Br. J. Pharmacol.*, vol. 161, n° 6, p. 1219-1237, 2010, doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00604.x.
- [4]R. A. Copeland, D. L. Pompliano, et T. D. Meek, « Drug–target residence time and its implications for lead optimization », *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 5, n° 9, p. 730-739, sept. 2006, doi: 10.1038/nrd2082.
- [5]R. A. Copeland, « Conformational adaptation in drug–target interactions and residence time », *Future Med. Chem.*, vol. 3, n° 12, p. 1491-1501, sept. 2011, doi: 10.4155/fmc.11.112.
- [6]P. J. Tonge, « Drug–Target Kinetics in Drug Discovery », *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 9, n° 1, p. 29-39, janv. 2018, doi: 10.1021/acscchemneuro.7b00185.
- [7]N. Hh, P. J, K. S, et K. M, « Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications », *Sensors*, vol. 15, n° 5, mai 2015, doi: 10.3390/s150510481.
- [8]R. Bakhtiar, « Surface Plasmon Resonance Spectroscopy: A Versatile Technique in a Biochemist's Toolbox », *J. Chem. Educ.*, vol. 90, n° 2, p. 203-209, févr. 2013, doi: 10.1021/ed200549g.
- [9]E. Fabini et U. H. Danielson, « Monitoring drug–serum protein interactions for early ADME prediction through Surface Plasmon Resonance technology », *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 144, p. 188-194, sept. 2017, doi: 10.1016/j.jpba.2017.03.054.
- [10] P. P. Vachali, B. Li, A. Bartschi, et P. S. Bernstein, « Surface Plasmon Resonance (SPR)-Based Biosensor Technology for the Quantitative Characterization of Protein-Carotenoid Interactions », *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 572, p. 66-72, avr. 2015, doi: 10.1016/j.abb.2014.12.005.
- [11] E. Zeidan, C. L. Kepley, C. Sayes, et M. G. Sandros, « Surface plasmon resonance: a label-free tool for cellular analysis », *Nanomed.*, vol. 10, n° 11, p. 1833-1846, 2015, doi: 10.2217/nmm.15.31.

- [12] D. Kitagawa, M. Gouda, et Y. Kirii, « Quick Evaluation of Kinase Inhibitors by Surface Plasmon Resonance Using Single-Site Specifically Biotinylated Kinases », *SLAS Discov.*, vol. 19, n° 3, p. 453-461, mars 2014, doi: 10.1177/1087057113506051.
- [13] W.-T. Kuo *et al.*, « Quantitative Analysis of Ligand-EGFR Interactions: A Platform for Screening Targeting Molecules », *PLoS ONE*, vol. 10, n° 2, p. e0116610, févr. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0116610.
- [14] L. Ma *et al.*, « Generation and characterization of a human nanobody against VEGFR-2 », *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 37, n° 6, p. 857-864, juin 2016, doi: 10.1038/aps.2016.2.
- [15] D. Erickson, « Surface Plasmon Resonance Sensors », in *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, D. Li, Éd., Boston, MA: Springer US, 2008, p. 1939-1945. doi: 10.1007/978-0-387-48998-8\_1504.
- [16] A. H. Orrego, M. Romero-Fernández, M. D. C. Millán-Linares, M. D. M. Yust, J. M. Guisán, et J. Rocha-Martin, « Stabilization of Enzymes by Multipoint Covalent Attachment on Aldehyde-Supports: 2-Picoline Borane as an Alternative Reducing Agent », *Catalysts*, vol. 8, n° 8, Art. n° 8, août 2018, doi: 10.3390/catal8080333.
- [17] R. Jha, P. Gorai, A. Shrivastav, et A. Pathak, « Label-Free Biochemical Sensing Using Processed Optical Fiber Interferometry: A Review », *ACS Omega*, vol. 9, n° 3, p. 3037-3069, janv. 2024, doi: 10.1021/acsomega.3c03970.
- [18] W. Ott, E. Durner, et H. E. Gaub, « Enzyme-Mediated, Site-Specific Protein Coupling Strategies for Surface-Based Binding Assays », *Angew. Chem.*, vol. 130, n° 39, p. 12848-12851, 2018, doi: 10.1002/ange.201805034.
- [19] D. Yang, A. Singh, H. Wu, et R. Kroe-Barrett, « Comparison of biosensor platforms in the evaluation of high affinity antibody-antigen binding kinetics », *Anal. Biochem.*, vol. 508, p. 78-96, sept. 2016, doi: 10.1016/j.ab.2016.06.024.
- [20] Y. Ji et R. J. Woods, « Quantifying Weak Glycan-Protein Interactions Using a Biolayer Interferometry Competition Assay: Applications to ECL Lectin and X-31 Influenza Hemagglutinin », in *Glycobiophysics*, vol. 1104, Y. Yamaguchi et K. Kato, Éd., in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1104. , Singapore: Springer Singapore, 2018, p. 259-273. doi: 10.1007/978-981-13-2158-0\_13.

- [21] C. J. Weeramange, M. S. Fairlamb, D. Singh, A. W. Fenton, et L. Swint-Kruse, « The strengths and limitations of using biolayer interferometry to monitor equilibrium titrations of biomolecules », *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*, vol. 29, n° 4, p. 1018-1034, avr. 2020, doi: 10.1002/pro.3827.
- [22] I. Szatmári, G. Tóth, I. Kertész, P. W. Schiller, et A. Borsodi, « Synthesis and binding characteristics of [3H] H-Tyr-Ticpsi[CH<sub>2</sub>-NH] Cha-Phe-OH, a highly specific and stable delta-opioid antagonist », *Peptides*, vol. 20, n° 9, p. 1079-1083, 1999, doi: 10.1016/s0196-9781(99)00101-1.
- [23] R. A. Armstrong, P. P. Humphrey, et P. Lumley, « Characteristics of the binding of [3H]-GR32191 to the thromboxane (TP-) receptor of human platelets. », *Br. J. Pharmacol.*, vol. 110, n° 2, p. 539-547, oct. 1993.
- [24] A. Shrikhande *et al.*, « Fully automated radioligand binding filtration assay for membrane-bound receptors », *BioTechniques*, vol. 33, n° 4, p. 932-937, oct. 2002, doi: 10.2144/02334pf01.
- [25] F. Ahmadi, S. Dabirian, M. Faizi, S. A. Tabatabai, D. Beiki, et S. Shahhosseini, « Optimum Conditions of Radioligand Receptor Binding Assay of Ligands of Benzodiazepine Receptors », *Iran. J. Pharm. Res. IJPR*, vol. 13, n° Suppl, p. 79-86, 2014.
- [26] P. Potalitsyn *et al.*, « A radioligand binding assay for the insulin-like growth factor 2 receptor », *PLOS ONE*, vol. 15, n° 9, p. e0238393, sept. 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0238393.
- [27] H. H. Kim, S. A. DiVall, R. M. Deneau, et A. Wolfe, « Insulin regulation of GnRH gene expression through MAP kinase signaling pathways », *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 242, n° 1, p. 42-49, oct. 2005, doi: 10.1016/j.mce.2005.07.002.
- [28] J. J. Maguire, R. E. Kuc, et A. P. Davenport, « Radioligand binding assays and their analysis », *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 897, p. 31-77, 2012, doi: 10.1007/978-1-61779-909-9\_3.
- [29] K. A. Krohn, « The physical chemistry of ligand-receptor binding identifies some limitations to the analysis of receptor images », *Nucl. Med. Biol.*, vol. 28, n° 5, p. 477-483, juill. 2001, doi: 10.1016/s0969-8051(01)00216-5.
- [30] D. B. Bylund et M. L. Toews, « Radioligand binding methods: practical guide and tips », *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 265, n° 5, p. L421-L429, nov. 1993, doi: 10.1152/ajplung.1993.265.5.L421.

- [31] J. Anguizola *et al.*, « Development of Affinity Microcolumns for Drug–Protein Binding Studies in Personalized Medicine: Interactions of Sulfonylurea Drugs with in vivo Glycated Human Serum Albumin », *Anal. Chem.*, vol. 85, n° 9, p. 4453-4460, mai 2013, doi: 10.1021/ac303734c.
- [32] Z. Zeng *et al.*, « A Proteomics Platform Combining Depletion, Multi-lectin Affinity Chromatography (M-LAC), and Isoelectric Focusing to Study the Breast Cancer Proteome », *Anal. Chem.*, vol. 83, n° 12, p. 4845-4854, juin 2011, doi: 10.1021/ac2002802.
- [33] X. Zheng *et al.*, « Analysis of biomolecular interactions using affinity microcolumns: A review », *J. Chromatogr. B*, vol. 968, p. 49-63, oct. 2014, doi: 10.1016/j.jchromb.2014.01.026.
- [34] R. Matsuda, Z. Li, X. Zheng, et D. S. Hage, « Analysis of multi-site drug–protein interactions by high-performance affinity chromatography: Binding by glimepiride to normal or glycated human serum albumin », *J. Chromatogr. A*, vol. 1408, p. 133-144, août 2015, doi: 10.1016/j.chroma.2015.07.012.
- [35] Y. An *et al.*, « Target-directed screening of the bioactive compounds specifically binding to  $\beta$ 2-adrenoceptor in Semen brassicae by high-performance affinity chromatography », *J. Mol. Recognit.*, vol. 28, n° 10, p. 628-634, 2015, doi: 10.1002/jmr.2478.
- [36] A. Renaudin, « Chromatographie de faible affinité pour la découverte de médicament: nouvelle méthodologie de criblage ultra miniaturisée pour les protéines membranaires ».
- [37] M. Sanghvi, R. Moaddel, et I. W. Wainer, « The development and characterization of protein-based stationary phases for studying drug–protein and protein–protein interactions », *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, n° 49, p. 8791-8798, déc. 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2011.05.067.
- [38] J. J. Slon-Usakiewicz *et al.*, « Global Kinase Screening. Applications of Frontal Affinity Chromatography Coupled to Mass Spectrometry in Drug Discovery », *Anal. Chem.*, vol. 77, n° 5, p. 1268-1274, mars 2005, doi: 10.1021/ac048716q.
- [39] E. Calleri, C. Temporini, et G. Massolini, « Frontal affinity chromatography in characterizing immobilized receptors », *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 54, n° 5, p. 911-925, avr. 2011, doi: 10.1016/j.jpba.2010.11.040.
- [40] K. Jozwiak, S. C. Hernandez, K. J. Kellar, et I. W. Wainer, « Enantioselective interactions of dextromethorphan and levomethorphan with the  $\alpha$ 3 $\beta$ 4-nicotinic acetylcholine receptor: comparison of chromatographic and functional data », *J. Chromatogr. B*, vol. 797, n° 1, p. 373-379, nov. 2003, doi: 10.1016/S1570-0232(03)00608-1.

- [41] R. Moaddel *et al.*, « Development and characterization of immobilized cannabinoid receptor (CB1/CB2) open tubular column for on-line screening », *Anal. Biochem.*, vol. 412, n° 1, p. 85-91, mai 2011, doi: 10.1016/j.ab.2010.12.034.
- [42] D. S. Hage *et al.*, « Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments », *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 69, p. 93-105, oct. 2012, doi: 10.1016/j.jpba.2012.01.004.
- [43] K. S. Joseph, A. C. Moser, S. B. G. Basiaga, J. E. Schiel, et D. S. Hage, « Evaluation of alternatives to warfarin as probes for Sudlow site I of human serum albumin: Characterization by high-performance affinity chromatography », *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, n° 16, p. 3492-3500, avr. 2009, doi: 10.1016/j.chroma.2008.09.080.
- [44] D. S. Hage *et al.*, « Chromatographic analysis of drug interactions in the serum proteome », *Anal. Methods*, vol. 3, n° 7, p. 1449-1460, juill. 2011, doi: 10.1039/C1AY05068K.
- [45] X. Chen *et al.*, « Comparative Normal/Failing Rat Myocardium Cell Membrane Chromatographic Analysis System for Screening Specific Components That Counteract Doxorubicin-Induced Heart Failure from *Acontium carmichaeli* », *Anal. Chem.*, vol. 86, n° 10, p. 4748-4757, mai 2014, doi: 10.1021/ac500287e.
- [46] H. Du, J. He, S. Wang, et L. He, « Investigation of calcium antagonist–L-type calcium channel interactions by a vascular smooth muscle cell membrane chromatography method », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 397, n° 5, p. 1947-1953, juill. 2010, doi: 10.1007/s00216-010-3730-8.
- [47] S. Wang, M. Sun, Y. Zhang, H. Du, et L. He, « A new A431/cell membrane chromatography and online high performance liquid chromatography/mass spectrometry method for screening epidermal growth factor receptor antagonists from *Radix sophorae flavescentis* », *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, n° 32, p. 5246-5252, août 2010, doi: 10.1016/j.chroma.2010.06.037.
- [48] H. Du, J. Ren, S. Wang, et L. He, « Cell membrane chromatography competitive binding analysis for characterization of  $\alpha$ 1A adrenoreceptor binding interactions », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 400, n° 10, p. 3625-3633, juill. 2011, doi: 10.1007/s00216-011-5026-z.
- [49] W. Ma *et al.*, « Interactions between histamine H1 receptor and its antagonists by using cell membrane chromatography method », *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 67, n° 11, p. 1567-1574, nov. 2015, doi: 10.1111/jphp.12453.

- [50] Y. Wang *et al.*, « Comparison of  $\alpha$ 1-adrenergic receptor cell-membrane stationary phases prepared from expressed cell line and from rabbit hepatocytes », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 386, n° 7, p. 2003-2011, déc. 2006, doi: 10.1007/s00216-006-0859-6.
- [51] H. Du, S. Wang, J. Ren, N. Lv, et L. He, « Revealing multi-binding sites for taspine to VEGFR-2 by cell membrane chromatography zonal elution », *J. Chromatogr. B*, vol. 887-888, p. 67-72, mars 2012, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.01.011.
- [52] W. Yu, B. Yuan, X. Deng, L. He, Z. Youyi, et H. Qide, « The preparation of HEK293  $\alpha$ 1A or HEK293  $\alpha$ 1B cell membrane stationary phase and the chromatographic affinity study of ligands of  $\alpha$ 1 adrenoceptor », *Anal. Biochem.*, vol. 339, n° 2, p. 198-205, avr. 2005, doi: 10.1016/j.ab.2005.01.004.
- [53] N. R. Mohamad, N. H. C. Marzuki, N. A. Buang, F. Huyop, et R. A. Wahab, « An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes », *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, vol. 29, n° 2, p. 205-220, mars 2015, doi: 10.1080/13102818.2015.1008192.
- [54] S. Datta, L. R. Christena, et Y. R. S. Rajaram, « Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials », *3 Biotech*, vol. 3, n° 1, p. 1-9, févr. 2013, doi: 10.1007/s13205-012-0071-7.
- [55] N. A. Mohidem, M. Mohamad, M. U. Rashid, M. N. Norizan, F. Hamzah, et H. bin Mat, « Recent Advances in Enzyme Immobilisation Strategies: An Overview of Techniques and Composite Carriers », *J. Compos. Sci.*, vol. 7, n° 12, Art. n° 12, déc. 2023, doi: 10.3390/jcs7120488.
- [56] A. Basso et S. Serban, « Industrial applications of immobilized enzymes—A review », *Mol. Catal.*, vol. 479, p. 110607, déc. 2019, doi: 10.1016/j.mcat.2019.110607.
- [57] M. Olabi, M. Stein, et H. Wätzig, « Affinity capillary electrophoresis for studying interactions in life sciences », *Methods*, vol. 146, p. 76-92, août 2018, doi: 10.1016/j.ymeth.2018.05.006.
- [58] M. Asmari, L. Michalcová, A. E. Ibrahim, Z. Glatz, H. Wätzig, et S. El Deeb, « Studying molecular interactions via capillary electrophoresis and microscale thermophoresis: A review », *Electrophoresis*, vol. 44, n° 13-14, p. 1114-1142, juill. 2023, doi: 10.1002/elps.202200275.

- [59] V. A. Galievsky, A. S. Stasheuski, et S. N. Krylov, « Capillary Electrophoresis for Quantitative Studies of Biomolecular Interactions », *Anal. Chem.*, vol. 87, n° 1, p. 157-171, janv. 2015, doi: 10.1021/ac504219r.
- [60] H. Mlčochová, L. Michalcová, et Z. Glatz, « Extending the application potential of capillary electrophoresis/frontal analysis for drug-plasma protein studies by combining it with mass spectrometry detection », *Electrophoresis*, vol. 43, n° 9-10, p. 955-963, 2022, doi: 10.1002/elps.202100301.
- [61] K. Vuignier, J. Schappler, J.-L. Veuthey, P.-A. Carrupt, et S. Martel, « Drug–protein binding: a critical review of analytical tools », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, n° 1, p. 53-66, sept. 2010, doi: 10.1007/s00216-010-3737-1.
- [62] M. H. A. Busch, L. B. Carels, H. F. M. Boelens, J. C. Kraak, et H. Poppe, « Comparison of five methods for the study of drug–protein binding in affinity capillary electrophoresis », *J. Chromatogr. A*, vol. 777, n° 2, p. 311-328, août 1997, doi: 10.1016/S0021-9673(97)00369-5.
- [63] C. Davoine, A. Pardo, L. Pochet, et M. Fillet, « Fragment Hit Discovery and Binding Site Characterization by Indirect Affinity Capillary Electrophoresis: Application to Factor XIIa », *Anal. Chem.*, vol. 93, n° 44, p. 14802-14809, nov. 2021, doi: 10.1021/acs.analchem.1c03611.
- [64] Y. Zhang, Y. Sha, K. Qian, X. Chen, et Q. Chen, « Comparison of three methods for analyzing loureirin B and human serum albumin interaction using capillary electrophoresis », *Electrophoresis*, vol. 38, n° 7, p. 1038-1043, 2017, doi: 10.1002/elps.201600529.
- [65] G. Ramírez-García *et al.*, « Electrokinetic Hummel-Dreyer characterization of nanoparticle-plasma protein corona: The non-specific interactions between PEG-modified persistent luminescence nanoparticles and albumin », *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 159, p. 437-444, nov. 2017, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.08.012.
- [66] C. Bruno *et al.*, « The chemosensitizing agent lubeluzole binds calmodulin and inhibits Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II », *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 116, p. 36-45, juin 2016, doi: 10.1016/j.ejmech.2016.03.045.
- [67] E. Farcaş, J. Hanson, L. Pochet, et M. Fillet, « Capillary electrophoretic mobility shift displacement assay for the assessment of weak drug-protein interactions », *Anal. Chim. Acta*, vol. 1034, p. 214-222, nov. 2018, doi: 10.1016/j.aca.2018.06.024.

- [68] G. V. Semisotnov, N. A. Rodionova, O. I. Razgulyaev, V. N. Uversky, A. F. Gripas', et R. I. Gilmanshin, « Study of the “molten globule” intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe », *Biopolymers*, vol. 31, n° 1, p. 119-128, 1991, doi: 10.1002/bip.360310111.
- [69] F. H. Niesen, H. Berglund, et M. Vedadi, « The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability », *Nat. Protoc.*, vol. 2, n° 9, p. 2212-2221, sept. 2007, doi: 10.1038/nprot.2007.321.
- [70] S. Pinz, E. Daskocil, et W. Seufert, « Thermofluor-Based Analysis of Protein Integrity and Ligand Interactions. », *Methods Mol. Biol. Clifton Nj*, vol. 2533, p. 247-257, 2022, doi: 10.1007/978-1-0716-2501-9\_15.
- [71] V. Petrauskas, E. Kazlauskas, M. Gedgaudas, L. Baranauskienė, A. Zubrienė, et D. Matulis, « Thermal shift assay for protein–ligand dissociation constant determination », *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 170, p. 117417, janv. 2024, doi: 10.1016/j.trac.2023.117417.
- [72] A. Sali, E. Shakhnovich, et M. Karplus, « How does a protein fold? », *Nature*, vol. 369, n° 6477, p. 248-251, mai 1994, doi: 10.1038/369248a0.
- [73] B. K. Shoichet, W. A. Baase, R. Kuroki, et B. W. Matthews, « A relationship between protein stability and protein function. », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 92, n° 2, p. 452-456, janv. 1995, doi: 10.1073/pnas.92.2.452.
- [74] K. Huynh et C. L. Partch, « Analysis of Protein Stability and Ligand Interactions by Thermal Shift Assay », *Curr. Protoc. Protein Sci.*, vol. 79, n° 1, p. 28.9.1-28.9.14, 2015, doi: 10.1002/0471140864.ps2809s79.
- [75] T. T. Waldron et K. P. Murphy, « Stabilization of Proteins by Ligand Binding: Application to Drug Screening and Determination of Unfolding Energetics », *Biochemistry*, vol. 42, n° 17, p. 5058-5064, mai 2003, doi: 10.1021/bi034212v.
- [76] E. L. G. Samuel, S. L. Holmes, et D. W. Young, « Processing binding data using an open-source workflow », *J. Cheminformatics*, vol. 13, n° 1, p. 99, déc. 2021, doi: 10.1186/s13321-021-00577-1.
- [77] P. Cimmperman *et al.*, « A Quantitative Model of Thermal Stabilization and Destabilization of Proteins by Ligands », *Biophys. J.*, vol. 95, n° 7, p. 3222-3231, oct. 2008, doi: 10.1529/biophysj.108.134973.

- [78] D. Matulis, J. K. Kranz, F. R. Salemme, et M. J. Todd, « Thermodynamic Stability of Carbonic Anhydrase: Measurements of Binding Affinity and Stoichiometry Using ThermoFluor », *Biochemistry*, vol. 44, n° 13, p. 5258-5266, avr. 2005, doi: 10.1021/bi048135v.
- [79] M.-C. Lo *et al.*, « Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery », *Anal. Biochem.*, vol. 332, n° 1, p. 153-159, sept. 2004, doi: 10.1016/j.ab.2004.04.031.
- [80] A. S. Bommarius, J. M. Broering, J. F. Chaparro-Riggers, et K. M. Polizzi, « High-throughput screening for enhanced protein stability », *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 17, n° 6, p. 606-610, déc. 2006, doi: 10.1016/j.copbio.2006.10.001.
- [81] G. Andreotti, M. Monticelli, et M. V. Cubellis, « Looking for protein stabilizing drugs with thermal shift assay », *Drug Test. Anal.*, vol. 7, n° 9, p. 831-834, 2015, doi: 10.1002/dta.1798.
- [82] S. Shi, A. Semple, J. Cheung, et M. Shameem, « DSF Method Optimization and Its Application in Predicting Protein Thermal Aggregation Kinetics », *J. Pharm. Sci.*, vol. 102, n° 8, p. 2471-2483, août 2013, doi: 10.1002/jps.23633.
- [83] K. Gao, R. Oerlemans, et M. R. Groves, « Theory and applications of differential scanning fluorimetry in early-stage drug discovery », *Biophys. Rev.*, vol. 12, n° 1, p. 85-104, févr. 2020, doi: 10.1007/s12551-020-00619-2.
- [84] G. A. Holdgate, M. Anderson, F. Edfeldt, et S. Geschwindner, « Affinity-based, biophysical methods to detect and analyze ligand binding to recombinant proteins: Matching high information content with high throughput », *J. Struct. Biol.*, vol. 172, n° 1, p. 142-157, oct. 2010, doi: 10.1016/j.jsb.2010.06.024.
- [85] B. Hochreiter, A. Pardo-Garcia, et J. A. Schmid, « Fluorescent Proteins as Genetically Encoded FRET Biosensors in Life Sciences », *Sensors*, vol. 15, n° 10, Art. n° 10, oct. 2015, doi: 10.3390/s151026281.
- [86] J. Liao, Y. Song, et Y. Liu, « A new trend to determine biochemical parameters by quantitative FRET assays », *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 36, n° 12, p. 1408-1415, déc. 2015, doi: 10.1038/aps.2015.82.
- [87] E. Hirata et E. Kiyokawa, « Future Perspective of Single-Molecule FRET Biosensors and Intravital FRET Microscopy », *Biophys. J.*, vol. 111, n° 6, p. 1103-1111, sept. 2016, doi: 10.1016/j.bpj.2016.01.037.

- [88] S. Ding, A. A. Cargill, S. R. Das, I. L. Medintz, et J. C. Claussen, « Biosensing with Förster Resonance Energy Transfer Coupling between Fluorophores and Nanocarbon Allotropes », *Sensors*, vol. 15, n° 6, Art. n° 6, juin 2015, doi: 10.3390/s150614766.
- [89] K. F. Chou et A. M. Dennis, « Förster Resonance Energy Transfer between Quantum Dot Donors and Quantum Dot Acceptors », *Sensors*, vol. 15, n° 6, Art. n° 6, juin 2015, doi: 10.3390/s150613288.
- [90] M. Stanisavljevic, S. Krizkova, M. Vaculovicova, R. Kizek, et V. Adam, « Quantum dots-fluorescence resonance energy transfer-based nanosensors and their application », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 74, p. 562-574, déc. 2015, doi: 10.1016/j.bios.2015.06.076.
- [91] M. Wade, J. Méndez, N. P. Coussens, M. R. Arkin, et M. A. Glicksman, « Inhibition of Protein-Protein Interactions: Cell-Based Assays », in *Assay Guidance Manual*, S. Markossian, A. Grossman, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, J. Baell, K. Brimacombe, T. D. Y. Chung, N. P. Coussens, J. L. Dahlin, V. Devanarayan, T. L. Foley, M. Glicksman, K. Gorshkov, J. V. Haas, M. D. Hall, S. Hoare, J. Inglese, P. W. Iversen, M. Lal-Nag, Z. Li, J. R. Manro, J. McGee, O. McManus, M. Pearson, T. Riss, P. Saradjian, G. S. Sittampalam, M. Tarselli, O. J. Trask, J. R. Weidner, M. J. Wildey, K. Wilson, M. Xia, et X. Xu, Éd., Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004. Consulté le: 6 avril 2024. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK464632/>
- [92] Y. A. Domanov, J. G. Molotkovsky, et G. P. Gorbenko, « Coverage-dependent changes of cytochrome *c* transverse location in phospholipid membranes revealed by FRET », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1716, n° 1, p. 49-58, oct. 2005, doi: 10.1016/j.bbamem.2005.09.002.
- [93] G. de las Heras-Martínez, J. Andrieu, B. Larijani, et J. Requejo-Isidro, « Quantifying intracellular equilibrium dissociation constants using single-channel time-resolved FRET », *J. Biophotonics*, vol. 11, n° 1, p. e201600272, 2018, doi: 10.1002/jbio.201600272.
- [94] E. Alvarez-Curto, J. D. Pediani, et G. Milligan, « Applications of fluorescence and bioluminescence resonance energy transfer to drug discovery at G protein coupled receptors », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, n° 1, p. 167-180, sept. 2010, doi: 10.1007/s00216-010-3823-4.
- [95] S. Lu et Y. Wang, « Fluorescence resonance energy transfer biosensors for cancer detection and evaluation of drug efficacy », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 16, n° 15, p. 3822-3824, août 2010, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1333.

- [96] S. J. Leavesley et T. C. Rich, « Overcoming Limitations of FRET Measurements », *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.*, vol. 89, n° 4, p. 325-327, avr. 2016, doi: 10.1002/cyto.a.22851.
- [97] R. Huang et B. L. T. Lau, « Biomolecule–nanoparticle interactions: Elucidation of the thermodynamics by isothermal titration calorimetry », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1860, n° 5, p. 945-956, mai 2016, doi: 10.1016/j.bbagen.2016.01.027.
- [98] L. D. Hansen, M. K. Transtrum, C. Quinn, et N. Demarse, « Enzyme-catalyzed and binding reaction kinetics determined by titration calorimetry », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1860, n° 5, p. 957-966, mai 2016, doi: 10.1016/j.bbagen.2015.12.018.
- [99] M. Kabiri et L. D. Unsworth, « Application of Isothermal Titration Calorimetry for Characterizing Thermodynamic Parameters of Biomolecular Interactions: Peptide Self-Assembly and Protein Adsorption Case Studies », *Biomacromolecules*, vol. 15, n° 10, p. 3463-3473, oct. 2014, doi: 10.1021/bm5004515.
- [100] W. H. J. Ward et G. A. Holdgate, « 7 Isothermal Titration Calorimetry in Drug Discovery », in *Progress in Medicinal Chemistry*, vol. 38, F. D. King et A. W. Oxford, Éd., Elsevier, 2001, p. 309-376. doi: 10.1016/S0079-6468(08)70097-3.
- [101] R. J. Falconer, « Applications of isothermal titration calorimetry – the research and technical developments from 2011 to 2015 », *J. Mol. Recognit.*, vol. 29, n° 10, p. 504-515, 2016, doi: 10.1002/jmr.2550.
- [102] M. W. Freyer et E. A. Lewis, « Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions », in *Methods in Cell Biology*, vol. 84, Elsevier, 2008, p. 79-113. doi: 10.1016/S0091-679X(07)84004-0.
- [103] L. Li *et al.*, « Discovery of two aminoglycoside antibiotics as inhibitors targeting the menin–mixed lineage leukaemia interface », *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 24, n° 9, p. 2090-2093, mai 2014, doi: 10.1016/j.bmcl.2014.03.055.
- [104] A. Daddaoua, T. Krell, C. Alfonso, B. Morel, et J.-L. Ramos, « Compartmentalized glucose metabolism in *Pseudomonas putida* is controlled by the PtxS repressor », *J. Bacteriol.*, vol. 192, n° 17, p. 4357-4366, sept. 2010, doi: 10.1128/JB.00520-10.
- [105] T. Hanke *et al.*, « Development and Characterization of Type I, Type II, and Type III LIM-Kinase Chemical Probes », *J. Med. Chem.*, p. acs.jmedchem.2c01106, sept. 2022, doi: 10.1021/acs.jmedchem.2c01106.

- [106] S. Mathea *et al.*, « Human LIM domain kinase 1 (LIMK1), kinase domain; A Target Enabling Package ». Zenodo, 2 juin 2017. doi: 10.5281/ZENODO.1219706.
- [107] J. Orts et A. D. Gossert, « Structure determination of protein-ligand complexes by NMR in solution », *Methods*, vol. 138-139, p. 3-25, avr. 2018, doi: 10.1016/j.ymeth.2018.01.019.
- [108] O. Cala, F. Guillièrre, et I. Krimm, « NMR-based analysis of protein–ligand interactions », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, n° 4, p. 943-956, févr. 2014, doi: 10.1007/s00216-013-6931-0.
- [109] B. Meyer et T. Peters, « NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 42, n° 8, p. 864-890, 2003, doi: 10.1002/anie.200390233.
- [110] M. Mayer et B. Meyer, « Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 38, n° 12, p. 1784-1788, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1521-3773(19990614)38:12<1784::AID-ANIE1784>3.0.CO;2-Q.
- [111] C. Dalvit, G. Fogliatto, A. Stewart, M. Veronesi, et B. Stockman, « WaterLOGSY as a method for primary NMR screening: Practical aspects and range of applicability », *J. Biomol. NMR*, vol. 21, n° 4, p. 349-359, déc. 2001, doi: 10.1023/A:1013302231549.
- [112] M. Mayer et B. Meyer, « Mapping the Active Site of Angiotensin-Converting Enzyme by Transferred NOE Spectroscopy », *J. Med. Chem.*, vol. 43, n° 11, p. 2093-2099, juin 2000, doi: 10.1021/jm990194x.
- [113] M. Liu, J. K. Nicholson, J. A. Parkinson, et J. C. Lindon, « Measurement of Biomolecular Diffusion Coefficients in Blood Plasma Using Two-Dimensional  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  Diffusion-Edited Total-Correlation NMR Spectroscopy », *Anal. Chem.*, vol. 69, n° 8, p. 1504-1509, avr. 1997, doi: 10.1021/ac9612133.
- [114] D. Nietlispach *et al.*, « An Approach to the Structure Determination of Larger Proteins Using Triple Resonance NMR Experiments in Conjunction with Random Fractional Deuteration », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 118, n° 2, p. 407-415, janv. 1996, doi: 10.1021/ja952207b.
- [115] A. Bourafai-Azies *et al.*, « Binding mode of Pyridoclast to myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy, docking and molecular dynamics approaches », *J. Biomol. Struct. Dyn.*, vol. 38, n° 14, p. 4162-4178, sept. 2020, doi: 10.1080/07391102.2019.1680434.

- [116] C. J. Morton, D. J. Pugh, E. L. Brown, J. D. Kahmann, D. A. Renzoni, et I. D. Campbell, « Solution structure and peptide binding of the SH3 domain from human Fyn », *Structure*, vol. 4, n° 6, p. 705-714, juin 1996, doi: 10.1016/S0969-2126(96)00076-7.
- [117] C. Dalvit, I. Gmür, P. Rößler, et A. D. Gossert, « Affinity measurement of strong ligands with NMR spectroscopy: Limitations and ways to overcome them », *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, vol. 138-139, p. 52-69, nov. 2023, doi: 10.1016/j.pnmrs.2023.07.001.
- [118] C. Aguirre, O. Cala, et I. Krimm, « Overview of Probing Protein-Ligand Interactions Using NMR », *Curr. Protoc. Protein Sci.*, vol. 81, n° 1, p. 17.18.1-17.18.24, 2015, doi: 10.1002/0471140864.ps1718s81.
- [119] S. Maity, R. K. Gundampati, et T. K. Suresh Kumar, « NMR Methods to Characterize Protein-Ligand Interactions », *Nat. Prod. Commun.*, vol. 14, n° 5, p. 1934578X1984929, mai 2019, doi: 10.1177/1934578X19849296.
- [120] L. Fielding, « NMR methods for the determination of protein–ligand dissociation constants », *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, vol. 51, n° 4, p. 219-242, nov. 2007, doi: 10.1016/j.pnmrs.2007.04.001.
- [121] C. Kang, « Applications of In-Cell NMR in Structural Biology and Drug Discovery », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, n° 1, p. 139, janv. 2019, doi: 10.3390/ijms20010139.
- [122] J. Xie, R. Thapa, S. Reverdatto, D. S. Burz, et A. Shekhtman, « Screening of Small Molecule Interactor Library by Using In-Cell NMR Spectroscopy (SMILI-NMR) », *J. Med. Chem.*, vol. 52, n° 11, p. 3516-3522, juin 2009, doi: 10.1021/jm9000743.
- [123] A. Langer *et al.*, « A New Spectral Shift-Based Method to Characterize Molecular Interactions », *Assay Drug Dev. Technol.*, vol. 20, n° 2, p. 83-94, 2022, doi: 10.1089/adt.2021.133.
- [124] T.-H. Nguyen *et al.*, « The Binding of the SARS-CoV-2 Spike Protein to Platelet Factor 4: A Proposed Mechanism for the Generation of Pathogenic Antibodies », *Biomolecules*, vol. 14, n° 3, Art. n° 3, mars 2024, doi: 10.3390/biom14030245.
- [125] J. S. Nowak *et al.*, « Microscale thermophoresis (MST) and Spectral Shift (SpS) in drug discovery », *TrAC Trends Anal. Chem.*, p. 117716, avr. 2024, doi: 10.1016/j.trac.2024.117716.
- [126] Ludwig, « Diffusion zwischen ungleich erwärmten Orten gleich zusammengesetzter Lösungen. » 1856.

- [127] S. Iacopini et R. Piazza, « Thermophoresis in protein solutions », *Europhys. Lett.*, vol. 63, n° 2, p. 247, juill. 2003, doi: 10.1209/epl/i2003-00520-y.
- [128] S. Duhr et D. Braun, « Why molecules move along a temperature gradient », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, n° 52, p. 19678-19682, déc. 2006, doi: 10.1073/pnas.0603873103.
- [129] S. A. I. Seidel *et al.*, « Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions », *Methods*, vol. 59, n° 3, p. 301-315, mars 2013, doi: 10.1016/j.ymeth.2012.12.005.
- [130] M. Jerabek-Willemsen, C. J. Wienken, D. Braun, P. Baaske, et S. Duhr, « Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis », *ASSAY Drug Dev. Technol.*, vol. 9, n° 4, p. 342-353, août 2011, doi: 10.1089/adt.2011.0380.
- [131] P. Baaske, C. J. Wienken, P. Reineck, S. Duhr, et D. Braun, « Optical Thermophoresis for Quantifying the Buffer Dependence of Aptamer Binding », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 49, n° 12, p. 2238-2241, mars 2010, doi: 10.1002/anie.200903998.
- [132] C. J. Wienken, P. Baaske, U. Rothbauer, D. Braun, et S. Duhr, « Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis », *Nat. Commun.*, vol. 1, n° 1, p. 100, déc. 2010, doi: 10.1038/ncomms1093.
- [133] M. Jerabek-Willemsen *et al.*, « MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond », *J. Mol. Struct.*, vol. 1077, p. 101-113, déc. 2014, doi: 10.1016/j.molstruc.2014.03.009.
- [134] D. Ross, M. Gaitan, et L. E. Locascio, « Temperature Measurement in Microfluidic Systems Using a Temperature-Dependent Fluorescent Dye », *Anal. Chem.*, vol. 73, n° 17, p. 4117-4123, sept. 2001, doi: 10.1021/ac010370l.
- [135] C. A. Royer, « Probing Protein Folding and Conformational Transitions with Fluorescence », *Chem. Rev.*, vol. 106, n° 5, p. 1769-1784, mai 2006, doi: 10.1021/cr0404390.
- [136] S. A. I. Seidel *et al.*, « Label-Free Microscale Thermophoresis Discriminates Sites and Affinity of Protein-Ligand Binding », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 51, n° 42, p. 10656-10659, oct. 2012, doi: 10.1002/anie.201204268.
- [137] T. Bartoschik *et al.*, « Near-native, site-specific and purification-free protein labeling for quantitative protein interaction analysis by MicroScale Thermophoresis », *Sci. Rep.*, vol. 8, n° 1, p. 4977, déc. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-23154-3.

- [138] M. Malak, J. James, J. Grantham, et M. B. Ericson, « Contribution of autofluorescence from intracellular proteins in multiphoton fluorescence lifetime imaging », *Sci. Rep.*, vol. 12, n° 1, p. 16584, oct. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-20857-6.
- [139] R. Magnez, B. Thiroux, S. Taront, Z. Segaula, B. Quesnel, et X. Thuru, « PD-1/PD-L1 binding studies using microscale thermophoresis », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, Art. n° 1, déc. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-17963-1.
- [140] L. Khavrutskii *et al.*, « Protein Purification-free Method of Binding Affinity Determination by Microscale Thermophoresis », *J. Vis. Exp.*, n° 78, p. 50541, août 2013, doi: 10.3791/50541.
- [141] W. Shao, R. Sharma, M. H. Clausen, et H. V. Scheller, « Microscale thermophoresis as a powerful tool for screening glycosyltransferases involved in cell wall biosynthesis », *Plant Methods*, vol. 16, n° 1, p. 99, juill. 2020, doi: 10.1186/s13007-020-00641-1.
- [142] M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, et S. J. Remington, « Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein », *Science*, vol. 273, n° 5280, p. 1392-1395, sept. 1996, doi: 10.1126/science.273.5280.1392.
- [143] *Molecular biology of the cell*, 6th ed. New York: Garland science, Taylor and Francis group, 2015.
- [144] F. Hannemann, A. K. Bera, B. Fischer, M. Lisurek, K. Teuchner, et R. Bernhardt, « Unfolding and Conformational Studies on Bovine Adrenodoxin Probed by Engineered Intrinsic Tryptophan Fluorescence », *Biochemistry*, vol. 41, n° 36, p. 11008-11016, sept. 2002, doi: 10.1021/bi020450z.
- [145] S. El Deeb *et al.*, « Microscale thermophoresis as a powerful growing analytical technique for the investigation of biomolecular interaction and the determination of binding parameters », *Methods Appl. Fluoresc.*, vol. 10, n° 4, p. 042001, oct. 2022, doi: 10.1088/2050-6120/ac82a6.
- [146] A. P. Siegel, M. A. Baird, M. W. Davidson, et R. N. Day, « Strengths and Weaknesses of Recently Engineered Red Fluorescent Proteins Evaluated in Live Cells Using Fluorescence Correlation Spectroscopy », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, n° 10, p. 20340-20358, oct. 2013, doi: 10.3390/ijms141020340.
- [147] P. Linke *et al.*, « An Automated Microscale Thermophoresis Screening Approach for Fragment-Based Lead Discovery », *SLAS Discov.*, vol. 21, n° 4, p. 414-421, avr. 2016, doi: 10.1177/1087057115618347.

- [148] F. Bao *et al.*, « New natural inhibitors of hexokinase 2 (HK2): Steroids from *Ganoderma sinense* », *Fitoterapia*, vol. 125, p. 123-129, mars 2018, doi: 10.1016/j.fitote.2018.01.001.
- [149] S.-T. Wu *et al.*, « Esculetin Inhibits Cancer Cell Glycolysis by Binding Tumor PGK2, GPD2, and GPI », *Front. Pharmacol.*, vol. 11, p. 379, mars 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00379.
- [150] M. Winiewska, E. Bugajska, et J. Poznański, « ITC-derived binding affinity may be biased due to titrant (nano)-aggregation. Binding of halogenated benzotriazoles to the catalytic domain of human protein kinase CK2 », *PLOS ONE*, vol. 12, n° 3, p. e0173260, mars 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0173260.
- [151] Y. Phillip et G. Schreiber, « Formation of protein complexes in crowded environments – From in vitro to in vivo », *FEBS Lett.*, vol. 587, n° 8, p. 1046-1052, avr. 2013, doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.007.
- [152] H.-X. Zhou, G. Rivas, et A. P. Minton, « Macromolecular Crowding and Confinement: Biochemical, Biophysical, and Potential Physiological Consequences\* », *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 37, n° [Volume 37, 2008, Volume 37, ], p. 375-397, juin 2008, doi: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125817.
- [153] R. Nasreddine *et al.*, « Polyethylene glycol crowding effect on hyaluronidase activity monitored by capillary electrophoresis », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 412, n° 17, p. 4195-4207, juill. 2020, doi: 10.1007/s00216-020-02659-9.
- [154] S. Albeck et G. Schreiber, « Biophysical Characterization of the Interaction of the  $\beta$ -Lactamase TEM-1 with Its Protein Inhibitor BLIP », *Biochemistry*, vol. 38, n° 1, p. 11-21, janv. 1999, doi: 10.1021/bi981772z.
- [155] R. Magnez, C. Bailly, et X. Thuru, « Microscale Thermophoresis as a Tool to Study Protein Interactions and Their Implication in Human Diseases », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, n° 14, p. 7672, juill. 2022, doi: 10.3390/ijms23147672.
- [156] B. Björkblom *et al.*, « Parkinson Disease Protein DJ-1 Binds Metals and Protects against Metal-induced Cytotoxicity », *J. Biol. Chem.*, vol. 288, n° 31, p. 22809-22820, août 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.482091.
- [157] S. Kleinboelting *et al.*, « Crystal structures of human soluble adenylyl cyclase reveal mechanisms of catalysis and of its activation through bicarbonate », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, n° 10, p. 3727-3732, mars 2014, doi: 10.1073/pnas.1322778111.

- [158] G. van den Bogaart, K. Meyenberg, U. Diederichsen, et R. Jahn, « Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Increases Ca<sup>2+</sup> Affinity of Synaptotagmin-1 by 40-fold\* », *J. Biol. Chem.*, vol. 287, n° 20, p. 16447-16453, mai 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.343418.
- [159] J. L. Parker et S. Newstead, « Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter NRT1.1 », *Nature*, vol. 507, n° 7490, p. 68-72, mars 2014, doi: 10.1038/nature13116.
- [160] T. Bartoschik *et al.*, « Microscale Thermophoresis in Drug Discovery », in *Applied Biophysics for Drug Discovery*, D. Huddler et E. R. Zartler, Éd., Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017, p. 73-92. doi: 10.1002/9781119099512.ch5.
- [161] N. C. Dale, E. K. M. Johnstone, C. W. White, et K. D. G. Pflieger, « NanoBRET: The Bright Future of Proximity-Based Assays », *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, mars 2019, doi: 10.3389/fbioe.2019.00056.
- [162] R. Collins *et al.*, « Comparative Analysis of Small-Molecule LIMK1/2 Inhibitors: Chemical Synthesis, Biochemistry, and Cellular Activity », *J. Med. Chem.*, p. acs.jmedchem.2c00751, oct. 2022, doi: 10.1021/acs.jmedchem.2c00751.
- [163] N. E. Brown, J. B. Blumer, et J. R. Hepler, « Bioluminescence Resonance Energy Transfer to Detect Protein-Protein Interactions in Live Cells », *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 1278, p. 457-465, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-2425-7\_30.
- [164] Q. Xie, M. Soutto, X. Xu, Y. Zhang, et C. H. Johnson, « Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) Imaging in Plant Seedlings and Mammalian Cells », *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 680, p. 3-28, 2011, doi: 10.1007/978-1-60761-901-7\_1.
- [165] M.-C. Menet, « Principes de la spectrométrie de masse », *Rev. Francoph. Lab.*, vol. 2011, n° 437, p. 41-53, déc. 2011, doi: 10.1016/S1773-035X(11)71211-4.
- [166] K. Ishii, M. Noda, et S. Uchiyama, « Mass spectrometric analysis of protein–ligand interactions », *Biophys. Physicobiology*, vol. 13, p. 87, 2016, doi: 10.2142/biophysico.13.0\_87.
- [167] H. Hernández et C. V. Robinson, « Determining the stoichiometry and interactions of macromolecular assemblies from mass spectrometry », *Nat. Protoc.*, vol. 2, n° 3, p. 715-726, 2007, doi: 10.1038/nprot.2007.73.

- [168] M. E. Dueñas, R. E. Peltier-Heap, M. Leveridge, R. S. Annan, F. H. Büttner, et M. Trost, « Advances in high-throughput mass spectrometry in drug discovery », *EMBO Mol. Med.*, vol. 15, n° 1, p. e14850, janv. 2023, doi: 10.15252/emmm.202114850.
- [169] S. E. Hutchinson *et al.*, « Enabling Lead Discovery for Histone Lysine Demethylases by High-Throughput RapidFire Mass Spectrometry », *SLAS Discov.*, vol. 17, n° 1, p. 39-48, janv. 2012, doi: 10.1177/1087057111416660.
- [170] N. Uchiyama *et al.*, « Identification of AHCY inhibitors using novel high-throughput mass spectrometry », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 491, n° 1, p. 1-7, sept. 2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.107.
- [171] M. Yoneyama-Hirozane *et al.*, « Identification of PARP14 inhibitors using novel methods for detecting auto-ribosylation », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 486, n° 3, p. 626-631, mai 2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.052.
- [172] K. Godl *et al.*, « An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, n° 26, p. 15434-15439, déc. 2003, doi: 10.1073/pnas.2535024100.
- [173] M. Bantscheff *et al.*, « Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors », *Nat. Biotechnol.*, vol. 25, n° 9, p. 1035-1044, sept. 2007, doi: 10.1038/nbt1328.
- [174] F. S. Oppermann *et al.*, « Large-scale proteomics analysis of the human kinome », *Mol. Cell. Proteomics MCP*, vol. 8, n° 7, p. 1751-1764, juill. 2009, doi: 10.1074/mcp.M800588-MCP200.
- [175] M. L. Cann, I. M. McDonald, M. P. East, G. L. Johnson, et L. M. Graves, « Measuring Kinase Activity—A Global Challenge », *J. Cell. Biochem.*, vol. 118, n° 11, p. 3595-3606, 2017, doi: 10.1002/jcb.26103.
- [176] F. Pachl, P. Plattner, B. Ruprecht, G. Médard, N. Sewald, et B. Kuster, « Characterization of a Chemical Affinity Probe Targeting Akt Kinases », *J. Proteome Res.*, vol. 12, n° 8, p. 3792-3800, août 2013, doi: 10.1021/pr400455j.
- [177] X. Ku, S. Heinzlmeir, X. Liu, G. Médard, et B. Kuster, « A new chemical probe for quantitative proteomic profiling of fibroblast growth factor receptor and its inhibitors », *J. Proteomics*, vol. 96, p. 44-55, janv. 2014, doi: 10.1016/j.jprot.2013.10.031.

- [178] X. Ku, S. Heinzlmeir, D. Helm, G. Médard, et B. Kuster, « New Affinity Probe Targeting VEGF Receptors for Kinase Inhibitor Selectivity Profiling by Chemical Proteomics », *J. Proteome Res.*, vol. 13, n° 5, p. 2445-2452, mai 2014, doi: 10.1021/pr401247t.
- [179] I. Becher, M. M. Savitski, M. F. Savitski, C. Hopf, M. Bantscheff, et G. Drewes, « Affinity Profiling of the Cellular Kinome for the Nucleotide Cofactors ATP, ADP, and GTP », *ACS Chem. Biol.*, vol. 8, n° 3, p. 599-607, mars 2013, doi: 10.1021/cb3005879.
- [180] H. Daub, « Quantitative Proteomics of Kinase Inhibitor Targets and Mechanisms », *ACS Chem. Biol.*, vol. 10, n° 1, p. 201-212, janv. 2015, doi: 10.1021/cb5008794.
- [181] Y. Jia, X. Gu, A. Brinker, et M. Warmuth, « Measuring the tyrosine kinase activity: a review of biochemical and cellular assay technologies », *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 3, n° 8, p. 959-978, août 2008, doi: 10.1517/17460441.3.8.959.
- [182] J. M. Lizcano *et al.*, « Molecular Basis for the Substrate Specificity of NIMA-related Kinase-6 (NEK6) », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 31, p. 27839-27849, août 2002, doi: 10.1074/jbc.M202042200.
- [183] M. Kim, D.-S. Shin, J. Kim, et Y.-S. Lee, « Substrate screening of protein kinases: Detection methods and combinatorial peptide libraries », *Pept. Sci.*, vol. 94, n° 6, p. 753-762, 2010, doi: 10.1002/bip.21506.
- [184] B. A. Harrison *et al.*, « Discovery and Development of LX7101, a Dual LIM-Kinase and ROCK Inhibitor for the Treatment of Glaucoma », *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 6, n° 1, p. 84-88, janv. 2015, doi: 10.1021/ml500367g.
- [185] S. H. Diks *et al.*, « Kinome Profiling for Studying Lipopolysaccharide Signal Transduction in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 47, p. 49206-49213, nov. 2004, doi: 10.1074/jbc.M405028200.
- [186] H. Zhu *et al.*, « Analysis of yeast protein kinases using protein chips », *Nat. Genet.*, vol. 26, n° 3, p. 283-289, nov. 2000, doi: 10.1038/81576.
- [187] A. S. Karra, S. Stippec, et M. H. Cobb, « Assaying Protein Kinase Activity with Radiolabeled ATP », *JoVE J. Vis. Exp.*, n° 123, p. e55504, mai 2017, doi: 10.3791/55504.
- [188] G. A. H. D. Banni et R. Nehmé, « Capillary electrophoresis for enzyme-based studies: Applications to lipases and kinases », *J. Chromatogr. A*, vol. 1661, p. 462687, janv. 2022, doi: 10.1016/j.chroma.2021.462687.

- [189] N. Banke, K. Hansen, et I. Diers, « Detection of enzyme activity in fractions collected from free solution capillary electrophoresis of complex samples », *J. Chromatogr. A*, vol. 559, n° 1, p. 325-335, oct. 1991, doi: 10.1016/0021-9673(91)80082-R.
- [190] H. Nehme, « Etude des réactions enzymatiques par électrophorèse capillaire », These de doctorat, Orléans, 2013. [En ligne]. Disponible sur: <https://theses.fr/2013ORLE2041>
- [191] H. Nehmé, R. Nehmé, P. Lafite, S. Routier, et P. Morin, « In-capillary reactant mixing for monitoring glycerol kinase kinetics by CE », *J. Sep. Sci.*, vol. 36, n° 13, p. 2151-2157, 2013, doi: 10.1002/jssc.201300063.
- [192] R. Nehmé *et al.*, « New in-capillary electrophoretic kinase assays to evaluate inhibitors of the PI3k/Akt/mTOR signaling pathway », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, n° 15, p. 3743-3754, juin 2014, doi: 10.1007/s00216-014-7790-z.
- [193] H.-F. Tzeng et H.-P. Hung, « Simultaneous determination of thymidylate and thymidine diphosphate by capillary electrophoresis as a rapid monitoring tool for thymidine kinase and thymidylate kinase activities », *Electrophoresis*, vol. 26, n° 11, p. 2225-2230, 2005, doi: 10.1002/elps.200410091.
- [194] P. G. Righetti, « Determination of the isoelectric point of proteins by capillary isoelectric focusing », *J. Chromatogr. A*, vol. 1037, n° 1, p. 491-499, mai 2004, doi: 10.1016/j.chroma.2003.11.025.
- [195] T. Wehr, R. Rodriguez-Diaz, et M. Zhu, Éd., *Capillary Electrophoresis of Proteins*. Boca Raton: CRC Press, 2014. doi: 10.1201/9781482289855.
- [196] H. Stutz, « Protein attachment onto silica surfaces – a survey of molecular fundamentals, resulting effects and novel preventive strategies in CE », *Electrophoresis*, vol. 30, n° 12, p. 2032-2061, 2009, doi: 10.1002/elps.200900015.
- [197] V. Dolník, « Wall coating for capillary electrophoresis on microchips », *Electrophoresis*, vol. 25, n° 21-22, p. 3589-3601, 2004, doi: 10.1002/elps.200406113.
- [198] L. Hajba et A. Guttman, « Recent advances in column coatings for capillary electrophoresis of proteins », *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 90, p. 38-44, mai 2017, doi: 10.1016/j.trac.2017.02.013.

- [199] P. G. Righetti, C. Gelfi, B. Verzola, et L. Castelletti, « The state of the art of dynamic coatings », *Electrophoresis*, vol. 22, n° 4, p. 603-611, 2001, doi: 10.1002/1522-2683(200102)22:4<603::AID-ELPS603>3.0.CO;2-N.
- [200] C. Y. Liu, « Stationary phases for capillary electrophoresis and capillary electrochromatography », *Electrophoresis*, vol. 22, n° 4, p. 612-628, 2001, doi: 10.1002/1522-2683(200102)22:4<612::AID-ELPS612>3.0.CO;2-N.
- [201] J. S. Creamer, N. J. Oborny, et S. M. Lunte, « Recent advances in the analysis of therapeutic proteins by capillary and microchip electrophoresis », *Anal Methods*, vol. 6, n° 15, p. 5427-5449, 2014, doi: 10.1039/C4AY00447G.
- [202] J. Znaleziona, J. Petr, R. Knob, V. Maier, et J. Ševčík, « Dynamic Coating Agents in CE », *Chromatographia*, vol. 67, n° 1, p. 5-12, mai 2008, doi: 10.1365/s10337-007-0509-y.
- [203] C. A. Lucy, A. M. MacDonald, et M. D. Gulcev, « Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis », *J. Chromatogr. A*, vol. 1184, n° 1-2, p. 81-105, mars 2008, doi: 10.1016/j.chroma.2007.10.114.
- [204] C. Huhn, R. Ramautar, M. Wuhler, et G. W. Somsen, « Relevance and use of capillary coatings in capillary electrophoresis–mass spectrometry », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 396, n° 1, p. 297-314, janv. 2010, doi: 10.1007/s00216-009-3193-y.
- [205] X. Wu, W. Wei, Q. Su, L. Xu, et G. Chen, « Simultaneous separation of basic and acidic proteins using 1-butyl-3-methylimidazolium-based ion liquid as dynamic coating and background electrolyte in capillary electrophoresis », *Electrophoresis*, vol. 29, n° 11, p. 2356-2362, 2008, doi: 10.1002/elps.200700746.
- [206] C. S. Robb, « Applications of Physically Adsorbed Polymer Coatings in Capillary Electrophoresis », *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, vol. 30, n° 5-7, p. 729-759, févr. 2007, doi: 10.1080/10826070701191029.
- [207] R. Nehmé, C. Perrin, H. Cottet, M. Blanchin, et H. Fabre, « Influence of polyelectrolyte capillary coating conditions on protein analysis in CE », *Electrophoresis*, vol. 30, n° 11, p. 1888-1898, juin 2009, doi: 10.1002/elps.200800688.
- [208] R. Nehmé, C. Perrin, H. Cottet, M.-D. Blanchin, et H. Fabre, « Stability of capillaries coated with highly charged polyelectrolyte monolayers and multilayers under various analytical conditions—

Application to protein analysis », *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, n° 22, p. 3537-3544, juin 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2011.03.040.

[209] F. M. Tarongoy Jr., P. R. Haddad, R. I. Boysen, M. T. W. Hearn, et J. P. Quirino, « Open tubular-capillary electrochromatography: Developments and applications from 2013 to 2015 », *Electrophoresis*, vol. 37, n° 1, p. 66-85, 2016, doi: 10.1002/elps.201500339.

[210] S. Hjertén, « High-performance electrophoresis: Elimination of electroendosmosis and solute adsorption », *J. Chromatogr. A*, vol. 347, p. 191-198, janv. 1985, doi: 10.1016/S0021-9673(01)95485-8.

[211] L. Sola et M. Chiari, « Modulation of electroosmotic flow in capillary electrophoresis using functional polymer coatings », *J. Chromatogr. A*, vol. 1270, p. 324-329, déc. 2012, doi: 10.1016/j.chroma.2012.10.039.

[212] E. Freire, « Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class? », *Drug Discov. Today*, vol. 13, n° 19, p. 869-874, oct. 2008, doi: 10.1016/j.drudis.2008.07.005.

[213] S. G. Krimmer *et al.*, « Rational Design of Thermodynamic and Kinetic Binding Profiles by Optimizing Surface Water Networks Coating Protein-Bound Ligands », *J. Med. Chem.*, vol. 59, n° 23, p. 10530-10548, déc. 2016, doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00998.

[214] N. C. Garbett et J. B. Chaires, « Thermodynamic Studies for Drug Design and Screening », *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 7, n° 4, p. 299-314, avr. 2012, doi: 10.1517/17460441.2012.666235.

[215] G. A. Holdgate et W. H. J. Ward, « Measurements of binding thermodynamics in drug discovery », *Drug Discov. Today*, vol. 10, n° 22, p. 1543-1550, nov. 2005, doi: 10.1016/S1359-6446(05)03610-X.

[216] J. E. Ladbury et S. Arold, « Searching for specificity in SH domains », *Chem. Biol.*, vol. 7, n° 1, p. R3-R8, janv. 2000, doi: 10.1016/S1074-5521(00)00067-3.

[217] J. E. Ladbury, « Measurement of the formation of complexes in tyrosine kinase-mediated signal transduction », *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, vol. 63, n° Pt 1, p. 26-31, janv. 2007, doi: 10.1107/S0907444906046373.

[218] S. T. Arold *et al.*, « The Role of the Src Homology 3-Src Homology 2 Interface in the Regulation of Src Kinases\* », *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n° 20, p. 17199-17205, mai 2001, doi: 10.1074/jbc.M011185200.

- [219] A. Cooper, « Heat capacity of hydrogen-bonded networks: an alternative view of protein folding thermodynamics », *Biophys. Chem.*, vol. 85, n° 1, p. 25-39, mai 2000, doi: 10.1016/S0301-4622(00)00136-8.
- [220] A. Cooper, C. M. Johnson, J. H. Lakey, et M. Nöllmann, « Heat does not come in different colours: entropy–enthalpy compensation, free energy windows, quantum confinement, pressure perturbation calorimetry, solvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions », *Biophys. Chem.*, vol. 93, n° 2, p. 215-230, nov. 2001, doi: 10.1016/S0301-4622(01)00222-8.
- [221] G. Bruylants, J. Wouters, et C. Michaux, « Differential Scanning Calorimetry in Life Science: Thermodynamics, Stability, Molecular Recognition and Application in Drug Design », *Curr. Med. Chem.*, vol. 12, n° 17, p. 2011-2020, août 2005, doi: 10.2174/0929867054546564.
- [222] S. Kędracka-Krok et Z. Wasylewski, « A differential scanning calorimetry study of tetracycline repressor », *Eur. J. Biochem.*, vol. 270, n° 22, p. 4564-4573, 2003, doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03856.x.
- [223] J. A. C. Stein, A. Ianeselli, et D. Braun, « Kinetic Microscale Thermophoresis for Simultaneous Measurement of Binding Affinity and Kinetics », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 60, n° 25, p. 13988-13995, juin 2021, doi: 10.1002/anie.202101261.
- [224] T. André et D. Breitsprecher, « Thermodynamic characterization of DNA hybridization ».
- [225] G. M. Morris *et al.*, « AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility », *J. Comput. Chem.*, vol. 30, n° 16, p. 2785-2791, déc. 2009, doi: 10.1002/jcc.21256.
- [226] M. L. Verdonk, J. C. Cole, M. J. Hartshorn, C. W. Murray, et R. D. Taylor, « Improved protein–ligand docking using GOLD », *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 52, n° 4, p. 609-623, 2003, doi: 10.1002/prot.10465.
- [227] B. Kramer, M. Rarey, et T. Lengauer, « Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein–ligand docking », *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 37, n° 2, p. 228-241, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-0134(19991101)37:2<228::AID-PROT8>3.0.CO;2-8.
- [228] S. F. Sousa, P. A. Fernandes, et M. J. Ramos, « Protein–ligand docking: Current status and future challenges », *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 65, n° 1, p. 15-26, 2006, doi: 10.1002/prot.21082.

- [229] M. M. Jaghoori, B. Bleijlevens, et S. D. Olabarriaga, « 1001 Ways to run AutoDock Vina for virtual screening », *J. Comput. Aided Mol. Des.*, vol. 30, n° 3, p. 237-249, mars 2016, doi: 10.1007/s10822-016-9900-9.
- [230] W. M. Rockey et A. H. Elcock, « Rapid Computational Identification of the Targets of Protein Kinase Inhibitors », *J. Med. Chem.*, vol. 48, n° 12, p. 4138-4152, juin 2005, doi: 10.1021/jm049461b.
- [231] R. Rentzsch et B. Y. Renard, « Docking small peptides remains a great challenge: an assessment using AutoDock Vina », *Brief. Bioinform.*, vol. 16, n° 6, p. 1045-1056, nov. 2015, doi: 10.1093/bib/bbv008.
- [232] H. Nishi, A. Shaytan, et A. R. Panchenko, « Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation », *Front. Genet.*, vol. 5, août 2014, doi: 10.3389/fgene.2014.00270.
- [233] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, et S. Sudarsanam, « The Protein Kinase Complement of the Human Genome », *Science*, vol. 298, n° 5600, p. 1912-1934, déc. 2002, doi: 10.1126/science.1075762.
- [234] P. Ross-Macdonald *et al.*, « Identification of a nonkinase target mediating cytotoxicity of novel kinase inhibitors », *Mol. Cancer Ther.*, vol. 7, n° 11, p. 3490-3498, nov. 2008, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0826.
- [235] R. Berabaz, S. Routier, H. Bénédicti, K. Plé, et B. Vallée, « LIM Kinases, Promising but Reluctant Therapeutic Targets: Chemistry and Preclinical Validation In Vivo », *Cells*, vol. 11, n° 13, p. 2090, juin 2022, doi: 10.3390/cells11132090.
- [236] K. Mizuno *et al.*, « Identification of a human cDNA encoding a novel protein kinase with two repeats of the LIM/double zinc finger motif », *Oncogene*, vol. 9, n° 6, p. 1605-1612, juin 1994.
- [237] O. Bernard, S. Ganiatsas, G. Kannourakis, et R. Dringen, « Kiz-1, a protein with LIM zinc finger and kinase domains, is expressed mainly in neurons », *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 5, n° 11, p. 1159-1171, nov. 1994.
- [238] I. Okano *et al.*, « Identification and Characterization of a Novel Family of Serine/Threonine Kinases Containing Two N-terminal LIM Motifs », *J. Biol. Chem.*, vol. 270, n° 52, p. 31321-31330, déc. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.52.31321.

- [239] K. Acevedo, N. Moussi, R. Li, P. Soo, et O. Bernard, « LIM Kinase 2 Is Widely Expressed in All Tissues », *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 54, n° 5, p. 487-501, mai 2006, doi: 10.1369/jhc.5C6813.2006.
- [240] V. C. Foletta, N. Moussi, P. D. Sarmiere, J. R. Bamburg, et O. Bernard, « LIM kinase 1, a key regulator of actin dynamics, is widely expressed in embryonic and adult tissues », *Exp. Cell Res.*, vol. 294, n° 2, p. 392-405, avr. 2004, doi: 10.1016/j.yexcr.2003.11.024.
- [241] C. Pröschel, M. J. Blouin, N. J. Gutowski, R. Ludwig, et M. Noble, « Limk1 is predominantly expressed in neural tissues and phosphorylates serine, threonine and tyrosine residues in vitro », *Oncogene*, vol. 11, n° 7, p. 1271-1281, oct. 1995.
- [242] T. Sumi, K. Matsumoto, Y. Takai, et T. Nakamura, « Cofilin Phosphorylation and Actin Cytoskeletal Dynamics Regulated by Rho- and Cdc42-Activated Lim-Kinase 2 », *J. Cell Biol.*, vol. 147, n° 7, p. 1519-1532, déc. 1999, doi: 10.1083/jcb.147.7.1519.
- [243] T. Sumi, K. Matsumoto, A. Shibuya, et T. Nakamura, « Activation of LIM Kinases by Myotonic Dystrophy Kinase-related Cdc42-binding Kinase  $\alpha^*$  », *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n° 25, p. 23092-23096, juin 2001, doi: 10.1074/jbc.C100196200.
- [244] S. Arber *et al.*, « Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase », *Nature*, vol. 393, n° 6687, p. 805-809, juin 1998, doi: 10.1038/31729.
- [245] N. Yang *et al.*, « Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization », *Nature*, vol. 393, n° 6687, p. 809-812, juin 1998, doi: 10.1038/31735.
- [246] M. Gorovoy *et al.*, « LIM Kinase 1 Coordinates Microtubule Stability and Actin Polymerization in Human Endothelial Cells\* », *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n° 28, p. 26533-26542, juill. 2005, doi: 10.1074/jbc.M502921200.
- [247] S. T. Po'uha, M. S. Y. Shum, A. Goebel, O. Bernard, et M. Kavallaris, « LIM-kinase 2, a regulator of actin dynamics, is involved in mitotic spindle integrity and sensitivity to microtubule-destabilizing drugs », *Oncogene*, vol. 29, n° 4, p. 597-607, janv. 2010, doi: 10.1038/onc.2009.367.
- [248] E. Villalonga *et al.*, « LIM Kinases, LIMK1 and LIMK2, Are Crucial Node Actors of the Cell Fate: Molecular to Pathological Features », *Cells*, vol. 12, n° 5, p. 805, mars 2023, doi: 10.3390/cells12050805.

- [249] D. Chatterjee, F. Preuss, V. Dederer, S. Knapp, et S. Mathea, « Structural Aspects of LIMK Regulation and Pharmacology », *Cells*, vol. 11, n° 1, p. 142, janv. 2022, doi: 10.3390/cells11010142.
- [250] R. W. Scott et M. F. Olson, « LIM kinases: function, regulation and association with human disease », *J. Mol. Med.*, vol. 85, n° 6, p. 555-568, mai 2007, doi: 10.1007/s00109-007-0165-6.
- [251] F. Manetti, « LIM kinases are attractive targets with many macromolecular partners and only a few small molecule regulators », *Med. Res. Rev.*, vol. 32, n° 5, p. 968-998, sept. 2012, doi: 10.1002/med.20230.
- [252] E. Salah *et al.*, « Lessons from LIMK1 enzymology and their impact on inhibitor design », *Biochem. J.*, vol. 476, n° 21, p. 3197-3209, nov. 2019, doi: 10.1042/BCJ20190517.
- [253] N. C. Goodwin *et al.*, « Discovery of a Type III Inhibitor of LIM Kinase 2 That Binds in a DFG-Out Conformation », *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 6, n° 1, p. 53-57, janv. 2015, doi: 10.1021/ml500242y.
- [254] B. A. Harrison *et al.*, « Novel Class of LIM-Kinase 2 Inhibitors for the Treatment of Ocular Hypertension and Associated Glaucoma », *J. Med. Chem.*, vol. 52, n° 21, p. 6515-6518, nov. 2009, doi: 10.1021/jm901226j.
- [255] Y. Yin *et al.*, « Bis-aryl Urea Derivatives as Potent and Selective LIM Kinase (Limk) Inhibitors », *J. Med. Chem.*, vol. 58, n° 4, p. 1846-1861, févr. 2015, doi: 10.1021/jm501680m.
- [256] K. J. Mandell, M. R. Kudelka, et B. Wirostko, « Rho kinase inhibitors for treatment of glaucoma », *Expert Rev. Ophthalmol.*, vol. 6, n° 6, p. 611-622, déc. 2011, doi: 10.1586/eop.11.65.
- [257] S. Boland *et al.*, « Design, synthesis and biological characterization of selective LIMK inhibitors », *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 25, n° 18, p. 4005-4010, sept. 2015, doi: 10.1016/j.bmcl.2015.07.009.





# **Partie Expérimentale**

**Combiner la MST à la CE : une stratégie d'intérêt  
pour l'évaluation des interactions enzyme/ligand de  
petite taille dans des lysats cellulaires**



## Introduction générale

Comme cela a été détaillé dans le **chapitre I**, les protéines kinases jouent un rôle important dans de multiples processus cellulaires en contrôlant de nombreuses voies de signalisation cellulaire. Parmi les protéines kinases, la famille des LIM kinases, qui comprend LIMK1 et 2, est impliquée dans la régulation de la polymérisation de l'actine *via* la phosphorylation et l'inactivation des facteurs de dépolymérisation de l'actine ADF/cofiline. Parallèlement à un intérêt grandissant pour les LIM kinases, un nombre croissant d'inhibiteurs a été rapporté au cours de la dernière décennie. La concentration inhibitrice médiane ( $IC_{50}$ ) est la mesure la plus utilisée afin de quantifier la performance d'un médicament dans la recherche pharmacologique. Cependant, elle peut dépendre de la lignée cellulaire utilisée, de la concentration de la cible (enzyme) et peut ne pas différencier la capacité d'un composé à inhiber des interactions spécifiques dans un milieu biologique complexe, proche du *in vivo*. D'autre part, la constante de dissociation ( $K_d$ ) est le paramètre de référence pour évaluer la capacité d'un composé à se lier à sa cible.

L'inhibition des protéines entières LIMK1 et LIMK2 ainsi que de leur domaine catalytique Kin1 et Kin2 (donc la protéine tronquée mais qui garde son activité enzymatique) a été évaluée. Nous nous sommes focalisés dans ces travaux de thèse sur les inhibiteurs de référence disponibles dans le commerce ont été choisis : LX7101, BMS-5, TH-257 et T56-LIMKi. Dans la littérature, la valeur d' $IC_{50}$  a pu être mesurée en utilisant plusieurs techniques : l'incorporation de phosphate radioactif  $^{32}P$  ou  $^{33}P$  dans la cofiline ou la destrine, protéine apparentée de la famille de la cofiline. La spectrométrie permet une mesure quantitative, sans marquage, à la fois du substrat et du produit dans des essais *in vitro*, utilisant des milieux d'incubation purifiés et dessalés au moment de la détection. Elle a fourni également des données sur la phosphorylation de la cofiline *in cellulo*. Le titrage calorimétrique isotherme (ITC) a été utilisé pour évaluer la seule valeur de  $K_d$  pour ces cibles, et précisément entre TH-257 et Kin1 purifiée. L'ITC est limitée par la nécessité d'utiliser une concentration de l'ordre du micromolaire de protéines purifiées ce qui n'est clairement pas cohérent avec des essais d'interaction dans des conditions proches du *in vivo*.

Nous avons choisi la thermophorèse à micro-échelle (MST) afin d'évaluer les interactions entre les LIM Kinases et leurs ligands de petites tailles. Cette technique ne nécessite pas de radioactivité ni d'immobilisation de surface et est adaptée à des essais d'interactions dans des matrices complexes telles que les lysats cellulaires sans purification de la cible. Par ailleurs, la MST est bien adaptée à l'évaluation de la valeur de  $K_d$  pour l'interaction entre les enzymes (plusieurs kDa) et les petits ligands (moins de 1 kDa). La MST est basée sur le suivi d'un signal fluorescent dans un capillaire lorsque l'on applique un

gradient de température induit par un laser infrarouge à 1475 nm. Afin de rendre une enzyme fluorescente, le marquage chimique de ladite cible est la méthode privilégiée. Cependant, lors de l'utilisation d'un marquage fluorescent chimique de la cible dans des échantillons complexes, tels que des extraits cellulaires, la répétabilité du processus peut être faible, un sur- ou sous-marquage de la cible peut être observé, et le choix du tampon MST peut être limité. Afin de contourner le marquage chimique, plusieurs groupes ont travaillé avec des protéines de fusion émettant dans le spectre vert (Green Fluorescent Protein, GFP) ou jaune (Yellow Fluorescent Protein, YFP). Cependant, les protéines de fusion de type GFP ou YFP ne sont pas bien adaptées aux mesures des interactions de haute affinité ( $K_d$  de quelques nM) directement dans les extraits cellulaires en raison de l'auto-fluorescence de la matrice. Pour cela, nous proposons dans la première partie de ce travail de thèse (**chapitre II**), l'utilisation d'une protéine fluorescente monomérique dans le proche infrarouge, la mRFP670, pour réaliser des mesures de MST directement dans des lysats cellulaires, sans aucune étape de purification. L'utilisation de la mRFP670 permet de travailler en MST dans une fenêtre optique - environ 650 à 900 nm - où le bruit de fond de la fluorescence des cellules (et des tissus) est faible. Le  $K_d$  pour l'interaction de LIMK1, LIMK2, Kin1 et Kin2 avec les différents types d'inhibiteurs de référence (LX7101, BMS-5, TH-257 et T56-LIMKi) a été étudié de façon systématique, directement dans les lysats de cellules dérivées de rein embryonnaire humain appelées les cellules HEK293 (voire même cellules HEK). Ces cellules sont faciles à cultiver et à transfecter et sont donc largement utilisées dans les expériences basées sur la transfection, l'expression des protéines et la production de vaccins.

Après avoir étudié les interactions entre les LIM Kinases et leurs inhibiteurs de référence, nous avons voulu vérifier que la protéine de fusion mRFP670-LIMK est toujours active, malgré la présence du tag fluorescent. En effet, les études d'affinités sont souvent faites dans la littérature sur des protéines modifiées, mais l'activité catalytique de l'enzyme cible est rarement vérifiée. Une perte d'activité dans ce cas peut révéler une modification de la conformation 3D de la cible au cours des étapes de marquage et des étapes de purification lorsque celles-ci sont nécessaires pour éliminer l'excès de l'agent de fluorescence encore libre. Vérifier si une enzyme conserve son activité après le marquage est crucial pour le développement de médicaments dans les conditions les plus proches de celles *in vivo*. Pour cela, dans le **chapitre III**, nous avons développé une méthode basée sur l'électrophorèse capillaire (CE) afin de valider la conservation de l'activité de phosphorylation de la cofiline, en présence d'ATP – donneur de phosphate, par la mRFP670-LIMK1 ainsi que son inhibition en présence du TH-257. La méthode la plus simple pour contrôler l'activité enzymatique est d'observer l'augmentation de la concentration du produit de la réaction dans le milieu réactionnel. La cofiline (ou tout autre facteur de dépolymérisation de l'actine) n'a jamais été étudiée par CE, et surtout pas directement dans un lysat

cellulaire. En raison de leur nature, ces protéines, ainsi que les constituants du lysat cellulaire, peuvent provoquer des phénomènes d'adsorption indésirables significatifs sur les capillaires en silice utilisés pour les séparations en CE. La mise en place de solutions efficaces est ainsi nécessaire pour permettre des analyses quantitatives réussies par la suite.

Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes qui régissent les interactions entre les LIM Kinases et leurs inhibiteurs, nous avons mis en place dans le **chapitre IV** une méthode basée sur la MST pour l'évaluation des paramètres thermodynamiques de l'interaction entre les LIMKs et deux de leurs inhibiteurs de référence dans les lysats cellulaires. Pour ce faire, la constante de dissociation ( $K_d$ ) a été mesurée à différentes températures. Le modèle de Van't Hoff a été utilisé pour décrire l'effet de la température sur les constantes d'équilibre. Les paramètres thermodynamiques de miRFP670-LIMK avec un inhibiteur compétitif, le LX7101, et un inhibiteur allostérique, le TH-257, ont été évalués.



# **Chapitre II :**

**Étude de l'interaction LIM  
Kinase/inhibiteur dans des lysats cellulaires  
utilisant la thermophorèse à micro-échelle  
dans le spectre rouge**

## Introduction

La dynamique cellulaire est orchestrée par de nombreuses interactions moléculaires impliquées dans des voies de signalisation. L'étude de ces interactions dans des conditions proches de l'*in vivo* reste un défi majeur pour la découverte de nouveaux médicaments. Dans ce chapitre, la MST est proposée comme une technique versatile pour évaluer des constantes de dissociation ( $K_d$ ), du nM au  $\mu$ M, des interactions protéine/petit ligand directement dans des lysats cellulaires sans étape de purification. À cette fin, nous présentons pour la première fois l'utilisation de la protéine miRFP670, émettant dans le spectre rouge, comme fluorophore pour la MST. Contrairement à la protéine GFP, couramment utilisée pour des études dans le spectre vert, la protéine miRFP670 devrait permettre des études par MST dans une fenêtre optique où la fluorescence des lysats cellulaires est faible. Les protéines miRFP670-LIMK, fluorescentes, ont été surexprimées dans des cellules HEK293, confirmées par des analyses par western blot. Les lysats cellulaires contenant les miRFP670-Kinases ont ensuite été analysés par MST et les valeurs de  $K_d$  pour évaluer l'affinité de l'interaction avec divers inhibiteurs ont été obtenues de manière systématique. Les résultats obtenus ont été mis en perspective avec les résultats de la littérature, souvent en termes d' $IC_{50}$ .

## LIM Kinase/inhibitor binding study in cell lysates using microscale thermophoresis in the red spectrum

Solweig CHARTIER<sup>1</sup> and coworkers from the following affiliations:

<sup>1</sup>Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), CNRS FR 2708 – UMR 7311, Université d'Orléans, 45067 Orléans, France. e-mail\*: [reine.nehme@univ-orleans.fr](mailto:reine.nehme@univ-orleans.fr)

<sup>2</sup> Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301, CNRS-Université d'Orléans and INSERM, 45071 Orléans CEDEX 2, France

<sup>3</sup>Normandie Université, COBRA, UMR6014 & FR3038 CNRS, Université de Rouen, INSA de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

*Members of the consortium performed MST experiments and analyzed the corresponding data; planed and performed docking experiments and the experiences for the production of HEK293 cells overexpressing miRFP670-LIMKs. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.*

**Key words:** Microscale Thermophoresis, red fluorescent protein, LIM Kinases, cell lysates, molecular interactions, Binding affinity

## Abstract

Cell life is orchestrated by many molecular interactions triggering signalling pathways. Key in drug discovery, studying these interactions under conditions close to *in vivo* remains a hard challenge. In this study, microscale thermophoresis (MST) is shown as a valuable technique that allows the evaluation of the dissociation constant ( $K_d$ ), from nM to  $\mu$ M, of protein/small ligand interactions directly in cell lysates without radioactivity, immobilization or any purification steps. For this purpose, we report for the first time the use of the red fusion mRFP670 protein as a fluorophore for MST. In contrast to the commonly used Green fluorescent protein (GFP), mRFP670 allowed to conduct MST assays in an optical window where background autofluorescence of cells and most molecules is low. LIM kinases (LIMKs) were used as enzymes of interest because, despite their established implication in numerous pathologies, no inhibitor has passed the clinical trial stage, undoubtedly due to a lack of holistic understanding of these therapeutic targets. Red-fluorescent mRFP670-LIM Kinases were overexpressed in HEK293 cells, as confirmed by western blot analyses. Cell lysates containing mRFP670-LIM Kinases were then analysed by MST and  $K_d$  values for the affinity of the interaction of full length or kinase domains of LIMK1/2 with various small inhibitors were obtained in a systematic manner. The proposed approach has a plethora of potential applications and demonstrates MST versatility when it comes to studies in near-native conditions.

## Introduction

Protein kinases play a crucial role in cell fate by controlling many signal transduction pathways *via* the activation or deactivation of their targets. For instance, they control metabolism, cell division, differentiation, motility and they participate in the immune response and nervous system function <sup>1</sup>. Among protein kinases, the LIM kinase family, which includes LIMK1 and 2, is involved in the regulation of actin filament turnover *via* the phosphorylation and inactivation of the actin depolymerizing factor (ADF) cofilin. They also play a role in microtubule dynamics, but the molecular connection remain to be elucidated.<sup>2</sup> LIMKs regulate many physiological processes and as a consequence they are involved in several diseases: cancer, neuronal diseases, neurofibromatosis, viral infections, pain and erectile dysfunctions. For instance, high levels of LIMK1 are observed in exceedingly invasive breast and prostate cancer cell lines, <sup>3</sup> making them an attractive key target for developing drugs in cancer therapy <sup>4</sup>. Along with this growing interest in LIM kinases, an increasing number of inhibitors have been reported during the last two decades. The half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) is the most widely used and informative measure of a drug's potency in pharmacological research. Yet, it can depend on the experimental cell line used, on the target (enzyme) concentration and may not differentiate a compound's ability to inhibit specific interactions. On the other hand, the equilibrium dissociation constant (K<sub>d</sub>) is the basic parameter to evaluate the binding property of a drug to its target. Under most experimental conditions, IC<sub>50</sub> values do not accurately reflect K<sub>d</sub> values.<sup>5</sup>

Many inhibitors of LIMKs are well described in the literature; the following ones are commercially available. BMS-5/LIMKi3, a thiazole derivative, is a potent LIMK inhibitor as demonstrated by Ross-Macdonald et al.<sup>6</sup> It showed a nanomolar IC<sub>50</sub> towards both LIMK1 and LIMK2. T56-LIMKi belonging to isoxazole derivative compounds has been identified in 2012 as a LIM kinase inhibitor.<sup>7</sup> This compound reduced phosphorylation of cofilin, in NF1-deficient mouse embryonic fibroblasts. The same authors demonstrated in a subsequent study<sup>8</sup> that T56-LIMKi reduced cofilin phosphorylation in HeLa cells overexpressing LIMK2 but not LIMK1. Moreover, T56-LIMKi also inhibited growth of several cancer cell lines (*i.e.* U87 glioblastoma and Panc-1 pancreatic cancer) at micromolar concentrations.<sup>9</sup> Collins et al.<sup>10</sup> concluded very recently that, surprisingly, T56-LIMKi would not be a LIM Kinase inhibitor. In 2015, Harrison *et al.*<sup>11</sup> reported a novel class of pyrrolopyrimidine LIMK inhibitors efficient in treating intraocular pressure in a mouse model. This family of compounds inhibits potently LIMK1 and LIMK2 in both *in vitro* and cell-based assays. Among developed molecules, LX7101 completed the investigational new drug enabling studies and was tested in a phase I/IIa clinical trial in 2015. Aryl sulfonamide series were described by Goodwin et al.<sup>12</sup> These compounds, such as

TH-257, are LIM Kinase inhibitors that does not bind to the hinge region of the kinase that is to say they do not bind competitively against ATP<sup>12,13</sup>. TH-257 is the only LIM Kinase inhibitor for which a  $K_d$  is available (64 nM towards Kin1).<sup>14</sup> Mostly, the inhibition of LIMK1, LIMK2, Kin1 and Kin2 (kinase domains of LIMK1 and LIMK2, respectively) by the referenced and commercially available inhibitors LX7101, BMS-5, TH-257 and T56-LIMKi have been characterized in term of  $IC_{50}$ , as it can be seen in Table 1. For this, several techniques are used.<sup>6,10,11,14,15</sup> More precisely, the radioactive phosphate (<sup>32</sup>P or <sup>33</sup>P) incorporation into recombinant cofilin or the related cofilin family protein destrin was used to obtain the  $IC_{50}$  for LIMK1/2 as well as Kin1/2. However, this is a controversial technique because the radioactivity may contaminate the work environment and an appropriate storage of radioactive waste is mandatory<sup>6,16</sup>. Mass spectrometry may allow label-free quantitative measurement of both substrate and product in *in vitro* assays, as long as a mass shift occurs.<sup>17</sup> For electrospray ionization (ESI), the RapidFire system<sup>18</sup> has been described on purified LIMK kinase domains to study their inhibition *in vitro*, whereas NanoBRET was used exclusively to determine the  $IC_{50}$  of small molecules towards full length LIMKs and provided data on the cofilin phosphorylation *in celullo*.<sup>10,14</sup> More specifically, all  $IC_{50}$  obtained by radioactive phosphate incorporation and RF-MS assays resulted from the study of proteins expressed in insect cells. Only the nanoBRET assay was conducted on mammalian HEK293 cells for studying the inhibition of full length LIMK1/2. Isothermal calorimetry (ITC) has been reported to evaluate the affinity between some small inhibitors and LIMK1 kinase domain.<sup>14</sup> This technique requires a large amount of purified protein (hundreds of micromolars). For this study, microscale thermophoresis (MST) was chosen to evaluate the interaction between enzymes, LIMKs, and their small ligand inhibitors. MST is based on the monitoring of a fluorescent signal in a 10  $\mu$ L glass capillary upon a few degrees' temperature gradient induced by an infrared laser at 1475 nm at its focal volume of a few nanolitres. Fluorescence intensity will change due to a dimming of the fluorophore by the temperature along with a concentration modification induced by the thermophoretic motion within the temperature gradient. When a ligand is added to the target solution, if a binding occurs the fluorescence modification upon measurement will be modified and this modification can be quantified using various ligand concentrations to evaluate the affinity between both molecules. The MST signal of the molecules depends on their size, charge, and hydration shell<sup>19–21</sup>. The labelled molecules' fluorescence is measured and converted into a binding curve from which the  $K_d$  of the target and its ligand is calculated. MST requires no radioactivity or surface immobilisation and is expected to work well in complex matrices such as cell lysate without purification of the target.<sup>22–24</sup> Only a few micromolar of target/ligand solutions are needed and the  $K_d$  is evaluated in less than 20 minutes.<sup>25,26</sup> MST is well suited for the evaluation of  $K_d$  value for the interaction between

enzymes (several kDa) and small ligands (less than 1 kDa)<sup>22,27–29</sup>. However, when using chemical fluorescent labelling of the target in complex samples, such as cell extracts, the repeatability of the process can be low<sup>28</sup>, over or under labelling of the target can be observed, and the choice of the MST buffer can be limited.<sup>22</sup> In order to bypass chemical labelling, several groups have worked with fusion protein emitting in the green (Green Fluorescent Protein, GFP)<sup>23,29,30</sup> or yellow (Yellow Fluorescent Protein, YFP)<sup>31,32</sup> spectrum. Khavrutskii *et al.*<sup>30</sup> used GFP-fused protein for the first time to determine the affinity of STAT3, a cytoplasmic transcription factor, to different sequences of oligonucleotides without purification of the target protein from cell lysates. Later, this protocol was adapted to evaluate, directly in cell lysates, the affinity of the PD-1/PD-L1 couple, which is involved in tumour escape processes.<sup>23</sup> However, GFP- or YFP-like fusion proteins are not well adapted for high affinity measurements ( $K_d$  of few nM) directly in cell extracts because of the background autofluorescence of the matrix. The RED-tris-NTA (nitrilotriacetic acid) demonstrates a strong affinity for His<sub>6</sub>-tagged proteins. Its emission in the red region of the spectrum allows for reliable measurements even within complex biological matrices like cell lysates.<sup>22</sup>

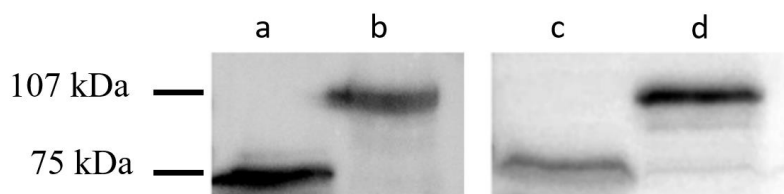
In this study, our group reports and validates, for the first time, the use of a monomeric near-infrared (NIR) fluorescent protein (FP), the mRFP670, to conduct MST assays directly in cell lysate without any purification step of the target. The use of mRFP670 allows to work in MST in an ‘optical window’ – approximately 650 to 900 nm – where background autofluorescence of cells (and tissues) is low and light scattering is reduced<sup>33</sup>. LIMK1, LIMK2 and their kinase domains were fused with mRFP670 at their C-terminal extremity, based on Verkhusha *et al.*<sup>34</sup> work, they were named as mRFP670-LIMK1/2 or mRFP670-Kin1/2. The  $K_d$  for the inhibition of LIMK1, LIMK2, Kin1 and Kin2 by various types of referenced inhibitors (LX7101, BMS-5, TH-257 and T56-LIMKi) was studied in a systematic way, directly in HEK293 cell lysates overexpressing these different mRFP670 fused proteins.

## Results

### Production of proteins tagged with mRFP670.

Full length LIMK1 and LIMK2 as well as their respective kinase domains, Kin1 and Kin2, were fused at their C-terminal part to mRFP670<sup>35</sup>. HEK293 cells were transiently transfected with the different plasmids pmiRFP670-LIMK1, pmiRFP670-LIMK2, pmiRFP670-Kin1, or pmiRFP670-Kin2. Cells were lysed, and lysates were analyzed by western blot using anti-LIMK1 or anti-LIMK2 antibodies which recognized both full length kinases and kinase domains as they recognize the C-terminal part of

LIMKs. As it can be seen in Figure 1, all four constructs were effectively expressed at the expected size: 75 kDa for Kin1 and Kin2 (Fig. 1a and 1c) fused with miRFP670 (which is 35 kDa on its own), and 107 kDa for LIMK1 and LIMK2 (Fig. 1b and 1d) fused with miRFP670.



**Figure 1:** Western blot analysis of a) miRFP670-Kin1, b) miRFP670-LIMK1, c) miRFP670-Kin2 and d) miRFP670-LIMK2 overexpressing lysates. Anti-LIMK1 antibody was used in a) and b). Anti-LIMK2 antibody was used in c) and d).

The concentration of miRFP670-protein in the cell lysates was estimated on 4 different lysates (n=4) using double beam UV-visible spectroscopy at 642 nm, the specific excitation wavelength of miRFP670, in order to avoid any interference with other species in the cell lysate. UV-visible spectroscopy was conducted to determine the concentration of miRFP670-kinases because miRFP670 is not yet widely used nor studied. In contrast, dosage kits for GFP are commercially available, and the use of calibration curves for its quantification is well established <sup>23</sup>. The concentration obtained in the different lysates were of few hundreds of nM regardless of the type of the kinase produced. The concentrations in the cell lysates used all over this study were found to be 487 nM for miRFP670-Kin1, 453 nM for miRFP670-LIMK1, 416 nM for miRFP670-Kin2 and 494 nM for miRFP670-LIMK2. This was satisfactory giving that few tens of nM of fluorescent proteins should be enough for MST assays *i.e.* to obtain fluorescence intensity of at least 3000 counts (as per the manufacturer's instructions). The schematic representation of the procedure from molecular cloning to the determination of the dissociation constant between miRFP670-proteins and their inhibitors is available in Supplementary Fig. S1.

### **MST signal is driven by buffer composition.**

To determine the best conditions for evaluating the interaction between miRFP670-Kinases and their ligands, the storage conditions of the cell lysates (temperature and storage buffer) and the composition of the working or MST buffer were investigated. According to the recommended usage guidelines for correct MST utilization, the ideal working buffer must provide uniform fluorescence among the sixteen capillaries, with a maximum tolerance of 20% from the average. MST traces should not present any bumpy curve that is characteristic of target aggregation. The storage buffer of the cell lysates and the

inhibitor solvent were carefully studied since the stock solutions will be diluted in the MST buffer during the analysis and will therefore influence its composition. Cell lysates containing miRFP670-LIMK2 were selected for the optimization trials. Once the optimal conditions were determined, they were used to study the remaining protein kinases of interest; miRFP670-Kin1, miRFP670-LIMK1 and miRFP670-Kin2.

First, non-transfected HEK293 cells were used to evaluate the fluorescent background signal. This signal was negligible, less than 500 counts at 100% excitation power, even in the undiluted lysates. Then, the influence on the MST signals of a flash freezing of the fresh cell lysates at -20°C and at -80°C, without adding any cryoprotectant agent, was evaluated. The results showed that miRFP670-LIMK2 frozen either at -20°C or -80°C exhibited a very low fluorescence signal and MST traces were disturbed compared to fresh lysates. This could be due to the formation of fine ice crystals during fast freezing impairing the 3D conformation of proteins.<sup>36</sup> These results strongly suggest that the addition of a cryoprotectant agent is mandatory for optimal cell lysate storage. Glycerol, a commonly used cryoprotectant,<sup>37</sup> was chosen, and the addition of 30% (v/v) of glycerol to the cell lysate stored at -20°C allowed for the achievement of satisfactory results in terms of fluorescence intensity between 3000 and 20000 counts (as per the manufacturer's instructions) and smooth MST traces. For this purpose, a 1:10 dilution in the lysis buffer of each cell lysate was realized, for a final concentration of 34 nM for miRFP670-Kin1, 32 nM for miRFP670-LIMK1, 29 nM for miRFP670-Kin2 and 35 nM for miRFP670-LIMK2. The concentration of the fluorescent proteins was hence kept constant all over this study. A 20% LED excitation power and medium MST power were sufficient, and the measurements were performed in standard capillaries.

It is important to note that DMSO was required to dissolve the inhibitors of the LIMKs. In order to limit the influence of DMSO on the protein and binding analysis, the percentage of DMSO was limited to 0.1 % (v/v) for the rest of the study. It is well known that DMSO may change the properties of proteins in solution leading to protein denaturation, aggregation or degradation.<sup>38,39</sup> DMSO can even act as a competitive ligand as is the case for hGHbp<sup>40</sup> and alcohol dehydrogenase<sup>41</sup>. Cubrilovic and Zenobi<sup>42</sup> showed that a concentration of DMSO greater than or equal to 0.5 % (v/v) increased the  $K_d$  value of three different sets of protein/ligand. Very recently, Feoli *et al.*<sup>43</sup> demonstrated that the effects of DMSO are protein- and technique-dependent, and in particular, DMSO affects the MST traces and the subsequent  $K_d$  determination.

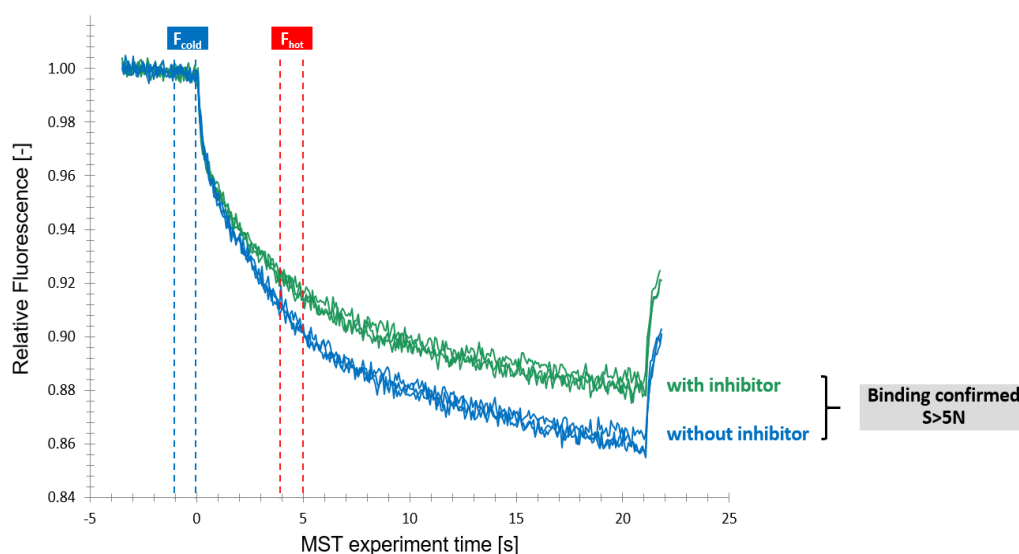
In this study, the MST experiments were all performed at 37°C in order to be at the average internal human body temperature. Al Hamoui Dit Banni *et al.*<sup>28</sup> previously calculated  $K_d$  for pancreatic lipases at 37°C. So far, most interaction studies using MST in literature were conducted between 22 °C and

25 °C to match already published data *e.g.* Thuru *et al.*<sup>44</sup>, Magnez *et al.*<sup>23</sup> and Tröster *et al.*<sup>45</sup>. Indeed, most affinity measurement equipment cannot tolerate a wide range of temperature operations (often constrained between 20-25°C). Therefore, the literature includes  $K_d$  measurement protocols within these temperature ranges, along with their associated values.

### **Measurement of ligand binding constants.**

Having set up the optimal conditions to store the cell lysates and to perform the MST affinity assays, the interaction of miRFP670-protein with some of their ligands, *i.e.* small molecule inhibitors described in the literature and commercially available was then studied. All inhibitors were prepared in 100% DMSO at initial concentration of 10 mM and stored at -20°C except for TH-257 which was at 4 mM (due to its lack of solubility at 10 mM). To ensure that the MST traces of the complex miRFP670-protein / inhibitor are only due to the state of the protein, whether free or bound, the autofluorescence of LX7101, BMS-5, T56-LIMKi3 and TH-257 were measured at the highest tested concentration. Our results confirmed that the four tested inhibitors had a negligible fluorescence intensity, less than 500 counts even at 100% excitation power.

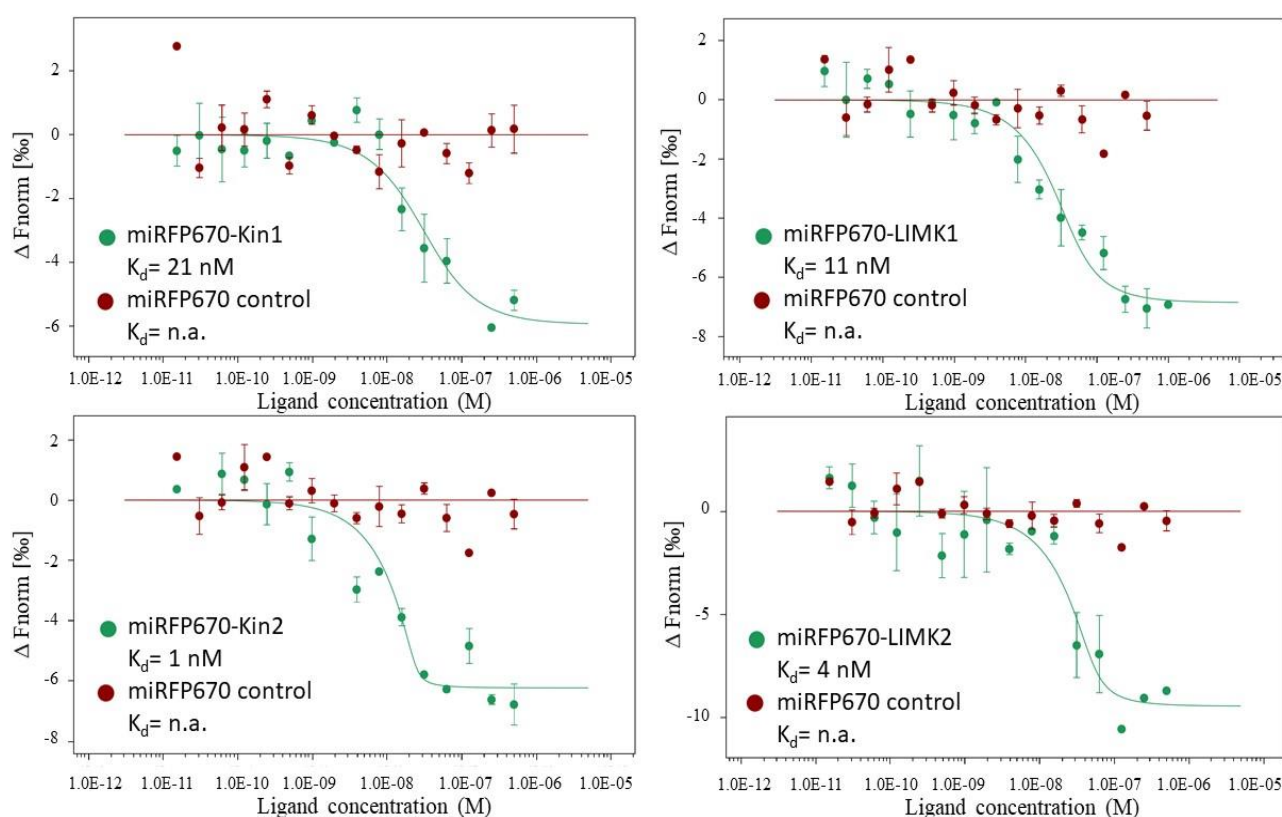
As only one  $K_d$  is available in the literature (Kin1 against TH-257) for LIM Kinase inhibitors, the concentration range of each of the tested inhibitors had to be defined. For this purpose, at first, the differences between MST traces recorded for miRFP670-LIMK2 in the absence or in the presence of LX7101 were examined to conduct the so-called “binding check” towards this compound. This experiment consists in scanning 8 capillaries, 4 of them containing miRFP670-LIMK2 without LX7101 (blue traces in Fig. 2) and the 4 others containing miRFP670-LIMK2 with LX7101 at 500 nM (green traces in Fig. 2). The chosen maximum concentration tested of each inhibitor was 10 to 100 folds the  $IC_{50}$  found in the literature (or the  $K_d$  when available). As it can be seen, the repeatability of each experiment was confirmed since the blue curves are overlapped with each other, as are the green curves. Moreover, a clear difference is shown between the traces depending on the state of the protein whether free (blue traces) or bounded to LX7101 (green traces). Indeed, a signal to noise (S/N) ratio *i.e.* the amplitude of the signal divided by the standard deviation of the replicate was found to be equal to 11. This value is higher than 5, which is the manufacturer recommendations,<sup>29</sup> confirming a significant interaction between LIMK2 and LX7101 at 500 nM.



**Figure 2:** Influence of the presence of LX7101 (500 nM; green curves,  $n=4$ ) on miRFP670-LIMK2 thermophoretic traces as compared to the signal in the absence of LX7101 (blue curves,  $n=4$ ). Signal to noise ratio or  $S/N > 5$  indicates that the binding miRFP670-LIMK2 / LX7101 is confirmed. MST conditions: miRFP670-LIMK2 in cell lysate at 35 nM; DMSO at 0.005% (v/v) in the MST buffer; 37°C; LED power 20%; medium MST power; standard capillaries.  $F_{\text{cold}}$  indicates the “initial fluorescence” when the laser is off.  $F_{\text{hot}}$  indicates the thermophoresis response 5 seconds after the laser is turned on.

In the same manner, equivalent experiments were carried out with the three other inhibitors (BMS-5, T56-LIMKi and TH-257) and the other miRFP670-protein (Kin2, LIMK1, Kin1) in presence of the same inhibitors, and significant binding was always revealed. To summarize, the optimal maximum concentration was found to be 500 nM for LX7101 and BMS-5, 2  $\mu\text{M}$  for TH-257 and 10  $\mu\text{M}$  for T56-LIMKi. Afterwards, MST binding affinity assays were performed to measure the  $K_d$  value of the interaction between each of these inhibitors and the four miRFP670-proteins. For this, 16 different inhibitor concentrations were prepared using a 1 to 1 serial dilution starting from the concentration used for the binding check experiment.

The binding affinity study was carried out according to the protocol described in the “methods” part of this paper. Each experiment was repeated in triplicates for LX7101 and BMS-5 and in duplicates for T56-LIMKi and TH-257. A dose-response curve was obtained from two or three merged sets of experiments using the *MO.affinity Analysis* software (Figure 3) and error bars representing the standard deviation of the average values obtained for each concentration were also plotted.



**Figure 3:** Dose-response curves for the binding interaction between miRFP670-proteins and LX7101 (green) compared to the curves for miRFP670 mixed with the LX7101 (red).

The concentration of miRFP670-proteins is kept constant (Kin1 34 nM; LIMK1 32 nM; Kin2 29 nM and LIMK2 35 nM) whereas the concentration of LX7101 varies from 15 pM to 500 nM. Error-bars indicate the standard deviation of three merged sets ( $n=3$ ). Dose-response curves fitted to a one-site binding model provided with the MO.affinity Analysis software to obtain the  $K_d$  value. MST conditions are the same as in Figure 2.

The Figure 3 shows that each dose-response curve of LX7101 towards each miRFP670-protein displays well-defined lower and higher plateau for all conditions. The negative control, where the miRFP670 tag is mixed to the tested ligand instead of the miRFP670-kinases, showed a straight curve (red curves) corroborating the fact that the interactions between the tested kinases and ligand occur specifically with the LIM Kinase and not with the miRFP670. Given the impossibility of comparing the  $K_d$  values obtained by MST to  $K_d$  data from the literature, the results were contextualized by referring to  $IC_{50}$  values from the literature (Table 1). Despite the fact that under most experimental conditions (the type of cell expression vector used and the use or not of purified proteins - see “Introduction” section for more details), it can be mentioned that the  $K_d$  values obtained by MST in the optimized conditions are consistent with the  $IC_{50}$  values found in the literature. This approves the reliability of the approach implemented for studying LIMK1/2 or Kin1/2 interaction with LX7101 in cell lysates.

Table 1:  $IC_{50}$  or  $K_d$  (nM) for whole LIMK proteins or their kinase domain towards LX7101, BMS-5, T56 LIMKi and TH-257.

Values gathered from literature using various techniques (■, ●, ▲, \*) are compared with those obtained in this study using Microscale Thermophoresis (◇) (highlighted in grey).

| IC <sub>50</sub> or K <sub>d</sub> (nM) using various techniques for full length LIMK1/2 or their Kin1/2 domain |         |        |                    |         |        |                    |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|--------|--------------------|---------|--------|--------------------|------------|
|                                                                                                                 | Kin1    | Kin2   | Tool, constant     | LIMK1   | LIMK2  | Tool, constant     | Reference  |
| LX7101                                                                                                          | 12      | 11     | ■ IC <sub>50</sub> | 23      | 7      | ▲ IC <sub>50</sub> | [10]       |
|                                                                                                                 | 32      | n.d.   | ● IC <sub>50</sub> | n.d.    | 4      | ● IC <sub>50</sub> | [11]       |
|                                                                                                                 | n.d.    | n.d.   | n.r.               | 24      | 2      | ● IC <sub>50</sub> | [15]       |
|                                                                                                                 | 21      | 1      | ◇ K <sub>d</sub>   | 11      | 4      | ◇ K <sub>d</sub>   | This study |
| BMS-5 or LIMKi3                                                                                                 | 7       | 8      | ● IC <sub>50</sub> | n.d.    | n.d.   | n.r.               | [6]        |
|                                                                                                                 | 6       | 33     | ■ IC <sub>50</sub> | 76      | 26     | ▲ IC <sub>50</sub> | [10]       |
|                                                                                                                 | 16      | 12     | ■ IC <sub>50</sub> | 62      | 17     | ▲ IC <sub>50</sub> | [14]       |
|                                                                                                                 | 54      | 15     | ◇ K <sub>d</sub>   | 1       | 55     | ◇ K <sub>d</sub>   | This study |
| T56-LIMKi                                                                                                       | >10 000 |        | ■ IC <sub>50</sub> | >10 000 |        | ▲ IC <sub>50</sub> | [10]       |
|                                                                                                                 | 595     | 21 300 | ◇ K <sub>d</sub>   | 47 800  | 18 600 | ◇ K <sub>d</sub>   | This study |
| TH-257                                                                                                          | 200     | 14     | ■ IC <sub>50</sub> | 230     | 191    | ▲ IC <sub>50</sub> | [10]       |
|                                                                                                                 | 84      | 15     | ■ IC <sub>50</sub> | 238     | 91     | ▲ IC <sub>50</sub> | [14]       |
|                                                                                                                 | 64      | n.d.   | * K <sub>d</sub>   | n.d.    | n.d.   | n.r.               | [14]       |
|                                                                                                                 | 33      | 12     | ◇ K <sub>d</sub>   | 9       | 16     | ◇ K <sub>d</sub>   | This study |

**Annotations:** ■ RF-MS, RapidFire Mass spectrometry assay; ● Radiometric phosphorylation assay; ▲ Cellular NanoBRET assay; \* ITC, Isothermal titration calorimetry; ◇, MST; n.d.: not determined; n.r.: not relevant.

It is important to note that, at equilibrium, precise measurement of  $K_d$  values is relevant when they exceed the concentration of the target protein. Here, some  $K_d$  values are obviously lower than the target concentration, which is around 30 nM for each of the targeted proteins. Therefore, in this case, it is more accurate to conclude that  $K_d$  is less than [target]/10, that is less than 3 nM. This confirms the conclusion drawn in literature: LX7101 exhibits significant affinity for the tested proteins, on the order of a few nanomolars, in cell lysates.

The affinity constants of the 4 proteins with each of the three other inhibitors of interest could also be evaluated. These data were summarized in Table 1 and compared with the literature. The same observation as for LX7101 was reported with the three other inhibitors as it can be seen in the Supplementary Information (Fig. S2 for BMS-5, Fig. S3 for T56-LIMKi and Fig. S4 for TH-257).

As for LX7101, the characterization of BMS-5 revealed a low nanomolar affinity for Kin1/2 as well as LIMK1/2. The claimed LIMK2-selective inhibitor, T56-LIMKi, was found to be weakly active (towards Kin1) or even inactive ( $K_d > 10 \mu M$ ), which is consistent with the results recently proclaimed by Collins *et al.*<sup>10</sup> The results confirm that T56-LIMKi exhibits good specificity for Kin1, despite its

low efficiency and a lack of interaction with the other targets, which reinforces the notion that LIMK1 cannot be solely characterized by its kinase domain Kin1 (21300 nM vs. 595 nM, a 36-fold difference). Hanke *et al.*<sup>14</sup> determined the  $K_d$  of TH-257 with Kin1 by ITC at 20°C. Precisely, LIMK1 residues 330 to 637 were amplified by PCR using suitable primers to obtain recombinant LIMK1 kinase domain, LIMK1<sub>330-637</sub>, expressed in insect cells, at a concentration of about 50 nM after appropriate purification. ITC revealed that  $K_d$  value of TH-257 towards Kin1 was 64 nM. This is of the same order of magnitude as the value of 33 nM obtained in this study by MST, in lysates without any purification. All these results confirm the interest of the MST as an efficient tool to evaluate protein/small ligand interaction directly in cell lysates.

## Discussion

Development of close to native analysis conditions is crucial in the understanding and quantification of intermolecular interaction leading to the development of new drugs. For this reason, a new MST protocol was developed to study molecular interactions in the red spectrum using a fusion fluorescent protein, which so far was only performed using green fluorescent proteins, suffering from possible important background noise. This protocol involves the overexpression of mRFP670-LIMK fusion protein in HEK293 cells, followed by cell lysis and MST binding affinity studies directly in the aforementioned cell lysate without purification. During the development of this protocol, several parameters were identified as critical for obtaining repeatable and exploitable MST curves: the conditions of the conservation of the tagged proteins and the working buffer (MST buffer) composition with DMSO being highly detrimental to the MST signal quality and thus the relevance of the results. The work reported herein allowed for the determination of new dissociation constants,  $K_d$ , in agreement with the dissociation constant and the half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) in the literature when available. It is important to recall that  $IC_{50}$  is the most widely used metric when it comes to enzyme/inhibitor interaction characterization. But the main limitation of this indicator is its enzyme concentration dependence. The development of methods to determine  $K_d$  provides complementary information and can speed up the work of drug discovery. All three inhibitors, LX7101, BMS-5 or LIMKi3 and TH-257 showed sub-micromolar on-target activity, making them suitable as chemical probes for LIMKs studied as full-length proteins (LIMK1/2) or as kinase domain (Kin1/2). In this notion, it is important to emphasize that the amalgam “LIMK2 = Kin2” and “LIMK1 = Kin1” must be treated cautiously in the literature. Experiments conducted on Kin1/2 can be inadvertently presented

as results on full length LIMK1/2, while the present study shows that  $K_d$  may differ from the kinase domain compared to the full-length LIM Kinase.

Furthermore, our results regarding T56-LIMKi strongly support recently published studies suggesting that T56-LIMKi has no inhibitory activity against either LIMK1 or 2. These results showed that MST is a powerful, simple and efficient tool to study the binding affinity in cell lysates in a straightforward manner compared to conventional techniques. Results also showed that miRFP670 is very efficient as fluorescent fusion protein for MST experiments, sparing laborious purification steps. Due to the tagging of the protagonist target by miRFP670 fusion protein, the developed MST-based approach allows to accurately determine  $K_d$  values of kinase/ligand interaction and helps distinguish inhibitors that specifically target the labelled kinases in a cell lysate. Important details of the experimental procedure have been revealed in this paper to allow the application of this novel method. This work opens a large array of new possibilities for the assessment of intermolecular interactions by MST in near-native conditions allowing for more physiologically realistic studies.

## Methods

### Cloning.

To construct pmiRFP670-LIMK1, LIMK1 was amplified by PCR from the plasmid pcDNA3-LIMK1<sup>46</sup> with oligonucleotides CGACGTGCTAGCGCCACCATGAGGTTGACGCTACTTTGT and CTGAGCACCGGTAAGTCGGGGACCTCAGGGTGGGC, and cloned into the miRFP670 plasmid (#79987 from Addgene, Watertown, USA) opened with NheI and AgeI restriction sites. The pmiRFP670-Kin1 was constructed by PCR amplifying the fragment of LIMK1 encoding the kinase domain using the same template and oligonucleotides CGACGTGCTAGCGCCACCATGAGCATCGACAGGTCTCCG and CTGAGCACCGGTAAGTCGGGGACCTCAGGGTGGGC, and cloned into the miRFP670 plasmid with the same restriction sites. To construct pmiRFP670-LIMK2, LIMK2 was amplified by PCR from the plasmid pcDNA3-LIMK2a<sup>46</sup> with oligonucleotides CGACGTGAATTCGCCACCATGTCCGCGCTGGCGGGTGAA and CTGAGCACCGGTGCGGGAGGTGAGTCCCGGGTCA, and cloned into the miRFP670 plasmid opened with EcoRI and AgeI restriction sites. The pmiRFP670-Kin2 was constructed by PCR amplifying the kinase domain of LIMK2a using the same template and oligonucleotides CGACGTGCTAGCGCCACCATGAGTATCTCCAAGTCCCCTGGCCCCAGCTC and CTGAGCACCGGTGCGGGAGGTGAGTCCCGGGTCA, and cloned into the miRFP670 plasmid

opened with NheI and AgeI restriction sites. All the constructions were checked by sequencing by Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany).

### **Cell culture.**

HEK293 (ATCC, CRL1573) were cultured under 5% CO<sub>2</sub> at 37°C in low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum. Cells were transiently transfected with 10 µg of expression plasmid/100-mm dish using calcium phosphate method. They were cultured for 48h before performing any experiments. Cells were regularly checked for mycoplasma contamination using a luminescence-based kit (Lonza, MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit).

### **Lysis.**

Cells were lysed in 0.5 mL of lysis buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 50 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 20 mM p-nitrophenyl phosphate, 20 mM β-glycerophosphate, 10 µg/mL aprotinin, 0.05 µg/mL okadaic acid, 1 µg/mL leupeptin, and 1 mM PMSF), and incubated on ice for 10 min. After centrifugation for 10 minutes at 10,000 x g, supernatants were collected. This corresponds to the cell lysate fraction.

### **Western Blot.**

Proteins were separated on a 10% SDS-PAGE, at +200 V, and transferred onto Immobilon-P PVDF membranes (IPVH00010) using a wet-transfer system (BioRad) at +100 V and 4°C for 90 minutes. Membranes were then blocked in 5% non-fat milk in Tris buffered saline with 0.1% Tween-20 (TBS-T) for 60 minutes. Membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibody anti-LIMK1 antibody (#8146 from Cell Signaling) and anti-LIMK2 antibody (sc 5577 from Santa Cruz Biotechnology® Inc.). Both of these antibodies recognize full-length LIMKs as well as their kinase domains. Membranes were washed six times during 5 minutes prior to incubation with secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Invitrogen) for 120 minutes. The proteins were then visualized by chemiluminescence (SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate, Pierce™-ThermoFischer Scientific Inc.) using the PXi imaging system from SynGene.

## MST assay optimization.

MST experiments were performed on a Monolith® NT.115<sup>pico</sup> (NanoTemper Technologies GmbH, Munich, Germany). Samples were prepared in the previously described buffer and loaded into borosilicate standard capillaries. Measurements were performed at 37 °C using 20% excitation power and a medium MST power with laser off/on/off times of 5/20 /1 s, respectively using the MO.control 1.6.1. All experiments were repeated two or three times for each measurement. Data analyses were performed using the MO.affinity analysis 2.3.0 software. The  $K_d$  constants between a protein and its ligand was calculated using the saturation binding curve at equilibrium<sup>47</sup>. The fitting function is derived from the law of mass action:

$$\frac{[LP]}{[P_{tot}]} = \frac{[L_{tot}] + [P_{tot}] + K_d - \sqrt{([L_{tot}] + [P_{tot}] + K_d)^2 - 4[L_{tot}] \cdot [P_{tot}]}}{2[P_{tot}]} \quad (1)$$

With: [LP]: bound complex concentration; [P<sub>tot</sub>]: total protein concentration; [L<sub>tot</sub>]: total ligand concentration;  $K_d$ : dissociation constant.

## Measurement of protein concentration.

The protein concentration was estimated by using a double beam UV-Vis spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan). For this, each miRFP670-protein sample was transferred into 0.5 mL quartz cuvettes with 10-mm optical path length. UV-visible absorption of the solution was measured within a wavelength range of 190–800 nm at fast scan speed with 0.5-nm sampling intervals. Blank assays were conducted with lysis buffer. Then, the concentration of the miRFP670-kinase samples was estimated using Beer-Lambert law (equation 2):

$$A_{642} = \varepsilon_{642} \times l \times C \quad (2)$$

With:  $A_{642}$  the absorbance of the sample at the maximum of absorbance of the miRFP670 tag ( $\lambda_{max} = 642$  nm);  $l$  the optical path of the cuvette ( $l = 1$  cm);  $C$  the molar concentration (mol/L) of analyzed miRFP670-protein;  $\varepsilon$  the molar coefficient of miRFP670 at 642 nm ( $\varepsilon$  being equal to 87 400 L/mol/cm at 642 nm).<sup>48</sup>

## LIM Kinase binding assay

The binding affinities between miRFP670-proteins and four of their inhibitors were determined using MST. HEK293 cell lysate containing 30 % (v/v) of glycerol was diluted five times in the lysis buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 50 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 20 mM p-nitrophenyl phosphate, 20 mM  $\beta$ -glycerophosphate,

10 µg/mL aprotinin, 0.05 µg/mL okadaic acid, 1 µg/mL leupeptin, and 1 mM PMSF) in order to obtain the desired fluorescence intensity (between 3000 and 20000 counts). Solutions of 1 µM, 20 µM and 4 µM were prepared for LX7101 and BMS-5, T56-LIMKi and TH-257 respectively. A 16-point 1 to 1 serial dilution was made in the lysis buffer containing the same amount of DMSO as the highest concentration of inhibitor (0.01% for LX7101 and BMS-5, 0.2% for T56-LIMKi and 0.1% for TH-257) to ensure that the only variable is the inhibitor concentration. The 16 point of the dilution series was mixed in equivolume with the miRFP670-proteins in cell lysate, for a constant final concentration of protein and a concentration range of inhibitor reported in Table 2.

**Table 2:** Concentration of miRFP670-proteins and inhibitors used for MST binding affinity assays

| Inhibitor concentration range |    |                             |                |              |
|-------------------------------|----|-----------------------------|----------------|--------------|
| Protein concentration (nM)    |    | LX7101 or<br>BMS-5 (LIMKi3) | T56-LIMKi      | TH-257       |
| miRFP670-LIMK1                | 32 | 15 pM – 500 nM              | 305 pM – 10 µM | 60 pM – 2 µM |
| miRFP670-LIMK2                | 35 |                             |                |              |
| miRFP670-Kin1                 | 34 |                             |                |              |
| miRFP670-Kin2                 | 29 |                             |                |              |

## References

- (1) Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* **2002**, 298 (5600), 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>.
- (2) Bernard, O. Lim Kinases, Regulators of Actin Dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, 39 (6), 1071–1076. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.11.011>.
- (3) Davila, M.; Frost, A. R.; Grizzle, W. E.; Chakrabarti, R. LIM Kinase 1 Is Essential for the Invasive Growth of Prostate Epithelial Cells: Implications in Prostate Cancer. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (38), 36868–36875. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306196200>.
- (4) Bhullar, K. S.; Lagarón, N. O.; McGowan, E. M.; Parmar, I.; Jha, A.; Hubbard, B. P.; Rupasinghe, H. P. V. Kinase-Targeted Cancer Therapies: Progress, Challenges and Future Directions. *Mol. Cancer* **2018**, 17 (1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0804-2>.
- (5) Barbet, J.; Huclier-Markai, S. Equilibrium, Affinity, Dissociation Constants, IC50: Facts and Fantasies. *Pharm. Stat.* **2019**, 18 (5), 513–525. <https://doi.org/10.1002/pst.1943>.
- (6) Ross-Macdonald, P.; de Silva, H.; Guo, Q.; Xiao, H.; Hung, C.-Y.; Penhallow, B.; Markwalder, J.; He, L.; Attar, R. M.; Lin, T.; Seitz, S.; Tilford, C.; Wardwell-Swanson, J.; Jackson, D. Identification of a Nonkinase Target Mediating Cytotoxicity of Novel Kinase Inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, 7 (11), 3490–3498. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0826>.
- (7) Mashiach-Farkash, E.; Rak, R.; Elad-Sfadia, G.; Haklai, R.; Carmeli, S.; Kloog, Y.; Wolfson, H. J. Computer-Based Identification of a Novel LIMK1/2 Inhibitor That Synergizes with Salirasib to Destabilize the Actin Cytoskeleton. *Oncotarget* **2012**, 3 (6), 629–639. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.525>.
- (8) Rak, R.; Haklai, R.; Elad-Tzfadia, G.; Wolfson, H. J.; Carmeli, S.; Kloog, Y. Novel LIMK2 Inhibitor Blocks Panc-1 Tumor Growth in a Mouse Xenograft Model. *Oncoscience* **2014**, 1 (1), 39–48. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.7>.
- (9) Manetti, F. Recent Advances in the Rational Design and Development of LIM Kinase Inhibitors Are Not Enough to Enter Clinical Trials. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 155, 445–458. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.016>.
- (10) Collins, R.; Lee, H.; Jones, D. H.; Elkins, J. M.; Gillespie, J. A.; Thomas, C.; Baldwin, A. G.; Jones, K.; Waters, L.; Paine, M.; Attack, J. R.; Ward, S. E.; Grubisha, O.; Foley, D. W. Comparative Analysis of Small-Molecule LIMK1/2 Inhibitors: Chemical Synthesis, Biochemistry, and Cellular Activity. *J. Med. Chem.* **2022**. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00751>.
- (11) Harrison, B. A.; Almstead, Z. Y.; Burgoon, H.; Gardyan, M.; Goodwin, N. C.; Healy, J.; Liu, Y.; Mabon, R.; Marinelli, B.; Samala, L.; Zhang, Y.; Stouch, T. R.; Whitlock, N. A.; Gopinathan, S.; McKnight, B.; Wang, S.; Patel, N.; Wilson, A. G. E.; Hamman, B. D.; Rice, D. S.; Rawlins, D. B. Discovery and Development of LX7101, a Dual LIM-Kinase and ROCK Inhibitor for the Treatment of Glaucoma. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, 6 (1), 84–88. <https://doi.org/10.1021/ml500367g>.
- (12) Goodwin, N. C.; Cianchetta, G.; Burgoon, H. A.; Healy, J.; Mabon, R.; Strobel, E. D.; Allen, J.; Wang, S.; Hamman, B. D.; Rawlins, D. B. Discovery of a Type III Inhibitor of LIM Kinase 2 That Binds in a DFG-Out Conformation. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, 6 (1), 53–57. <https://doi.org/10.1021/ml500242y>.
- (13) Mathea, S.; Eidarus Salah; Beltrami, A.; Apirat Chaikuad; Hanke, T.; Kashima, R.; Canning, P.; Muller-Knapp, S.; Knaus, P.; Hata, A.; Knapp, S.; Bullock, A. N. Human LIM Domain Kinase 1 (LIMK1), Kinase Domain; A Target Enabling Package, 2017. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.1219706>.
- (14) Hanke, T.; Mathea, S.; Woortman, J.; Salah, E.; Berger, B.-T.; Tumber, A.; Kashima, R.; Hata, A.; Kuster, B.; Müller, S.; Knapp, S. Development and Characterization of Type I, Type II, and Type III LIM-Kinase Chemical Probes. *J. Med. Chem.* **2022**. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01106>.

- (15) Boland, S.; Bourin, A.; Alen, J.; Geraets, J.; Schroeders, P.; Castermans, K.; Kindt, N.; Boumans, N.; Panitti, L.; Vanormelingen, J.; Fransen, S.; Van de Velde, S.; Defert, O. Design, Synthesis and Biological Characterization of Selective LIMK Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (18), 4005–4010. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.07.009>.
- (16) Harrison, B. A.; Whitlock, N. A.; Voronkov, M. V.; Almstead, Z. Y.; Gu, K.; Mabon, R.; Gardyan, M.; Hamman, B. D.; Allen, J.; Gopinathan, S.; McKnight, B.; Crist, M.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Courtney, L. F.; Key, B.; Zhou, J.; Patel, N.; Yates, P. W.; Liu, Q.; Wilson, A. G. E.; Kimball, S. D.; Crosson, C. E.; Rice, D. S.; Rawlins, D. B. Novel Class of LIM-Kinase 2 Inhibitors for the Treatment of Ocular Hypertension and Associated Glaucoma. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (21), 6515–6518. <https://doi.org/10.1021/jm901226j>.
- (17) Dueñas, M. E.; Peltier-Heap, R. E.; Leveridge, M.; Annan, R. S.; Büttner, F. H.; Trost, M. Advances in High-Throughput Mass Spectrometry in Drug Discovery. *EMBO Mol. Med.* **2023**, *15* (1), e14850. <https://doi.org/10.15252/emmm.202114850>.
- (18) Bretschneider, T.; Ozbal, C.; Holstein, M.; Winter, M.; Buettner, F. H.; Thamm, S.; Bischoff, D.; Luippold, A. H. RapidFire BLAZE-Mode Is Boosting ESI-MS Toward High-Throughput-Screening. *SLAS Technol.* **2019**, *24* (4), 386–393. <https://doi.org/10.1177/2472630318822449>.
- (19) Lee, N.; Wiegand, S. Thermophoretic Micron-Scale Devices: Practical Approach and Review. *Entropy* **2020**, *22* (9), 950. <https://doi.org/10.3390/e22090950>.
- (20) El Deeb, S.; Al-Harrasi, A.; Khan, A.; Al-Broumi, M.; Al-Thani, G.; Alomairi, M.; Elumalai, P.; Sayed, R. A.; Ibrahim, A. E. Microscale Thermophoresis as a Powerful Growing Analytical Technique for the Investigation of Biomolecular Interaction and the Determination of Binding Parameters. *Methods Appl. Fluoresc.* **2022**, *10* (4), 042001. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ac82a6>.
- (21) Duhr, S.; Braun, D. Why Molecules Move along a Temperature Gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (52), 19678–19682. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603873103>.
- (22) Bartoschik, T.; Galinec, S.; Kleusch, C.; Walkiewicz, K.; Breitsprecher, D.; Weigert, S.; Muller, Y. A.; You, C.; Piehler, J.; Vercruysse, T.; Daelemans, D.; Tschammer, N. Near-Native, Site-Specific and Purification-Free Protein Labeling for Quantitative Protein Interaction Analysis by MicroScale Thermophoresis. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 4977. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23154-3>.
- (23) Magnez, R.; Thiroux, B.; Taront, S.; Segaula, Z.; Quesnel, B.; Thuru, X. PD-1/PD-L1 Binding Studies Using Microscale Thermophoresis. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 17623. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17963-1>.
- (24) Rascol, E.; Dufourquet, A.; Baccouch, R.; Soule, P.; Alves, I. D. An Original Approach to Measure Ligand/Receptor Binding Affinity in Non-Purified Samples. *Sci. Rep.* **2022**, *12* (1), 5400. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09217-6>.
- (25) Jerabek-Willemsen, M.; André, T.; Wanner, R.; Roth, H. M.; Duhr, S.; Baaske, P.; Breitsprecher, D. MicroScale Thermophoresis: Interaction Analysis and Beyond. *J. Mol. Struct.* **2014**, *1077*, 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.03.009>.
- (26) Zimmermann, R. A.; Schwickert, M.; Meidner, J. L.; Nidoieva, Z.; Helm, M.; Schirmeister, T. An Optimized Microscale Thermophoresis Method for High-Throughput Screening of DNA Methyltransferase 2 Ligands. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2022**, *5* (11), 1079–1085. <https://doi.org/10.1021/acscptsci.2c00175>.
- (27) Syntia, F.; Nehmé, R.; Claude, B.; Morin, P. Human Neutrophil Elastase Inhibition Studied by Capillary Electrophoresis with Laser Induced Fluorescence Detection and Microscale Thermophoresis. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1431*, 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.079>.
- (28) Al Hamoui Dit Banni, G.; Nasreddine, R.; Fayad, S.; Colas, C.; Marchal, A.; Nehmé, R. Investigation of Lipase-Ligand Interactions in Porcine Pancreatic Extracts by Microscale Thermophoresis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2021**. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03314-7>.
- (29) Wienken, C. J.; Baaske, P.; Rothbauer, U.; Braun, D.; Duhr, S. Protein-Binding Assays in Biological Liquids Using Microscale Thermophoresis. *Nat. Commun.* **2010**, *1* (1), 100. <https://doi.org/10.1038/ncomms1093>.

- (30) Khavrutskii, L.; Yeh, J.; Timofeeva, O.; Tarasov, S. G.; Pritt, S.; Stefanisko, K.; Tarasova, N. Protein Purification-Free Method of Binding Affinity Determination by Microscale Thermophoresis. *J. Vis. Exp.* **2013**, No. 78, 50541. <https://doi.org/10.3791/50541>.
- (31) Seidel, S. A. I.; Dijkman, P. M.; Lea, W. A.; Van Den Bogaart, G.; Jerabek-Willemsen, M.; Lazic, A.; Joseph, J. S.; Srinivasan, P.; Baaske, P.; Simeonov, A.; Katritch, I.; Melo, F. A.; Ladbury, J. E.; Schreiber, G.; Watts, A.; Braun, D.; Duhr, S. Microscale Thermophoresis Quantifies Biomolecular Interactions under Previously Challenging Conditions. *Methods* **2013**, *59* (3), 301–315. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.12.005>.
- (32) Shao, W.; Sharma, R.; Clausen, M. H.; Scheller, H. V. Microscale Thermophoresis as a Powerful Tool for Screening Glycosyltransferases Involved in Cell Wall Biosynthesis. *Plant Methods* **2020**, *16* (1), 99. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00641-1>.
- (33) Weissleder, R. A Clearer Vision for in Vivo Imaging. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19* (4), 316–317. <https://doi.org/10.1038/86684>.
- (34) Shcherbakova, D. M.; Verkhusa, V. V. Near-Infrared Fluorescent Proteins for Multicolor in Vivo Imaging. *Nat. Methods* **2013**, *10* (8), 751–754. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2521>.
- (35) Matlashov, M. E.; Shcherbakova, D. M.; Alvelid, J.; Balaban, M.; Pennacchietti, F.; Shemetov, A. A.; Testa, I.; Verkhusa, V. V. A Set of Monomeric Near-Infrared Fluorescent Proteins for Multicolor Imaging across Scales. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 239. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13897-6>.
- (36) Cao, E.; Chen, Y.; Cui, Z.; Foster, P. R. Effect of Freezing and Thawing Rates on Denaturation of Proteins in Aqueous Solutions. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *82* (6), 684–690. <https://doi.org/10.1002/bit.10612>.
- (37) Jang, K.; Kim, H. G.; Hlaing, S. H. S.; Kang, M.; Choe, H.-W.; Kim, Y. J. A Short Review on Cryoprotectants for 3D Protein Structure Analysis. *Crystals* **2022**, *12* (2), 138. <https://doi.org/10.3390/cryst12020138>.
- (38) Bhattacharjya, S.; Balaram, P. Effects of Organic Solvents on Protein Structures: Observation of a Structured Helical Core in Hen Egg-White Lysozyme in Aqueous Dimethylsulfoxide. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **1997**, *29* (4), 492–507. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(199712\)29:4<492::AID-PROT9>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(199712)29:4<492::AID-PROT9>3.0.CO;2-A).
- (39) Arakawa, T.; Kita, Y.; Timasheff, S. N. Protein Precipitation and Denaturation by Dimethyl Sulfoxide. *Biophys. Chem.* **2007**, *131* (1), 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2007.09.004>.
- (40) Tjernberg, A.; Markova, N.; Griffiths, W. J.; Hallén, D. DMSO-Related Effects in Protein Characterization. *J. Biomol. Screen.* **2006**, *11* (2), 131–137. <https://doi.org/10.1177/1087057105284218>.
- (41) Chadha, V. K.; Leidal, K. G.; Plapp, B. V. Inhibition by Carboxamides and Sulfoxides of Liver Alcohol Dehydrogenase and Ethanol Metabolism. *J. Med. Chem.* **1983**, *26* (6), 916–922. <https://doi.org/10.1021/jm00360a024>.
- (42) Cubrilovic, D.; Zenobi, R. Influence of Dimethylsulfoxide on Protein–Ligand Binding Affinities. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (5), 2724–2730. <https://doi.org/10.1021/ac303197p>.
- (43) Feoli, A.; Sarno, G.; Castellano, S.; Sbardella, G. DMSO-Related Effects on Ligand-Binding Properties of Lysine Methyltransferases G9a and SETD8. *ChemBioChem* **2024**, e202300809. <https://doi.org/10.1002/cbic.202300809>.
- (44) Thuru, X.; Magnez, R.; Vergoten, G.; Bailly, C. A Potential Off-Target Effect of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Inhibitor KYA1797K: PD-L1 Binding and Checkpoint Inhibition. *Biomed. Hub* **2023**, 1–9. <https://doi.org/10.1159/000528499>.
- (45) Tröster, A.; DiPrima, M.; Jores, N.; Kudlinzki, D.; Sreeramulu, S.; Gande, S. L.; Linhard, V.; Ludig, D.; Schug, A.; Saxena, K.; Reinecke, M.; Heinzlmeir, S.; Leisegang, M. S.; Wollenhaupt, J.; Lennartz, F.; Weiss, M. S.; Kuster, B.; Tosato, G.; Schwalbe, H. Optimization of the Lead Compound NVP-BHG712 as a Colorectal Cancer Inhibitor. *Chem. – Eur. J.* **2023**, *29* (23), e202203967. <https://doi.org/10.1002/chem.202203967>.

- (46) Vallée, B.; Doudeau, M.; Godin, F.; Gombault, A.; Tchalikian, A.; De Tauzia, M.-L.; Bénédicti, H. Nf1 RasGAP Inhibition of LIMK2 Mediates a New Cross-Talk between Ras and Rho Pathways. *PLoS ONE* **2012**, 7 (10), e47283. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047283>.
- (47) S Swillens. Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis. *Mol. Pharmacol.* **1995**, 47 (6), 1197.
- (48) Oliinyk, O. S.; Shemetov, A. A.; Pletnev, S.; Shcherbakova, D. M.; Verkhusha, V. V. Smallest Near-Infrared Fluorescent Protein Evolved from Cyanobacteriochrome as Versatile Tag for Spectral Multiplexing. *Nat. Commun.* **2019**, 10 (1), 279. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08050-8>.

## Supplementary Data

### **LIM Kinase/inhibitor binding study in cell lysates using microscale thermophoresis in the red spectrum**

Solweig CHARTIER<sup>1</sup> and coworkers from the following affiliations:

<sup>1</sup>Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), CNRS FR 2708 – UMR 7311, Université d'Orléans, 45067 Orléans, France. e-mail\*: [reine.nehme@univ-orleans.fr](mailto:reine.nehme@univ-orleans.fr)

<sup>2</sup> Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301, CNRS-Université d'Orléans and INSERM, 45071 Orléans CEDEX 2, France

<sup>3</sup>Normandie Université, COBRA, UMR6014 & FR3038 CNRS, Université de Rouen, INSA de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

**Key words:** Microscale Thermophoresis, red fluorescent protein, LIM Kinases, cell lysates, molecular interactions, Binding affinity

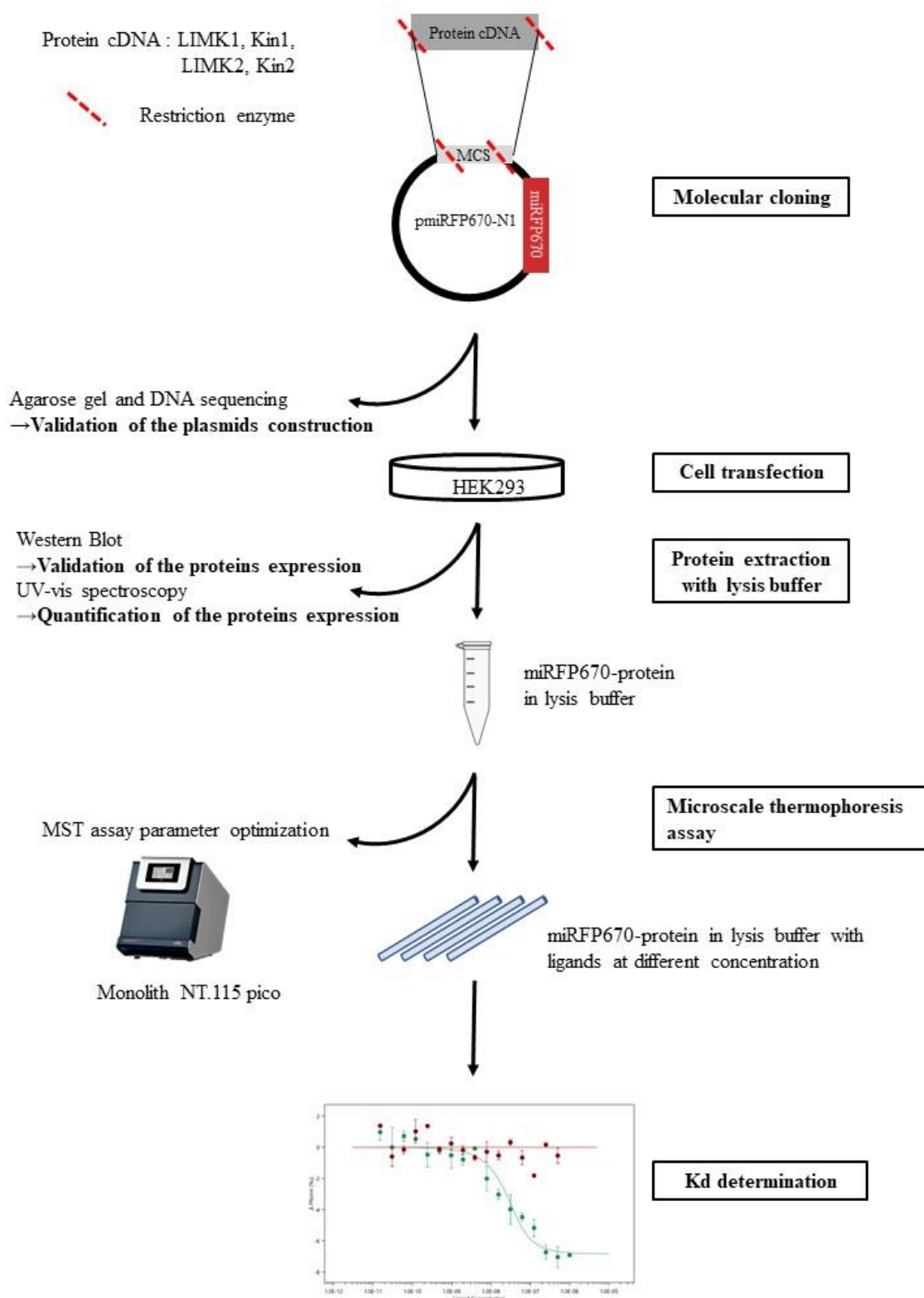


Figure S1: Schematic representation of the procedure leading to the determination of the dissociation constant between miRFP670-proteins and their inhibitors in the red spectrum.

The following figures provide the binding affinity curves of miRFP670-proteins against TH-257, BMS-5 and T56-LIMKi leading to the determination of the dissociation constant ( $K_d$ ) of each protein/inhibitor couple by microscale thermophoresis (MST).

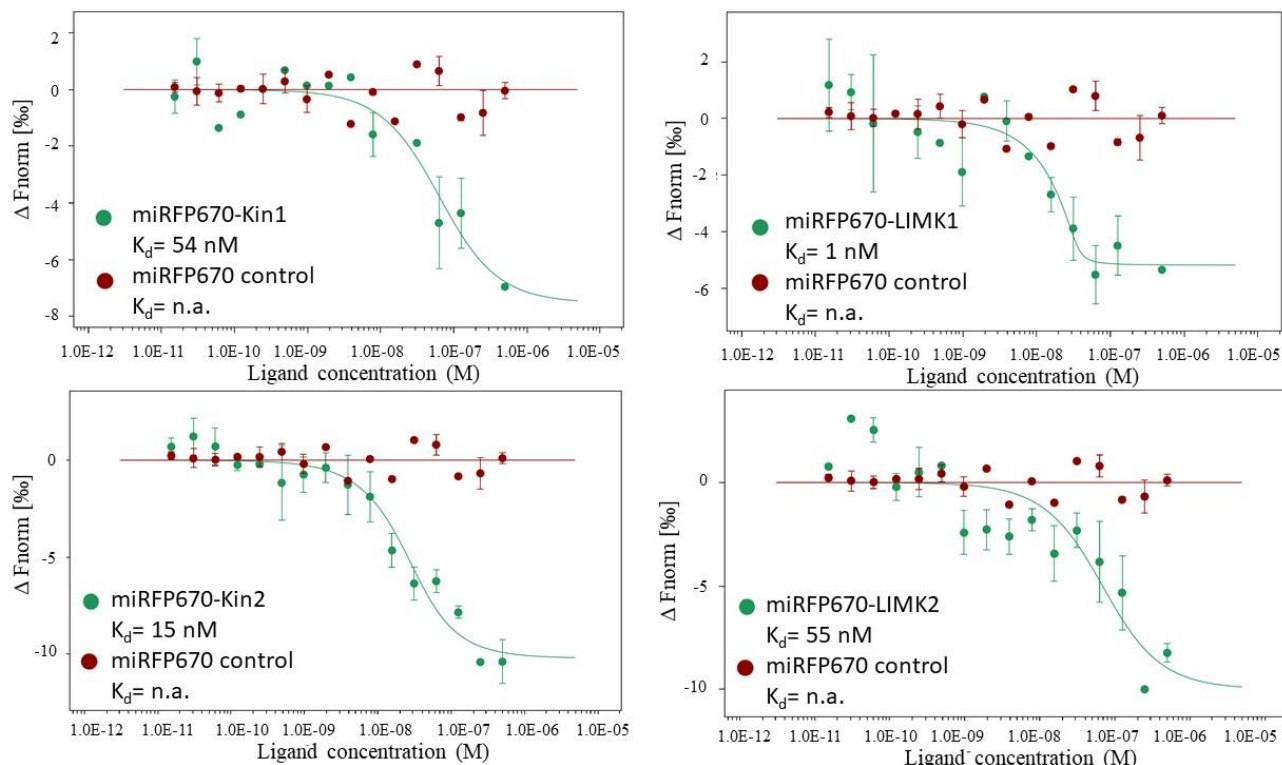


Figure S2: Dose-response curves for the binding interaction between miRFP670-proteins and BMS-5 (green) compared to the curves for miRFP670 mixed with the BMS-5 (red). The concentration of miRFP670-proteins is kept constant whereas the concentration of BMS-5 varies from 15 pM to 500 nM. Error-bars indicate the standard deviation ( $n=3$ ). Dose-response curves fitted to a one-site binding model provided with the MO.affinity Analysis software to obtain the  $K_d$  value. MST conditions: 37°C; LED power 20%; medium MST power; standard capillaries.

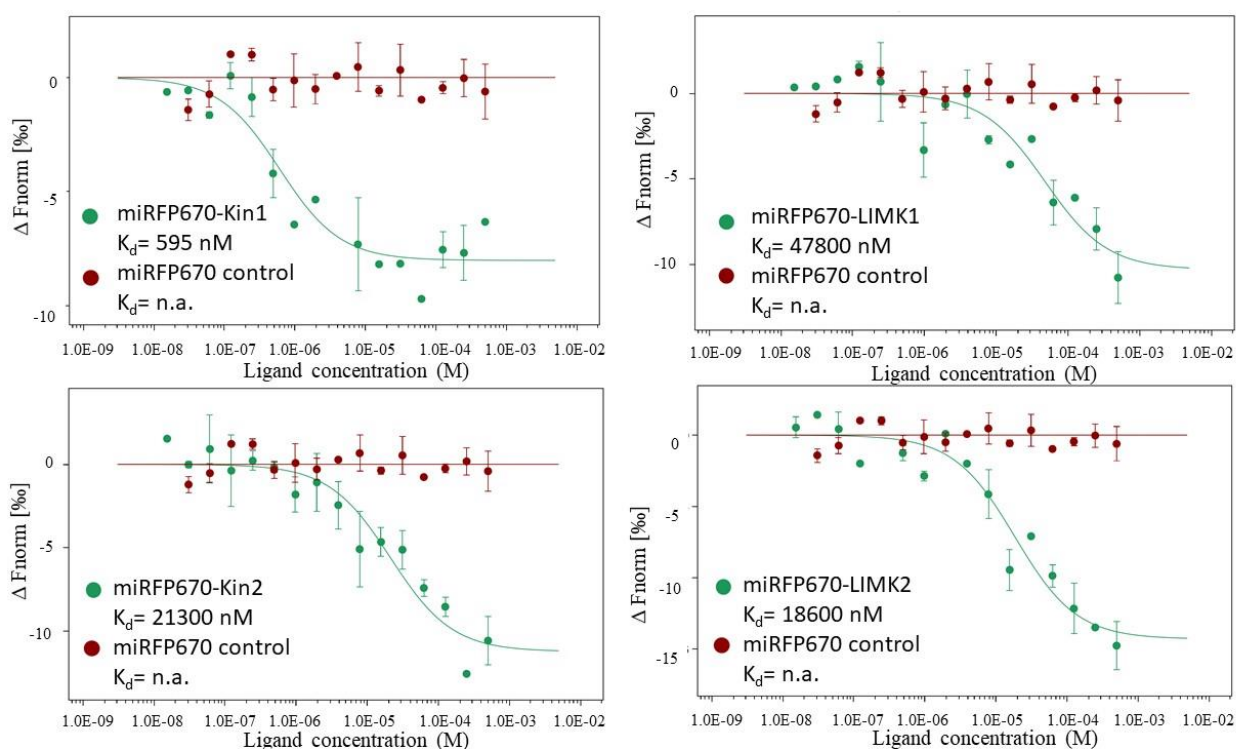


Figure S3: Dose-response curves for the binding interaction between miRFP670-proteins and T56-LIMKi (green) compared to the curves for miRFP670 mixed with the T56-LIMKi (red). The concentration of miRFP670-proteins is kept constant whereas the concentration of T56-LIMKi varies from 305 pM to 10  $\mu$ M. Error-bars indicate the standard deviation ( $n=2$ ). Dose-response curves fitted to a one-site binding model provided with the MO.affinity Analysis software to obtain the  $K_d$  value. MST conditions: 37°C; LED power 20%; medium MST power; standard capillaries.

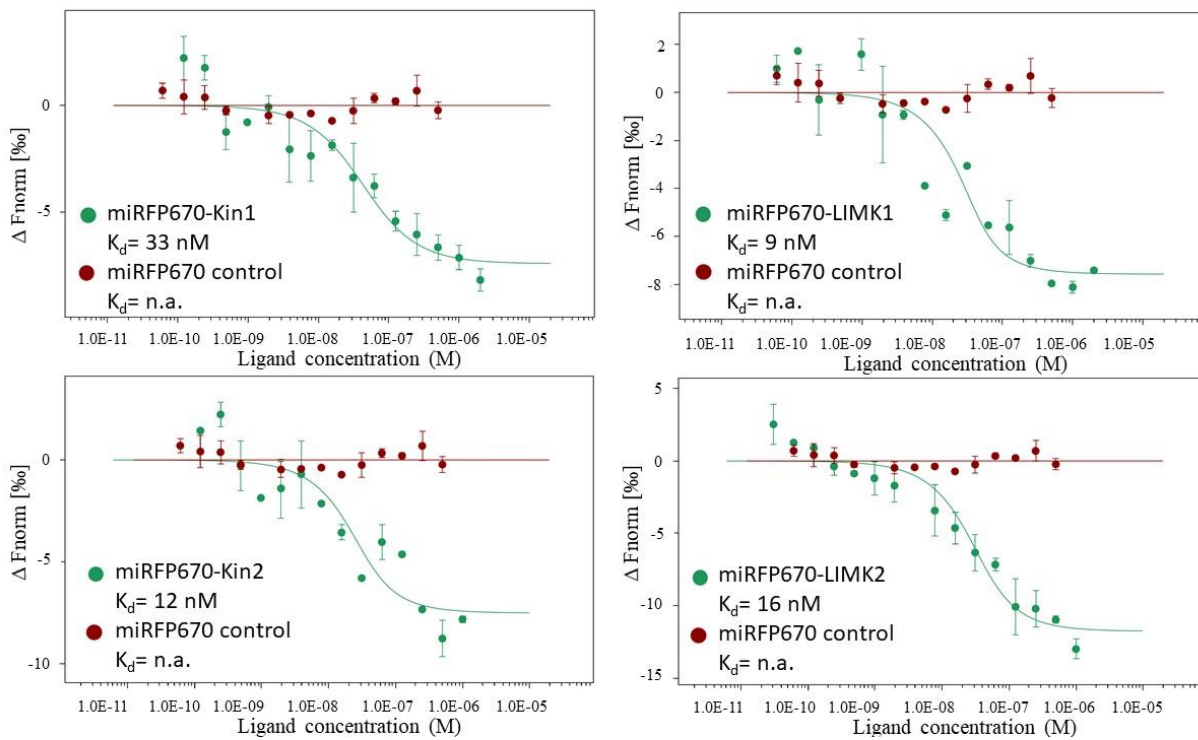


Figure S4: Dose-response curves for the binding interaction between miRFP670-proteins and TH-257 (green) compared to the curves for miRFP670 mixed with the TH-257 (red). The concentration of miRFP670-proteins is kept constant whereas the concentration of TH-257 varies from 60 pM to 2  $\mu$ M. Error-bars indicate the standard deviation ( $n=2$ ). Dose-response curves fitted to a one-site binding model provided with the MO.affinity Analysis software to obtain the  $K_d$  value. MST conditions: 37°C; LED power 20%; medium MST power; standard capillaries.

## Conclusion

Dans ce chapitre, un nouveau protocole MST est mis en œuvre afin d'étudier les interactions moléculaires entre une enzyme et un ligand de petite taille, dans des lysats cellulaires directement. Ce protocole implique la surexpression de la protéine de fusion miRFP670-LIMK dans des cellules HEK293. Nous avons confirmé que la miRFP670 ne présente aucune affinité envers les ligands testés ce qui valide pleinement son utilisation pour la MST en tant que marqueur fluorescent dans le spectre du rouge. Au cours du développement de ce protocole, plusieurs paramètres ont été identifiés comme critiques pour l'obtention de courbes de MST répétables et parfaitement exploitables : la composition du tampon de travail (tampon MST) et les conditions de conservation des protéines marquées sont les paramètres les plus significatifs.

Ce travail propose une approche originale pour la détermination de nouvelles valeurs de  $K_d$  par MST de l'interaction LIMK/inhibiteur dans des conditions proches du *in vivo*. Les trois inhibiteurs, LX7101, BMS-5 ou LIMKi3 et TH-257 ont montré une forte affinité envers les LIMKs (faible valeur de  $K_d$  de quelques nM). Concernant T56-LIMKi, nos résultats corroborent les études récemment publiées suggérant que T56-LIMKi n'a en fin de compte pas d'activité inhibitrice envers LIMK1 ou 2. Cet inhibiteur peut être alors considéré comme un contrôle négatif des essais d'affinité proposés par MST.

Grâce au marquage de la cible (LIMK) par la protéine de fusion miRFP670, l'approche MST développée permettra de déterminer avec précision des valeurs de  $K_d$  d'interaction enzyme/ligand de petite taille. Elle aidera à identifier les inhibiteurs qui ciblent spécifiquement les kinases marquées dans un lysat cellulaire encombré. L'approche proposée a de ce fait une multitude d'applications potentielles et démontre la polyvalence de la MST lorsqu'il s'agit d'études dans des conditions proches de l'état natif.

Ce chapitre ayant traité des études d'affinité miRFP670-LIMK/ligand, le chapitre suivant aborde la question de l'activité de ces miRFP670-LIMK ; est-ce que le marquage par la miRFP670 altère la fonction catalytique de ces enzymes, ce qui se traduirait par une réduction, voire une incapacité, de phosphorylation de leur substrat cofiline en présence d'ATP ?





# **Chapitre III :**

**L'activité de miRFP670-LIMK1 dans les  
lysats cellulaires contrôlée par  
électrophorèse capillaire**

## Introduction

Dans ce chapitre, nous présentons une étude de l'activité catalytique de la LIM Kinase 1 contrôlée directement dans le lysat des cellules HEK293 par électrophorèse capillaire (CE) avec détection UV (254 nm). L'activité de miRFP670-LIMK1 a été évaluée en mesurant l'évolution de la quantité d'ADP dans le milieu réactionnel après phosphorylation de la cofiline en présence de l'ATP. Les conditions pour réaliser l'essai d'activité par CE ont été systématiquement optimisées. Comme cela a été détaillé dans la partie bibliographie (**chapitre I**), les études par CE impliquant des protéines dans des matrices complexes peuvent souvent se montrer délicates à cause, entre autres, de problèmes d'adsorption sur les capillaires. Le recouvrement des capillaires en CE améliore les performances de séparation dans ce cas. Les critères les plus importants d'un bon recouvrement sont une grande stabilité sur une large gamme de pH et une interférence minimale voire nulle avec le système de séparation et/ou de détection. Les recouvrements physiques permanents sont faciles à réaliser puisqu'il suffit d'un simple rinçage du capillaire par la solution contenant l'agent de recouvrement. Il est important de rappeler que ces recouvrements sont stables même sans ajout de l'agent de recouvrement dans le BGE. Un recouvrement composé d'une couche du polymère cationique hautement chargé, le chlorure de poly(diallyldiméthylammonium) (PDADMAC), physiquement adsorbé a été employé pour les essais enzymatiques en CE réalisés au cours de ce travail de thèse.

# Activity of miRFP670-LIMK1 in cell lysates monitored by capillary electrophoresis

Solweig CHARTIER<sup>1</sup> and coworkers from the following affiliations:

<sup>1</sup>Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), CNRS FR 2708 – UMR 7311, Université d'Orléans, 45067 Orléans, France. e-mail\*: [reine.nehme@univ-orleans.fr](mailto:reine.nehme@univ-orleans.fr)

<sup>2</sup>Normandie Université, COBRA, UMR6014 & FR3038 CNRS, Université de Rouen, INSA de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

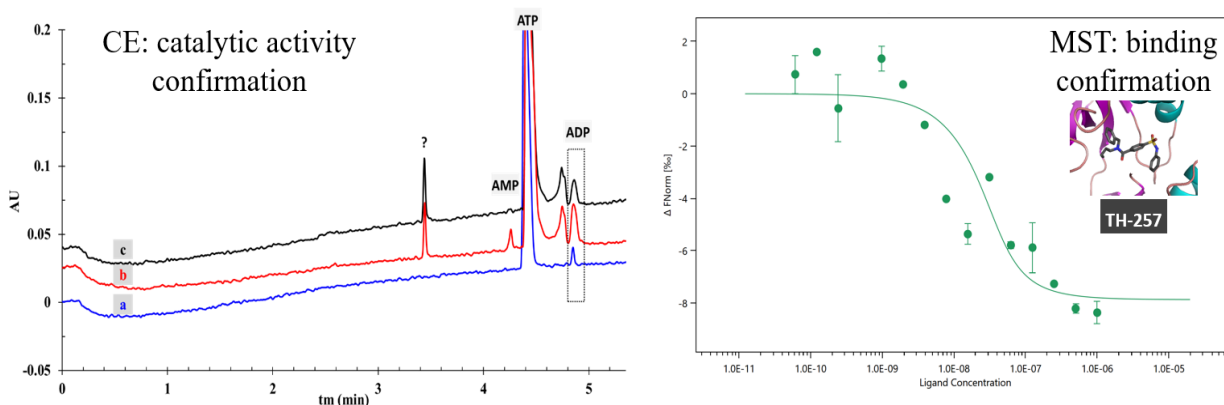
<sup>3</sup>Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301, CNRS-Université d'Orléans and INSERM, 45071 Orléans CEDEX 2, France

*Members of the consortium performed CE and MST experiments and analyzed the corresponding data; planed and performed docking experiments and the experiences for the production of HEK293 cells overexpressing miRFP670-LIMKs. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.*

**Key words:** Capillary electrophoresis, Cell lysate, Fusion protein, LIM Kinases, Microscale thermophoresis

## Graphical Abstract

Using CE to confirm the activity of fluorescent **miRFP670-LIMK1** protein produced for MST assays directly in cell lysate



## Abstract

LIMK1 is a promising therapeutic target regarding multiple pathologies. Its study in a holistic manner seems crucial as none of its inhibitors has passed the clinical trials. In addition, the need of new fluorescent probes for the study of enzyme/ligand interactions is always increasing with the development of new analytical tools. It is clear that a method for the assessment of LIMK activity directly in cell lysate is needed to ensure that interaction studies can be performed in close to native conditions and by using active enzymes.

Here, we introduce a study of LIM Kinase activity and inhibition monitored directly in cell lysate by capillary electrophoresis (CE). The miRFP670-LIMK1 was prepared as it is a fluorescent fusion protein emitting in the red spectrum and thus suitable for microscale thermophoresis (MST) affinity assays. A PDADMAC-coated capillary was mandatory to avoid adsorption issues. The results confirm that LIMK1 is still active in the cell lysate even with the miRFP670 fluorescent tag attached to its C-terminal. The inhibition of miRFP670-LIMK1 activity was also monitored by CE in the presence of TH-257. The dissociation constant,  $K_d$ , of the interaction miRFP670-LIMK1/TH-257 was then evaluated by MST, again directly in cell lysate without any purification step. Sub-micromolar cellular on-target activity was revealed ( $K_d = 9$  nM) confirming that TH-257 is suitable as a chemical probe for LIMK1.

This work demonstrates that LIMK1 fused with miRFP670 maintains its enzymatic capacities and its ability to be inhibited by an allosteric inhibitor. It highlights the complementarity of CE and MST approaches when studying enzyme/ligand interactions in close to *in vivo* conditions. The fluorescent protein miRFP670 is a suitable fluorescent tag that can be used for enzyme affinity and activity experiments in cell lysates.

## 1. Introduction

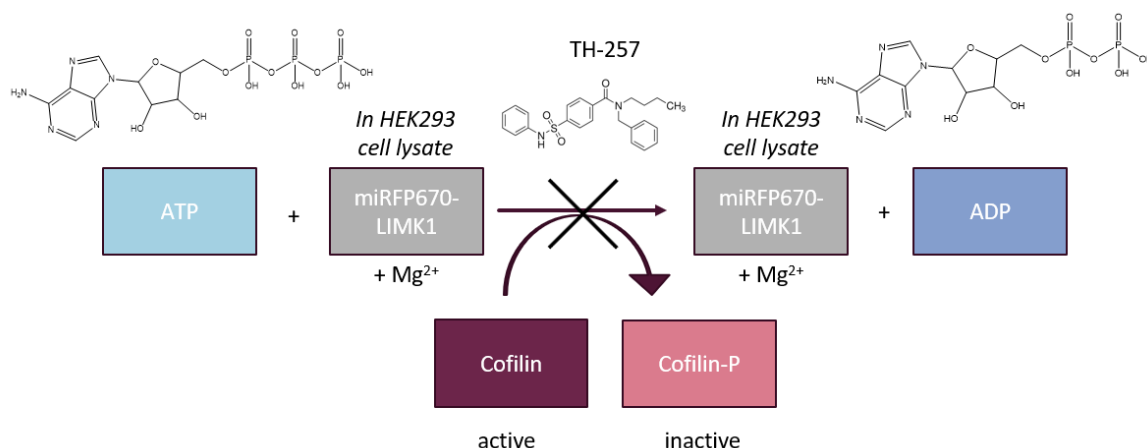
LIMK1 and LIMK2, the two members of the LIM Kinases family play a central role in regulating the actin cytoskeleton by phosphorylating cofilin on serine 3 and inactivating its actin depolymerization activity<sup>1</sup>. Dysregulation in LIMKs behaviour can lead to several pathologies including cancer<sup>2-4</sup>, neurofibromatosis<sup>5</sup> and neuronal diseases<sup>6</sup> (like Alzheimer and parkinson's deceases). LIMK1 is highly expressed in neural tissues<sup>7</sup>. Dendritic spines are critical for brain function, including memory and learning, and LIMK1 plays a crucial role in their deterioration. LIMK1 inhibition enhances the size and density of dendritic spines and has anti-Alzheimer's disease effects<sup>6</sup>. Studying LIMK1 inhibition is therefore pivotal in the search for neuronal diseases' medication. Furthermore, cofilin's dysregulation is broadly known to cause several neurodegenerative pathophysiology<sup>8</sup>, including Alzheimer's disease<sup>9,10</sup>. Studying LIMKs' activity and inhibition constitutes a major node in the search of new drug candidates. ATP or adenosine triphosphate being involved in a myriad of cellular processes<sup>11</sup> and being the substrate of several enzymes, including kinases, it has already been studied by capillary electrophoresis in the case of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase 3- $\beta$ <sup>12</sup> and the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway<sup>13</sup>. The major degradation product of ATP is ADP or adenosine diphosphate, obtained after the transfer, by a kinase, of a phosphate group from ATP to its proteic or lipidic substrate.

It is necessary to determine the chemical changes involved in the conversion of a substrate to its product in order to quantify an enzyme's catalytic activity. Currently, the most common method for managing the vast array of enzymatic activities is to classify enzymes based on the kinds of chemical reactions they catalyse<sup>14</sup>. In the case of kinases, the reaction occurring is the catalysis of the transfer of a phosphate group from a molecule to another : radioactive phosphate incorporation (<sup>31</sup>P) is widely used to monitor this reaction<sup>15</sup>. Another technique is immunoprecipitation: mass fingerprinting analysis can be performed after immunoprecipitation using anti-phospho antibody, which identifies the phosphorylation motif site by AMP-activated protein kinase<sup>16</sup>. The most straightforward method used to monitor enzymatic activity is the monitoring of the reaction product concentration increasing in the reaction media. In certain enzyme tests, the product can be measured directly using its absorbance characteristics. For example, quantitative indirect spectrophotometric analysis in the reaction catalyzed by glucose 6-phosphate dehydrogenase at 340 nm: one product, NADH, absorbs light, while the reactant, NAD<sup>+</sup>, does not. Therefore, the reaction can be monitored by observing the increase of the absorbance at 340 nm.<sup>17</sup> Other techniques rely on spectroscopy. For example, because the signals from ATP and phosphocreatine occur at distinct chemical shifts, creatine kinase activity may be measured

using magnetic resonance spectroscopy (MRS) and imaging (MRI), which are techniques based on  $^{31}\text{P}$ .<sup>18</sup>

A widely used separation technique is liquid chromatography (LC). LC is based on the retention of analytes by a solid phase in a column leading to their separation. This technique is suitable for enzymatic activities<sup>19</sup> but requires the use of organic solvent, which can negatively impact biomolecules.<sup>20</sup> Capillary electrophoresis (CE) is a separative method that enables quick, highly efficient, and economical analyses.<sup>21,22</sup> This analytical tool was chosen to conduct the present study, but working with an uncoated capillary can be tricky when working with biomolecules.<sup>23</sup> The coating of the capillary with a cationic polymer (*i.e.* poly(diallyldimethylammonium), PDADMAC<sup>12,24</sup> or hexadimethrine bromide, Polybrene<sup>25</sup>), an anionic polymer (*i.e.* polystyrene sulfonate, PSS<sup>26</sup>) or even neutral polymer (*i.e.* polyethylene oxide or PEO) limits the adsorption of macromolecules on the capillary wall.

For the first time, we present a study of LIM Kinases activity *via* CE, specifically miRFP670-LIMK1 which is a fluorescent fusion protein emitting in the red spectrum, which can be useful for any assay requiring a fluorescent LIM Kinase (Figure 1). Indeed, some affinity assays involve the use of fluorescence, as is the case when Microscale Thermophoresis (MST) is employed.<sup>27,28</sup>



**Figure 1** : Representation of the reaction catalyzed by miRFP670-LIMK1 for the phosphorylation of cofilin substrate in the presence of the phosphate-donor ATP and the co-factor  $\text{Mg}^{2+}$ , leading to a phosphorylated cofilin and ADP. The reaction was monitored by CE-UV, in the absence or presence of TH-257, a type III inhibitor.

The fluorescent partner can be obtained by producing a fusion fluorescent protein of the enzyme, for example with Green Fluorescent Protein (GFP)<sup>29</sup> or with red fusion miRFP670 protein (recently proposed by our group). However, fusion proteins being large macromolecules, they can hinder the binding process of the enzyme on its target or of inhibitors. Ensuring that an enzyme retains its activity

after labelling is crucial for the development of pharmaceutical drugs, under conditions closest to those *in vivo*. Moreover, cofilin (or any actin-depolymerizing factor) has never been studied by CE, especially not directly in cell lysate. These samples could cause significant undesirable adsorption phenomena on bare-silica capillaries. In this work, a systematic optimization of the conditions to study the enzymatic reaction of miRFP670-LIMK1 with ATP and cofilin by CE, in the absence and the presence of a referenced inhibitor, the TH-257, was performed (Figure 1). Then, the dissociation constant,  $K_d$ , of the interaction miRFP670-LIMK1/TH-257 was evaluated by MST to obtain complementary result confirming the affinity between these two partners.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

All reagents were of analytical grade and used as received without any further purification. Ammonia ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , 28%), dimethylsulfoxide (DMSO, purity 99%), glacial acetic acid ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , purity >99.7%) and sodium hydroxide ( $\text{NaOH}$ , purity 98.5-100%) were purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). Syringes and polytetrafluoroethylene (PTFE) syringe filters (pore size 0.45  $\mu\text{m}$ ) were purchased from Agilent Technologies (Les Ulis, France). Ethane-1,2-diyl dinitrilo tetraacetic acid (EDTA, 0.5 M, pH 8.0),  $\beta$ -glycerophosphate disodium salt hydrate ( $(\text{HOCH}_2)_2\text{CHOP}(\text{O})(\text{ONa})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ), 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) or HEPES ( $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ , purity > 99.5%), hydrochloric acid ( $\text{HCl}$ , 36.5-38.0%, pH <1), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF,  $\text{C}_7\text{H}_7\text{FO}_2\text{S}$ , purity > 99.0%), orthophosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 85%), sodium fluoride ( $\text{NaF}$ , purity > 99%), sodium pyrophosphate dibasic ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , purity > 99.0%), Triton X-100, TH-257 ( $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ ) and cell culture media were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Aprotinin (Apro), leupeptin (Leu), sodium chloride ( $\text{NaCl}$ , ultrapure grade), p-Nitrophenylphosphate (pNPP) and Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ , ultrapure grade), okadaic acid (AcOK, purity > 98% HPLC) were purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Sodium orthovanadate (OV) from LC laboratories (Woburn, USA). Ultrapure water (18  $\text{M}\Omega\text{-cm}$ ) was purified with a Milli-Q apparatus from Merck (Semoy, France). Fusion proteins were produced following the protocol detailed in a previous work.

## 2.2. Buffer solutions

All solutions were prepared with ultra-pure water and filtered through 0.45 µm PVDF Filter. The pH of the various solutions was measured using a MeterLab PHM201 Portable pH-Meter (Radiometer Analytical, Villeurbanne, France).

*HEK293 cell lysis buffer:* The HEK293 cells that overexpressed fluorescent LIMK1 fusion proteins, miRFP670-LIMK1, were lysed with a lysis buffer made of 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 50 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 20 mM p-nitrophenyl phosphate, 20 mM β-glycerophosphate, 10 µg/mL aprotinin, 0.05 µg/mL okadaic acid, 1 µg/mL leupeptin, and 1 mM PMSF.

*Background electrolyte buffers (BGE):* The BGEs ammonia/acetic acid at an ionic strength of 50 mM or 80 mM (pH 10) were obtained by diluting the appropriate volume of acetic acid (1M) and ammonia (1M) in ultrapure water. The Tris/phosphate containing 5 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7.2, 180 mM ionic strength) was prepared by diluting the appropriate amount of phosphoric acid (85 %) in ultra-pure water and weighing the right quantity of Tris and MgCl<sub>2</sub>.

*Incubation buffers (IB):* The different IB tested were prepared by weighing the appropriate amount of HEPES (25 mM) and MgCl<sub>2</sub> (0, 2.5 and 10 mM) in ultrapure water. The pH 7.2 of the IB was adjusted with NaOH 1M.

*MST buffer:* The lysis buffer previously described was also used as MST buffer for the affinity studies (K<sub>d</sub> measurement).

*Tris-buffered saline or TBS buffer:* This buffer, used for the preparation of cofilin solutions, was composed of 25 mM Tris, 2.7 mM KCl and 137 mM NaCl at pH 7.4.

## 2.3. Stock and working solutions

The cell lysate stock solutions, containing miRFP670-LIMK1, were prepared and stored in the lysis buffer containing glycerol at 30% (v/v). Working solutions at 64 nM for CE-assays and 32 nM for MST-assays were obtained by dilution in either the IB or the lysis buffer.

The TH-257 stock solution was prepared at a concentration of 4 mM in 100% DMSO. Working solutions at 100 nM for CE-assays and 1 µM for MST-assays were obtained by dilution in either the IB or the lysis buffer.

Stock solutions of the substrate ATP, at 25 mM, and the product ADP, at 2 mM, were prepared in the IB. They were diluted in the incubation buffer (IB) to the desired concentrations, 0.1 mM and 4 mM for ATP, and 0.1 mM for ADP.

Recombinant cofilin, purchased from Upstate cell signalling Inc., was transferred in a TBS buffer at 135  $\mu$ M. Cofilin working solution of 81  $\mu$ M was obtained by diluting the stock solution in the appropriate IB.

All stock solutions were stored at -20°C.

## 2.4. Instrumentation and operating conditions

### 2.4.1 Measurement of miRFP670-LIMK1 concentration in HEK293 cells

The concentration of miRFP670-LIMK1 in cell lysate was determined to be 453 nM using a double beam UV-visible spectrometer (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan) and a 0.5 mL quartz cuvette with 1 cm optical path length. Blank assays were conducted with the lysis buffer. The concentration of the miRFP670-LIMK1 was estimated using Beer-Lambert law (equation 1) at 642 nm, the specific excitation wavelength of miRFP670, to avoid any interference with other species in the cell lysate:

$$A_{642} = \varepsilon_{642} \times l \times C \quad (1)$$

With:  $A_{642}$  the absorbance of the sample at  $\lambda_{\max}$  of the miRFP670 tag;  $\varepsilon$  the molar coefficient of miRFP670 at 642 nm (87 400 L/mol/cm)<sup>30</sup>;  $l$  the optical path of the cuvette (1 cm);  $C$  the molar concentration (mol/L) of analyzed miRFP670-LIMK1 in HEK293 lysate.

### 2.4.2 Capillary electrophoresis (CE)

The CE system used was a Beckman P/ACE MDQ (AB Sciex, USA) CE apparatus equipped with a photodiode array detector. The acquisition of the UV spectrum was done between 200 and 400 nm, with a step of 1 nm. Beckman 32 karat software (Beckman Coulter, USA) was used to pilot the CE system and for signal acquisition. CE analyses were performed in fused-silica capillary (60 cm total length, 50 cm effective length, 50  $\mu$ m i.d.) purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). New capillaries were conditioned by 1 M NaOH for 20 min and water for 5 min. All rinse cycles were carried out at 50 psi. Hydrodynamic injection was used by applying a pressure of 0.5 psi during 5 sec (~4 nL). The volume of the injected plug was estimated using CE expert Lite from Sciex (<https://sciex.com/ce-features-and-benefits/ce-expert-lite>).

Separation was conducted at 25°C by applying a voltage of +15 kV for bare silica capillaries and at -30 kV for cationic PDADMAC coated capillaries. ATP and ADP detection was conducted by UV absorption at 254 nm. CE analysis repeatability of ATP and ADP was investigated by monitoring the relative standard deviations (RSD) of migration times (% RSD<sub>m</sub>) and of time-corrected peak areas (% RSD<sub>CPA</sub>).

Pressure mediated analysis was conducted to reveal adsorption issues on inner capillary surface by applying a pressure of 5 psi during 5 min, and detection at both wavelengths 214 and 254 nm.

#### 2.4.3. PDADMAC coating

New capillaries were conditioned by 1 M NaOH for 20 min and water for 5 min. They were then coated by rinsing with cationic PDADMAC solution (0.2 % w/v) for 10 min from the anode side followed by 10 min from the cathodic side. After a waiting period of 5 min, the capillary was rinsed with water for 5 min and then with background electrolyte (BGE) for 10 min. The coating was stabilized by applying an electric field of +30 kV for 10 min<sup>13,23</sup>. The electroosmotic flow was anodic; it was measured by using DMSO as a neutral marker<sup>31</sup>. The separation was conducted at -30 kV (reverse polarity). Between runs, the capillary was flushed 1 min with water, 2 min with PDADMAC 0.2% w/v, and 3 min with BGE.

#### 2.4.4. Enzymatic reaction monitored by CE-UV

A blank assay was conducted in order to establish the baseline of the experiment. For this, a reaction mixture was prepared in the IB that contains 4 mM of ATP and 64 nM of miRFP670-LIMK1 (dilution of the stock cell lysate containing 30% v/v glycerol by ~5). To study the enzymatic reaction, in the absence of the inhibitor, 81 µM of cofilin substrate was added to the previous solution. Finally, a solution of 100 nM of TH-257 was added to the previous enzymatic mixture to study the inhibition of the enzymatic reaction. 5 µL of each preparation was collected immediately after mixing in order to control the reaction media at t = 0 minutes (t<sub>0</sub>) for each experiment. Then, each of the three Eppendorf tubes previously prepared was put in a thermomixer at 37°C with a stirring of 450 rpm. After 210 minutes of incubation time (t<sub>210</sub>), the reaction medias were gotten out of the thermomixer and were centrifuged for 2 minutes at 2000 g, and the supernatant was collected with a pipette. Said supernatant was centrifuged for 2 minutes at 2000 g, and the supernatant was again collected, and centrifuged one last time, for a total of three centrifugations before supernatant collection. The reaction was stopped by these three successive centrifugation steps. The solutions were then either immediately analyzed by CE or stored at -20°C for later analysis.

The spontaneous non-enzymatic degradation of ATP was calculated for the blank assay, *i.e.* in the absence of substrate cofilin by taking into account the CPA of ADP present in cell lysate at t<sub>0</sub> (Figure 2a) and the one at 210 min (equation 2):

$$\% \text{ Degradation} = \left( \frac{A_{t210} - A_{t0}}{A_{t0}} \right) \times 100 \quad (2)$$

With:  $A_{t210}$  and  $A_{t0}$ , the CPA of ADP obtained, in the absence of cofilin, after 210 minutes and 0 minutes of incubation time, respectively. % Degradation is positive in case of degradation of ATP and null in case of no degradation of ATP.

The enzymatic reaction to control the so-called 100 % activity of the miRFP670-LIMK1 was calculated using the following equation 3:

$$\% \text{ Enzymatic reaction} = \left( \left( \frac{A_{C t210} - A_{C t0}}{A_{C t0}} \right) - \left( \frac{A_{t210} - A_{t0}}{A_{t0}} \right) \right) \times 100 \quad (3)$$

With:  $A_{C t210}$  and  $A_{C t0}$  the CPA of ADP obtained, in the presence of cofilin, after 210 minutes and 0 minutes of incubation time, respectively.

The inhibition of miRFP670-LIMK1 activity was calculated as follows (equation 4):

$$\% \text{ Inhibition} = \left( 1 - \left( \frac{A_{I t210} - A_{I t0}}{A_{C t210} - A_{C t0}} \right) \right) \times 100 \quad (4)$$

With:  $A_{I t210}$  and  $A_{C t210}$  the CPA of ADP obtained after 210 minutes of incubation time in presence and absence of the inhibitor, respectively.  $A_{I t0}$  and  $A_{C t0}$  are the CPA of ADP detected due to spontaneous hydrolysis at 0 minute of incubation time in presence and absence of the inhibitor, respectively.

#### 2.4.5. Affinity measurement by MST

The binding affinity between miRFP670-LIMK1 and TH-257 was determined using microscale thermophoresis (MST). HEK293 cell lysate containing 30 % (v/v) of glycerol was diluted five times in the lysis buffer specified in section 2.2. A solution of 2  $\mu\text{M}$  of TH-257 was prepared in the lysis buffer by diluting the corresponding stock solution. A 16-point serial dilution was made in the lysis buffer containing the same amount of DMSO as the highest concentration of the inhibitor, that is DMSO at 0.025% v/v, to ensure that the only variable is the inhibitor concentration. The concentration range of inhibitor TH-257 was 30 pM to 1  $\mu\text{M}$ . Each capillary contained a constant final concentration of miRFP670-LIMK1 in cell lysate at 32 nM.

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Optimization of ATP and ADP separation

The incubation buffer (IB) of the enzymatic reaction, the background electrolyte (BGE) for the CE-UV separation and the coating of the capillary inner surface were optimized to achieve satisfying separation in terms of resolution, analysis time and repeatability. The effect of  $\text{Mg}^{2+}$  complexation on the separation of ATP and ADP was principally considered. As the molecules that were to be monitored

were ATP and ADP, their separation was first investigated without neither miRFP670-LIMK1 nor cofilin in the cell lysate. The optimal wavelength at which the UV-detector monitored them was 254 nm, in accordance with their UV spectrum.

### 3.1.1. ATP and ADP analysis using a standard bare fused silica capillary

The first set of experiments was conducted using standard bare fused silica capillaries and the BGE ammonia/acetic acid at 50 mM (pH 10). A tension of +15 kV was applied which resulted in 26  $\mu$ A current. Three IB were prepared, based on HEPES 25 mM at pH 7.2, one without  $\text{Mg}^{2+}$ , one containing 2.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  and one containing 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$ . Solutions of 0.1 mM of ATP and 0.1 mM of ADP were prepared in each of the aforementioned IB.

As it can be seen in Table 1, the separation of ATP and ADP was not possible in the absence of  $\text{Mg}^{2+}$ : ATP and ADP had the same migration time, 19.15 minutes, corresponding to an electrophoretic mobility of -30.3 TU (*i.e.*  $-30.3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ). Complexation between cationic metals and nucleotides have been previously described and investigated by CE <sup>32,33</sup>. Furthermore, it is well established that the ATP and  $\text{Mg}^{2+}$  requirement for kinase reactions is to form an ATP- $\text{Mg}^{2+}$  complex facilitating the binding towards kinase <sup>34,35</sup>. Upon addition of 2.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  as a complexation agent, the peaks of ADP and ATP were well resolved ( $R_s = 4.0$ ). This can be easily explained by the fact that  $\text{Mg}^{2+}$  forms more stable complexes with ATP than with ADP and, in the pH range 4-8, the stoichiometry of ADP- $\text{Mg}^{2+}$  complexes is 1:1 whereas that of the complexes between  $\text{Mg}^{2+}$  and ATP depends on pH; hence ATP- $\text{Mg}^{2+}$  complexes have 1:2 stoichiometry at pH 7 and higher <sup>32,36</sup>.

When adding 10 mM of  $\text{Mg}^{2+}$  to the IB, the separation was thus highly improved, with a resolution equal to 26.5 and an efficiency of  $10^5$  theoretical plates. This also resulted, surprisingly, in a decrease in the EOF intensity;  $\mu_{\text{eof}}$  of +38.1 TU vs +47.7 TU in the absence of  $\text{Mg}^{2+}$ , and consequently a longer analysis time (Table 1). The capillary history may explain the effect on the EOF of the  $\text{Mg}^{2+}$  coming from the IB <sup>37</sup>. The migration time of ATP and ADP were 18.40 min and 20.79 min, respectively. This IB was considered to be optimal for the separation of ATP and ADP.

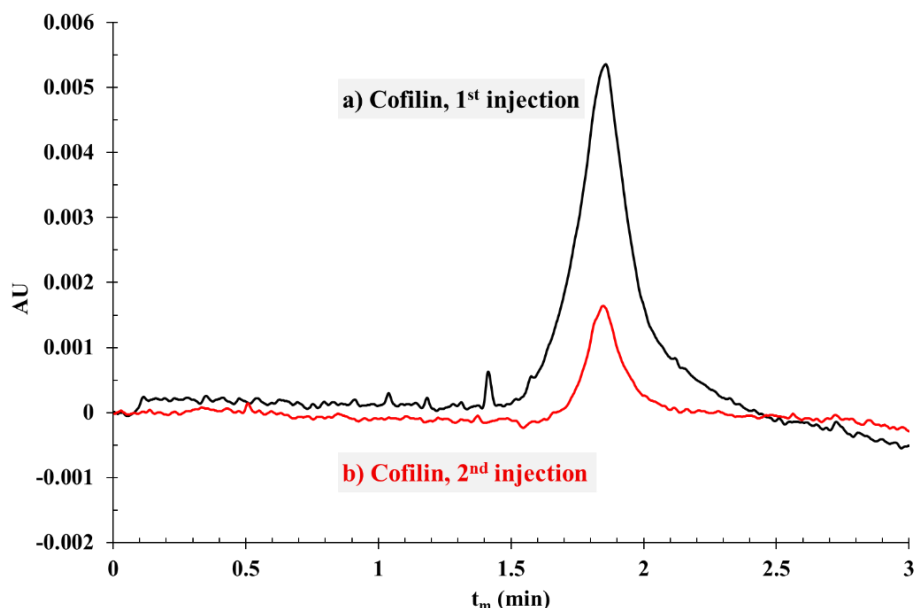
Increasing the BGE ionic strength from 50 mM to 80 mM had only a slight effect on the resolution and the efficiency (Table 1) and it understandably further extended the analysis time to 26 minutes. Using the ammonia/acetic acid at 50 mM (pH 10), the repeatability of the analyses was acceptable with  $\text{RSD}_{\text{tm}} < 1.2 \%$  and  $\text{RSD}_{\text{CPA}} < 3\%$  ( $n=6$ ).

**Table 1:** Optimization of ATP and ADP separation with different BGEs and incubation buffers (IB). Results are presented in terms of migration time of DMSO and EOF mobility, migration time and electrophoretic mobility of ATP and ADP as well as resolution between ATP and ADP. Capillary: 60 cm x 50 cm x 50  $\mu$ m i.d. Tiselius Unit: 1 TU =  $10^{-9}\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

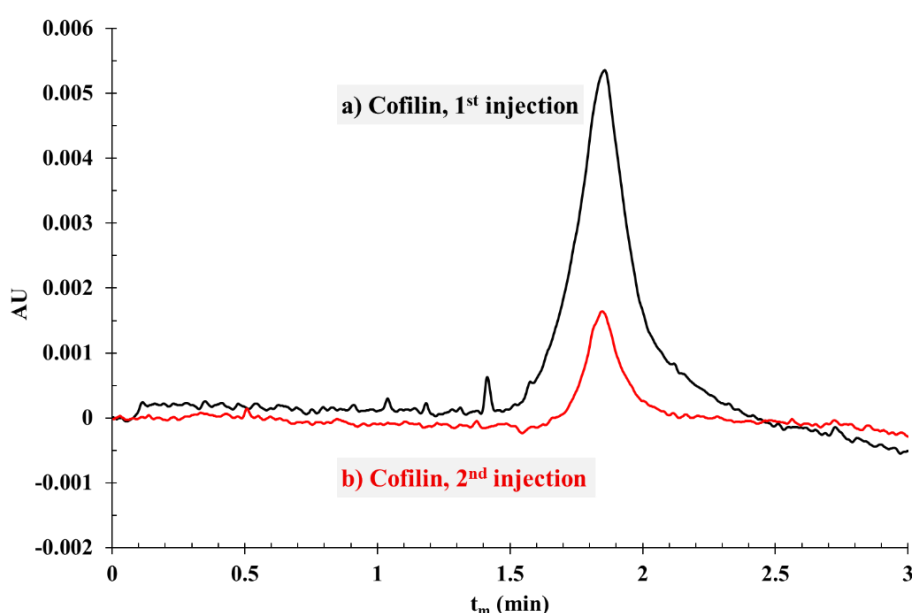
|                                                        |                                                                                                   | Bare silica capillary<br>(+15kV) |                  |                         |                  | PDADMAC-<br>coated capillary<br>(-30 kV) |
|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------------|-------------------------|------------------|------------------------------------------|
| <b>BGE</b>                                             | Ammonia/acetic acid (pH 10)<br>at an ionic strength (mM)<br><b>equal to:</b>                      | 50                               | 50               | <b>50</b>               | 80               | --                                       |
|                                                        | Tris/phosphate (pH 7.2) + 5<br>mM MgCl <sub>2</sub> at an ionic strength<br>(mM) <b>equal to:</b> |                                  | --               |                         | --               | <b>180</b>                               |
| <b>IB</b>                                              | HEPES 25 mM at pH 7.2 +<br>MgCl <sub>2</sub> at a concentration (mM)<br><b>equal to:</b>          | 0                                | 2.5              | <b>10</b>               | 10               | 10                                       |
| <b>t<sub>m</sub> min</b><br>( $\mu_{\text{eof}}$ ; TU) | DMSO                                                                                              | 6.99<br>(47.7)                   | 7.56<br>(44.1)   | <b>8.75</b><br>(38.1)   | 10.07<br>(33.1)  | 7.31<br>(-22.8)                          |
| <b>t<sub>m</sub> min</b><br>( $\mu_{\text{eph}}$ ; TU) | ATP                                                                                               | 19.15<br>(-30.3)                 | 16.96<br>(-24.4) | <b>18.40</b><br>(-20.0) | 23.58<br>(-19.0) | 4.40<br>(-15.1)                          |
|                                                        | ADP                                                                                               |                                  | 18.99<br>(-26.5) | <b>20.79</b><br>(-22.1) | 26.28<br>(-20.4) | 4.87<br>(-11.5)                          |
| <b>Rs</b>                                              | ATP/ADP                                                                                           | 0                                | 4.0              | <b>26.5</b>             | 26.4             | 6.9                                      |

To further explore optimization, enabling the successful investigation of the phosphorylation reaction of cofilin in cell lysate by miRFP670-LIMK1 in the presence of ATP, analysis of both the cellular lysate and the cofilin protein was undertaken. Pressure mediated analysis was conducted to reveal any adsorption of the cell lysate components and the cofilin protein. For this, 4 nL of the cell lysate were hydrodynamically injected in a bare fused-silica capillary filled with the optimal BGE (ammonia/acetic acid at 50 mM, pH 10) and pushed under a 5-psi pressure for 5 minutes (electric field turned off). A small peak was observed as expected at 1.8 minutes, in accordance with the Poiseuille law. This experiment was repeated 6 times and the result remained the same, confirming the absence of adsorption for the cell extracts in a bare silica capillary. Then, cofilin was injected and analyzed in the

same conditions. Results obtained for the first and the second injection are presented in



**Figure 2.** The cofilin was also detected as expected at 1.8 minutes. However, upon repeating the analysis, the intensity of the cofilin peak obtained during the second injection was almost three times lower than that of the first injection. The peak of cofilin was practically completely lost after the third injection. This result confirms that cofilin strongly tends to adsorb on the silica groups of the capillary inner walls. Monitoring the phosphorylation of cofilin by miRFP670-LIMK1 in cell lysates *via* CE was unfeasible unless the adsorption issues were remedied. Therefore, the implementation of a cationic coating of the silica capillaries was proposed for the remainder of the study.



**Figure 2:** Cofilin adsorption on uncoated silica capillary walls revealed by pressure mediated analysis because of poor repeatability between the first injection **(a)** and the second injection **(b)**.

**Experimental conditions:** 5 psi x 5 min; detection at 214 nm; cofilin at 135  $\mu$ M in TBS buffer (pH 7.4); uncoated fused-silica capillary (60 cm x 50  $\mu$ m i.d.).

### 3.1.2. ATP and ADP analysis using a capillary coated with a cationic layer of PDADMAC

Poly(diallyldimethylammonium chloride) or PDADMAC, which is a cationic polymer, was used to dynamically coat the silica capillary surface and thus to prevent cofilin adsorption by shielding the silanol groups.<sup>38</sup> The stability of PDADMAC monolayer coatings is known to be limited at high pH.<sup>24,39–41</sup> For this, the pH of the BGE needed to be lowered. Tris/phosphate at pH 7.2, the same as the pH of the IB, was used. Nonetheless, between runs, it was imperative to flush the capillary with PDADMAC 0.2% w/v to ensure the regeneration of the coating.<sup>40</sup> At the working pH 7.2, cofilin will be positively charged because its pI is about 8.6,<sup>42,43</sup> whereas the inner capillary surface is negatively charged. Thus, the tenacious adsorption onto the silanol groups is still expected, unless the inner surface is masked by positively charged polyelectrolytes such as PDADMAC.<sup>24</sup>

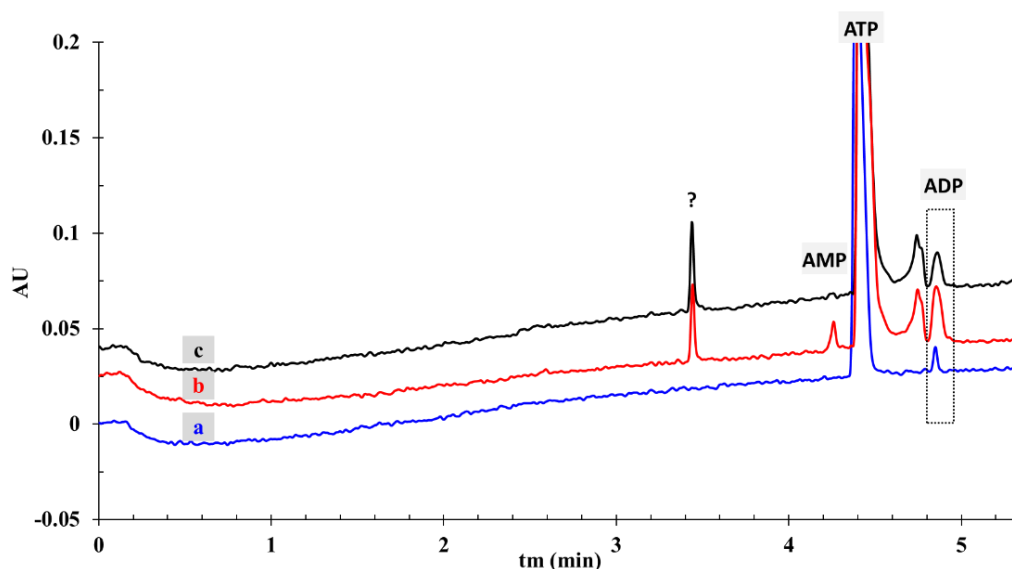
When employing a PDADMAC cationic coating, the EOF intensity is known to be relatively high and anodic,<sup>38</sup> thereby aligning with the direction of the anionic ATP and ADP analytes, which would significantly reduce their analysis time. This means that ATP and ADP peak resolution would be probably compromised. Indeed, even when using a Tris/phosphate BGE (pH 7.2) at an ionic strength of 180 mM, the resolution ATP/ADP was not sufficient ( $R \sim 1.1$ ). For this purpose, building upon the results of the previous section which confirmed the significant role of  $Mg^{2+}$  in the separation of ATP and ADP, a new BGE consisting of Tris/phosphate containing 5 mM  $MgCl_2$  was tested. The ionic strength was constant at 180 mM to avoid excessive Joule heating (resulting current -67  $\mu$ A) and therefore peak dispersion and reduced separation efficiencies.<sup>44</sup>

The results are summarized in Table 1. Briefly, the EOF was detected at 7.31 minutes which corresponds to -22.8 TU (anionic EOF). It was very repeatable ( $RSD_{tm\ DMSO} < 0.3\%$ ;  $n=6$ ) confirming the stability of the PDADMAC coating. The  $t_m$  of ATP and of ADP was highly reduced to 4.40 minutes (-15.1 TU) and 4.87 minutes (-11.5 TU), respectively, with satisfactory resolution of 6.9 and efficiency of  $10^4$  theoretical plates. It is worth noting that despite the reversal of the direction of the EOF, there has been no inversion of the ATP/ADP migration order compared to assays with uncoated capillaries. This can be explained, as indicated by the calculated electrophoretic mobilities, by the unlike complexation with  $Mg^{2+}$  added to the BGE (and not only in the IB) as well as the change in the working pH.<sup>32,33,45</sup>

These conditions were chosen for the remainder of the study. To summarize, the IB (pH 7.2) was 25 mM HEPES + 10 mM  $MgCl_2$ , the BGE (pH 7.2) was Tris/phosphate + 5 mM  $MgCl_2$  at an ionic strength 180 mM, and a PDADMAC-coated capillary.

### 3.2 Enzymatic activity of miRFP670-LIMK1 in cell lysate monitored by CE-UV

The specifics of the enzymatic reaction conditions are detailed in section 2.4.4. First, the blank enzymatic assay was conducted, at 37°C, by mixing miRFP670-LIMK1 in cell lysates with ATP, in the absence of cofilin substrate. This assay was repeatable ( $RSD_{CPA \text{ of ADP}} \sim 2\%$ ;  $n=3$ ) and demonstrated that even after 210 min of incubation time, there was only 6.6% (equation 2) increase in the quantity of ADP compared to the initial quantity present in the cell lysate at  $t_0$  (Table 2). This slight augmentation can be attributed to spontaneous, non-enzymatic degradation of ATP occurring at the reaction temperature of 37°C. An example of electropherogram for the blank assay is presented in Figure 3.a, showing that the peaks of high concentrated ATP and the small quantity of ADP due to spontaneous hydrolysis were detected in these conditions with excellent resolution.



**Figure 3:** Electropherogram of ATP degradation to ADP by miRFP670-LIMK1 in HEK293 cell lysates after a 210 min of incubation time. **(a)** Blank assay (in blue): ATP + miRFP670-LIMK1 (absence of substrate); **(b)** Enzymatic reaction control (100% activity, in red): ATP + miRFP670-LIMK1 + cofilin (substrate); **(c)** Inhibition assay (in black): ATP + miRFP670-LIMK1 + cofilin + TH-257 (a type III inhibitor).

**Enzymatic reaction conditions:** IB: 25 mM HEPES + 10 mM  $MgCl_2$  (pH 7.2); ATP at 4 mM; miRFP670-LIMK1, in HEK293 cell lysate, at 64 nM; cofilin at 81  $\mu M$  in TBS; TH-257 at 100 nM. Incubation time of 210 min at 37°C. **CE conditions:** BGE : Tris/phosphate + 5 mM  $MgCl_2$  (pH 7.2, 180 mM). PDADMAC-coated capillary: 60 cm total length, 50 cm detection length, 50  $\mu m$  i.d. Cathodic injection : 0.5 psi for 5 secondes ( $\sim 4$  nL). Separation : -30 kV at 25°C. Detection at 254 nm. Peak identification, according to the migration order in the capillary: AMP, ATP, ADP.

In order to verify if LIMK1 is still active despite the fluorescent protein miRFP670 fused to its C-terminal end, miRFP670-LIMK1 in cell lysate was mixed with ATP and its substrate cofilin, in the incubation buffer, and incubated at 37°C during 210 minutes. Figure 3.b shows that the migration times, resolution and efficiency were in the same order of magnitude as the blank assay reaction, with

good peak symmetry. Between  $t_0$  and  $t_{210}$ , the CPA of ADP increased to 495 (vs. 26 for the blank assay), which demonstrate that miRFP670-LIMK1 has indeed transferred a phosphate group from ATP, leading to the drastic increase of ADP in the reaction media: miRFP670-LIMK1 is still active despite its fluorescent tag. This means that miRFP670 being attached close to LIMK1 active site does not prevent ATP to access the hinge region of LIMK1, where competitive inhibitors would interact.<sup>46</sup> Using the equation 3, the miRFP670-LIMK1 activity was found to be 100.1% (Table 2), taking into account the spontaneous degradation estimated in the previous experiment (blank assay). It is worthy to note that when using Myelin Basic Protein or MBP, a non-specific kinase substrate that is used as a universal substrate for many *in-vitro* enzymatic activity assays, the phosphorylation by LIM kinase was not detected since the ADP concentration in the media did not increase upon time. The use of cofilin, the accurate substrate of LIMKs was mandatory for activity assays.

**Table 2:** Results obtained for the miRFP670-LIMK1 enzymatic and inhibition assays. Enzymatic and CE conditions as detailed in section 2.4.4 and in Figure 2.

|                                    | Blank assay | Enzymatic reaction | Inhibition assay |
|------------------------------------|-------------|--------------------|------------------|
| CPA <sub>ADP</sub> @ $t_0$ min     | 389         | 464                | 401              |
| CPA <sub>ADP</sub> @ $t_{210}$ min | 415         | 959                | 519              |
| $\Delta CPA (t_0 - t_{210})$       | 26          | 495                | 117              |
| % Degradation                      | 6.6         | 100.1              | 23.7 (76.3)      |
| (% <i>inhibition</i> )             | Equation 2  | Equation 3         | Equation 4       |

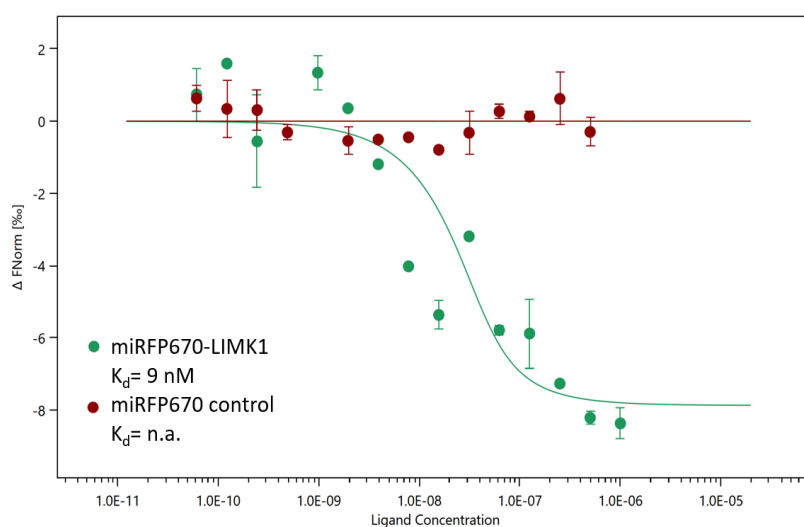
Now that miRFP670-LIMK1 activity was demonstrated by CE, in the complex media that is cell lysate, the ability of miRFP670-LIMK1 to be inhibited by a reference LIMK1 inhibitor, TH-257, was investigated by adding 100 nM of TH-257 to the reaction mixture. This concentration of TH-257 is in the same order of magnitude as its half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) on LIMK1.<sup>47,48</sup> The migration times and efficiency were comparable to those obtained with the blank and control/enzymatic reaction, confirming the reproducibility of the developed CE-based method (Figure 3.c). The presence of TH-257 decreased the production of ADP because, between  $t_0$  and  $t_{210}$ , the CPA of ADP only increased of 117 vs. 495 for the enzymatic reaction in the absence of TH-257. This result demonstrates undoubtably that miRFP670-LIMK1 has been inhibited by this compound (Table 2). The percentage of residual activity of the enzyme was found to be 23.7 % which corresponds to an inhibition of 76.3% (equation 4). This value is acceptable since the tested concentration in this study is in the same range as the  $IC_{50}$  reported in the previous interaction studies. It is essential to highlight

that  $IC_{50}$  values can vary depending on the experimental conditions used, mainly the cell line and the concentration of the target in the reaction media. Consequently, direct comparisons between our findings and those in the literature can be challenging. What is confirmed in our study is that more than being active in the cell lysate, miRFP670-LIMK1 can interact with TH-257, an allosteric inhibitor: the binding pocket of LIMK1 is probably not affected by the presence of miRFP670, even if it is attached closed to the active site (near the kinase domain).

In the forthcoming section, the equilibrium dissociation constant ( $K_d$ ) of miRFP670-LIMK1 / TH-257 will be evaluated using MST to confirm and quantify the interaction affinity between these partners in cell lysate, without any purification.  $K_d$  is a crucial parameter in assessing the binding propensity of a drug to its target, offering a measure less influenced by variations in target concentration. Hence,  $K_d$  will complement the activity assays conducted in this study, which relies on CE-UV analysis.

### **3.3 Affinity of miRFP670-LIMK1 / TH-257 in cell lysate monitored by MST**

First, the TH-257 autofluorescence at 1  $\mu$ M (the highest concentration studied) was checked and found to be negligible; less than 500 counts (as per the manufacturer's instructions). The specific steps are detailed in the method section. The MST binding assay was then conducted, a dose-response curve was obtained from two merged sets of data (Figure 4). The signal to noise (S/N) ratio *i.e.* the amplitude of the signal divided by the average of the replicate was found to be equal to 6. This value is higher than 5 which is suitable regarding the manufacturer recommendations<sup>49</sup>. The figure 4 shows that the dose-response curve of TH-257 towards miRFP670-LIMK1 has a sigmoid shape with a well-defined lower and higher plateau. The negative control, where the miRFP670 tag is mixed with TH-257 instead of miRFP670-LIMK1, showed a straight curve (red curve) corroborating the fact that the interactions between miRFP670-LIMK1 and TH-257 in the cell lysate occurs specifically with LIMK1 and not with miRFP670. Using a one-site binding model to fit the data obtained in figure 4, the  $K_d$  value of miRFP670-LIMK1/TH-257 was found to be 9 nM. Since the dissociation constant is lacking from the literature for this target/ligand couple, this result was contextualized by referring to the closest  $K_d$  that we can compare to, which is the one of TH-257 and purified Kin1 (the catalytic site of LIMK1), determined by ITC at 20°C, which is equal to 64 nM<sup>47</sup>. As it can be seen, the  $K_d$  determined in this study on full-length miRFP670-LIMK1, in cell lysate, by MST is in the same order of magnitude as the one obtained by ITC, despite the dissimilarity of assay conditions.



**Figure 4:** Dose-response curve for the binding interaction between miRFP670-LIMK1 and TH-257 (green) compared to the control where only miRFP670 was mixed with TH-257 (brown). The concentration of miRFP670-LIMK1 is kept constant at 32 nM whereas the concentration of TH-257 varies from 30 pM to 1  $\mu$ M. Each point represents the mean of two capillary readings and the corresponding error-bars. Dose-response curve was fitted to a one-site binding model provided with the MO.affinity Analysis software to obtain the  $K_d$  value. MST conditions: 37°C; LED power 20%; medium MST power.

## Conclusion

In this study, a straightforward approach was developed to evaluate by CE-UV the catalytic activity of LIM Kinases, particularly miRFP670-LIMK1 fluorescent protein, directly in cell lysates without any purification step. The optimal conditions for the electrophoretic separation of ATP and ADP in the presence of HEK293 cell lysate were found to be a BGE of Tris/phosphate/MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7.2, ionic strength 180 mM and an IB of HEPES/MgCl<sub>2</sub> 25mM/10 mM, pH 7.2, ionic strength 60 mM, in a PDADMAC-coated capillary and with a voltage of -30 kV. These conditions allowed a fast separation in only 5 minutes, with good repeatability, resolution and efficiency. The activity of miRFP670-LIMK1 in cell lysate was then assessed in the presence of the substrate cofilin and confirming that LIMK1 is still active even with the miRFP670 fluorescent tag attached to its C-terminal end. The presence of TH-257, one of LIM kinases referenced inhibitors, resulted as expected in a significant inhibition. Lastly, MST was used to quantify the interaction affinity between miRFP670-LIMK1 and TH-257 by successfully measuring the  $K_d$  value directly in the cell lysate ( $K_d = 9$  nM). The complementary of the CE and MST approaches confirms, all in all, that LIMK1 linked to miRFP670 tag retains its enzymatic abilities and its capacity to be inhibited by an allosteric inhibitor. The miRFP670 fluorescent fusion protein was thus revealed as a convenient fluorescent tag that can be used serenely for LIM kinase

affinity assays in cell lysates. The sub-micromolar cellular on-target activity obtained confirmed that TH-257 is suitable as a chemical probe for LIMK1.

#### 4. References

1. Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, et al. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*. 1998;393(6687):805-809. doi:10.1038/31729
2. Chen J, Ananthanarayanan B, Springer KS, et al. Suppression of LIM Kinase 1 and LIM Kinase 2 Limits Glioblastoma Invasion. *Cancer Res*. 2020;80(1):69-78. doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-1237
3. Malvi P, Janostiak R, Chava S, et al. LIMK2 promotes the metastatic progression of triple-negative breast cancer by activating SRPK1. *Oncogenesis*. 2020;9(8):77. doi:10.1038/s41389-020-00263-1
4. You T, Gao W, Wei J, et al. Overexpression of LIMK1 promotes tumor growth and metastasis in gastric cancer. *Biomed Pharmacother*. 2015;69:96-101. doi:10.1016/j.biopha.2014.11.011
5. Petrilli A, Copik A, Posadas M, et al. LIM domain kinases as potential therapeutic targets for neurofibromatosis type 2. *Oncogene*. 2014;33(27):3571-3582. doi:10.1038/onc.2013.320
6. Villalonga E, Mosrin C, Normand T, et al. LIM Kinases, LIMK1 and LIMK2, Are Crucial Node Actors of the Cell Fate: Molecular to Pathological Features. *Cells*. 2023;12(5):805. doi:10.3390/cells12050805
7. Foletta VC, Moussi N, Sarmiere PD, Bamberg JR, Bernard O. LIM kinase 1, a key regulator of actin dynamics, is widely expressed in embryonic and adult tissues. *Exp Cell Res*. 2004;294(2):392-405. doi:10.1016/j.yexcr.2003.11.024
8. Namme JN, Bepari AK, Takebayashi H. Cofilin Signaling in the CNS Physiology and Neurodegeneration. *Int J Mol Sci*. 2021;22(19):10727. doi:10.3390/ijms221910727
9. Kang DE, Woo JA. Cofilin, a Master Node Regulating Cytoskeletal Pathogenesis in Alzheimer's Disease. Reddy PH, ed. *J Alzheimers Dis*. 2019;72(s1):S131-S144. doi:10.3233/JAD-190585
10. Wang Y, Song X, Wang Y, et al. Dysregulation of cofilin-1 activity—the missing link between herpes simplex virus type-1 infection and Alzheimer's disease. *Crit Rev Microbiol*. 2020;46(4):381-396. doi:10.1080/1040841X.2020.1794789
11. Agteresch HJ, Dagnelie PC, van den Berg JWO, Wilson JHP. Adenosine Triphosphate. *Drugs*. 1999;58(2):211-232. doi:10.2165/00003495-199958020-00002
12. Nehmé H, Chantepie S, Defert J, Morin P, Papy-Garcia D, Nehmé R. New methods based on capillary electrophoresis for in vitro evaluation of protein tau phosphorylation by glycogen synthase kinase 3-β. *Anal Bioanal Chem*. 2015;407(10):2821-2828. doi:10.1007/s00216-015-8495-7
13. Nehmé R, Nehmé H, Saurat T, et al. New in-capillary electrophoretic kinase assays to evaluate inhibitors of the PI3k/Akt/mTOR signaling pathway. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(15):3743-3754. doi:10.1007/s00216-014-7790-z
14. Harris TK, Keshwani MM. Chapter 7 Measurement of Enzyme Activity. In: Burgess RR, Deutscher MP, eds. *Methods in Enzymology*. Vol 463. Guide to Protein Purification, 2nd Edition. Academic Press; 2009:57-71. doi:10.1016/S0076-6879(09)63007-X

15. Nasrin N, Kaushik VK, Fortier E, et al. JNK1 Phosphorylates SIRT1 and Promotes Its Enzymatic Activity. Rusche LN, ed. *PLoS ONE*. 2009;4(12):e8414. doi:10.1371/journal.pone.0008414
16. Eguchi S, Oshiro N, Miyamoto T, et al. AMP-activated protein kinase phosphorylates glutamine : fructose-6-phosphate amidotransferase 1 at Ser243 to modulate its enzymatic activity. *Genes Cells*. 2009;14(2):179-189. doi:10.1111/j.1365-2443.2008.01260.x
17. Belfield KD, Tichy EM. Review and drug therapy implications of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Am J Health Syst Pharm*. 2018;75(3):97-104. doi:10.2146/ajhp160961
18. Li Z, Qiao H, Lebherz C, et al. Creatine Kinase, a Magnetic Resonance-Detectable Marker Gene for Quantification of Liver-Directed Gene Transfer. *Hum Gene Ther*. 2005;16(12):1429-1438. doi:10.1089/hum.2005.16.1429
19. Lambeth DO, Muhonen WW. High-performance liquid chromatography-based assays of enzyme activities. *J Chromatogr B Biomed Sci App*. 1994;656(1):143-157. doi:10.1016/0378-4347(94)00072-7
20. Banni GAHD, Nehmé R. Capillary electrophoresis for enzyme-based studies: Applications to lipases and kinases. *J Chromatogr A*. 2022;1661:462687. doi:10.1016/j.chroma.2021.462687
21. Sastre Toraño J, Ramautar R, de Jong G. Advances in capillary electrophoresis for the life sciences. *J Chromatogr B*. 2019;1118-1119:116-136. doi:10.1016/j.jchromb.2019.04.020
22. Glatz Z. Determination of enzymatic activity by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B*. 2006;841(1):23-37. doi:10.1016/j.jchromb.2006.02.051
23. Nehmé R, Perrin C, Cottet H, Blanchin M, Fabre H. Influence of polyelectrolyte capillary coating conditions on protein analysis in CE. *Electrophoresis*. 2009;30(11):1888-1898. doi:10.1002/elps.200800688
24. Nehmé R, Perrin C, Cottet H, Blanchin MD, Fabre H. Stability of capillaries coated with highly charged polyelectrolyte monolayers and multilayers under various analytical conditions—Application to protein analysis. *J Chromatogr A*. 2011;1218(22):3537-3544. doi:10.1016/j.chroma.2011.03.040
25. Nehmé R, Nehmé H, Roux G, Destandau E, Claude B, Morin P. Capillary electrophoresis as a novel technique for screening natural flavonoids as kinase inhibitors. *J Chromatogr A*. 2013;1318:257-264. doi:10.1016/j.chroma.2013.10.024
26. Nehmé R, Perrin C. Highly Charged Polyelectrolyte Coatings to Prevent Adsorption During Protein and Peptide Analysis in Capillary Electrophoresis. In: Volpi N, Maccari F, eds. *Capillary Electrophoresis of Biomolecules*. Vol 984. Methods in Molecular Biology. Humana Press; 2013:191-206. doi:10.1007/978-1-62703-296-4\_14
27. Bartoschik T, Maschberger M, Feoli A, et al. Microscale Thermophoresis in Drug Discovery. In: Huddler D, Zartler ER, eds. *Applied Biophysics for Drug Discovery*. John Wiley & Sons, Ltd; 2017:73-92. doi:10.1002/9781119099512.ch5
28. Nasreddine R, Nehmé R. Microscale thermophoresis for studying protein-small molecule affinity: Application to hyaluronidase. *Microchem J*. 2021;170:106763. doi:10.1016/j.microc.2021.106763

29. Khavrutskii L, Yeh J, Timofeeva O, et al. Protein Purification-free Method of Binding Affinity Determination by Microscale Thermophoresis. *J Vis Exp*. 2013;(78):50541. doi:10.3791/50541
30. Oliinyk OS, Shemetov AA, Pletnev S, Shcherbakova DM, Verkhusha VV. Smallest near-infrared fluorescent protein evolved from cyanobacteriochrome as versatile tag for spectral multiplexing. *Nat Commun*. 2019;10(1):279. doi:10.1038/s41467-018-08050-8
31. Hellqvist A, Hedeland Y, Pettersson C. Evaluation of electroosmotic markers in aqueous and nonaqueous capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2013;34(24):3252-3259. doi:10.1002/elps.201300305
32. Cahours X, Morin Ph, Dreux M. Capillary electrophoretic study of the complexation of nucleotides with magnesium and calcium ions. *Chromatographia*. 1998;48(11-12):739-744. doi:10.1007/BF02467641
33. Cahours X, Morin Ph, Dreux M. Separation of nucleoside mono-, di- and triphosphates by capillary electrophoresis via cadmium complexation. *Chromatographia*. 1999;49(7-8):379-384. doi:10.1007/BF02467610
34. Yll JS. Effect of Mg<sup>2+</sup> Concentrations on Phosphorylation/Activation of Phosphorylase b Kinase by cAMP/ Ca<sup>2+</sup>-Independent, Autophosphorylation- Dependent Protein Kinase.
35. Yu L, Xu L, Xu M, Wan B, Yu L, Huang Q. Role of Mg<sup>2+</sup> ions in protein kinase phosphorylation: insights from molecular dynamics simulations of ATP-kinase complexes. *Mol Simul*. 2011;37(14):1143-1150. doi:10.1080/08927022.2011.561430
36. Stockbridge RB, Wolfenden R. The Intrinsic Reactivity of ATP and the Catalytic Proficiencies of Kinases Acting on Glucose, N-Acetylgalactosamine, and Homoserine. *J Biol Chem*. 2009;284(34):22747-22757. doi:10.1074/jbc.M109.017806
37. Dickens JE, Gorse J, Everhart JA, Ryan M. Dependence of electroosmotic flow in capillary electrophoresis on Group I and II metal ions. *J Chromatogr B Biomed Sci App*. 1994;657(2):401-407. doi:10.1016/0378-4347(94)00074-3
38. Liu Q, Lin F, Hartwick RA. Poly(diallyldimethylammonium chloride) as a Cationic Coating for Capillary Electrophoresis. *J Chromatogr Sci*. 1997;35(3):126-130. doi:10.1093/chromsci/35.3.126
39. Pei L, Lucy CA. Insight into the stability of poly(diallyldimethylammoniumchloride) and polybrene poly cationic coatings in capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*. 2014;1365:226-233. doi:10.1016/j.chroma.2014.09.013
40. Nehmé R, Perrin C, Cottet H, Blanchin MD, Fabre H. Influence of polyelectrolyte coating conditions on capillary coating stability and separation efficiency in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2008;29(14):3013-3023. doi:10.1002/elps.200700886
41. Wang Y, Dubin PL. Capillary Modification by Noncovalent Polycation Adsorption: Effects of Polymer Molecular Weight and Adsorption Ionic Strength. *Anal Chem*. 1999;71(16):3463-3468. doi:10.1021/ac990146k

42. Aizawa H, Kishi Y, Iida K, Sameshima M, Yahara I. Cofilin-2, a novel type of cofilin, is expressed specifically at aggregation stage of Dictyostelium discoideum development. *Genes Cells*. 2001;6(10):913-921. doi:10.1046/j.1365-2443.2001.00470.x
43. Lu JX, Xiang YF, Zhang JX, et al. Cloning, soluble expression, rapid purification and characterization of human Cofilin1. *Protein Expr Purif*. 2012;82(1):186-191. doi:10.1016/j.pep.2012.01.002
44. Heiger D. High performance capillary electrophoresis: an introduction: a primer. *Agilent Technologies*. <https://www.colby.edu/chemistry/CH332/laboratory/Agilent%20CE%20Primer.pdf>. Published 2000. Accessed March 11, 2024.
45. Malina A, Bryant SK, Chang SH, Waldrop GL, Gilman SD. Capillary electrophoresis-based assay of phosphofructokinase-1. *Anal Biochem*. 2014;447:1-5. doi:10.1016/j.ab.2013.10.028
46. Chatterjee D, Preuss F, Dederer V, Knapp S, Mathea S. Structural Aspects of LIMK Regulation and Pharmacology. *Cells*. 2022;11(1):142. doi:10.3390/cells11010142
47. Hanke T, Mathea S, Woortman J, et al. Development and Characterization of Type I, Type II, and Type III LIM-Kinase Chemical Probes. *J Med Chem*. Published online September 22, 2022:acs.jmedchem.2c01106. doi:10.1021/acs.jmedchem.2c01106
48. Collins R, Lee H, Jones DH, et al. Comparative Analysis of Small-Molecule LIMK1/2 Inhibitors: Chemical Synthesis, Biochemistry, and Cellular Activity. *J Med Chem*. Published online October 7, 2022:acs.jmedchem.2c00751. doi:10.1021/acs.jmedchem.2c00751
49. Wienken CJ, Baaske P, Rothbauer U, Braun D, Duhr S. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat Commun*. 2010;1(1):100. doi:10.1038/ncomms1093

## Conclusion

Dans ce chapitre, les conditions optimales de la séparation électrophorétique de l'ATP et de l'ADP, pour le suivi de la réaction de phosphorylation de la cofiline par la miRFP670-LIMK1 dans le lysat de cellules HEK293, ont été établies. Ces conditions ont permis une séparation rapide, répétable et efficace. L'activité de LIMK1 dans le lysat cellulaire a été confirmée, malgré la protéine fluorescente miRFP670 attachée à son extrémité C-terminale. La présence de TH-257, l'un des inhibiteurs de référence des LIM kinases, a entraîné comme attendu une inhibition significative de la réaction enzymatique. La complémentarité des approches CE et MST confirme que LIMK1 lié à la protéine fluorescente miRFP670 conserve ses capacités enzymatiques et sa capacité à être inhibé par un inhibiteur allostérique. Ces résultats confirment que la protéine miRFP670 est un marqueur fluorescent qui peut être utilisé d'une façon simple et efficace pour les tests d'affinité et d'activité des LIM kinases à l'échelle cellulaire par MST et par CE.

Après avoir développé et validé l'utilisation de la MST pour les études d'affinité LIMK/ligand (**chapitre II**) et de la CE pour l'activité enzymatique (**chapitre III**), nous avons évalué par la suite la polyvalence de la technique MST pour dresser le profil thermodynamique d'une interaction cible/ligand de petite taille (**chapitre IV**).

# **Chapitre IV :**

**Caractérisation thermodynamique des  
interactions LIMK/ligand de petite taille  
dans les lysats cellulaires**

## Introduction

Dans ce chapitre, les paramètres thermodynamiques de l'interaction entre LIMK1, LIMK2 et Kin1 avec deux de leurs inhibiteurs de référence, TH-257 et LX7101, ont été déterminés. Des lysats cellulaires HEK293 surexprimant miRFP670-LIMKs ont de nouveau été utilisés pour ces études par MST. La détermination des paramètres thermodynamiques a été réalisée en mesurant la constante de dissociation ( $K_d$ ) de chaque couple cible/inhibiteur par MST à différentes températures et en traçant l'équation de Van't Hoff pour chaque couple.

Les profils thermodynamiques et cinétiques de l'association protéine/ligand fournissent des informations mécanistiques sur les interactions moléculaires déterminant l'affinité d'un ligand pour sa cible. Ils sont alors de plus en plus indispensables aux chimistes médicaux pour comprendre de manière exhaustive la relation structure-activité (SAR) et particulièrement utiles pour obtenir des informations propres à orienter la sélection des composés (*hits* ou *leads*) et l'optimisation du processus *hit*-au-*lead*-au-médicament. Une caractérisation thermodynamique peut fournir des informations plus détaillées au-delà de l'affinité de liaison, telles que la contribution enthalpique ( $\Delta H$ ) et/ou entropique ( $\Delta S$ ) pour l'association du ligand avec sa cible.

# Microscale thermophoresis for evaluating LIM Kinase interaction with small inhibitors: a thermodynamic approach

Solweig CHARTIER<sup>1</sup> and coworkers from the following affiliations:

<sup>1</sup>Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), CNRS FR 2708 – UMR 7311, Université d'Orléans, 45067 Orléans, France. e-mail\*: [reine.nehme@univ-orleans.fr](mailto:reine.nehme@univ-orleans.fr)

<sup>2</sup>Application Team, NanoTemper Technologies GmbH, Munich, Germany

<sup>3</sup>Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301, CNRS-Université d'Orléans and INSERM, 45071 Orléans CEDEX 2, France

<sup>4</sup>Normandie Université, COBRA, UMR6014 & FR3038 CNRS, Université de Rouen, INSA de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

*Members of the consortium performed MST experiments and analyzed the corresponding data; planed and performed docking experiments and the experiences for the production of HEK293 cells overexpressing miRFP670-LIMKs. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.*

**Key words:** Binding affinity; Cell lysate; LIM Kinases; Microscale Thermophoresis; Molecular interactions; Thermodynamics

## Abstract

LIMK1 and LIMK2, the two members of the LIM Kinases family, play a critical role in the regulation of cytoskeleton dynamics by regulating independently actin filament turnover through the phosphorylation of cofilin and microtubule remodelling. Due to their implication in many pathologies, LIM Kinases are considered as promising therapeutic targets. Nevertheless, no LIMK small molecule inhibitor has passed clinical trial stage, which is probably due to a lack of holistic understanding of these kinases. In this paper, for the first time, thermodynamic parameters of the interaction between LIMK1, LIMK2 and the kinase domain from LIMK1, *i.e.* Kin1, with two of their reference inhibitors, TH-257 and LX7101, were investigated. Lysates of HEK293 cells overexpressing fluorescent LIMK fusion proteins, miRFP670-LIMKs, were used for microscale thermophoresis (MST) assays without any purification. The determination of the thermodynamic parameters was then achieved by measuring by MST the dissociation constant ( $K_d$ ) of each target/inhibitor couple at different temperatures and

plotting the Van't Hoff equation. The linearity range was determined and validated with  $r^2$  values ranging from 0.9579 to 0.9993. The results show that LIM Kinase 1 exhibits a similar thermodynamic behaviour as its kinase domain: the Gibbs free energy at 37°C ( $\Delta G_{37^\circ\text{C}}$ ) for the interaction of TH-257 or LX7101 with LIMK1 and Kin1 was about  $-10.3 \pm 0.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ . However, the  $\Delta G_{37^\circ\text{C}}$  of the interaction between miRFP670-LIMK2 and both inhibitors are significantly lower, by a gap of 1.5 kcal mol<sup>-1</sup>, than  $\Delta G_{37^\circ\text{C}}$  of the miRFP670-LIMK1. More interestingly, the results indicate that entropy opposes the interaction regardless of the tested target/inhibitor couples, whereas enthalpy favors it. This suggests that it would be beneficial to improve the entropic term in order to enhance the interaction and promote the development of LIM Kinase inhibitors capable of passing clinical stages. This proof of concept shows that MST is a user-friendly tool to rapidly determine the thermodynamic parameters of protein-small ligand interactions, directly in cell lysates, with very small sample consumption, and without any immobilization step or use of radioactivity.

## Introduction

Understanding the process of molecular interaction between an enzyme and its ligand is a central node in the process of drug discovery. Isothermal titration calorimetry (ITC) is the primary tool used to detect the heat release upon complex formation at constant temperature, leading to the determination of thermodynamic parameters. Nevertheless, ITC requires purified target within a concentration in the micromolar range, which is not always possible or desirable. Furthermore, the need for stirring and the use of pure enzyme can give results in assay conditions far from the native state of the protein<sup>1,2,3</sup>. Another method for studying thermally induced changes, in particular the conformational transitions of biological macromolecules, is differential scanning calorimetry (DSC) which exhibits the same limitations as ITC<sup>4</sup>. NMR spectroscopic methods are also a powerful tool for characterizing protein-ligand interactions under near physiological conditions.<sup>5-7</sup> Actually, <sup>1</sup>H NMR 1D STD<sup>8</sup>, Water-LOGSY<sup>9</sup>, 2D tr-NOESY<sup>10</sup> and/or DOSY<sup>11</sup>, based on the observation of the ligands signals, make it possible to evidence the protein-ligands interaction and to perform epitope mapping. These methods allow to identify protons of the ligand close to the target and thus involved in the interaction, and the determination of the 3D structure of the ligand when bound to its target. On the other hand, experiments based on enzyme/protein's signal observation (2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC)<sup>12,13</sup> lead to the identification of the amino acids implicated in the interaction with the inhibitor and also allow the estimation of the affinity of ligands to their target ( $K_d$  measurements). The latter set of methods requires to prior produce milligrams of the target, uniformly enriched in <sup>15</sup>N and/or <sup>13</sup>C isotopes. Several methods used for investigating biomolecule binding requires either fluorescent or radioactive labelling. Förster Resonance Energy Transfer (FRET) involves the labelling of both molecules with donor and acceptor fluorophores. It can provide information about molecular interactions, distances, and conformational changes<sup>14,15</sup>. There is also fluorescence polarization (FP)<sup>16</sup>, which measures the rotation of a fluorescently labelled molecule. When the labelled molecule binds to another molecule, its gyration is restricted, leading to FP changes<sup>17</sup>. This technique is often used for high-throughput screening of protein-ligand interactions<sup>18</sup>. Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) is also used, which measures the fluctuations in fluorescence intensity caused by the diffusion of fluorescently labelled molecules through a small detection window. FCS provides information about the mobility and interactions of molecules in solution.<sup>19</sup> The method requiring radioactive labelling that is the most often employed is Radioimmunoassay (RIA), which is a sensitive technique that uses radioactive isotopes to label antigens or antibodies. RIA involves competitive binding between a known labelled molecule (radioligand) and an unlabelled molecule.<sup>20</sup> Finally, there is autoradiography in which a radioactive ligand binds to a target in a tissue sample and the distribution of radioactivity indicates the location of

the bound ligand.<sup>21</sup> Other techniques rely on surface immobilization, including biolayer interferometry (BLI)<sup>22</sup>, surface plasmon resonance (SPR)<sup>23</sup> and quartz crystal microbalance (QCM)<sup>24</sup>. However, immobilization may lead to hindering binding processes<sup>25</sup>.

For this study, microscale thermophoresis (MST) was chosen to evaluate the interaction between enzymes and their small weight ligand. MST is a technique based on the monitoring of a fluorescent signal upon a temperature change of few degrees induced by a 1475 nm infrared laser within a focal volume of about 5 nL, focused in the center of a capillary. Molecules distribute along the temperature gradient generated and the fluorescence intensity is hence modified.<sup>26,27</sup> This is known as the thermophoretic signal. Temperature Related Intensity Changes (TRIC) are also induced upon this temperature increase, hence dimming the dyes.<sup>28</sup> When a ligand is added to the target solution, the fluorescence intensity is modified upon complex formation enabling the detection of binding. The remaining fluorescence of the molecules depends on their size, charge, and solvation shell<sup>26,29,30</sup>. The labelled molecules' fluorescence is measured and normalized during the temperature increase, and this information is converted into a binding curve from which the dissociation constant ( $K_d$ ) of the target and its ligand is calculated. MST requires no surface immobilization, works well in complex matrix without purification of the target, requires only a few micromolar (about 20  $\mu$ L) of target/ligand solutions and allows the user to obtain a dissociation constant ( $K_d$ ) in less than 20 minutes.<sup>31</sup> This method is well suited for the evaluation of  $K_d$  value for the interaction between enzymes (several kDa) and small ligands (hundreds of Da). This has been demonstrated in literature for the inhibition of: elastase (29.5 kDa) by two small triterpenes, the ursolic and the oleanolic acid (456 g.mol<sup>-1</sup> for both)<sup>32</sup>; pancreatic lipase (50 kDa) by quercotriterpenoside-I (QTT-I, 818 g.mol<sup>-1</sup>), 3-O-galloylbarrinic acid (3-GBA, 670 g.mol<sup>-1</sup>) and bartogenic acid (BA, 518 g.mol<sup>-1</sup>)<sup>33</sup>; and hyaluronidase (55 kDa) by two small flavonoid compounds, epigallocatechin gallate (EGCG, 458 g.mol<sup>-1</sup>) and apigenin-7-glucoside (432 g.mol<sup>-1</sup>)<sup>34</sup>. More recently, Thuru *et al.*<sup>35</sup> successfully confirmed experimentally the binding of Wnt/ $\beta$ -Catenin inhibitor KYA1797K (442 g.mol<sup>-1</sup>) towards the programmed death-ligand 1 (PD-L1, 40 kDa) protein. However, repeatability can be low when using unspecific chemical labelling of the target in complex samples such as pancreatic extracts<sup>33</sup> and the choice of the MST buffer can be limited by the labelling strategy<sup>36</sup>. To bypass chemical labelling, several groups have worked with fusion protein emitting in the green (Green Fluorescent Protein, GFP)<sup>37-39</sup> or yellow (Yellow Fluorescent Protein, YFP)<sup>40,41</sup> spectrum. Our group very recently reported, for the first time, the use a monomeric near-infrared (NIR) fluorescent proteins (FPs), the miRFP670, to conduct MST in cell lysate without any purification of the target. The use of miRFP670 allows to work in an 'optical window' (650 to 900 nm) where background autofluorescence of cells is low and light scattering is reduced<sup>42</sup>.

Recently, determination of the thermodynamic parameters of a bio-molecular interaction with MST has been done on the interaction of two large macromolecules; DNA hybridization after a chemical fluorescent labelling<sup>43</sup>. To the best of our knowledge, never the interaction between a protein and a small ligand directly in cell lysate was yet reported. In this regard, we chose to evaluate the thermodynamic parameters, in cell lysates overexpressing LIM Kinase 1, LIM Kinase 2 or the kinase domain of LIMK1, Kin1, fused to mRFP670<sup>44</sup>, with two of their reference inhibitors.

LIMK1 and LIMK2, the two enzymes that constitute the LIM Kinases family play a crucial role in the regulation of cytoskeleton dynamics by controlling actin filament dynamics and microtubule turnover<sup>45,46</sup>. Misregulation of LIMKs has been shown to result in many diseases<sup>47</sup>: cancer<sup>48</sup>, neurofibromatosis<sup>49</sup> and neurological disorders<sup>50</sup>. Several LIM Kinase inhibitors have been developed, but none of them has passed the clinical trial stage<sup>51,52</sup>. A better understanding of LIM Kinases is needed, through the determination of thermodynamic parameters that rule the interaction LIMK/inhibitor. MST, as any equilibrium based measurement, can determine the thermodynamic of interaction by monitoring the binding constant at various temperatures<sup>31</sup>. Negative value of Gibbs free energy ( $\Delta G$ ) related to enthalpy and entropy would indicate spontaneous interactions. The enthalpy parameter ( $\Delta H$ ) shows the change in energy due to noncovalent interaction (hydrogen bonds and/or van der Waals interactions) between the target, the ligand and the solvent. Large negative binding enthalpy  $\Delta H$  is advantageous regarding binding affinity, target selectivity, and ADME (absorption, distribution, metabolism, and excretion) properties, because it reflects specific, direct, polar interactions. The entropic counterpart ( $\Delta S$ ) shows the degree of freedom of the system as a global thermodynamic property<sup>53</sup>. Entropy-driven binding can be explained as the release of unstable waters from the hydrophobic surface.<sup>25,54</sup> Enthalpy and entropic contributions are thought to integrate multiple contributions to the ligand-target complex formation with a dominant role of water molecules. It was shown recently that these contributions are very sensitive to experimental conditions, and are affected by enthalpy-entropy compensation.<sup>55,56</sup>

In the present work, MST and the Van't Hoff model were used to describe the effect of temperature on the equilibrium constants and can be used to determine the thermodynamic parameters of an interaction.<sup>57,58,59</sup> The thermodynamic parameters of mRFP670-LIMK with LX7101<sup>51</sup> (competitive inhibitor) and TH-257<sup>60</sup> (allosteric inhibitor) were evaluated. LX7101 binds to the hinge region of the active site of LIMKs<sup>61</sup> and TH-257 in its hydrophobic pocket<sup>62</sup>. This study was conducted with lysates of HEK293 cells overexpressing mRFP670-LIMK, without any purification step. The optimization of all the MST-based assays will be carefully discussed.

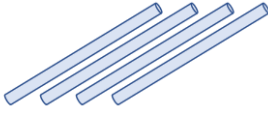
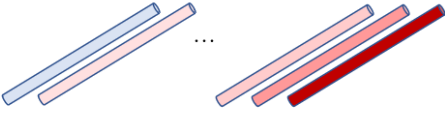
## 1. Materials and methods

### 1.1. Experimental approach

The MST analyses were performed on a Monolith NT.115 Pico (NanoTemper technologies) using MO.control software (v.1.6) equipped with a red light filter, and the data analysis was conducted using MO.Affinity Analysis (v.2.3) software. Standard uncoated silica capillaries were used throughout this study (Monolith NT115 capillaries, #MO-K022, NanoTemper Technologies, GmbH, Munich, Germany). The infra-red laser heat source produced a beam at 1475 nm inducing changes in temperature of few degrees. Medium MST power was used. The excitation and emission wavelengths of the fluorophore ranged from 605–645 nm and 680–685 nm, respectively. The LED light was adjusted to 40% excitation power. For each experiment, once the capillaries were filled, they were loaded into the Monolith NT.115 Pico apparatus and the temperature of the thermostated chamber was set to the value of interest. Measurements started 2 minutes after reaching a constant temperature.

To determine the thermodynamic parameters  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  and  $\Delta G$  of the interaction between miRFP670-LIMKs and their inhibitors, the  $K_d$  of the interaction was measured at different temperatures, which allowed the plotting of the Van't Hoff equation, from which the thermodynamic parameters were computed. The  $K_d$  values were measured *via* MST analysis: for each miRFP670-LIMK/inhibitor pair, a 16-point serial dilution of the inhibitor was mixed with a constant concentration of miRFP670-LIMK in HEK293 cell lysate (for a final concentration comprised between 32 nM and 35 nM). The sixteen mixtures were then introduced into sixteen Monolith NT.115 standard capillaries. The fluorescence in each capillary was successively monitored before and upon temperature increase induced by the IR laser. Data processing of the MST behaviour of a whole dilution series resulted in a  $K_d$  value for one miRFP670-LIMK/inhibitor couple at a given temperature. This protocol was conducted for each miRFP670-LIMK/inhibitor couple, on a 29°C–37°C range, with steps of 1°C.

Given the high number of dilution series needed to complete this study, the ability of miRFP670-LIMK to tolerate successive LED excitations, changes in temperatures and room temperature life time were investigated to determine if a single dilution series can be analysed several times at different temperatures. For this, MST capillaries were filled with cell lysate from HEK293, overexpressing miRFP670-Kin1 cell lysate at 34 nM, and were measured twenty times at 30°C, corresponding to an incubation period up to 90 minutes. Four capillaries were used to ensure reproducibility (Figure 1-a). The fluorescence of the miRFP670-Kin1 was measured first without laser heating ( $F_{\text{cold}}$ ) and then 5 seconds after turning on the IR-laser ( $F_{\text{hot}}$ ). The variation of the fluorescence ( $F_{\text{hot}}$ ) between MST-traces, namely the response amplitude ( $\delta F$ ), was also reported.

| Evaluated parameter(s)                                                                | Monitored variable(s)                       | MST set-up                                                       |                                   |                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                       |                                             | Target                                                           | Ligand                            | Number of capillaries                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>a.</b> Incubation time: 0-90 min                                                   | $F_{\text{cold}}, F_{\text{hot}}, \delta F$ | miRFP670-Kin1 in cell lysate                                     | No ligand                         | <br>4 capillaries filled with constant concentration of target                                                                                        |
| <b>b-1.</b> Incubation $T^\circ$ : 22-37°C (steps of 1°C)                             | $F_{\text{cold}}, F_{\text{hot}}$           |                                                                  |                                   |                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>b-2.</b> Incubation $T^\circ$ : 22-37°C (steps of 1°C)                             | $\delta F, S/N$                             | miRFP670-Kin1 in cell lysate                                     | With TH-257 at 2 $\mu\text{M}$    | <br>4 capillaries filled with constant concentration of target mixed with TH-257                                                                      |
| <b>c.</b> Incubation $T^\circ$ and Van't Hoff plot ( $\Delta H, \Delta S, \Delta G$ ) | $K_d$ at various temperatures               | miRFP670-Kin1<br>miRFP670-LIMK1<br>miRFP670-LIMK2 in cell lysate | Without and with TH-257 or LX7101 | <br>16 capillaries filled with constant concentration of the target and a serial dilution of TH-257 or LX7101 (capillary #16 contains only the target) |

**Figure 1:** Scheme of the experimental approach adopted for this study.

$F_{\text{cold}}$  indicates the “initial fluorescence” when the laser is off (just before its turned on for MST experiment).  $F_{\text{hot}}$  indicates the thermophoresis motion at 5 seconds after activation of the IR-laser.  $\delta F$  is the variation of the fluorescence between the corresponding MST-traces, or the response amplitude.  $S/N$  is the signal-to-noise ratio of the MST signal.

Then, the influence of the temperature changes, between 22°C and 37°C, on the MST response of miRFP670-Kin1 was investigated, in the absence (Figure 1.b-1) and in the presence (Figure 1.b-2) of the reference inhibitor, TH-257. Four capillaries were also used to monitor reproducibility. The MST measurements begun 2 minutes after reaching the appropriate temperature. For the experiments carried out in the absence of TH-257,  $F_{\text{cold}}$  and  $F_{\text{hot}}$  were monitored to conclude on the miRFP670-Kin1 behaviour depending on the incubation temperature. In presence of TH-257 (2  $\mu\text{M}$ ), the response amplitude ( $\delta F$ ) was reported. The ratio of the response amplitude of the MST signal to the MST noise ( $S/N$ ) was also measured to evaluate if  $\delta F$  is significative of interactions between miRFP670-Kin1 and TH-257.

At last, the experiments performed to obtain  $K_d$  values of miRFP670-LIMK/Kin1 and inhibitors, TH-257 and LX7101, consisted in mixing each target at a fixed concentration in cell lysates with 16 different concentrations of inhibitor ranging from 60 pM to 2  $\mu\text{M}$ . These concentrations were determined to include the  $K_d$  values at 37°C, which are in the nanomolar range for both LIM Kinases

and LIM Kinase domain (Figure 1-c). Two additional measurements were performed at the end of the experiment at the initial temperature (either 22°C or 37°C) in order to ensure repeatability. The  $K_d$  values were obtained, at each temperature, from dose-response curves reporting  $F_{\text{norm}}$  defined as  $F_{\text{hot}}/F_{\text{cold}}$  against the concentration of the inhibitor (or ligand).

By plotting the natural logarithm of  $K_a$ , equal to  $K_d^{-1}$ , against the inverse of the temperature (in Kelvin), the thermodynamic parameters of the reaction ( $\Delta S$ ,  $\Delta H$  and  $\Delta G$ ) were calculated by exploiting the linear extrapolation of the Van't Hoff plot. The enthalpy ( $\Delta H$ ) can be determined using the slope of the curve, and the entropy ( $\Delta S$ ) can be determined using the intercept (equation 1). Once  $\Delta H$  and  $\Delta S$  calculated, the Gibbs free energy  $\Delta G$  can be determined using the equation 2.<sup>63</sup>

$$\ln(K_a) = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (\text{equation 1})$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{equation 2})$$

With:  $K_a$  the association constant;  $\Delta H$  the enthalpy ( $\text{kcal.mol}^{-1}$ );  $\Delta S$  the entropy ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ );  $R$  the gas constant ( $=1.987 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ );  $T$  the temperature (K) and  $\Delta G$  the Gibbs free energy ( $\text{kcal.mol}^{-1}$ ).

## 1.2. Chemicals

All reagents were used as received without any further purification. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 0.5 M, pH 8.0),  $\beta$ -glycerophosphate disodium salt hydrate  $((\text{HOCH}_2)_2\text{CHOP}(\text{O})(\text{ONa})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O})$ , 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid, glycerol (purity  $\geq 99\%$ ) hydrochloric acid (HCl, 36.5-38.0%, pH  $<1$ ), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF,  $\text{C}_7\text{H}_7\text{FO}_2\text{S}$ , purity  $> 99\%$ ), sodium fluoride (NaF, purity  $\geq 99\%$ ), sodium pyrophosphate dibasic ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , purity  $> 99\%$ ), Triton X-100 and cell culture media were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Aprotinin (Apro), leupeptin (Leu), sodium chloride (NaCl, ultrapure grade), p-Nitrophenylphosphate (pNPP), Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ , ultrapure grade), okadaic acid (AcOK, purity  $> 98\%$  HPLC) were purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Dimethylsulfoxyde (DMSO, purity 99%) was purchased from VWR international (Fontenay-sous-Bois, France) and sodium orthovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) from LC laboratories (Woburn, USA). Ultrapure water ( $18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$ ) was purified with a Milli-Q apparatus from Merck (Semoy, France). Syringes and polytetrafluoroethylene (PTFE) Syringe Filters, pore size  $0.45 \mu\text{m}$ , were purchased from Agilent (Les Ulis, France). ( $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_3$ ) LX7101 was purchased from

Medchem express, NJ, USA. (C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S, TH-257) was purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

### 1.3. miRFP670-LIMK production

HEK-293 (ATCC, CRL1573) were cultured under 5% CO<sub>2</sub> at 37°C in low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum. Cells were transiently transfected with 10 µg of plasmid/100-mm dish using calcium phosphate method and cultured for 48 hours. Cells were lysed in 0.5 mL of lysis buffer and then incubated on ice for 10 min. The *cell lysis buffer* contained 50 mM Tris/HCl at pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 50 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate dibasic, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 20 mM p-nitrophenyl phosphate, 20 mM β-glycerophosphate, 10 µg mL<sup>-1</sup> aprotinin, 0.05 µg mL<sup>-1</sup> okadaic acid, 1 µg mL<sup>-1</sup> leupeptin, and 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride). After centrifugation for 10 minutes at 10000g, the supernatants were collected to obtain the cell lysate stock solutions that were stored at -20°C after adding 30% (v/v) glycerol.

### 1.4. Buffer solutions and sample preparation

*MST buffer*: this buffer was identical to the cell lysis buffer described above.

*LX7101 and TH-257 stock solutions*: they were at 10 mM and 4 mM in 100% DMSO, respectively. They were stocked at -20°C.

*Working solutions*: protein concentration in cell lysate was estimated to 487 nM for miRFP670-Kin1, 453 nM for miRFP670-LIMK1 and 494 nM for miRFP670-LIMK2 by using a double beam UV-Vis spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan). For this, each protein-miRFP670 sample was transferred into 0.5 mL quartz cuvettes with 10-mm optical path length. UV-visible absorption of the solution was measured at a wavelength range of 190–800 nm at fast scan speed with 0.5-nm sampling intervals. Blank assays were conducted with ultrapure water and lysis buffer. Then, the concentration of the miRFP670-kinase samples was estimated using Beer-Lambert law (equation 3):

$$A_{642} = \varepsilon_{642} \times l \times C \quad (\text{equation 3})$$

With:  $A_{642}$  the absorbance of the sample at  $\lambda = 642$  nm;  $L$  the optical path of the cuvette = 10 mm;  $C$  the molar concentration (mol L<sup>-1</sup>) of analyzed miRFP670-kinase;  $\varepsilon$  the molar coefficient of miRFP670 which is equal to 87 400 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> at 642 nm.<sup>64</sup>

HEK293 lysate stock solutions containing the overexpressed miRFP670 fused to LIMK1, LIMK2 or Kin1 were diluted 5 times in the lysis buffer and centrifuged for 7 minutes at 10°C at 10000g.

For LX7101 and TH-257 working solutions, 5 µL of each stock solution were diluted in 495 µL of MST buffer in order to produce intermediate solutions at 100 µM for LX7101 and at 40 µM for TH-257. Then, 4 µM solution of each inhibitor was prepared by appropriate dilution of the intermediate solutions in the MST buffer. For every experiment involving either inhibitor, the solution at 4 µM was diluted by two. Precisely, for the optimization of the MST assays (part 3.2.c), the same volume of HEK293 cell lysate and inhibitor working solution was mixed and centrifuged for 2 minutes at 2000 g at 25°C. Therefore, for all these assays, the protein concentration was comprised between 32 nM and 35 nM and the final concentration of inhibitor was 2 µM.

For affinity assays, a serial dilution (1:1) of inhibitor solution was conducted in 16 PCR strip tubes, the lowest inhibitor concentration being 60 nM. The lysis buffer containing DMSO, at 0.1% v/v for TH-257 and 0.04% v/v for LX7101, was used for the dilutions of the inhibitor stock solutions. This was important to maintain a constant percentage of DMSO in each tube, lower than 1% v/v. Equal volumes of cell lysate containing equivalent concentration of each target protein was added to each tube to check the binding with each inhibitor. The PCR strip tubes were stored on ice during experiments, the same preparation being used for the entire study of one inhibitor and one protein.

### **1.5. Molecular docking**

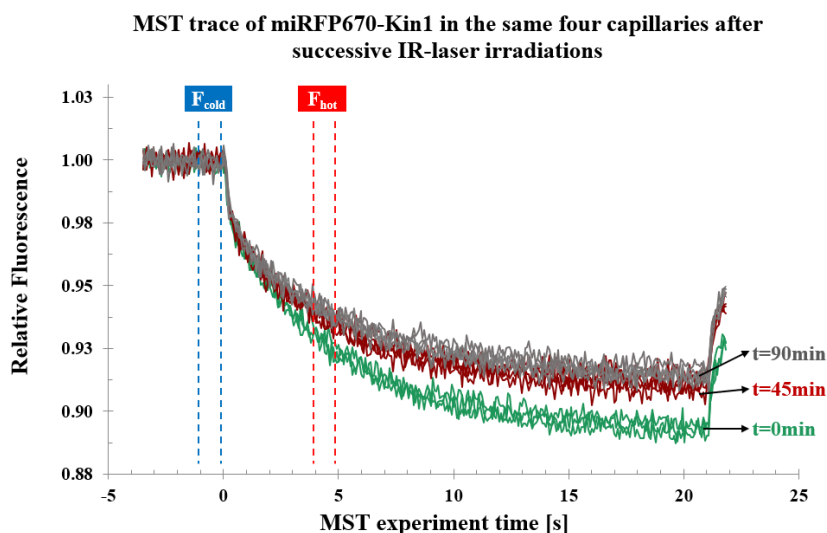
In order to evaluate the binding energy of LIM Kinases and TH-257, the crystallographic structure of TH-300 (PDB id: 9D8) bound to Kin2, which is the Kinase domain of LIMK2 (PDB id: 5NXD), was studied. Molecular docking computations of TH-257 were conducted using Autodock Vina. Water and 1,2-ethanediol molecules were removed from the crystallographic structures. 5NXD being a dimer and 7B8W being a tetramer, only the chain A was retained for the docking. The A chain of 7B8W was aligned on the A chain of 5NXD so that the box contained the active sites of Kin1 and Kin2 for docking experiments. The docking parameters were the following: center\_x = 25.369; center\_y = -12.05; center\_z = 15.926; size\_x = 20; size\_y = 21 and size\_z = 18. The number of binding modes was equal to 9.

## 2. Results and discussion

The stability of miRFP670-LIM Kinase fluorescent signal in cell lysate upon the time and successive measurements was investigated using miRFP670-Kin1. The influence of the incubation temperature was also addressed. Then, the interaction between miRFP670-Kin1 and LX7101 or TH-257 was studied at different temperatures. The optimized conditions were applied to the two full-length LIM Kinases, miRFP670-LIMK1 and miRFP670-LIMK2. The thermodynamic parameters of each interaction were evaluated.

### 2.1. Influence of the incubation time on miRFP670-Kin1 in cell lysate stability

To investigate the feasibility of the thermodynamic study of LIMK interaction with its inhibitors, the ability of LIM Kinases fused with the miRFP670 fluorescent protein (*i.e.* miRFP670-LIMKs) to maintain its fluorescent signal over time was studied. The fluorescent domain kinase 1, precisely miRFP670-Kin1, was used as a model for this optimization step (Figure 1.a). Therefore, the same four capillaries containing miRFP670-Kin1 in cell lysate, at 30°C, underwent successive acquisitions, up to twenty times at an interval of five minutes. Figure 2 presents the MST signals obtained immediately after capillary filling ( $t=0$  min), and after 45 minutes and 90 minutes of incubation (*i.e.* after 20 LED excitations).



**Figure 2:** MST traces after successive acquisitions, corresponding to an incubation period of 0, 45 and 90 minutes, at 30°C, of miRFP670-Kin1 at 34 nM in HEK293 cell lysate filled in four different capillaries. **Annotation:** first irradiation at  $t=0$  min in green;  $t=45$  min in brown and 90 min in grey. MST experiments were performed at a LED power of 40% and at medium MST power.  $F_{cold}$  indicates the “initial fluorescence” when the laser is off.  $F_{hot}$  indicates the thermophoresis response at 5 seconds.

The “initial fluorescence” ( $F_{\text{cold}}$ ) of the miRFP670-Kin1 is measured first without laser heating (*indicated by the blue dotted lines*). This value slightly decreased from 2300 counts at  $t=0$  to 2000 counts at  $t=90$  minutes (data not shown). Then, the IR-laser is turned on and the MST signal is observed by monitoring the fluorescence change ( $F_{\text{hot}}$ ) induced by the IR laser. This signal was monitored between 4 and 5 seconds (*indicated by the red dotted lines*). The results reported in Figure 2 pointed out that the signal reproducibility between the four capillaries was acceptable, regardless of the incubation time. Moreover, the MST-traces show that the amplitude of the signal of miRFP670-Kin1 decreases as the time passes; the  $F_{\text{hot}}$  is equal to 929 ‰ at  $t=0$  min but to 939 ‰ from  $t=45$  min to  $t=90$  min. This may be attributed to an evolution of the cell lysate over time, potentially accelerated by the influence of successive excitations; the more the time passes, the less the difference between the  $F_{\text{hot}}$  of experiment ‘n’ and experiment ‘n-1’ is important indicating that the signal stabilizes. Essentially, the variation of the fluorescence between the corresponding MST-traces, which is the response amplitude, noted in this manuscript as  $\delta F$ , was found to be negligible for experiments conducted every five minutes since it blends in with the background noise intensity ( $N \sim 1\%$ ). In addition, as mentioned previously, the fluorescence signal stabilizes completely after 45 minutes.

These results indicate: firstly, that the reproducibility between each four capillaries is acceptable regardless of the incubation time and the number of measurements; secondly, that miRFP670-Kin1 present in HEK293 cell lysates can be incubated for up to 90 minutes at 30°C, with only a slight decrease of its fluorescence; and thirdly that the decrease of  $F_{\text{cold}}$  and  $F_{\text{hot}}$  upon the time would encourage the use of fresh solutions or at least 45 minute-incubated solutions to conduct MST studies in cell lysate to be sure to work with a stable signal.

## **2.2. Influence of the incubation temperature on miRFP670-Kin1 in cell lysates**

The influence of the temperature changes, between 22°C and 37°C, on the MST response of miRFP670-Kin1 was investigated in this section, in the absence (Figure 1.b-1) and in the presence (Figure 1.b-2) of the reference inhibitor, TH-257.

### **2.2.a) Influence of the incubation temperature on miRFP670-Kin1 behaviour in MST**

The influence of the temperature change on miRFP670-Kin1 was successively investigated between 22°C, the lowest temperature the Monolith NT.115 Pico apparatus could provide, and 37°C, with steps of 1°C. Four capillaries containing cell lysates with 34 nM miRFP670-Kin1 were used to monitor the reproducibility of the experiments (Figure 1.b-1). The MST measurements began 2 minutes after the

appropriate temperature was reached to guarantee that the temperature is homogeneous inside each capillary.

The results indicate that the increase of the temperature between 22°C and 35°C led to a tolerable decrease in  $F_{\text{cold}}$  of about 1000 counts (data not shown) probably due to photobleaching, the passage of time and possibly to changes in miRFP670-Kin1 conformation<sup>65,66</sup>. Nevertheless, the MST response,  $F_{\text{hot}}$ , stayed consistent from 22°C to 35°C. It was also noticed that experiments conducted at temperature higher than 35°C (*i.e.* at 36°C and 37°C) were not successful due to an important evaporation of the samples. This limitation may be overcome by sealing the capillaries, for example with mineral oil, wax<sup>43</sup> or silicone,<sup>67</sup> however bubbles and solvent dilatation repeatedly unblocked the closed capillary resulting in unusable data.

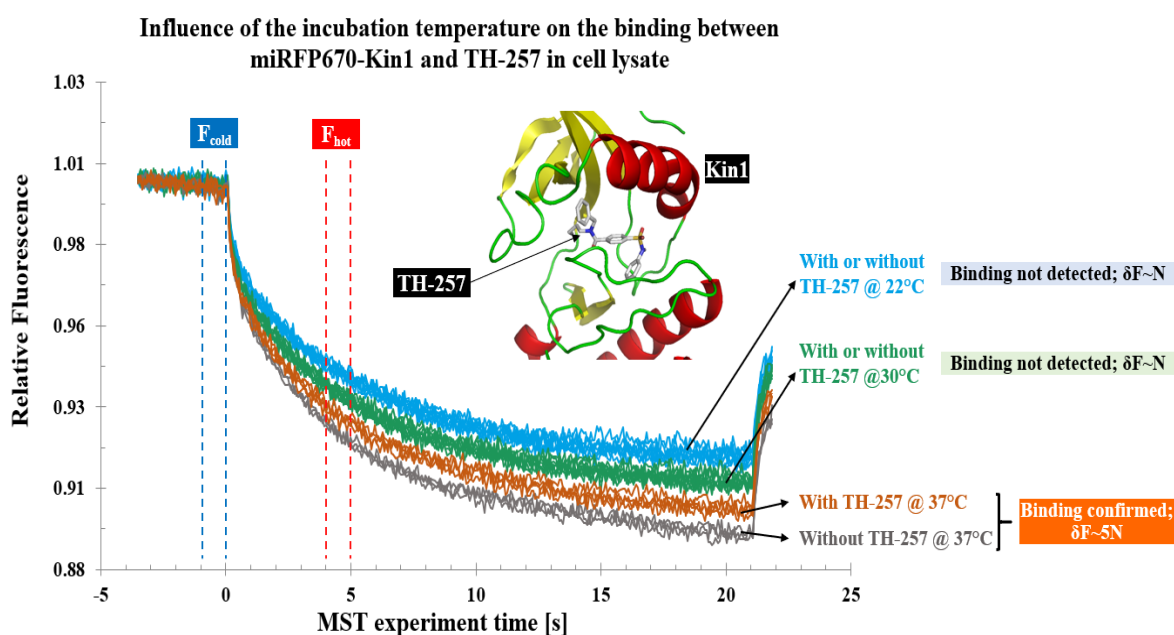
Despite the good stability of miRFP670-Kin1 throughout the measurement, given the evaporation of the samples when working at temperatures above 35°C and, as mentioned in section 3.1, the decrease of  $F_{\text{cold}}$  and  $F_{\text{hot}}$  during the incubation period, it was decided that fresh solutions would be prepared for each assay instead of measuring the same capillary several times.

### **2.2.b) Influence of the incubation temperature on miRFP670-Kin1/TH-257 interaction**

The MST signal of miRFP670-Kin1 mixed with TH-257 at a fixed concentration was recorded and compared to the one of miRFP670-Kin1 alone (Figure 1.b-2). In this experiment, the assays were conducted between 22°C and 37°C, each capillary being measured only once to prevent drifts. As it can be seen in Figure 3, when incubating the capillaries at 22°C as well as at 30°C, the MST traces obtained in the presence and in the absence of the TH-257 overlapped. Indeed, the variation of the fluorescence between the corresponding MST-traces,  $\delta F$ , was comparable to the noise ( $\delta F \sim N \sim 1 \text{ ‰}$ ) which indicates that MST could not measure the affinity between miRFP670-Kin1 and TH-257 in this temperature range. On the contrary, the MST traces recorded at 37°C in the absence of the inhibitor presented significantly lower  $F_{\text{hot}}$  values than those in the presence of TH-257 (Figure 3). The

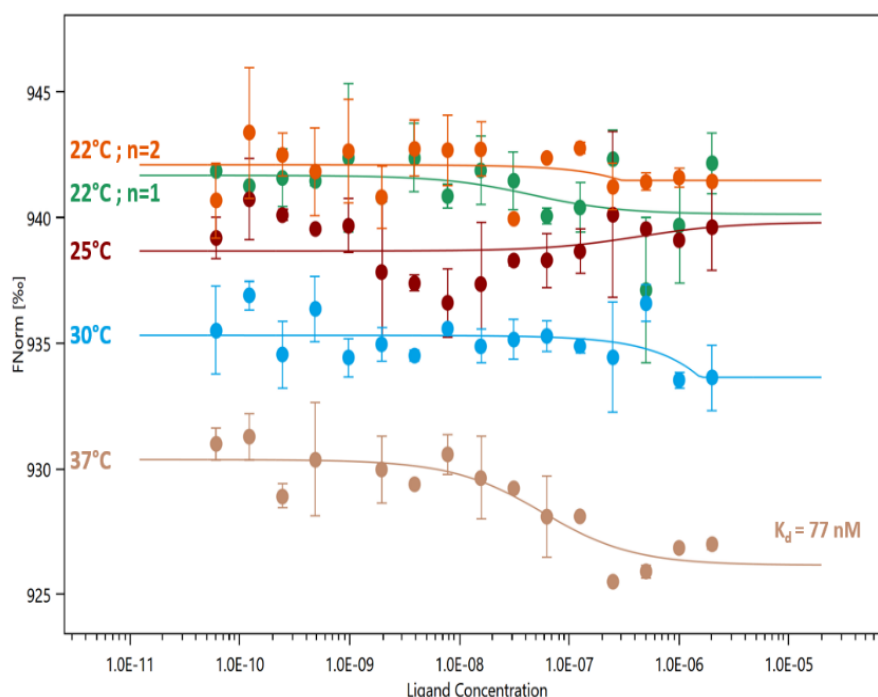
calculated  $\delta F$  was 5 ‰, corresponding to 5 times the noise, revealing without doubt a binding between miRFP670-Kin1 and TH-257 at 37°C.

This set of experiments demonstrates the significant influence of the temperature on the MST signal and/or on the interaction miRFP670-Kin1/TH-257.



**Figure 3:** miRFP670-Kin1/TH-257 binding assay in cell lysate conducted at different temperatures: 22°C (blue), 30°C (green) and 37°C (grey and orange). MST conditions: miRFP-Kin1 in cell lysates at 34 nM; TH-257 at 2  $\mu$ M; MST experiments performed at a LED power of 40% and at medium MST power. Inserted image: molecular docking of TH-257 interaction with Kin1 active site (PDB id: 7B8W).

To further investigate the influence of the incubation temperature on miRFP670-Kin1/TH-257 interaction and determine the corresponding thermodynamic parameters, MST experiments were afterwards performed by mixing miRFP670-Kin1 (at 34 nM in cell lysate) with 16 different concentrations of TH-257 (Figure 1.c). Different temperatures were tested viz. 22°C, 25°C, 30°C and 37°C. A dose-response curve could thus be plotted at each temperature to estimate the  $K_d$  value of miRFP670-Kin1/TH-257 interaction (Figure 4). Each experiment was repeated twice to confirm repeatability; capillaries filled with the same preparation were scanned twice and the mean was represented in Figure 4. At the end of a batch, MST traces were repeated at 22°C and a second dose-response curve was obtained (n=2, orange curve) to ensure that the same dose-response curve can be obtained in these conditions, even after two hours.



**Figure 4:** Influence of the incubation temperature on the dose-response curve of TH-257 (from 60 pM to 2  $\mu$ M) towards the miRFP670-Kin1 (34 nM) in HEK293 cell lysates.

Dose-response curves were obtained at 22°C (green  $n=1$  and orange  $n=2$ ), 25°C (red), 30°C (blue) and 37°C (brown). They were fitted to a one-site binding model to extract the  $K_d$  value. Each point represents the mean of two capillary readings and corresponding error-bars. MST experiments were performed at a LED power of 40% and at medium MST power.  $F_{norm}$  stands for normalized fluorescence ( $F_{norm} = F_{hot}/F_{cold}$ ).

As it can be seen in Figure 4, the curves obtained at temperatures of 30°C or less are almost straight ( $\delta F \leq 2\%$ ), as opposed to sigmoidal, with a low signal-to-noise ratio ( $S/N \leq 2$ ). In other words, the response amplitude was not significant and the  $K_d$  could not be calculated. Whereas the dose-response curve plotted at 37°C allowed to obtain a  $K_d$  value of 77 nM with a  $\delta F$  and  $S/N$  ratio of about 7% and 6, respectively (Table 1). The value obtained in this study, 77 nM, was therefore compared with the only one reported in literature using ITC at 20°C, that was 64 nM<sup>68</sup> obtained for purified Kin1, without the fluorescent protein miRFP670.

**Table 1:** Influence of the temperature on miRFP670-Kin1/TH-257, miRFP670-LIMK1/TH-257 and miRFP670-LIMK2/LX7101 in terms of response amplitude  $\delta F$  (%) and signal to noise ratio (S/N).

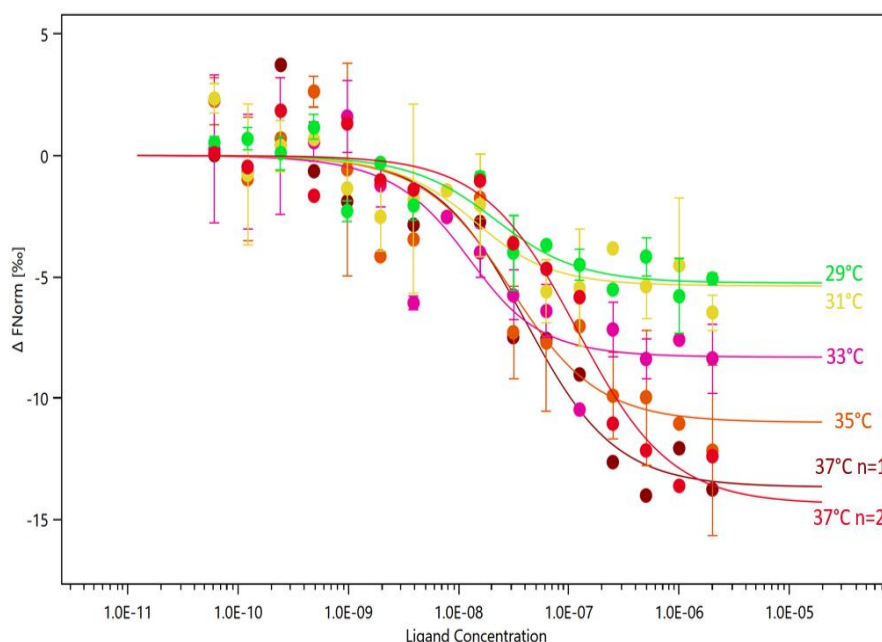
|        | Kinase domain +<br>allosteric inhibitor:<br><i>miRFP670-Kin1</i><br>+ <i>TH-257</i> |     | Full length LIMK1 +<br>allosteric inhibitor:<br><i>miRFP670-LIMK1</i><br>+ <i>TH-257</i> |     | Full length LIMK2 +<br>competitive inhibitor:<br><i>miRFP670-LIMK2</i><br>+ <i>LX7101</i> |             |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| T (°C) | $\delta F$ (%)                                                                      | S/N | $\delta F$ (%)                                                                           | S/N | $\delta F$ (%)                                                                            | S/N         |
| 29     | 3                                                                                   | 6   | 4                                                                                        | 5   | <i>n.d.</i>                                                                               | <i>n.d.</i> |
| 31     | 4                                                                                   | 4   | 5                                                                                        | 5   | ~1                                                                                        | ~1          |
| 33     | 6                                                                                   | 9   | 8                                                                                        | 5   | ~1                                                                                        | ~1          |
| 35     | 7                                                                                   | 9   | 11                                                                                       | 6   | 2                                                                                         | 3           |
| 37     | 7                                                                                   | 6   | 14                                                                                       | 13  | 4                                                                                         | 7           |

In order to demonstrate that this approach is applicable to other enzyme/inhibitor couples, an inhibitor with a different mode of binding was tested. For this, the LX7101, a LIMK type I inhibitor, was chosen. LX7101 is an ATP competitive inhibitor that interacts with LIMKs directly into their active site, whereas the TH-257 is a type III inhibitor or an allosteric inhibitor (see docking image inserted in Figure 3). The interaction towards the full length LIMKs, namely LIMK1 and LIMK2, was also studied at different incubation temperatures. Table 1 brings together all the data obtained in this section in terms of  $\delta F$  (%) and S/N values. Results will be detailed in the coming subsections.

### 2.2.c) Influence of the incubation temperature on miRFP670-LIMK1/TH-257 and miRFP670-LIMK2/LX7101 interactions

Kin1 is the kinase domain of the LIMK1 protein, which contains the active site. miRFP670-LIMK1 interactions with TH-257 were studied at different temperatures to verify if miRFP670-Kin1 and miRFP670-LIMK1 have similar responses to temperature (Figure 4). For this, the influence of temperature between 29°C and 37°C on miRFP670-LIMK1/TH-257 interaction was studied, following the same protocol described in section 3.2.b. Based on the results obtained with miRFP670-Kin1, temperatures lower than 29°C were not considered for the remaining assays. Moreover, the starting temperature (and hence the control temperature) was 37°C, as opposed to 22°C in the study of miRFP670-Kin1/TH-257 interactions, to see if another control of the temperature can be used: the affinity curve at 37°C was repeated at the end of the experiment in order to ensure that the evolution of the affinity is linked to the temperature and not to system modification over time.

The results indicated that miRFP670-LIMK1 and miRFP670-Kin1 show a similar trend concerning their interaction with TH-257 under various incubation temperatures; higher temperature leading to greater response amplitude since the  $\delta F$  is equal to 14 % at 37°C vs 5 % at 29°C (Figure 5).



**Figure 5:** Influence of the incubation temperature on the dose-response curve of TH-257 (from 60 pM to 2  $\mu$ M) towards the miRFP670- LIMK1 (32 nM) in HEK293 cell lysates.

Dose-response curves were obtained at 29°C (green); 31°C (yellow), 33°C (pink), 35 °C (orange) and 37°C (dark brown n=1 and red n=2). Each point represents the mean of two capillary readings and corresponding error-bars. Other conditions: see Figures 2 and 4.

Afterwards, the binding affinity between miRFP670-LIMK2 and LX7101 was investigated from 29°C to 37°C under the same operating conditions as the one of TH-257 towards LIMK1 or Kin1. The amplitude of the affinity curve was found to be high enough to calculate a dissociation constant only for temperatures of 34°C and above, having a response amplitude of 2 % or more (*data not shown*). An accurate  $K_d$  value could only be evaluated at a temperature of 37°C. For TH-257,  $K_d$  values were found to be 77 nM (vs. 64 nM by ITC<sup>68</sup>) towards miRFP670-Kin1 as presented in the previous section, 35 nM towards miRFP670-LIMK1 and 3 nM towards miRFP670-LIMK2. For LX7101,  $K_d$  values were found to be 48 nM towards miRFP670-Kin1, 88 nM towards miRFP670-LIMK1 and 6 nM towards miRFP670-LIMK2. These values are all consistent with those reported in the literature, and with the docking results, when available.

It can be noted, from these results and the data assembled in Table 1, that there is a general trend of  $\delta F$  and S/N increasing with the temperature rising. And to summarise, the affinity of LIMKs towards the

ligand is not detected by MST below 30°C and corresponding  $K_d$  values could be obtained at a temperature of 34°C or more.

### 2.3 Determination of thermodynamic parameters by MST

The  $K_d$  (inverse of  $K_a$ ) of the interaction between miRFP670-Kin1, miRFP670-LIMK1 or miRFP670-LIMK2 with TH-257 or LX7101 were measured from 29°C to 37°C. This allowed the plotting of Van't Hoff relation (natural logarithm of  $K_a$  against the inverse of the temperature in Kelvin) and the determination of thermodynamic parameters of each binding equilibrium from linear extrapolation of this plot (equations 1 and 2). Results are assembled in Table 2.

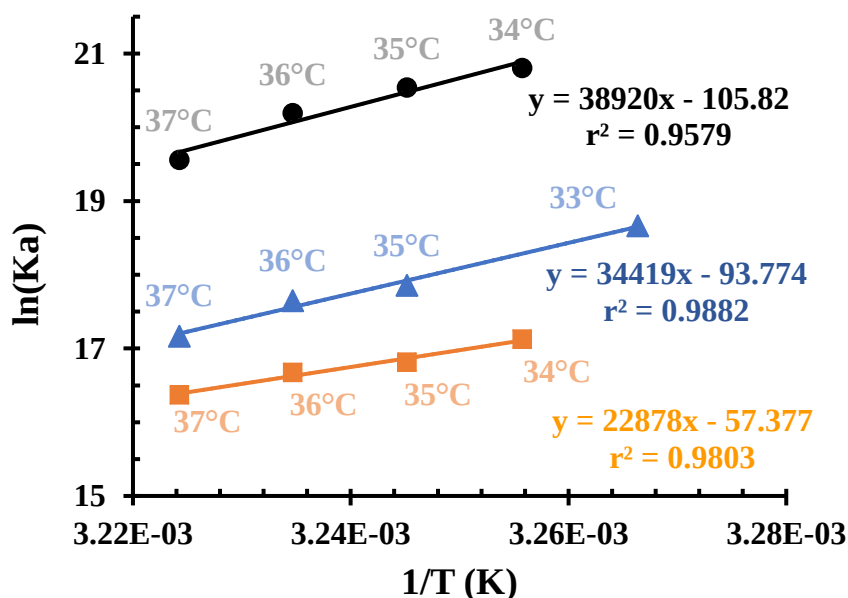
**Table 2:** MST results ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $T \Delta S_{37^\circ\text{C}}$  and  $\Delta G_{37^\circ\text{C}}$ ) for the interaction between miRFP670- Kin1/ LIMK1 /LIMK2 and TH-257 or LX7101. Comparison with the results obtained for  $\Delta G_{30^\circ\text{C}}$  after extrapolation of the Van't Hoff plots and with the *Autodock vina*. (*n.d.*: not determined).

| <i>Inhibitor</i>                                                                                      | Kinase domain<br><i>miRFP670-Kin1 /</i> |               | Full length<br><i>miRFP670-LIMK1 /</i> |               | Full length<br><i>miRFP670-LIMK2 /</i> |               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------|----------------------------------------|---------------|----------------------------------------|---------------|
|                                                                                                       | <i>TH-257</i>                           | <i>LX7101</i> | <i>TH-257</i>                          | <i>LX7101</i> | <i>TH-257</i>                          | <i>LX7101</i> |
| $\Delta H$ (kcal mol <sup>-1</sup> )                                                                  | -45                                     | -152          | -69                                    | -41           | -77                                    | -29           |
| $\Delta S$ (cal K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )                                                   | -114                                    | -458          | -187                                   | -99           | -211                                   | -57           |
| $T \Delta S_{37^\circ\text{C}}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )                                             | -35                                     | -142          | -58                                    | -31           | -65                                    | -18           |
| $\Delta G_{37^\circ\text{C}}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )                                               | -10.1                                   | -10.4         | -10.6                                  | -9.9          | -12.1                                  | -11.4         |
| $\Delta G_{30^\circ\text{C}}$ (kcal mol <sup>-1</sup> ) –<br><i>Extrapolation of Van't Hoff plots</i> | -10.9                                   | -13.6         | -11.9                                  | -10.7         | -13.6                                  | -11.8         |
| $\Delta G$ ( <i>Autodock vina</i> )                                                                   | -10.6                                   | <i>n.d.</i>   | <i>n.d.</i>                            | <i>n.d.</i>   | -11.4<br>( <i>for Kin2</i> )           | <i>n.d.</i>   |

The  $K_d$  values of miRFP670-Kin1 and TH-257 were determined between 29°C and 37°C. The linearity range of the Van't Hoff plot was then found to be between 34°C and 37°C with a regression coefficient  $r^2$  of 0.9803 (Figure 6). Using the linear equation,  $\Delta H$  was found to be equal to -45 kcal mol<sup>-1</sup>,  $\Delta S$  to -114 cal K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>, and  $\Delta G_{37^\circ\text{C}}$  to -10.1 kcal mol<sup>-1</sup>. Enthalpic and entropic contributions nearly cancel each other resulting in small negative  $\Delta G$ , supporting that miRFP670-Kin1 and TH-257 interaction is a spontaneous process at 37°C. Moreover, the negative values of  $\Delta H$  and  $\Delta S$  indicate that the binding is exothermic, more ordered and based on hydrogen bonds and/or van der Waals interactions<sup>53</sup>.

Then, the interaction of TH-257 with the full-lengths miRFP670-LIMK1 and miRFP670-LIMK2 was monitored between 29°C and 37°C. The interaction of each of the three enzymes with LX7101 was also monitored and thermodynamic parameters determined using the linear range of Van't Hoff plot

(Figure 6). The range slightly differs between each couple as it goes from 33°C to 37°C for miRFP670-LIMK1/TH-257 ( $r^2 = 0.9882$ ); 34°C to 37°C for miRFP670-LIMK2/TH-257 ( $r^2 = 0.9579$ ); 34°C to 37°C for the interactions of each of the three targets with LX7101 with  $r^2$  of 0.9644 for miRFP670-Kin1/LX7101,  $r^2$  of 0.9946 for miRFP670-LIMK1/LX7101 and  $r^2$  of 0.9993 for miRFP670-LIMK2/LX7101. Regarding the values of  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $T\Delta S_{37^\circ\text{C}}$  and  $\Delta G_{37^\circ\text{C}}$  (Table 2), the negative values of enthalpy, entropy and Gibbs free energy let to conclude, as for miRFP670-Kin1/TH-257 interaction, that a spontaneous binding at 37°C with hydrogen bonds and/or Van der Waals interactions is involved.



**Figure 6:** Linearity range of Van't Hoff plots obtained by MST of the interaction between TH-257 and miRFP670-Kin1 (■), miRFP670-LIMK1 (▲) and miRFP670-LIMK2 (●).

Moreover, in the case of TH-257, the experimental values of  $\Delta G_{37^\circ\text{C}}$  obtained with miRFP670-Kin1 and miRFP670-LIMK2 could be compared to the values we obtained from computational data of molecular docking handling Kin1/Kin2 interactions with TH-257. The docking of TH-257 in 5NXD revealed that TH-257 was superimposed on TH-300. The latter only differs from TH-257 by a Cl and a CH<sub>3</sub> so it is expected that TH-257 binds to Kin2 in the same way as TH-300. TH-257 was then docked in Kin1 (PDB id: 7B8W) and it was found that TH-257 binds to Kin1 in the same way as Kin2. This validated our docking protocol and enabled the Gibbs free energy calculation with Autodock vina. As observed in Table 2, the experimental values and those predicted by molecular docking are very close which confirms the reliability of the MST data and the obtained results.

Enthalpy and entropy values are largely different between each inhibitor tested, particularly in the case of interactions with LX7101, for which an increase of the absolute values of enthalpy and entropy by an approximate factor of 4 was observed from miRFP670-LIMK1 to miRFP670-Kin1. This confirms

that the interaction process is different between both enzymes and each of the evaluated inhibitor. Indeed, as mentioned before, TH-257 is an allosteric inhibitor whereas LX7101 is a competitive one. All the obtained results indicate that the interaction between TH-257 and LX7101 with Kin1, LIMK1 or LIMK2 is driven by enthalpy. Indeed, regardless of the tested target/inhibitor pairs, the entropy opposes the interaction since it has negative values, whereas enthalpy, also negative, favors it.

In an attempt to reveal whether the temperature affects affinity and/or MST signal, we compared all the  $\Delta G$  at 37°C obtained experimentally, under exactly the same MST conditions, with the ones estimated at 30°C by extrapolating the Van't Hoff lines (30°C was not in the linearity domain validated for any of the tested couples). The results are compiled in Table 2. It is important to remember that the amplitude of the MST binding curves recorded at 30°C was not high enough to accurately calculate  $K_d$ . The results for LX7101 with miRFP670-Kin1 as well as that for TH-257 with miRFP670-LIMK1 or miRFP670-LIMK2 in terms of  $\Delta G$  value estimated at 30°C seems to be significantly lower from the one experimentally measured at 37°C, pointing out that the temperature would significantly influence these interactions. On the other hand,  $\Delta G$  at 37°C and at 30°C are almost identical for the other tested couples indicating that the temperature has no significant influence on the affinity but only influenced the MST signal.

All in all, miRFP670-LIMK1 and miRFP670-Kin1 displayed similar values of  $\Delta G_{37^\circ\text{C}}$  for both inhibitors,  $-10.3 \pm 0.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ ; whereas,  $\Delta G_{37^\circ\text{C}}$  of the interaction between miRFP670-LIMK2 and both inhibitors are significantly lower, by a gap of  $1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ , than  $\Delta G_{37^\circ\text{C}}$  of the miRFP670-LIMK1, respectively,  $-12.1$  vs  $-10.6 \text{ kcal mol}^{-1}$  for TH-257 and  $-11.4$  vs  $-9.9 \text{ kcal mol}^{-1}$  for LX7101. These trends would indicate that both inhibitors have a significantly better affinity for LIMK2 than for LIMK1.

### 3. Conclusion

Here, we have demonstrated the use of red fusion protein miRFP670 as a fluorophore for MST studies is a reliable choice: HEK293 cell lysate overexpressing miRFP670-Kin1 at 34 nM can be measured reliably for 90 min resulting in 20 measurements with an 11 % variation of the  $F_{\text{norm}}$  in MST responses or 300 counts decrease of the initial fluorescence. It can also tolerate at least fourteen measurements, from 22°C to 35°C, without influence on the MST signal. Furthermore, it was found that the temperature has an influence on the MST signal and/or the  $K_d$  measurement of miRFP670-LIMK and its inhibitors: below a temperature around 30°C for each enzyme/inhibitor pair tested, the response amplitude and signal to noise ratio are too low to detect the MST signal and the binding. MST was

used to successfully assess the  $K_d$  of miRFP670-Kin1, miRFP670-LIMK1 and miRFP670-LIMK2 and two of their reference inhibitors between 34°C and 37°C, resulting in the determination of the thermodynamic parameters that characterize these interactions. The results indicate that entropy opposes the interaction regardless of the tested target/inhibitor pairs, whereas enthalpy favors it. Therefore, to enhance the interaction and promote the development of LIM Kinase inhibitors capable of passing clinical stages, it would be beneficial to improve the entropic term. For this purpose, compounds with more hydrophobic surfaces would likely be favored. This study shows that MST, associated with the Van't Hoff plot, is an appropriate tool to determine the thermodynamic parameters in a complex sample, directly in cell lysates without any purification step, of the interactions between the LIM Kinase family and some of its inhibitors, being allosteric or competitive inhibitor. Depending on the temperature sensitivity of the protein that is studied, this method could be applied to other targets.

Apart from determining the enthalpic and entropic contributions of an interaction leading to the development of optimised ligands, the thermodynamic parameters can be altered by pathogenic mutations<sup>69</sup>. Determining the Gibbs free energy of a protein-ligand interaction then have various purposes such as supporting that a compound is efficient for the inhibition of an enzyme due to favourable thermodynamic interaction or finding out if an enzyme has undergone any mutation by monitoring its effect on the interaction with one of its ligands.

## References

1. Di Trani JM, De Cesco S, O'Leary R, et al. Rapid measurement of inhibitor binding kinetics by isothermal titration calorimetry. *Nat Commun.* 2018;9(1):893. doi:10.1038/s41467-018-03263-3
2. Su H, Xu Y. Application of ITC-Based Characterization of Thermodynamic and Kinetic Association of Ligands With Proteins in Drug Design. *Front Pharmacol.* 2018;9:1133. doi:10.3389/fphar.2018.01133
3. Perozzo R, Folkers G, Scapozza L. Thermodynamics of Protein–Ligand Interactions: History, Presence, and Future Aspects. *J Recept Signal Transduct.* 2004;24(1-2):1-52. doi:10.1081/RRS-120037896
4. Bruylants G, Wouters J, Michaux C. Differential Scanning Calorimetry in Life Science: Thermodynamics, Stability, Molecular Recognition and Application in Drug Design. *Curr Med Chem.* 2005;12(17):2011-2020. doi:10.2174/0929867054546564
5. Orts J, Gossert AD. Structure determination of protein-ligand complexes by NMR in solution. *Methods.* 2018;138-139:3-25. doi:10.1016/j.ymeth.2018.01.019
6. Cala O, Guillièrre F, Krimm I. NMR-based analysis of protein–ligand interactions. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(4):943-956. doi:10.1007/s00216-013-6931-0
7. Meyer B, Peters T. NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Angew Chem Int Ed.* 2003;42(8):864-890. doi:10.1002/anie.200390233
8. Mayer M, Meyer B. Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew Chem Int Ed.* 1999;38(12):1784-1788. doi:10.1002/(SICI)1521-3773(19990614)38:12<1784::AID-ANIE1784>3.0.CO;2-Q
9. Dalvit C, Fogliatto G, Stewart A, Veronesi M, Stockman B. WaterLOGSY as a method for primary NMR screening: Practical aspects and range of applicability. *J Biomol NMR.* 2001;21(4):349-359. doi:10.1023/A:1013302231549
10. Mayer M, Meyer B. Mapping the Active Site of Angiotensin-Converting Enzyme by Transferred NOE Spectroscopy. *J Med Chem.* 2000;43(11):2093-2099. doi:10.1021/jm990194x
11. Liu M, Nicholson JK, Parkinson JA, Lindon JC. Measurement of Biomolecular Diffusion Coefficients in Blood Plasma Using Two-Dimensional <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H Diffusion-Edited Total-Correlation NMR Spectroscopy. *Anal Chem.* 1997;69(8):1504-1509. doi:10.1021/ac9612133
12. Nietlispach D, Clowes RT, Broadhurst RW, et al. An Approach to the Structure Determination of Larger Proteins Using Triple Resonance NMR Experiments in Conjunction with Random Fractional Deuteration. *J Am Chem Soc.* 1996;118(2):407-415. doi:10.1021/ja952207b
13. Bourafai-Azies A, Sebban M, Benabderrahmane M, et al. Binding mode of Pyridoclast to myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy, docking and molecular dynamics approaches. *J Biomol Struct Dyn.* 2020;38(14):4162-4178. doi:10.1080/07391102.2019.1680434
14. Wang Q, Song Y, Kim M, Hahn SK, Jiang G. Effect of chitoooligosaccharide on the inhibition of SARS-CoV-2 main protease. *Biomater Res.* 2023;27(1):13. doi:10.1186/s40824-023-00351-4
15. Milligan G. Applications of bioluminescence- and fluorescence resonance energy transfer to drug discovery at G protein-coupled receptors. *Eur J Pharm Sci.* 2004;21(4):397-405. doi:10.1016/j.ejps.2003.11.010

16. Parker GJ, Law TL, Lenocho FJ, Bolger RE. Development of High Throughput Screening Assays Using Fluorescence Polarization: Nuclear Receptor-Ligand-Binding and Kinase /Phosphatase Assays. *SLAS Discov.* 2000;5(2):77-88. doi:10.1177/108705710000500204
17. Anmangandla A, Jana S, Peng K, et al. A Fluorescence Polarization Assay for Macrod domains Facilitates the Identification of Potent Inhibitors of the SARS-CoV-2 Macrod domain. *ACS Chem Biol.* 2023;18(5):1200-1207. doi:10.1021/acschembio.3c00092
18. Samrat SK, Bashir Q, Zhang R, et al. A universal fluorescence polarization high throughput screening assay to target the SAM-binding sites of SARS-CoV-2 and other viral methyltransferases. *Emerg Microbes Infect.* 2023;12(1):2204164. doi:10.1080/22221751.2023.2204164
19. Krichevsky O, Bonnet G. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. *Rep Prog Phys.* 2002;65(2):251. doi:10.1088/0034-4885/65/2/203
20. Yoneyama-Hirozane M, Matsumoto S ichi, Toyoda Y, et al. Identification of PARP14 inhibitors using novel methods for detecting auto-ribosylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;486(3):626-631. doi:10.1016/j.bbrc.2017.03.052
21. Caro LG, Van Tubergen RP. HIGH-RESOLUTION AUTORADIOGRAPHY. *J Cell Biol.* 1962;15(2):173-188. doi:10.1083/jcb.15.2.173
22. Mezzanotte L, van 't Root M, Karatas H, Goun EA, Löwik CWGM. In Vivo Molecular Bioluminescence Imaging: New Tools and Applications. *Trends Biotechnol.* 2017;35(7):640-652. doi:10.1016/j.tibtech.2017.03.012
23. Mohammadzadeh-Asl S, Aghanejad A, Yekta R, De La Guardia M, Ezzati Nazhad Dolatabadi J, Keshtkar A. Kinetic and thermodynamic insights into interaction of erlotinib with epidermal growth factor receptor: Surface plasmon resonance and molecular docking approaches. *Int J Biol Macromol.* 2020;163:954-958. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.048
24. Zhang Y, Wang X, Wang P, Song J, Jin Y, Rojas OJ. Interactions between type A carbohydrate binding modules and cellulose studied with a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. *Cellulose.* 2020;27(7):3661-3675. doi:10.1007/s10570-020-03070-4
25. Wang L, Zhang W, Shao Y, Zhang D, Guo G, Wang X. Analytical methods for obtaining binding parameters of drug-protein interactions: A review. *Anal Chim Acta.* 2022;1219:340012. doi:10.1016/j.aca.2022.340012
26. Duhr S, Braun D. Why molecules move along a temperature gradient. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103(52):19678-19682. doi:10.1073/pnas.0603873103
27. Rascol E, Dufourquet A, Baccouch R, Soule P, Alves ID. An original approach to measure ligand/receptor binding affinity in non-purified samples. *Sci Rep.* 2022;12(1):5400. doi:10.1038/s41598-022-09217-6
28. Jeridi S, Rak A, Gupta A, Soule P. Fast Mek1 Hit Identification with TRIC Technology Correlates Well with Other Biophysical Methods. *SLAS Discov.* 2021;26(8):1014-1019. doi:10.1177/24725552211026267
29. Lee N, Wiegand S. Thermophoretic Micron-Scale Devices: Practical Approach and Review. *Entropy.* 2020;22(9):950. doi:10.3390/e22090950
30. El Deeb S, Al-Harrasi A, Khan A, et al. Microscale thermophoresis as a powerful growing analytical technique for the investigation of biomolecular interaction and the determination of binding parameters. *Methods Appl Fluoresc.* 2022;10(4):042001. doi:10.1088/2050-6120/ac82a6

31. Jerabek-Willemsen M, André T, Wanner R, et al. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *J Mol Struct.* 2014;1077:101-113. doi:10.1016/j.molstruc.2014.03.009
32. Syntia F, Nehmé R, Claude B, Morin P. Human neutrophil elastase inhibition studied by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection and microscale thermophoresis. *J Chromatogr A.* 2016;1431:215-223. doi:10.1016/j.chroma.2015.12.079
33. Al Hamoui Dit Banni G, Nasreddine R, Fayad S, Colas C, Marchal A, Nehmé R. Investigation of lipase-ligand interactions in porcine pancreatic extracts by microscale thermophoresis. *Anal Bioanal Chem.* Published online April 2, 2021. doi:10.1007/s00216-021-03314-7
34. Nasreddine R, Nehmé R. Microscale thermophoresis for studying protein-small molecule affinity: Application to hyaluronidase. *Microchem J.* 2021;170:106763. doi:10.1016/j.microc.2021.106763
35. Thuru X, Magnez R, Vergoten G, Bailly C. A Potential Off-Target Effect of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Inhibitor KYA1797K: PD-L1 Binding and Checkpoint Inhibition. *Biomed Hub.* Published online January 19, 2023;1-9. doi:10.1159/000528499
36. Bartoschik T, Galinec S, Kleusch C, et al. Near-native, site-specific and purification-free protein labeling for quantitative protein interaction analysis by MicroScale Thermophoresis. *Sci Rep.* 2018;8(1):4977. doi:10.1038/s41598-018-23154-3
37. Wienken CJ, Baaske P, Rothbauer U, Braun D, Duhr S. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat Commun.* 2010;1(1):100. doi:10.1038/ncomms1093
38. Magnez R, Thiroux B, Taront S, Segaula Z, Quesnel B, Thuru X. PD-1/PD-L1 binding studies using microscale thermophoresis. *Sci Rep.* 2017;7(1):17623. doi:10.1038/s41598-017-17963-1
39. Khavrutskii L, Yeh J, Timofeeva O, et al. Protein Purification-free Method of Binding Affinity Determination by Microscale Thermophoresis. *J Vis Exp.* 2013;(78):50541. doi:10.3791/50541
40. Seidel SAI, Dijkman PM, Lea WA, et al. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods.* 2013;59(3):301-315. doi:10.1016/j.ymeth.2012.12.005
41. Shao W, Sharma R, Clausen MH, Scheller HV. Microscale thermophoresis as a powerful tool for screening glycosyltransferases involved in cell wall biosynthesis. *Plant Methods.* 2020;16(1):99. doi:10.1186/s13007-020-00641-1
42. Weissleder R. A clearer vision for in vivo imaging. *Nat Biotechnol.* 2001;19(4):316-317. doi:10.1038/86684
43. Stein JAC, Ianeselli A, Braun D. Kinetic Microscale Thermophoresis for Simultaneous Measurement of Binding Affinity and Kinetics. *Angew Chem Int Ed.* 2021;60(25):13988-13995. doi:10.1002/anie.202101261
44. Shcherbakova DM, Verkhusha VV. Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging. *Nat Methods.* 2013;10(8):751-754. doi:10.1038/nmeth.2521
45. Prunier C, Prudent R, Kapur R, Sadoul K, Lafanechère L. LIM kinases: cofilin and beyond. *Oncotarget.* 2017;8(25):41749-41763. doi:10.18632/oncotarget.16978
46. Bernard O. Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int J Biochem.* Published online 2007:6.
47. Villalonga E, Mosrin C, Normand T, et al. LIM Kinases, LIMK1 and LIMK2, Are Crucial Node Actors of the Cell Fate: Molecular to Pathological Features. *Cells.* 2023;12(5):805. doi:10.3390/cells12050805

48. Prunier C, Josserand V, Vollaire J, et al. LIM Kinase Inhibitor Pyr1 Reduces the Growth and Metastatic Load of Breast Cancers. *Cancer Res.* 2016;76(12):3541-3552. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1864
49. Petrilli A, Copik A, Posadas M, et al. LIM domain kinases as potential therapeutic targets for neurofibromatosis type 2. *Oncogene.* 2014;33(27):3571-3582. doi:10.1038/onc.2013.320
50. Manetti F. Recent Findings Confirm LIM Domain Kinases as Emerging Target Candidates for Cancer Therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2012;12(5):543-560. doi:10.2174/156800912800673266
51. Harrison BA, Almstead ZY, Burgoon H, et al. Discovery and Development of LX7101, a Dual LIM-Kinase and ROCK Inhibitor for the Treatment of Glaucoma. *ACS Med Chem Lett.* 2015;6(1):84-88. doi:10.1021/ml500367g
52. Berabez R, Routier S, Bénédicti H, Plé K, Vallée B. LIM Kinases, Promising but Reluctant Therapeutic Targets: Chemistry and Preclinical Validation In Vivo. *Cells.* 2022;11(13):2090. doi:10.3390/cells11132090
53. Claveria-Gimeno R, Vega S, Abian O, Velazquez-Campoy A. A look at ligand binding thermodynamics in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2017;12(4):363-377. doi:10.1080/17460441.2017.1297418
54. Brookes JC, Gray ER, Loynachan CN, et al. Thermodynamic analysis of an entropically driven, high-affinity nanobody-HIV p24 interaction. *Biophys J.* 2023;122(2):279-289. doi:10.1016/j.bpj.2022.12.019
55. Geschwindner S, Ulander J, Johansson P. Ligand Binding Thermodynamics in Drug Discovery: Still a Hot Tip? *J Med Chem.* 2015;58(16):6321-6335. doi:10.1021/jm501511f
56. Fox JM, Zhao M, Fink MJ, Kang K, Whitesides GM. The Molecular Origin of Enthalpy/Entropy Compensation in Biomolecular Recognition. Published online 2018.
57. Thermodynamics of the Association of Aminoglycoside Antibiotics with Human Angiogenin | Bentham Science. Accessed August 24, 2023. <https://www.eurekaselect.com/article/127135>
58. Bhardwaj BK, Venkatesh T, Suresh PS. Study on the interaction of the bromodomain inhibitor JQ1 with human serum albumin by spectroscopic and molecular docking studies. *J Mol Struct.* 2023;1273:134374. doi:10.1016/j.molstruc.2022.134374
59. Holdgate GA, Ward WHJ. Measurements of binding thermodynamics in drug discovery. *Drug Discov Today.* 2005;10(22):1543-1550. doi:10.1016/S1359-6446(05)03610-X
60. Collins R, Lee H, Jones DH, et al. Comparative Analysis of Small-Molecule LIMK1/2 Inhibitors: Chemical Synthesis, Biochemistry, and Cellular Activity. *J Med Chem.* Published online October 7, 2022;acs.jmedchem.2c00751. doi:10.1021/acs.jmedchem.2c00751
61. Boland S, Bourin A, Alen J, et al. Design, synthesis and biological characterization of selective LIMK inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015;25(18):4005-4010. doi:10.1016/j.bmcl.2015.07.009
62. Goodwin NC, Cianchetta G, Burgoon HA, et al. Discovery of a Type III Inhibitor of LIM Kinase 2 That Binds in a DFG-Out Conformation. *ACS Med Chem Lett.* 2015;6(1):53-57. doi:10.1021/ml500242y
63. Varani K, Gessi S, Merighi S, Borea PA. van't Hoff Based Thermodynamics. In: Keserü GM, Swinney DC, eds. *Methods and Principles in Medicinal Chemistry.* 1st ed. Wiley; 2015:15-35. doi:10.1002/9783527673025.ch2
64. Oliinyk OS, Shemetov AA, Pletnev S, Shcherbakova DM, Verkhusha VV. Smallest near-infrared fluorescent protein evolved from cyanobacteriochrome as versatile tag for spectral multiplexing. *Nat Commun.* 2019;10(1):279. doi:10.1038/s41467-018-08050-8

65. Deepa HR, Thipperudrappa J, Suresh Kumar HM. Effect of temperature on fluorescence quenching and emission characteristics of laser dyes. *J Phys Conf Ser.* 2020;1473(1):012046. doi:10.1088/1742-6596/1473/1/012046
66. Lyu T, Sohn SH, Jimenez R, Joo T. Temperature-Dependent Fluorescence of mPlum Fluorescent Protein from 295 to 20 K. *J Phys Chem B.* 2022;126(12):2337-2344. doi:10.1021/acs.jpcc.1c10516
67. Popp C, Schramm P, Wagner R, et al. *Multi-Parameter Formulation Development for an HIV-Vaccine Protein with Direct Validation of Epitope Binding Integrity and Stoichiometry.* Biophysics; 2020. doi:10.1101/2020.11.30.403873
68. Hanke T, Mathea S, Woortman J, et al. Development and Characterization of Type I, Type II, and Type III LIM-Kinase Chemical Probes. *J Med Chem.* Published online September 22, 2022:acs.jmedchem.2c01106. doi:10.1021/acs.jmedchem.2c01106
69. Pandey P, Ghimire S, Wu B, Alexov E. On the linkage of thermodynamics and pathogenicity. *Curr Opin Struct Biol.* 2023;80:102572. doi:10.1016/j.sbi.2023.102572

## Conclusion

Dans ce dernier chapitre de ce travail de thèse, il a été confirmé, sans surprise, que la température a une influence sur le signal MST. Il a également été démontré la dépendance à la température de la mesure du  $K_d$  de l'association des miRFP670-LIMK à ses inhibiteurs : en dessous d'une température d'environ 30°C pour chaque couple enzyme/inhibiteur testé, l'amplitude de la réponse et le rapport signal sur bruit en MST sont trop faibles pour permettre l'élaboration d'une courbe d'affinité. La MST a été utilisée pour évaluer avec succès le  $K_d$  de miRFP670-Kin1, miRFP670-LIMK1 et miRFP670-LIMK2 et de deux de leurs inhibiteurs de référence entre 34°C et 37°C. Ceci a permis par la suite de déterminer les paramètres thermodynamiques qui caractérisent ces interactions. Nos résultats confirment que l'entropie s'oppose à l'interaction quel que soit le couple cible/inhibiteur testé, alors que l'enthalpie la favorise. Par conséquent, pour favoriser le développement d'inhibiteurs plus fiables de LIMKs, il serait bénéfique d'améliorer le terme entropique en proposant des composés plus hydrophobes.

Ce chapitre montre que la MST, associée à la loi de Van't Hoff, est un outil approprié pour déterminer les paramètres thermodynamiques, dans un échantillon complexe, des interactions entre la famille des LIM Kinases et certains inhibiteurs, qu'il s'agisse d'inhibiteurs allostériques ou compétitifs.



# **Conclusions et perspectives**

Les activités des protéines kinases sont souvent dérégulées dans de nombreuses maladies. Si leurs inhibiteurs montrent de bonnes réponses *in vitro* en première intention, ils échouent souvent aux essais cliniques, voire ils peuvent parfois déclencher des mutations oncogéniques et des mécanismes de résistance au cours du traitement à moyen ou long terme. Ce projet de thèse visait à développer des méthodes basées sur la MST et la CE pour l'évaluation quantitative des interactions cible:ligand, dans notre cas kinase:inhibiteur, dans des lysats cellulaires sans utilisation d'étapes de purification, de radioactivité ou de solvants organiques. Nous avons également réalisé le positionnement du ligand par modélisation 3D du site de liaison dans le but de rationaliser le design de nouveaux inhibiteurs, potentiels agents thérapeutiques plus efficaces et fiables. Comme preuve de concept, l'inhibition des LIM kinases (LIMKs), LIMK1 et LIMK2, a été étudiée. Les LIMKs sont devenues des cibles thérapeutiques attractives pour le traitement de la neurofibromatose de type 1, de certains cancers et maladies neurologiques. Des centaines de molécules sont reportées en tant qu'inhibitrices de LIMKs avec des constantes de dissociation ( $K_d$ ) de l'ordre du nM *in vitro*. Néanmoins, une seule molécule, LX7101, a atteint la phase clinique, mais aucun résultat n'est publié.

Comparées aux techniques conventionnelles, cytométrie en flux, SPR ou ITC, la MST est choisie parce qu'elle fournit des données quantitatives,  $K_d$  allant jusqu'au pM, en quelques minutes, avec une faible consommation d'échantillons, sans purification, ni immobilisation ou radioactivité. En revanche, la MST requiert que l'un des deux partenaires à étudier soit fluorescent. Pour travailler dans des lysats cellulaires, la fluorescence dans le rouge semble être un choix approprié en termes de sélectivité et de sensibilité pour la détection. Pour cela, les protéines entières, LIMK1 et LIMK2, ainsi que leurs domaines catalytiques, Kin1 et Kin2, ont été produites directement fluorescentes dans les cellules HEK293 en les fusionnant avec une protéine, la mRFP670 ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 650/670$  nm). Ce fluorophore mRFP670 n'est pas toxique pour les cellules. Le choix de marquage de la cible protéique (et non les ligands) repose sur la possibilité de cribler plus facilement les bibliothèques d'inhibiteurs potentiels ayant des structures diverses et variées. Les gènes codant pour LIMK1 et LIMK2 ainsi que leurs domaines kinases Kin1 et Kin2 ont été fusionnés avec le plasmide contenant mRFP670. Les cellules HEK293 ont été transfectées avec les différents plasmides, permettant la surexpression des versions étiquetées des protéines d'intérêt. La production des protéines étiquetées avec mRFP670 a été confirmée par Western blot, leurs activités catalytiques ont été évaluées par électrophorèse capillaire et leur signal de fluorescence a été contrôlé par MST sur les mêmes lysats cellulaires.

Les conditions de stockage des cibles dans le temps ainsi que les tampons de lyse et le tampon utilisé en MST ont été soigneusement optimisés afin d'obtenir des signaux répétables en MST (signal de

fluorescence et thermographes). Nos travaux montrent également que le DMSO présent dans le milieu réactionnel (tous les inhibiteurs testés ont été préparés dans le DMSO) est fortement préjudiciables à la qualité du signal en MST et donc à la pertinence des résultats obtenus.

La préservation de l'activité catalytique des Kinases fusionnées au miRFP670 a été évaluée par CE et les résultats obtenus confirment que les LIMKs fusionnées à la protéine fluorescente miRFP670 à leur extrémité C-terminale conservent bien leur fonction enzymatique, à savoir le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP à la cofiline, générant ainsi de l'ADP. De plus, l'effet inhibiteur du TH-257 envers les Kinases a été également démontré par CE.

Ce travail de thèse montre pour la première fois qu'un tel tag, la miRFP670, peut être utilisé comme une protéine de fusion fluorescente pour des essais en MST, épargnant par la suite des étapes de purification laborieuses. Ceci ouvre de nouvelles perspectives pour cette technique puissante. Grâce au marquage de la cible protagoniste par la protéine de fusion miRFP670, l'approche par MST permet également d'identifier les inhibiteurs qui ciblent spécifiquement les kinases marquées dans un milieu complexe tel que le lysat cellulaire.

Afin de valider la méthodologie MST optimisée, nous avons évalué l'affinité de liaison des inhibiteurs commercialement disponibles, LX7101, BMS-5, T56-LIMKi et TH-257, envers les miRFP670-kinases dans des lysats cellulaires de HEK-293. De nouvelles constantes de dissociation,  $K_d$ , ont été déterminées, celles-ci étant en parfait accord avec celles reportées dans la littérature lorsqu'elles sont disponibles. Les trois inhibiteurs, LX7101, BMS-5 ou LIMKi3 et TH-257 ont montré une activité inhibitrice de l'ordre du sub-micromolaire sur la cible, ce qui les rend particulièrement appropriés comme sondes chimiques pour les LIMKs. De plus, nos résultats concernant le T56-LIMKi soutiennent fortement les plus récentes études suggérant que le T56-LIMKi n'est 'finalement' pas un inhibiteur de LIMKs.

Le recouvrement du capillaire par le PDADMAC s'est avéré indispensable pour assurer des séparations répétables et efficaces et, de ce fait, des résultats fiables en complément de ceux en MST.

De plus, nous avons réussi au cours de cette thèse à utiliser la MST pour la première fois pour évaluer les paramètres thermodynamiques ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$  et  $\Delta G$ ) des interactions entre les LIM Kinases et leurs inhibiteurs, toujours dans le lysat cellulaire sans purification. Pour cela, les valeurs de  $K_d$  ont été mesurées à différentes températures d'incubation, entre 29°C et 37°C. Les résultats confirment sans équivoque que l'entropie  $\Delta S$  s'oppose à l'interaction quel que soit le couple cible/inhibiteur testé, alors que l'enthalpie  $\Delta H$  la favorise. Par conséquent, pour promouvoir le développement d'inhibiteurs de

LIMKs capables de passer les étapes des essais cliniques, il serait bénéfique d'améliorer le terme entropique. À cette fin, les composés plus hydrophobes seraient probablement favorisés. Ces déterminations expérimentales ont par ailleurs été complétées par une étude théorique de détermination de  $\Delta G$  par docking. Il serait alors intéressant de valider ces résultats en utilisant des modulateurs plus hydrophobes que ceux utilisés dans cette thèse ainsi que de nouvelles classes de molécules pour obtenir de nouveaux éclairages sur le mécanisme des interactions moléculaires avec les LIMKs. Cette méthodologie pourrait être aisément appliquée à d'autres cibles, en tenant compte de leur sensibilité thermique.

Dans l'ensemble, l'avantage de la MST dans la mesure à la fois des paramètres thermodynamiques et cinétiques de la liaison cible/ligand, dans des conditions proches du *in vivo*, en fait un instrument de choix dans le domaine de la chimie médicinale et de la santé.

Le protocole de marquage des LIMKs étant facilement applicable à de nombreuses autres enzymes, ce travail ouvre un large éventail de nouvelles possibilités pour l'évaluation des interactions intermoléculaires par MST dans des conditions proches du *in vivo*. Ceci permet des études plus réalistes et une meilleure compréhension des interactions entre les protéines et leurs partenaires afin de développer de nouveaux actifs plus fiables. Outre la détermination des contributions enthalpique et entropique d'une interaction conduisant au développement de ligands optimisés, les paramètres thermodynamiques peuvent indiquer des mutations pathogènes d'une cible.

Les nombreux résultats de ce projet de thèse nous ont permis d'initier la mise en place d'une méthodologie originale et particulièrement innovante en MST pour quantifier l'affinité de candidats inhibiteurs envers les LIMKs directement à l'intérieur d'une cellule vivante. Ceci nous a donc permis de se rapprocher des essais sur cellule unique et d'apporter un modèle pour comprendre les processus *in vivo* ; il fournit des informations précieuses sur l'activité du composé *in cellulo*, la perméabilité de la membrane des cellules ainsi que l'influence du milieu cellulaire sur les interactions entre les deux partenaires. Cette approche constituera sans doute une percée scientifique car elle permet d'accéder d'une façon simple aux interactions cible:ligand directement dans la cellule vivante. Les informations fournies pourraient escompter l'échec rencontré les 15 dernières années et ouvrir la porte à de nouvelles voies de design/synthèse d'inhibiteurs de LIMKs en concevant de nouveaux actifs. En outre, cette stratégie ouvre le champ à de nombreuses études d'interactions cible-ligand dans des matrices complexes.

Pour conclure, le couplage des essais d'activité catalytique et d'affinité de liaison grâce à l'utilisation complémentaire de la CE et la MST serait une approche intéressante pour cribler de nouveaux candidats médicaments, comprendre leurs mécanismes de liaison et leur effet modulateur sur une cible directement dans un milieu cellulaire. L'approche développée se base sur des méthodes économes en réactifs, fiables, simples, robustes, rapides et s'appliquent parfaitement à des milieux biologiques complexes sans radioactivité ni immobilisation ou purification des cibles.





## Combiner la MST à la CE : une stratégie d'intérêt pour l'évaluation des interactions enzyme/ligand de petite taille dans des lysats cellulaires

Ce projet de thèse visait à développer une stratégie analytique utilisant la thermophorèse à micro-échelle (MST) et l'électrophorèse capillaire (CE) pour évaluer quantitativement les interactions enzyme/petite molécule directement dans des lysats cellulaires, sans purification ni utilisation de radioactivité. Comme preuve de concept, nous avons étudié l'inhibition des LIM kinases (LIMK1 et LIMK2), des cibles thérapeutiques prometteuses pour la neurofibromatose de type 1, certains cancers et maladies neurologiques. Des centaines de molécules inhibitrices des LIMKs avec des constantes de dissociation ( $K_d$ ) de l'ordre du nanomolaires *in vitro* ont été rapportées, mais seule la molécule LX7101 a atteint la phase clinique I/IIa, sans résultats publiés. La MST utilisée nécessite que l'un des partenaires de l'interaction soit fluorescent. Pour travailler dans des lysats cellulaires, la fluorescence rouge est optimale en termes de sélectivité et de sensibilité. Nous avons produit les protéines LIMK1, LIMK2, ainsi que leurs domaines catalytiques Kin1 et Kin2, fluorescentes dans les cellules HEK293 en les fusionnant avec la mRFP670 ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 650/670$  nm). Avant les essais MST, la production des protéines étiquetées a été confirmée par Western blot et leurs activités catalytiques par CE. Ce travail montre pour la première fois que la mRFP670 peut être utilisée comme protéine de fusion fluorescente pour des essais en MST, éliminant ainsi les étapes de purification de la cible à partir du lysat cellulaire. La méthodologie MST a été développée et validée en évaluant l'affinité de liaison des inhibiteurs LX7101, BMS-5, T56-LIMKi et TH-257. Nous avons également utilisé la MST pour évaluer les paramètres thermodynamiques ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$  et  $\Delta G$ ) des interactions entre les LIMKs et leurs inhibiteurs dans des lysats cellulaires. Les résultats montrent que l'entropie ( $\Delta S$ ) s'oppose à l'interaction, tandis que l'enthalpie ( $\Delta H$ ) la favorise. Pour développer des inhibiteurs de LIMKs capables de passer les essais cliniques, il serait alors bénéfique d'améliorer le terme entropique en développant des actifs plus hydrophobes. Les avantages de la MST pour mesurer les paramètres thermodynamiques et d'affinité de la liaison cible/ligand dans des conditions proches du *in vivo* en font un outil précieux en chimie médicinale et en santé. De plus, le couplage des essais d'activité catalytique et d'affinité via l'utilisation combinée de la CE et de la MST constitue une approche intéressante pour cribler des candidats médicamenteux, comprendre leurs mécanismes de liaison et leurs effets modulateurs dans un milieu cellulaire. L'approche développée est économe en réactifs, fiable, simple, robuste, rapide et parfaitement adaptée aux milieux biologiques complexes.

**Mots clés :** Cellules, Affinités et activités enzymatiques, Criblage d'inhibiteurs, Miniaturisation, Neurofibromatose

## Combining MST and CE: a strategy of interest for assessing enzyme/small ligand interactions in cell lysates

This thesis project aimed to develop an analytical strategy using MicroScale Thermophoresis (MST) and Capillary Electrophoresis (CE) to quantitatively assess enzyme/small molecule interactions directly in cell lysates, without purification or the use of radioactivity. As a proof of concept, we studied the inhibition of LIM kinases (LIMK1 and LIMK2), promising therapeutic targets for neurofibromatosis type 1, certain cancers, and neurological diseases. Hundreds of LIMK inhibitor with dissociation constants ( $K_d$ ) in the nanomolar range *in vitro* have been reported, but only the molecule LX7101 has reached clinical phase I/IIa, with no published results. The MST technique we used requires one of the interaction partners to be fluorescent. To work in cell lysates, red fluorescence is optimal in terms of selectivity and sensitivity. We produced LIMK1, LIMK2 proteins, as well as their catalytic domains Kin1 and Kin2, fluorescent in HEK293 cells by fusing them with mRFP670 ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 650/670$  nm). Before the MST assays, the production of labeled proteins was confirmed by Western blot and their catalytic activities by CE. This work demonstrates for the first time that mRFP670 can be used as a fluorescent fusion protein for MST assays, thereby eliminating the purification steps of the target from cell lysates. The MST methodology was optimized and validated by evaluating the binding affinity of the inhibitors LX7101, BMS-5, T56-LIMKi, and TH-257. We also used MST to evaluate the thermodynamic parameters ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$ , and  $\Delta G$ ) of the interactions between LIMKs and their inhibitors in cell lysates. The results show that entropy ( $\Delta S$ ) opposes the interaction, while enthalpy ( $\Delta H$ ) favors it. To develop LIMK inhibitors able to pass clinical trials, it would be beneficial to improve the entropic term by developing more hydrophobic compounds. The advantage of MST in measuring thermodynamic and binding parameters of target/ligand binding under near *in vivo* conditions makes it a valuable tool in medicinal chemistry and health science. Additionally, coupling catalytic activity and binding affinity assays through the combined use of CE and MST constitutes an interesting approach for screening drug candidates, understanding their binding mechanisms, and their modulatory effects in a cellular environment. The developed approach is reagent-efficient, reliable, simple, robust, fast, and perfectly suited for complex biological environments.

**Keywords:** Cells, Enzymatic affinity and activity, Inhibitor screening, Miniaturisation, Neurofibromatosis



Institut de Chimie Organique et Analytique  
Université d'Orléans, CNRS UMR 7311, BP 6759  
45067 Orléans Cedex 2, France

