

La miniaturisation pour la découverte de candidats médicaments

Pascal Villa

Résumé

La nécessité d'accélérer la découverte de nouvelles entités chimiques pour en faire des médicaments a conduit l'industrie pharmaceutique à développer des essais miniaturisés et robotisés dans les années 1990. En 2003, la complétion du séquençage du génome humain a permis d'accéder à une multitude de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles parmi les protéines codées par les 25 000 gènes mis en évidence. Un effort supplémentaire a été mis en œuvre depuis pour perfectionner les techniques de miniaturisation afin d'aider les chercheurs à déterminer et comprendre les fonctions de ces cibles. Cet effort s'est d'abord porté sur la chimie et les modèles biologiques moléculaires et cellulaires, et se poursuit avec des modèles prédictifs des effets potentiels des futurs médicaments sur l'homme. Cet article décrit les avancées de la miniaturisation dans ces domaines.

Mots-clés

Miniaturisation, criblage à haut débit, chémobiologie, médicament.

Abstract

Miniaturization for the discovery of drug candidates

The need to accelerate the discovery of new chemical entities into drugs led the pharmaceutical industry to develop miniaturized and robotic tests in the 1990s. In 2003, the completion of human genome sequencing allowed to access to many new potential therapeutic targets among the proteins encoded by the 25,000 genes highlighted. An additional effort has since been put in place to improve miniaturization techniques to help researchers to identify and understand these target functions. This effort was initially focused on chemistry and molecular and cellular biological models, and is carrying on with predictive models of the potential effects of future drugs on humans. This article describes the advances in miniaturization in these areas.

Keywords

Miniaturization, high throughput screening, chemical biology, drug.

Le chemin qui mène à la mise sur le marché d'un nouveau médicament est long et coûteux. Il faut en moyenne de douze à quinze ans avant que le patient puisse bénéficier d'un nouveau traitement.

Les nouveaux médicaments sont principalement issus de la synthèse chimique, de substances naturelles ou des biotechnologies (comme les anticorps par exemple). La nécessité de trouver de nouvelles molécules actives a conduit l'industrie pharmaceutique à développer des outils de synthèse chimique performants et robotisés, à mettre en place des tests robotisés pour faire du criblage à haut débit (« high throughput screening », HTS), et à élaborer des stratégies pour tester rapidement les effets des substances actives issues de ces criblages.

Miniaturisation et synthèse chimique

Pour pouvoir disposer d'un socle minimal de molécules aux structures chimiques diverses permettant d'identifier les futurs précurseurs de médicaments, il a fallu augmenter la taille des collections de molécules (les chimiothèques) ainsi que leurs diversités (jusqu'à plusieurs millions de composés dans les industries pharmaceutiques). Ceci a été rendu possible grâce à la chimie combinatoire [1-2] qui, en miniaturisant, automatisant et parallélisant les réactions chimiques [3], permet de produire plusieurs centaines de molécules en un minimum de temps (*figure 1*) et ainsi d'obtenir rapidement des chimiothèques [4-6]. Ces dernières purent ainsi passer de 100 000 molécules à la fin des années 1990 à plusieurs



Figure 1 - Robot de synthèse chimique en parallèle (SOPHAS® Automated Synthesizer, Zinsser Analytic). Avec une capacité allant jusqu'à plusieurs milliers de composés par jour, ce type de synthétiseur est adapté au format des microplaques (96 puits) gérées par les robots de criblage. Employant aussi bien la synthèse sur support solide que la méthode classique en solution, ils permettent d'accomplir des synthèses combinatoires complexes. Ils ont ainsi contribué à réaliser de grandes collections de composés les plus divers possible dans les premiers temps. Aujourd'hui, leur utilisation est plus axée sur la création de chimiothèques de tailles plus modestes (quelques dizaines à centaines de produits de structures chimiques voisines) dans le but de contribuer aux phases d'optimisation des futurs médicaments.

millions quelques années plus tard. En même temps, des critères de qualité des composés testés permettent aujourd'hui d'accélérer le développement des projets de recherche de médicaments [7-8].

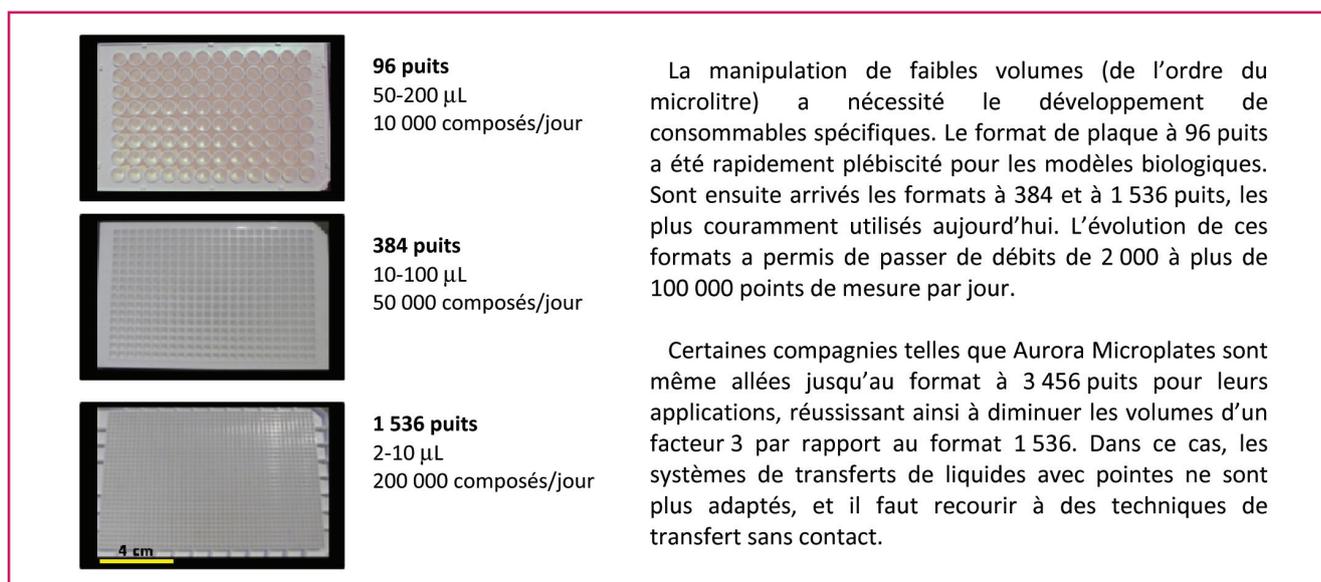


Figure 2 - Microplaques à 96, 384 et 1 536 puits avec leurs volumes de travail et les débits journaliers atteints lors des criblages.

Essais biologiques miniaturisés et criblage

Le criblage à haut débit consiste à tester un grand nombre de substances (molécules de synthèse, extraits ou substances naturelles, fragments, siRNA, etc.) sur des modèles biologiques en un minimum de temps. Il a été rendu possible grâce au développement simultané i) de formats de microplaques ou d'autres supports compatibles avec les essais biologiques, ii) d'appareils de transferts de faibles volumes de liquides, et iii) de lecteurs adaptés à ces formats et compatibles avec les technologies basées sur les mesures physiques.

Les formats miniatures

Le format de plaque à 96 puits a été adopté par une grande partie de la communauté scientifique (figure 2). Il a prouvé sa pertinence dans le déploiement de modèles biologiques très variés, moléculaires ou cellulaires.

Dans certains cas, un cap de miniaturisation supplémentaire a été franchi. Il a été rendu nécessaire pour les tests sur les acides désoxyribonucléiques réalisés sur puces ou des tests biochimiques mis en place sur des lames d'histologie (2,6 x 7,6 cm). Jusqu'à 6 000 réactions simultanées sont possibles sur ces lames grâce à des dépôts de l'ordre du picolitre [9] (société Reaction Biology Corp.).

Les types de tests

Une fois la pathologie sélectionnée, il s'agit de construire le modèle biologique miniaturisé pertinent pour tenter d'identifier les molécules actives. Les tests de criblage sont habituellement classés en deux catégories : les tests de liaison et les tests fonctionnels. Les tests de liaison sont pour la grande majorité des tests moléculaires permettant de mesurer la liaison directe d'une molécule chimique avec une protéine ou un acide nucléique. Les tests fonctionnels font appel à la détection d'un élément ou d'une cascade d'éléments suite à l'effet d'une molécule sur sa cible. Parmi ces tests, la mesure de flux calcique est l'un des plus répandus.

Il consiste à mesurer l'augmentation du calcium intracellulaire induite par la liaison d'un ligand sur son récepteur (par exemple les récepteurs membranaires couplés aux protéines G qui constituent une famille ciblée par plus d'un tiers des médicaments actuellement sur le marché). On peut également rechercher l'effet d'une molécule sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires après activation de cellules sanguines – en général des monocytes humains activés par des extraits de paroi bactérienne, modèle classique mimant la réaction inflammatoire chez l'homme. D'autres tests permettront de suivre la migration cellulaire ou leur prolifération. Enfin, des tests sur enzymes purifiées à l'aide de kits commerciaux permettront d'identifier des inhibiteurs ou activateurs de kinases, phosphatases, protéases ou autres enzymes.

Lorsque la cible est connue, les essais en liaison ou en fonction sont privilégiés. Si la cible n'est pas connue, on fait appel à des modèles phénotypiques (changement de morphologie, survie, etc.) donnant la possibilité de trouver des molécules actives dont on recherchera la cible ultérieurement [10].

Transfert de liquide : vers la suppression des contacts

En général, les tests de criblage se font selon une succession d'étapes où sont mis en présence le modèle biologique (moléculaire ou cellulaire) et les molécules d'intérêt, puis les substrats nécessaires à la mesure de l'effet biologique. Ces séquences d'événements sont généralement prises en charge par des robots de transferts de liquides (figure 3). La plupart des stations robotisées de ce type sont équipées de modules gérant les volumes allant de 100 nanolitres à 1 millilitre.

On sait aujourd'hui que les individus ne répondent pas forcément tous de la même façon à un traitement. Ceci conduit progressivement les médecins à envisager une médecine personnalisée. Pour envisager des thérapies individualisées, il devient alors nécessaire de pouvoir étudier l'effet de futurs médicaments sur des cellules de patients. Pour cela, il faut développer des technologies permettant de travailler avec de faibles quantités d'échantillons prélevés sur les personnes

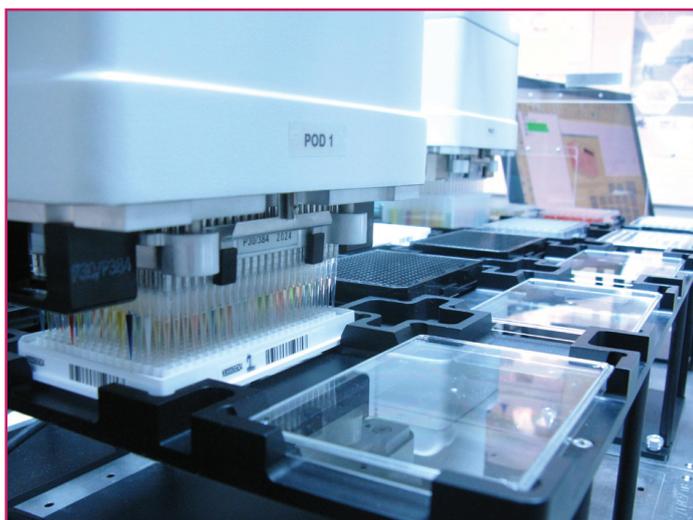


Figure 3 - Robot de pipetage Biomek FX^P (Beckman Coulter) en mesure de tester 384 molécules en quelques secondes (système par aspiration de volumes de 1 à 250 μ L). Dans les procédés de criblage, le modèle biologique est disposé dans une plaque « essai ». Les substances à tester sont prélevées dans une plaque de stockage puis mises en contact du modèle biologique. Enfin, les substrats nécessaires à l'activation du modèle biologique sont ajoutés. Après une période d'incubation, la plaque est insérée dans un lecteur permettant de vérifier l'efficacité des substances testées.

à soigner. La microfluidique se montre aujourd'hui bonne candidate pour répondre à ce défi. Elle consiste à encapsuler des microgouttes (de l'ordre du nanolitre) dans des circuits de capillaires très fins (figure 4), chaque goutte pouvant contenir une cellule de patient sur laquelle seront testées les molécules d'intérêt. Les flux sont créés par l'action de pompes et le débit généré atteint jusqu'à 2 000 gouttes par seconde.

Le souci de rentabilité et d'économie des produits synthétisés en faibles quantités a incité les chercheurs à concevoir une technologie basée sur les ultrasons, susceptible de transférer des liquides sans les toucher (figure 5). Un des intérêts de cette technologie est le déplacement de très petites quantités de produits (nanolitres) qui permet ainsi de fortement limiter la consommation des substances à tester.

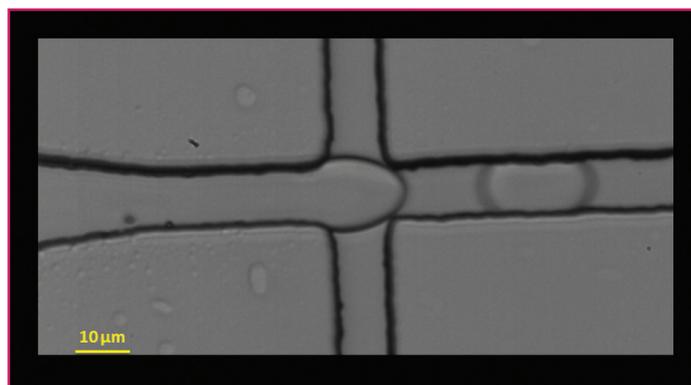


Figure 4 - Zoom sur une puce de microfluidique où l'on observe la création de gouttes grâce à l'utilisation de caméras ultra-rapides. Chaque goutte formée constituera un milieu réactionnel de quelques dizaines de nanolitres permettant de déterminer l'effet d'une molécule d'intérêt.

La détection des effets biologiques

Au fur et à mesure des développements technologiques, un nombre croissant de cibles sont devenues accessibles aux tests à haut débit.

Pour chacune de ces cibles, des essais ont été mis au point et des lecteurs assurant la détection de l'effet biologique se sont multipliés. Ils sont équipés pour mesurer la fluorescence, la luminescence ou l'absorbance en milieu homogène. En plus de ces lecteurs classiques de microplaques, l'emploi d'analyseurs d'images à haut débit est souvent utilisé. Ces analyseurs d'images utilisent les principes de l'imagerie avec un microscope adapté aux microplaques pour des tests cellulaires. Ils sont catégorisés dans la rubrique du « criblage à haut contenu » (ou « high content screening », HCS) car ils permettent d'obtenir plusieurs informations à partir d'une image de cellules dans les puits. On arrive ainsi à déterminer et suivre une activité précise d'un candidat médicament au niveau cellulaire. Ils sont majoritairement dédiés aux criblages phénotypiques [10].

Les canaux ioniques sont impliqués dans de multiples processus physiologiques et leurs dysfonctionnements est la source de nombreuses maladies. Les tests miniaturisés basés sur des mesures de fluorescence permettent d'évaluer rapidement l'effet de candidats médicaments. Ils ont

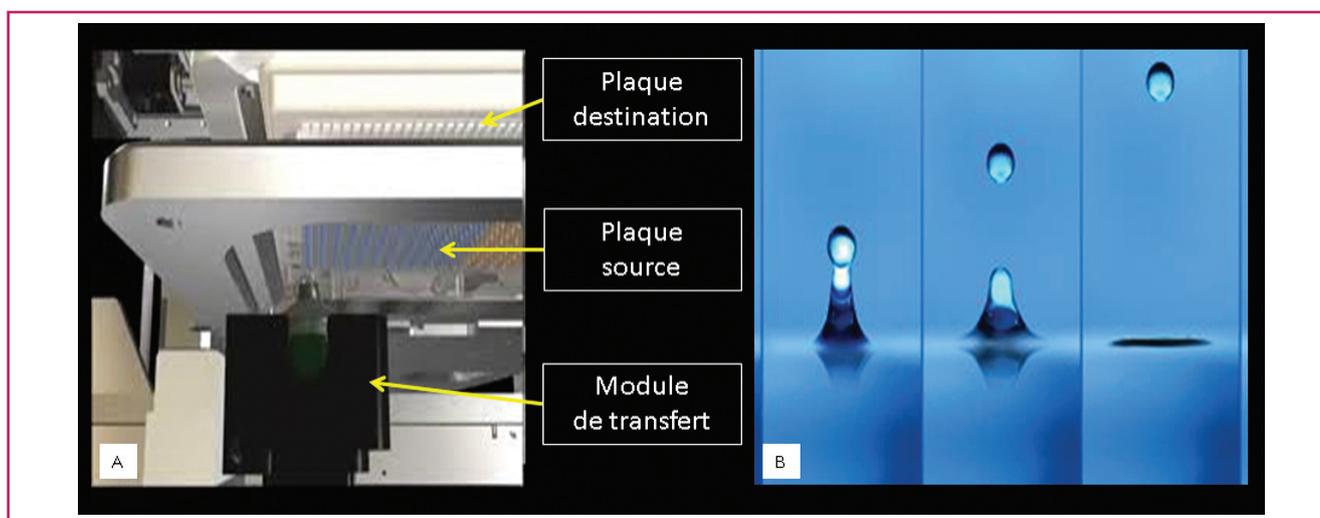


Figure 5 - Appareil de transfert de liquide sans contact Echo[®]555 (Labcyte Inc.) (A) utilisant l'énergie acoustique, qui provoque la projection d'une goutte de liquide vers le haut depuis la plaque source vers la plaque destination où elle ira se fixer au fond d'un puits. La taille de la goutte projetée (B) est déterminée par la fréquence de l'ultrason employée et peut varier de 2,5 à 25 nL.



Figure 6 - Les tests miniaturisés se font également sur petits organismes comme la levure qui fait 10 μm de diamètre (A) © J. Schacherer, J. de Montigny/Université de Strasbourg 2017), le nématode *C. elegans* long de 1 mm (B) © Ian D. Chin-Sang/Queen's University 2016) ou le poisson zèbre qui atteint les 5 cm (C) © Christine THISSE/CNRS Photothèque).

permis de s'affranchir des essais de liaison ou de mesure de flux, plus lents, et nécessitant la gestion d'éléments radioactifs. Ils restent cependant imparfaits car ils mesurent soit un potentiel membranaire, soit une variation de fluorescence dépendante d'une modification de la concentration en ion.

La dernière décennie a vu l'éclosion de techniques permettant de réaliser des mesures aussi sophistiquées que du « patch-clamp » à haut débit (jusqu'à 20 000 mesures par jour avec la SynchroPatch 384PE, Nanion Technologies) et ainsi d'évaluer avec précision l'effet de substances sur les canaux ioniques [11].

Miniaturisation de modèles prédictifs

Les tests précliniques sur animaux sont coûteux et doivent répondre aux obligations croissantes de la législation concernant les expérimentations sur animaux. Depuis plusieurs années, le challenge consiste à mettre en place des modèles biologiques les plus prédictifs possibles des effets attendus sur l'homme.

Dans le but d'optimiser les travaux de prédiction, le développement graduel de modèles intégrés miniaturisés poursuit son essor. Ces modèles sont cellulaires ou sur petits organismes. Ils comprennent par exemple les tests de toxicité cellulaire à haut débit [12]. De la même façon, on observe l'augmentation du nombre de modèles sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* [13], le nématode *Caenorhabditis elegans* [14] ou le poisson zèbre *Danio rerio* [15] (figure 6). Dans ces cas, même si l'on n'est pas à ultra haut débit, ce dernier reste suffisant pour détecter de nombreux effets sur le développement et ainsi éliminer des composés délétères avant les tests sur mammifères.

Ces travaux de mise au point de modèles prédictifs s'avèrent ardues mais permettront certainement de limiter encore les tests nécessaires sur les animaux dans le futur. Il n'en reste pas moins que la réponse biologique globale avec l'observation des effets secondaires sur des mammifères reste indispensable avant d'envisager d'administrer un produit à l'homme.

Conclusion

La miniaturisation permet d'augmenter le débit des tests tout en réduisant la consommation de réactifs, ce qui rend les systèmes miniaturisés très pertinents pour un grand nombre d'essais, de la découverte de candidats médicaments à la toxicologie, en passant par la recherche sur les cellules souches à des fins thérapeutiques.

Ces technologies de miniaturisation et de mise en place de tests automatisés, qui restaient l'apanage de l'industrie pharmaceutique avant les années 2000, ont aujourd'hui trouvé leur place au sein des laboratoires de recherche. En effet, le déploiement d'initiatives destinées à constituer des chimiothèques et créer des plateformes spécialisées

dans les tests à haut débit [16] permet aux chercheurs du secteur public d'accéder à la chimobiologie. Ils ont ainsi la possibilité de mieux appréhender les fonctions du vivant grâce à l'utilisation de petites molécules chimiques et de contribuer à la découverte de futurs médicaments.

Références

- [1] Geysen H.M., Schoenen F., Wagner D., Wagner R., Combinatorial compound libraries for drug discovery: an ongoing challenge, *Nat. Rev Drug Discov.*, **2003**, 2, p. 222.
- [2] Bellamy F., La synthèse à haut débit (synthèse combinatoire), une discipline arrivée à maturité dans la recherche pharmaceutique ?, *L'Act. Chim.*, **2000**, 238, p. 4.
- [3] Thomson L.A., Ellman J.A., Synthesis and applications of small molecule libraries, *Chem. Rev.*, **1996**, 96, p. 555.
- [4] Schreiber S.L., Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery, *Science*, **2000**, 287, p. 1964.
- [5] Nielsen T.E., Schreiber S.L., Towards the optimal screening collection: a synthesis strategy, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, p. 48.
- [6] Pathak A.K., Pathak V., Reynolds R.C., Solution-phase parallel synthesis of acyclic nucleoside libraries of purine, pyrimidine, and triazole acetamides, *ACS Comb. Sci.*, **2014**, 16, p. 485.
- [7] Mignani S., Huber S., Tomás H., Rodrigues J., Majoral J.P., Compound high-quality criteria: a new vision to guide the development of drugs, current situation, *Drug Discov. Today*, **2016**, 21, p. 573.
- [8] Galzi J.L., Ruggiu F., Gizzi P., Didier B., Quality control of chemical libraries, *Med. Sci. (Paris)*, **2015**, 31, p. 660.
- [9] Horiuchi K.Y., Wang Y., Diamond S.L., Ma H., Microarrays for the functional analysis of the chemical-kinase interactome, *J. Biomol. Screen.*, **2006**, 11, p. 48.
- [10] Soleilhac E., Nadon R., Lafanechere L., High-content screening for the discovery of pharmacological compounds: advantages, challenges and potential benefits of recent technological developments, *Expert Opin. Drug Discov.*, **2010**, 5, p. 135.
- [11] Obergrussberger A. *et al.*, Automated patch clamp meets high-throughput screening: 384 cells recorded in parallel on a planar patch clamp module, *J. Lab. Autom.*, **2016**, 21, p. 779.
- [12] Szymański P., Markowicz M., Mikiciuk-Olasik E., Adaptation of high-throughput screening in drug discovery-toxicological screening tests, *Int. J. Mol. Sci.*, **2012**, 13, p. 427.
- [13] Norcliffe J.L., Alvarez-Ruiz E., Martin-Plaza J.J., Steel P.G., Denny P.W., The utility of yeast as a tool for cell-based, target-directed high-throughput screening, *Parasitology*, **2014**, 141, p. 8.
- [14] Kinser H.E., Pincus Z., High-throughput screening in the *C. elegans* nervous system, *Mol. Cell. Neurosci.*, in press, doi: 10.1016/j.mcn.2016.06.001.
- [15] Truong L. *et al.*, Optimizing multi-dimensional high throughput screening using zebrafish, *Reprod. Toxicol.*, **2016**, 65, p. 139.
- [16] Hibert M.F., French/European academic compound library initiative, *Drug Discov. Today*, **2009**, 14, p. 723.



Pascal Villa

est ingénieur de recherche au CNRS et directeur de PCBIS (Plate-forme de Chimie Biologique Intégrative de Strasbourg), Unité Mixte de Service (UMS) CNRS/Université de Strasbourg (et membre du LabEx Medalis)*.

* Université de Strasbourg, CNRS, PCBIS UMS 3286, 300 bd S. Brant, F-67413 Illkirch.
Courriel : pvilla@unistra.fr