



# Développement d'un essai de criblage moléculaire à haut débit basé sur la variation de la stabilité thermique en fonction des interactions protéine-ligand

# PIRPC

Découvrez les possibilités de recherche au 1er cycle!

# uOttawa

Simon Reilley, Aïcha Zouggar (B.Sc.), Christine Langlois (M.Sc.), and Yannick D. Benoit (Ph.D.)

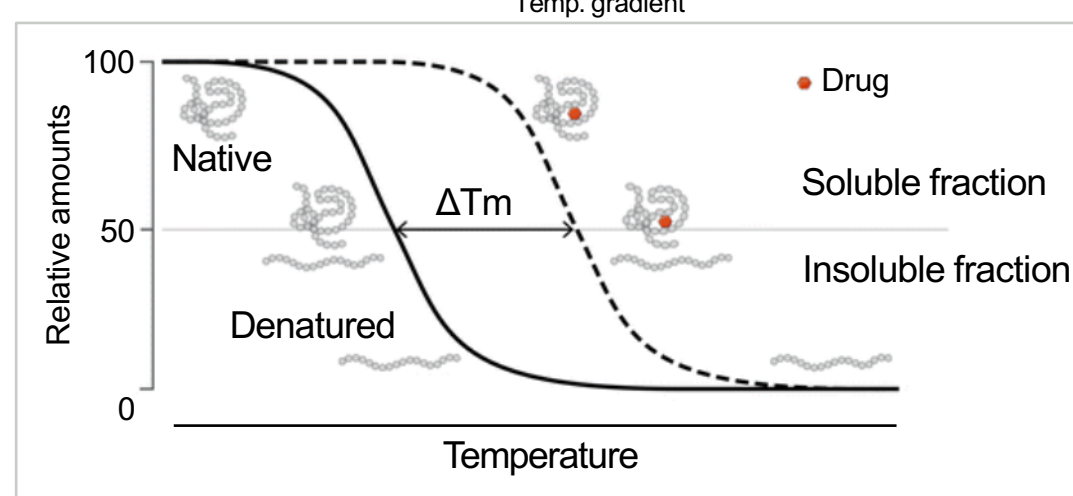
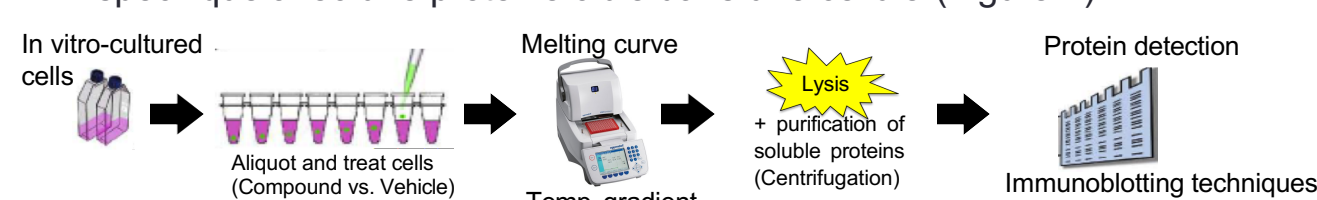
Departement of Cellular and Molecular Medicine, University of Ottawa, Ottawa, ON, K1H 8M5, [sreil084@uottawa.ca](mailto:sreil084@uottawa.ca)

## INTRODUCTION

- Les cancers colorectaux sont parmi les plus fréquemment diagnostiqués et les plus meurtriers au Canada. Les cellules tumorales du côlon sont organisées selon une hiérarchie gouvernée par des cellules souches cancéreuses. Celles-ci sont responsables des rechutes, de la formation de métastases, ainsi que du développement de résistance aux thérapies actuelles.
- Notre laboratoire vise à identifier de nouveaux composés pharmacologiques capables d'éradiquer les cellules souches cancéreuses colorectales humaines, et ainsi offrir de meilleures chances de survie aux patients.

## MÉTHODOLOGIE

- L'utilisation de méthodes de criblage moléculaire basées sur le changement de phénotype cellulaire conduit à l'identification de composés compromettant la viabilité des cellules souches cancéreuses.
- Toutefois cette technique ne parvient pas à identifier des composés dirigés contre une cible thérapeutique précise, définie par la littérature où des résultats préliminaires.
- La valeur du point de dénaturation thermique ( $T_m$ ) d'une protéine est influencée par l'interaction avec un ligand spécifique.
- Le principe de Cellular  $T_m$  Shift Assay (CETSA) permet d'identifier rapidement les molécules d'une librairie interagissant de manière spécifique avec une protéine cible dans une cellule (Figure-1).



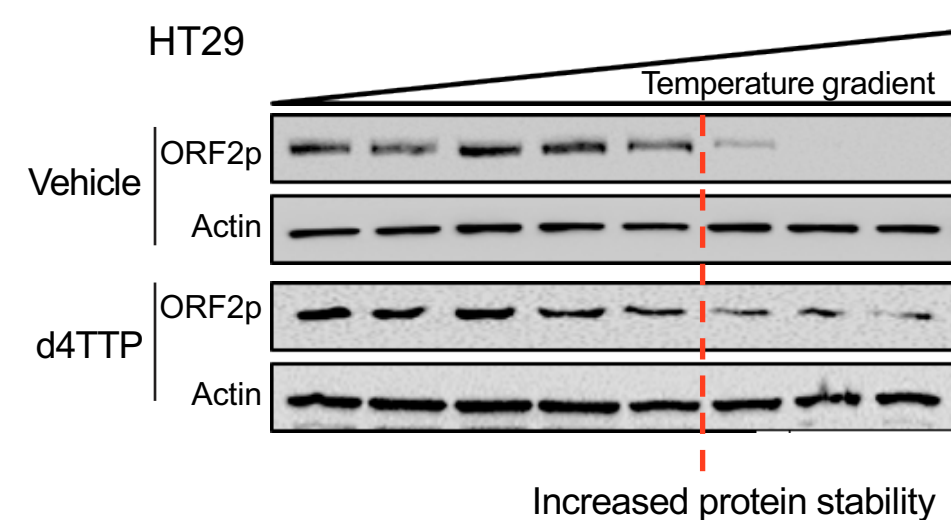
**Figure 1.** Principe du CETSA: Des cellules cancéreuses sont traitées avec des composés pharmacologiques, puis aliquotées dans des tubes réactionnels de 0.2ml. Les tubes sont soumis à un gradient de dénaturation thermique, à l'aide d'un thermocycleur. L'interaction d'un composé pharmacologique avec une protéine cible induit une augmentation de sa stabilité thermique. Ainsi, cette interaction augmente l'abondance de la protéine dans la fraction soluble du lysat cellulaire en fonction de la température d'incubation. Les niveaux protéiques sont quantifiés par immunobuvardage.

## OBJECTIFS

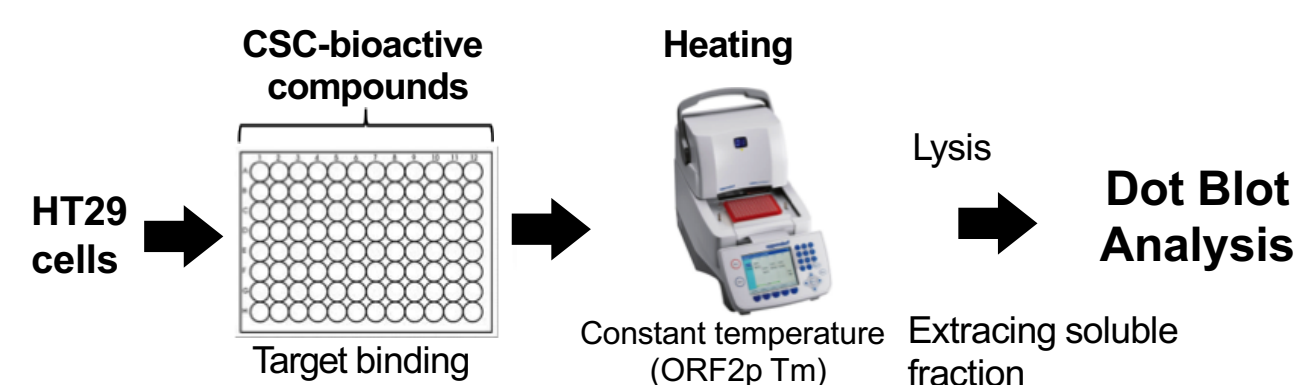
- Le but de notre projet est d'adapter la méthode du CETSA à un format utilisable pour des essais de criblage moléculaire à haut débit.
- Spécifiquement, notre protéine cible d'intérêt est L1ORF2p, un facteur impliqué dans la rétrotransposition des éléments génomiques de type LINE-1. Cette protéine possède une activité reverse-transcriptase et son expression est associée au développement de cellules souches cancéreuses.

## RÉSULTATS

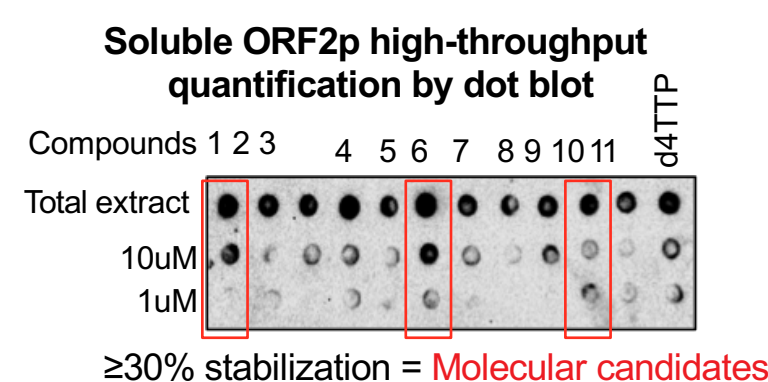
- Figure 2.** La température de dénaturation ( $T_m$ ) de ORF2p dans les cellules cancéreuses colorectales humaines (HT29) traitées avec le contrôle DMSO a été déterminée par immunobuvardage de type western. Cette valeur de  $T_m$  est augmentée par un traitement avec la molécule d4TTP, un ligand connu de ORF2p.



- Figure 3.** Les cellules HT29 sont exposées à une librairie de composés bioactifs dans des plaques de 96 puits. Suite au traitement, la plaque est soumise à la température de dénaturation ( $T_m$ ) de ORF2p préalablement déterminée. Les cellules sont ensuite lysées et la fraction des protéines solubles est isolée par centrifugation, en vue d'analyses quantitatives par immunobuvardage de type dot blots.



- Figure 4.** Une plateforme de distribution liquide (liquid handling) semi-automatisée est utilisée afin de déposer les échantillons de protéines solubles sur des membranes de nitrocellulose. Un anticorps spécifique à ORF2p est utilisé afin de détecter les niveaux de celle-ci dans la fraction soluble de chaque condition expérimentale. Sur 11 composés testés, 3 molécules pharmacologiques induisent une stabilisation thermique de ORF2p de manière semblable à d4TTP.

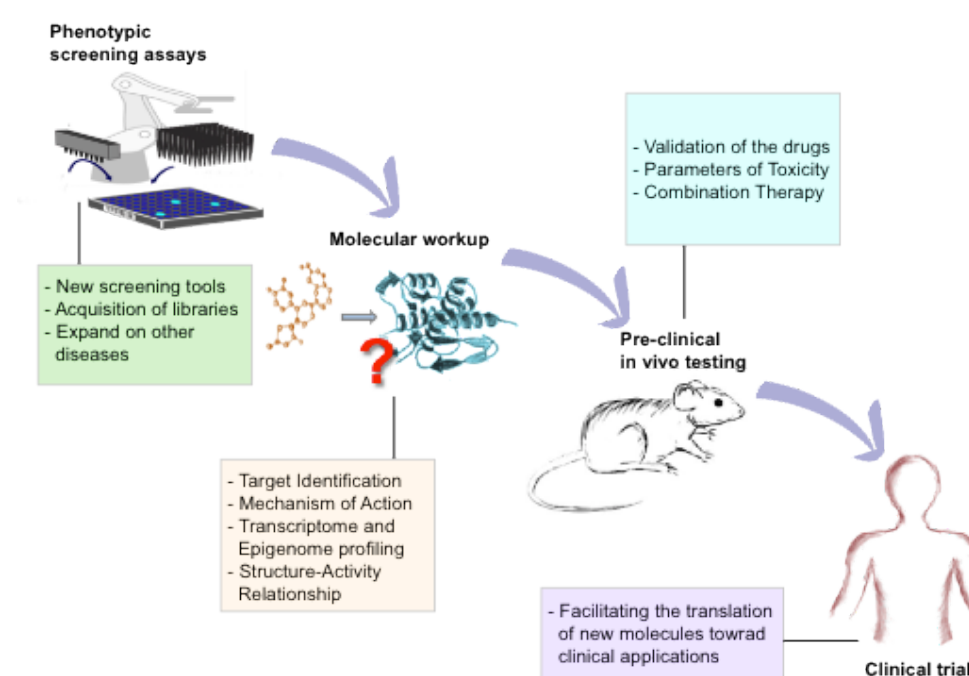


## RÉFÉRENCES

- Martinez Molina, D. *et al.* Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay. *Science* **341**, 84–87 (2013)
- Brandts, J.F. & Lin, L.N. Study of strong to ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry. *Biochemistry* **29**, 6927–6940 (1990)
- Jafari R, Almgvist H. The cellular thermal shift assay for evaluating drug target interactions in cells. *Nat Protoc.* Sep (9), 2100-22. (2014)

## CONCLUSIONS

- La mise au point de la méthode CETSA dans un format utile au criblage à haut débit peut servir à l'identification de molécules capables d'interagir directement avec la protéine cible ORF2p dans les cellules cancéreuses colorectales.
- La validation de l'interaction spécifique entre un composé thérapeutique potentiel et sa cible représente une étape clé dans le développement d'un médicament et la détermination de son mécanisme d'action. La méthode CETSA à haut débit permet donc d'évaluer rapidement la présence de telles interactions, pour un grand nombre de composés bioactifs.



- Figure 5.** L'interaction spécifique entre un composé thérapeutique potentiel et sa cible représente une étape clé dans le développement d'un médicament

## PERSPECTIVES FUTURES

- La méthode établie en laboratoire sera éventuellement incorporée à un pipeline de criblage moléculaire visant à trouver des inhibiteurs de rétrotranspositions des éléments LINE-1. Notre laboratoire testera ensuite l'efficacité de ces inhibiteurs à supprimer l'activité des cellules souches cancéreuses colorectales humaines dans un modèle de souris *in vivo*. Les conclusions de ces études serviront de bases à de futurs essais cliniques ayant pour but l'amélioration des traitements offerts en clinique et une meilleure survie des patients.

## REMERCIEMENTS

Cette recherche est subventionnée par l'Université d'Ottawa et le Programme d'opportunité de recherche au premier cycle. C'est avec une grande appréciation que je remercie leur contribution afin de me permettre de poursuivre un projet de recherche. J'aimerais également remercier le département de médecine moléculaire et cellulaire de la Faculté de Médecine de l'Université d'Ottawa, le Dr. Yannick Benoit et Aïcha Zouggar pour leur support exceptionnelle dans ma démarche.