



**HAL**  
open science

# Investigation de la relation structure activité de l'acide flufénamique et de ses dérivés en tant qu'activateurs du canal TRESK humain

Aymeric Monteillier

► **To cite this version:**

Aymeric Monteillier. Investigation de la relation structure activité de l'acide flufénamique et de ses dérivés en tant qu'activateurs du canal TRESK humain. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-00929833

**HAL Id: dumas-00929833**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00929833>**

Submitted on 14 Jan 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE JOSEPH-FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

2013

N°

---

**INVESTIGATION DE LA RELATION STRUCTURE ACTIVITE DE L'ACIDE  
FLUFENAMIQUE ET DE SES DERIVES EN TANT QU'ACTIVATEURS DU  
CANAL TRESK HUMAIN**

---

*Thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie, diplôme d'état*

Par Monsieur AYMERIC MONTEILLIER

Né le 17/11/1988 à Ales, Gard

*Thèse soutenue publiquement à la faculté de pharmacie à Grenoble*

Le : 10/01/2014

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : Mr Ahcène BOUMENDJEL, Professeur

Directeur de thèse : Mme Edwige NICOLLE, Maitre de conférence

Membres : Mme Sylvie SERTORIO, Docteur en pharmacie

*La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

Doyen de la Faculté : **M. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

**Année 2012-2013**

## ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

### PROFESSEURS DES UNIVERSITES (n=11)

<b>BAKRI</b>	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
<b>BOUMENDJEL</b>	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
<b>BURMEISTER</b>	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
<b>DECOUT</b>	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
<b>DROUET</b>	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
<b>DROUET</b>	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
<b>GODIN-RIBUOT</b>	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
<b>LENORMAND</b>	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
<b>PEYRIN</b>	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
<b>RIBUOT</b>	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
<b>WOUESSIDJEW</b>	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

### PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=6)

<b>CALOP</b>	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
<b>CORNET</b>	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
<b>DANEL</b>	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
<b>FAURE</b>	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
<b>MOSSUZ</b>	Pascal	Hématologie (PU-PH-THEREX-TIMC)
<b>SEVE</b>	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)

### PROFESSEUR EMERITE (n=1)

<b>GRILLOT</b>	Renée	Parasitologie – Mycologie Médicale (L.A.P.M)
----------------	-------	----------------------------------------------

### MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES (n=31)

<b>ALDEBERT</b>	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
<b>BATANDIER</b>	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
<b>BELAIDI-CORSAT</b>	Elise	Pharmacologie Physiologie –(HP2)
<b>BOURGOIN</b>	Sandrine	Biochimie – Biotechnologie (IAB)
<b>BRETON</b>	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
<b>BRIANCON-MARJOLLET</b>	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
<b>BUDAYOVA SPANO</b>	Monika	Biophysique (I.B.S)

DOMAINE DE LA MERCI  
38706 LA TRONCHE CEDEX – France  
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00  
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

<b>CAVAILLES</b>	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
<b>CHOISNARD</b>	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
<b>DELETRAZ-DELPORTE</b>	Martine	Droit Pharmaceutique (Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128)
<b>DEMEILLIERS</b>	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
<b>DURMORT-MEUNIER</b>	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
<b>GEZE</b>	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
<b>GILLY</b>	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
<b>GROSSET</b>	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
<b>GUIEU</b>	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
<b>HININGER-FAVIER</b>	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
<b>JOYEUX-FAURE</b>	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
<b>KHALEF</b>	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
<b>KRIVOBOK</b>	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
<b>MOUHAMADOU</b>	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
<b>MORAND</b>	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
<b>MELO DE LIMA</b>	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
<b>NICOLLE</b>	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
<b>PERES</b>	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
<b>PEUCHMAUR</b>	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
<b>RACHIDI</b>	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
<b>RAVEL</b>	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
<b>RAVELET</b>	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
<b>SOUARD</b>	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
<b>TARBOURIECH</b>	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
<b>VANHAVERBEKE</b>	Cécile	Chimie (D.P.M)

## **MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=3)**

<b>ALLENET</b>	Benoit	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
<b>BUSSER</b>	Benoit	Pharmacie (MCU-PH-IAB-INSERM)
<b>GERMI</b>	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I/MCU-PH)

## **PROFESSEUR CERTIFIE (PRCE) (n=2)**

<b>FITE</b>	Andrée	P.R.C.E
<b>GOUBIER</b>	Laurence	P.R.C.E

DOMAINE DE LA MERCI  
38706 LA TRONCHE CEDEX – France  
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00  
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

## PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=4)

<b>BELLET</b>	Béatrice	Pharmacie Clinique
<b>RIEU</b>	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
<b>TROUILLER</b>	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)
<b>DON</b>	Martin	Laboratoire TIMC-IMAG

## PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG) (n=1)

<b>GAUCHARD</b>	Pierre-Alexis	(D.P.M)
-----------------	---------------	---------

## ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

<b>SUEUR</b>	Charlotte	Virologie (U.V.H.C.I)
<b>VAN NOOLEN</b>	Laetitia	Biochimie Toxicologie (HP2-DBTP-BGM)

## ATER (n= 6)

<b>DAYDE David</b>	ATER	Parasitologie Mycologie (J.R)
<b>FAVIER Mathieu</b>	ATER	Pharmacologie - Laboratoire HP2 (JR)
<b>HADDAD-AMAMOU Anis</b>	ATER	Laboratoire de Pharmacie Galénique
<b>HENRI Marion</b>	ATER	Physiologie – Laboratoire HP2 (JR)
<b>LEHMANN Sylvia</b>	ATER	Biochimie Biotechnologie (JR)
<b>REGENT-KLOEKNER Myriam</b>	ATER	Biochimie (LECA-UJF)

## MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=9)

<b>CAVAREC</b>	Fanny	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
<b>GRAS</b>	Emmanuelle	(01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
<b>LESART</b>	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Laboratoire (TIMC-IMAG)
<b>MELAINE</b>	Feriel	(01-10-2011 au 30-09.2014)	Laboratoire HP2(JR)
<b>NASRALLAH</b>	Chady	(01-10-2011 au 30-09.2014)	Laboratoire HP2(JR)
<b>THOMAS</b>	Amandine	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
<b>LECERF-SHMIDT</b>	Florine	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Pharmacochimie (DPM)
<b>BERTHOIN</b>	Lionel	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Laboratoire (TIMC-IMAG-THEREX)
<b>MORAND</b>	Jessica	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Laboratoire HP2 (JR)

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire  
**CIB** : Centre d'Innovation en Biologie  
**DPM** : Département de Pharmacochimie Moléculaire  
**HP2** : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire  
**IAB** : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »  
**IBS** : Institut de Biologie Structurale  
**LAPM** : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes  
**LBFA** : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée  
**LCBM** : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux  
**LCIB** : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie  
**LECA** : Laboratoire d'Ecologie Alpine  
**LR** : Laboratoire des Radio pharmaceutiques  
**TIMC-IMAG** : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition  
**UVHCI** : Unit of Virus Host Cell Interactions

# REMERCIEMENTS

---

❖ A mon jury de thèse :

Monsieur Ahcène Boumendjel, Professeur au Département de Pharmacochimie  
Moléculaire

*Pour avoir su éveiller mon intérêt dans le domaine de la chimie, avoir su me guider dans mes premiers choix d'orientation, et m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury*

Madame Edwige Nicolle, Maître de conférences à l'Université Joseph Fourier

*Pour m'avoir supporté dans mon orientation en recherche, avoir apporté les connaissances de chimie médicinale indispensables à la réalisation de ce travail, et avoir accepté de m'accompagner dans sa réalisation*

Madame Sylvie Sertorio, Pharmacienne d'officine

*Pour m'avoir fait découvrir le métier de pharmacien d'officine et permis d'inestimables rencontres grâce auxquelles je garde en tête que l'intérêt des patients doit rester notre principale préoccupation, en recherche comme à l'officine*

❖ A l'équipe d'électrophysiologie du laboratoire Pfizer Neusentis :

Anne Phelan, Edward Stevens, David Pryde, Lishuang Cao, Alexandre Loucif, Pierre-Philippe Saintot, Ari Alexandrou, Gareth Young, Adam Brown et tous les autres

*Pour leur accueil chaleureux, leur enthousiasme et l'aide qu'ils m'ont apporté au long de ce travail*

❖ A Stephen J Tucker : responsable de l'équipe « canaux potassiques » au département de physique de l'université d'Oxford

*Pour m'avoir offert l'enrichissante opportunité de présenter ce travail à son  
équipe d'experts en canaux ioniques*

❖ A mes parents et sœurs

*Pour leur soutien, leur bienveillance et leur amour, infaillibles en toutes  
circonstances!*

❖ A Charlotte

*Sans qui je n'aurais probablement pas même franchi le cap de la première  
année, merci pour ton enthousiasme, ta motivation, ta patience (si si !), et plus  
généralement de m'avoir supporté (dans tous les sens du terme) pendant ces 7  
dernières années : Merci grosse patate !*

❖ A tous les copains !

*Qu'il est bon de se savoir entouré! Un énorme merci à vous tous pour votre  
amitié, tous les bons moments passés et tous ceux à venir !*

***Mes plus profonds remerciements à vous tous pour m'avoir accompagné tout au long de  
mon cursus et avoir répondu présent aujourd'hui pour clôturer ce chapitre***

# SOMMAIRE

---

Remerciements .....	5
Sommaire.....	7
Abréviations .....	8
Introduction .....	8
Développement.....	9
I. Problématique .....	9
II. Méthodologie .....	11
a. Design des dérivés .....	11
b. Test des dérivés .....	12
c. Modélisation moléculaire : .....	16
III. Résultats.....	18
Conclusion.....	26
Bibliographie.....	28
Article en anglais sur lequel repose la thèse.....	29

# ABRÉVIATIONS

---

TRESK : Twik related spinal cord K<sup>+</sup> channel

K2P : Twin pore domain K<sup>+</sup> channel

3D : En trois dimensions

FFA : Flufenamic acid

CE50 : Concentration Efficace médiane

μM : Micromoles par litres

LH : Liaison Hydrogène

# INTRODUCTION

---

Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires constituant l'une des plus vieilles et diverses familles de transporteurs. Ils forment un pore permettant le passage rapide et sélectif de différents ions à travers la membrane et jouent un rôle crucial dans un grand nombre de processus physiologiques tels que la prolifération cellulaire, la régulation de la pression artérielle, la cognition ou encore la transmission sensorielle<sup>1</sup>. Le travail présenté dans cette thèse concerne le canal TRESK (Twik Related Spinal cord K<sup>+</sup> channel), un membre de la famille des canaux potassiques à deux domaines P (K2P) majoritairement exprimé dans les ganglions spinaux et les neurones trigéminaux, deux structures nerveuses impliquées respectivement dans la transmission du message nociceptif et la migraine<sup>2,3</sup>. Son rôle de régulateur de l'excitabilité neuronale ainsi que sa distribution font de TRESK une cible très intéressante dans la recherche de nouveaux composés analgésiques qui pourraient apporter une réponse enfin satisfaisante à certaines douleurs non répondantes aux thérapies existantes. Malheureusement, peu de connaissances sont actuellement disponibles sur le fonctionnement de TRESK, et personne n'est parvenu à ce jour à purifier et cristalliser cette protéine en vue d'obtenir sa structure en trois dimensions (3D), formant

un frein considérable au développement de nouveaux composés sélectifs et efficaces. Ce travail propose de mieux comprendre les interactions impliquées dans l'effet ouvreur d'un ligand connu, l'acide flufénamique (FFA), grâce à la création et le test de dérivés comportant chacun de petites modifications structurales. En support des résultats biologiques ainsi obtenus, un modèle structural tridimensionnel de TRESK construit par homologie est utilisé afin de visualiser le site actif et les acides aminés impliqués dans l'interaction. Ce travail, fruit de mon stage de 6 mois réalisé à Pfizer Neusentis à Cambridge (UK), a permis de fournir la première vue prédictive d'un site actif de ligands ouvreurs de TRESK. Il sera soumis à publication dans les prochains mois.

# DÉVELOPPEMENT

---

## I. Problématique

L'implication de TRESK dans les phénomènes douloureux est largement décrite dans la littérature. Une mutation du gène KCNK18 codant pour TRESK serait ainsi responsable d'une forme congénitale de migraine avec aura<sup>4</sup>. Il a également été rapporté qu'une inactivation pharmacologique de TRESK par un traitement au long cours par du Tacrolimus ou de la Ciclosporine A provoquerait des céphalées semblables à des migraines<sup>5</sup>. D'autre part, la distribution majoritaire de TRESK dans les ganglions spinaux et neurones trigéminaux laisse penser qu'un composé sélectif de ce canal offrirait un profil de sécurité plus satisfaisant que les analgésiques opioïdes\* grâce à une action limitée à deux zones bien précises du système nerveux périphérique. En tant que canal potassique, son ouverture va provoquer une sortie massive d'ions K<sup>+</sup>, entraînant une hyperpolarisation des cellules nerveuses et donc un retardement dans l'émission par ces dernières de signaux

\* Les opioïdes sont des analgésiques forts utilisés en première intention dans les douleurs aiguës sévères, les douleurs chroniques cancéreuses, et en deuxième intention (pour la morphine et l'oxycodone) dans le traitement de certaines douleurs chroniques non cancéreuses. Leur marge thérapeutique est étroite et leurs effets indésirables nombreux (constipation, confusion, somnolence...) et parfois graves (pharmacodépendance, dépression respiratoire...).

nociceptifs. Le but des recherches effectuées sur cette cible au sein du laboratoire Pfizer Neusentis est donc de développer des ligands ouvreurs et sélectifs de TRESK, présentant de surcroît un bon profil de drugabilité\*. Pour le moment, l'état des connaissances ne permet pas le développement rationnel de nouveaux composés, dans la mesure où l'on est encore incapable d'expliquer le mode d'action des quelques composés actifs découverts jusque-là. La recherche repose donc exclusivement sur le screening de larges chimiothèques. Or, si certains domaines de recherche se prêtent bien aux techniques de screening à très haut débit grâce à des méthodes d'évaluations simples et reproductibles, ce n'est pas le cas dans le domaine des canaux ioniques (voir « méthodologies »). Dans ce contexte, toute nouvelle information concernant le site actif et les interactions qui régissent l'activité des ligands (ouvreurs comme bloqueurs) est intéressante, et le moyen le plus simple pour obtenir ces informations est d'établir une image « en négatif » de ce site actif grâce à une étude de relation structure activité de ligands connus tels que la FFA. Ce composé a été choisi comme pierre angulaire de l'étude car en plus d'être décrit dans la littérature comme ouvreur de K2P<sup>6</sup>, il s'agit d'un composé public, donc non confidentiel. La non-confidentialité des structures moléculaires créées était essentielle à la divulgation de ces résultats, non seulement dans la réalisation de ce document, mais également pour la publication à venir.

La problématique de ce travail était donc de comprendre quelles interactions régissent l'effet de la FFA sur TRESK, l'enjeu étant de pouvoir ensuite utiliser les connaissances de relation structure activité générées pour développer des dérivés ouvreurs à la puissance, l'efficacité, et la sélectivité optimisées.

\* Drugabilité : cet anglicisme décrit la capacité d'un composé à rassembler les caractéristiques physicochimiques dignes d'un futur principe actif, notamment en matière de solubilité, biodisponibilité, ou toxicité.

## II. Méthodologie

### a. Design des dérivés

La première étape de ce travail était d'émettre des hypothèses concernant la façon dont chaque groupement chimique potentiellement important de la FFA interagit avec le site actif, puis de valider ces hypothèses grâce à la création de ligands, dérivés très proches de la structure originale, dans lesquels chaque groupement chimique subit une modification. Les changements structuraux ainsi effectués doivent idéalement avoir le moins d'impact possible sur les propriétés physico-chimiques des composés (notamment la solubilité), tout en apportant un changement drastique dans leurs possibilités d'interaction avec le site actif.

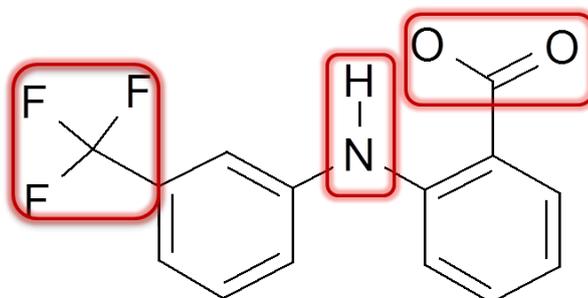
Il est important pour ce genre d'étude d'avoir en tête les 3 principaux types d'interaction ligand/cible :

- La liaison hydrogène (LH) : il s'agit d'une interaction de moyenne distance qui s'établit entre un groupement « donneur » de LH constitué d'un hétéroatome électronégatif (oxygène ou azote principalement) portant un hydrogène, et un autre hétéroatome électronégatif « receveur ». Les liaisons hydrogènes jouent un rôle important dans l'orientation du ligand au sein du site actif.

- Les interactions électrostatiques : il s'agit d'interactions longues distances intervenants entre deux groupes polaires ou chargés (interaction dipôle/dipôle ou liaison ionique). Ces interactions gouvernent l'approche du ligand vers le site actif.

- Les interactions hydrophobes : il s'agit d'interactions courtes distances intervenants entre plusieurs zones hydrophobes, dont le rapprochement est énergétiquement favorable dans la mesure où il permettra à ces zones de ne plus être en contact avec les molécules d'eau environnantes. Notons, dans ce groupe d'interactions, l'importance des interactions  $\pi$ - $\pi$  : interactions hydrophobes particulières survenant entre deux cycles aromatiques.

Ayant ces notions en tête, il est aisé de repérer les groupes de la FFA capables de fournir ces diverses interactions et dont des modifications structurales sont susceptibles d'apporter des informations sur la structure du site actif (Figure 1).



**Figure 1:** Groupements clés de l'acide flufénamique (FFA)

Notons que dans l'élaboration de ces dérivés, le profil de drugabilité n'était pas important dans la mesure où ces composés ne sont que des outils permettant de tester les hypothèses émises et ainsi progresser, petit à petit, dans la compréhension du site actif, ils n'ont pas vocation à devenir des candidats médicaments.

Une fois les composés imaginés, ils étaient commandés directement dans la chimiothèque de Pfizer, centralisée aux Etats-Unis, lorsqu'ils y étaient disponibles. Les composés qui n'y figuraient pas étaient commandés à une entreprise sous-traitante qui se charge de la synthèse de composés pour le compte de Pfizer Neusentis. Cette facilité d'acquisition de nouveaux composés simplifie considérablement ce type d'études, il est alors possible de tester un grand nombre d'idées, augmentant de ce fait les chances de succès. Au total, une soixantaine de composés ont ainsi été commandés puis testés sur TRESK.

### **b. Test des dérivés**

La seconde étape de ce travail a ensuite été l'évaluation de l'effet de chacun des composés sur les canaux TRESK. Trois principales méthodes sont utilisées chez Pfizer Neusentis,

différant chacune par leur débit et leur degré de précision. Ces méthodes sont décrites ici par débit décroissant :

- Le dosage au thallium : il s'agit de l'unique méthode optique utilisée au sein du laboratoire. Un fluorophore sensible au thallium est introduit dans des cellules HEK293 issues d'une lignée créée par l'équipe de biologistes de Pfizer Neusentis à l'aide du système T-REx<sup>TM</sup> (Life Technologies<sup>TM</sup>, USA), capables de surexprimer TRESK en réponse à une induction par de la Doxycycline<sup>\*</sup>. Ces dernières seront ensuite incubées dans un milieu contenant le composé à tester et des ions thallium. Si le composé test est un ouvreur de TRESK, les ions thallium rentrent dans la cellule par le canal ouvert et réagissent avec le fluorophore déjà présent, entraînant une fluorescence. Des ions thallium pouvant entrer dans la cellule indépendamment de l'ouverture de TRESK (par d'autres transporteurs de cations par exemple), le caractère ouvreur/bloqueur de TRESK pour un composé sera alors jugé en fonction du rapport du signal observé chez les cellules traitées par le composé sur celui observé chez les cellules non traitées. La simplicité de réalisation et le faible coût de cette méthode entièrement automatisable en font la méthode de criblage présentant le plus haut débit. Elle permet donc un premier tri parmi un grand nombre de composés, mais présente des limites quant à la qualité des informations ainsi recueillies. A l'issue d'un tel test il sera uniquement possible de dire si un composé augmente ou non l'entrée d'ions thallium dans une cellule exprimant TRESK. On peut alors supposer que le mécanisme passe par l'ouverture/fermeture de TRESK mais il n'est pas possible de l'affirmer, le composé pourrait aussi bien altérer la membrane des cellules ou ouvrir un autre canal, d'où la nécessité d'affiner ce premier test par des méthodes électro-physiologiques, plus fines mais également plus complexes et coûteuses.

\*Système T-REx<sup>TM</sup> : il s'agit d'un kit commercial permettant la création de lignées cellulaires à expression inductible d'un gène d'intérêt. Le plasmide transfecté contient le gène d'intérêt, placé sous le contrôle du répresseur Tet qui empêche son expression en l'absence de Tétracycline (ou de Doxycycline). Une fois ajoutée, la Tétracycline se lie au répresseur Tet qui se détache du site de répression, rendant alors l'expression du gène possible<sup>7</sup>.

- Le patch clamp automatique : il s'agit d'une adaptation automatique de la méthode du patch clamp manuel détaillé ci-après. Plusieurs types de plateformes automatiques existent (PatchXpress®, Qpatch®, IonWorks®Quattro™) et permettent un débit largement augmenté par rapport au patch clamp manuel tout en offrant plus d'informations que le dosage du thallium. Le débit de ces différentes plateformes est cependant inférieur à celui du dosage du thallium, et le coût de réalisation trop élevé pour permettre le criblage de grandes bibliothèques, d'où l'importance du premier tri. L'interprétation des résultats en électrophysiologie est souvent compliquée et doit être effectuée par des électrophysiologistes expérimentés, mais avec cette méthode il devient possible de savoir plus précisément si le composé altère la membrane, est toxique pour la cellule, ou sur quel type de canal il agit. L'activité des « hits » observés en patch clamp automatique est ensuite étudiée plus précisément en patch clamp manuel.

- Le patch clamp manuel : il s'agit du « gold standard » pour l'évaluation de l'effet d'un ligand sur un canal ionique. C'est un test fonctionnel permettant réellement de connaître l'effet d'un composé sur un canal au sein d'une cellule vivante. Si la réalisation de ce test est parfois un vrai challenge, le principe de base reste assez simple. L'idée est de mesurer le courant passant entre une électrode en contact avec le milieu intracellulaire d'une cellule surexprimant TRSK et une électrode de référence située dans le milieu extracellulaire. La mesure du courant repose sur la loi d'Ohm, qui stipule que l'intensité d'un courant traversant un dipôle électrique dépend de la différence de potentiel entre les deux pôles et de la résistance du milieu séparant ces deux pôles :

—

Avec  $U$  : différence de potentiel (V),  $R$  : résistance ( $\Omega$ ) et  $I$  : intensité (A)

Cette méthode considère la cellule comme un dipôle électrique avec une différence de potentiel entre le milieu intracellulaire et extracellulaire. En maintenant cette différence de

potentiel,  $U$ , fixe (exemple du patch clamp en voltage imposé), l'intensité du courant mesurée n'est alors plus dépendante que de la résistance entre les milieux intra/extracellulaires, elle-même proportionnelle au degré d'ouverture des canaux TRESK. Ainsi, l'ouverture des canaux TRESK entrainera une diminution de la résistance, et donc une augmentation du courant mesuré, et inversement.

Dans la réalisation, « l'introduction » de l'électrode dans le milieu intracellulaire est l'étape la plus délicate. En effet, cette étape nécessite d'approcher une micropipette, contenant l'électrode, de la membrane d'une cellule et d'appliquer une légère succion afin de plaquer cette dernière au bout de la pipette. La résistance de base enregistrée est uniquement due à l'étroitesse de la pipette, seul rempart au passage des électrons d'une électrode à l'autre dans le bain. Une résistance de base entre 2 et 3  $\Omega$  signale un diamètre de pipette idéal. Lorsque l'on plaque la membrane cellulaire au bout de la pipette, on observe une grande augmentation de la résistance devant atteindre le giga  $\Omega$ , valeur significative de la formation d'un sceau entre la pipette et la membrane. Le maintien de ce sceau tout au long de l'enregistrement est indispensable car il assure que le courant enregistré ne soit pas parasité par des électrons provenant du milieu extracellulaire. Une fois le sceau obtenu, une succion plus forte va entrainer la rupture de la membrane vers l'intérieur de la pipette, l'électrode qu'elle contient se retrouve alors en contact avec le milieu intracellulaire. Cette configuration dite en « cellule entière » enregistre le courant passant par tous les canaux potassiques de la cellule. Elle est particulièrement utile pour l'étude des canaux qui, comme TRESK, présentent un signal trop faible pour pouvoir être enregistré isolément. L'enregistrement du courant ainsi mesuré permet de voir en temps réel la façon dont le canal étudié réagit, on saura par exemple en fonction de l'allure de la courbe de quel type de canal il s'agit, ou si le composé testé endommage la membrane. Les deux électrodes utilisées permettant d'enregistrer des courants d'intensités très faibles

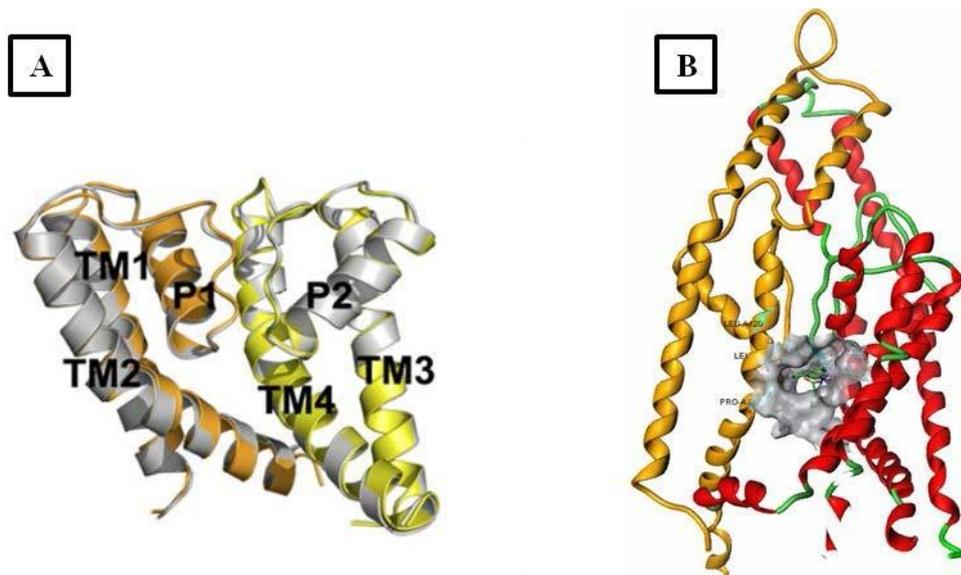
(généralement entre 250 et 1000 pA pour TRESK), la qualité des enregistrements est très dépendante de l'environnement et la moindre perturbation électronique sera source de bruit. Une bonne installation permet cependant de minimiser ce problème, et le principal facteur limitant de cette méthode reste la qualité des cellules. En effet la succion entraînant la rupture de la membrane peut être assez traumatisante pour la cellule et il est fréquent qu'elle ne survive pas ou que l'on perde le sceau au cours de cette étape, rendant impossible l'enregistrement. D'autre part, même si la cellule survit, il faudra qu'elle tienne suffisamment longtemps pour permettre de tester le ou les composés, sachant que l'application de chaque composé est suivie d'une phase de lavage. Un enregistrement type dure environ une demi-heure et seules des cellules de très bonne qualité peuvent tenir aussi longtemps une fois « patchées ». Ainsi, outre une certaine dextérité, le patch clamp manuel requiert surtout beaucoup de patience de la part du manipulateur. En général sur une semaine de travail seules deux ou trois journées apportaient des résultats exploitables qu'il fallait ensuite reproduire pour confirmer l'effet observé sur les cellules de la semaine d'après afin de s'affranchir du facteur « variabilité des cellules » dans les résultats. La qualité des cellules était parfois tellement variable qu'un composé pouvait montrer un jour un effet ouvreur et le lendemain un effet bloqueur, d'où la nécessité de reproduire chaque résultat.

### **c. Modélisation moléculaire :**

Enfin, la troisième étape de ce travail a été de m'appuyer sur les résultats biologiques obtenus pour effectuer une étude de modélisation moléculaire afin de générer une vue prédictive du site actif de la protéine et de la façon dont les ligands s'y amarrent. Aucune structure en trois dimensions (3D) n'étant disponible pour TRESK, un modèle par homologie avait été créé au laboratoire à partir des structures 3D connues de deux autres canaux potassiques : TWIK-1 et TRAAK. Le canal TRESK est constitué de deux sous-

unités homologues possédant chacune 4 domaines transmembranaires TM1 à TM4 et deux domaines P, P1 et P2, impliqués dans la formation du pore (Figure 2A). Les domaines P1 et P2 sont reliés aux autres domaines transmembranaires par des boucles P, et l'assemblage de ces boucles P forme le filtre de sélectivité permettant le passage spécifique des ions K<sup>+</sup>.

L'amarrage dans ce modèle de plusieurs ligands décrits dans la littérature comme ouvreurs de TRESK a permis d'élucider un site actif potentiellement impliqué dans cet effet ouvreur (Figure 2B). Ce site serait situé juste au-dessous des boucles P, entre le domaine TM4 d'une sous-unité et le domaine TM2 de l'autre sous-unité, et est couramment nommé « site de fenestration ». Plusieurs études de mutagénèses ont d'ailleurs identifié cette zone comme importante dans l'effet de ligands ouvreurs comme bloqueurs<sup>8</sup>. La FFA et ses dérivés ayant démontrés un effet biologique intéressant ont subi une étude d'amarrage dans cette zone de la protéine dans le but de valider ce site actif et d'identifier les groupements clés de la cible dans son interaction avec le ligand.

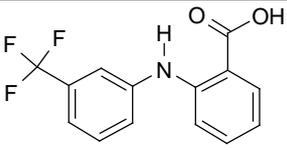
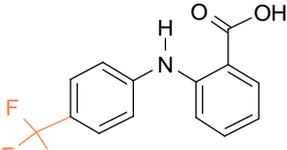
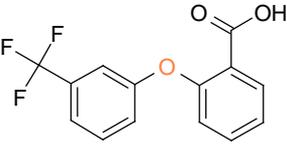
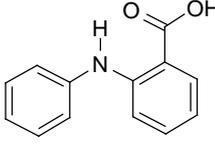


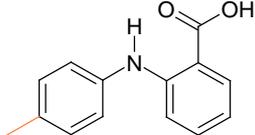
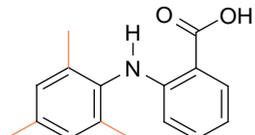
**Figure 2 :** A) Schéma descriptif d'une sous-unité de TRESK, adapté de (Kim, S. *et al*)<sup>8</sup> ; B) Canal TRESK entier, avec en gris le site de fenestration occupé par la FFA.

### III. Résultats

Seuls seront présentées dans ce mémoire les composés qui ont permis la progression vers une meilleure compréhension du site actif de TRESK. Chaque composé est présenté avec l'objectif ayant motivé son design, le résultat obtenu au patch clamp (Tableau 1) et les conclusions ou hypothèses faites aux vues des résultats. Chaque partie modifiée du composé est ici colorée en orange. Les phényles seront nommés par rapport à l'amine centrale en « phényle de gauche » et « phényle de droite ».

Les composés 1 à 5 ont été les premiers imaginés et testés, les résultats sont présentés dans le tableau 1.

COMPOSÉS	OBJECTIFS	RÉSULTATS	CONCLUSIONS
 FFA	Evaluer de l'effet ouvreur	66.49 %	La FFA possède bien l'effet ouvreur décrit dans la littérature
 1	Tester l'importance du positionnement du groupement CF3	10.02 %	L'effet ouvreur est moindre par rapport à la FFA, soulignant l'importance de la position <i>mé</i> ta du CF3
 2	Tester l'importance de l'amine reliant les deux cycles aromatiques	-6.45 %	L'effet ouvreur est nul pour ce composé, soulignant l'importance capitale de cette amine, probablement due à son caractère donneur de LH
 3	Tester l'importance du groupe CF3	3.99 %	L'effet ouvreur est nul pour ce composé, soulignant l'importance capitale du groupe CF3

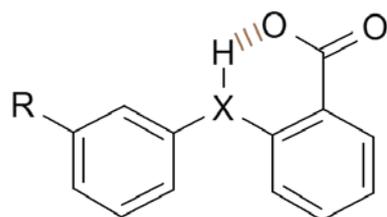
 4	Tester l'effet d'un enrichissement électronique du phényle de gauche	-6.60 %	Pour les composés dépourvus du CF <sub>3</sub> , on observe un effet bloqueur qui semble proportionnel au degré de substitution du phényle de gauche
 5	Idem 4	-76.06 %	

**Tableau 1 :** Résumé des tests des composés 1 à 5 (les résultats sont présentés en pourcentage d'augmentation du courant observé après application du composé)

Diverses hypothèses émanent de ce premier lot de composés :

- L'importance du groupement CF<sub>3</sub> en position *mé*ta du phényle de gauche suggère l'existence d'une poche hydrophobe sur le site actif devant impérativement être occupée par un substituant lipophile situé en position *mé*ta. Pour tenter de valider cette hypothèse et investiguer la taille de cette cavité, différents substituant seront testés à cette position.
- L'importance de l'amine centrale suggère l'implication d'une LH entre l'amine et un groupement receveur du site actif. Pour valider cette hypothèse, l'hydrogène porté par l'azote sera remplacé par d'autres substituant incapables de fournir cette interaction.
- Sera également évaluée l'importance de la contrainte conformationnelle impliquée par la LH intramoléculaire possible entre l'amine et l'oxygène du carbonyle (Figure 3). Ce type de contrainte peut en effet maintenir un composé dans une conformation plus active, mais l'implication de l'hydrogène dans une telle liaison

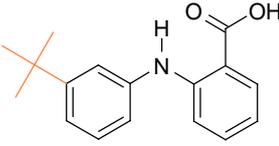
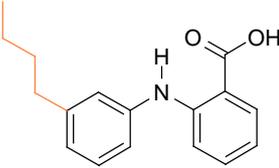
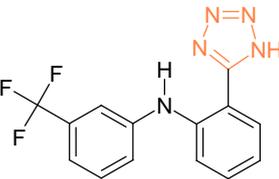
masquerait le potentiel donneur de LH de l'amine qui semble indispensable à l'activité (voir composé 2).



**Figure 3 :** Liaison hydrogène intramoléculaire possible chez les fénamates

Dans l'optique de vérifier ces nouvelles hypothèses, les composés 6 à 12 ont été commandés et testés (tableau 2).

COMPOSÉS	OBJECTIFS	RÉSULTATS	CONCLUSIONS
<p>6</p>	<p>Valider l'hypothèse de la LH entre l'amine et le site actif</p>	-3.00 %	Aucune activité. Confirme l'importance de l'hydrogène porté par l'azote dans l'activité ouvreure
<p>7</p>	<p>Tester l'importance de la contrainte conformationnelle</p>	-0.11 %	Aucune activité. La contrainte conformationnelle n'est donc probablement pas responsable de l'activité
<p>8</p>	<p>Tester la taille de la poche hydrophobe grâce à un groupement plus encombrant</p>	-55.18 %	Effet bloqueur
<p>9</p>	<p>Idem 9</p>	-32.60 %	Effet bloqueur

 <p>10</p>	<p>Tester la taille de la poche grâce à un substituant à peine plus encombrant que le CF3</p>	<p>184.08 %</p>	<p>Activité ouvreur beaucoup plus puissante que celle de la FFA</p>
 <p>11</p>	<p>Investiguer la profondeur de la poche hydrophobe</p>	<p>56.52 %</p>	<p>Activité ouvreur semblable à celle de la FFA</p>
 <p>12</p>	<p>Remplacement bioisostérique de la fonction acide carboxylique</p>	<p>171.34 %</p>	<p>L'activité ouvreur est semblable à celle du composé 10, bien supérieure à celle de la FFA.</p>

**Tableau 2** : Résumé des tests des composés 6 à 12 (les résultats sont présentés en pourcentage d'augmentation du courant observé après application du composé)

Ces composés ont apporté des précisions très intéressantes quant aux deux hypothèses formulées après le test de la première série de composés. Selon ces résultats, l'activité ouvreur de TRESK requiert du ligand :

- Qu'il soit capable de fournir une LH par le groupe central reliant les deux noyaux aromatiques, comme le confirme le composé 6.
- Qu'une cavité hydrophobe soit occupée par un groupement lipophile situé en position *mé*ta de l'amine. Les composés 8 et 9 suggèrent que la taille de cette cavité est limitée et que seuls des substituant de taille similaire au CF3 sont susceptibles d'y entrer et de fournir l'activité ouvreur, impliquant des possibilités d'optimisations limitées à ce niveau-là. Les résultats des composés 10 et 11 supportent cette hypothèse en montrant que d'autres substituant lipophiles de tailles

plus raisonnables peuvent entraîner une activité ouvreuse semblable (composé 11) et même bien supérieure (composé 10) à celle entraînée par le CF<sub>3</sub>. Notons que le groupe tertibutyle du composé 10 est légèrement plus encombrant et lipophile que le CF<sub>3</sub>, et donc susceptible d'offrir une meilleure occupation de la cavité hydrophobe du site actif qui pourrait expliquer la différence d'activité observée entre le composé 10 et la FFA.

Concernant la fonction acide portée par le phényle de droite, il s'est avéré difficile d'y toucher sans affecter la solubilité des composés, c'est pourquoi seul un remplacement biosostérique avec un groupe tétrazole a pu être effectué, les autres composés commandés (esters notamment) étant insolubles. Le composé 12 a révélé un deuxième site d'optimisation entraînant une grande augmentation de l'efficacité en tant qu'ouvreuse par rapport au FFA. Ce résultat montre que la fonction acide joue un rôle important dans l'effet ouvreuse de la FFA, probablement par des interactions électrostatiques ou des liaisons hydrogènes. Les deux optimisations ainsi révélées par les composés 10 et 12 permettent non seulement une augmentation de l'efficacité des ligands ouvreuses, mais également de leur puissance comme le montre le tableau 3 ci-dessous :

COMPOSES	CE50* (μM)
FFA	474.2
10	49.87
12	50.57

**Tableau 3:** Comparaison des CE50 entre les trois meilleurs ouvreuses

Les composés 10 et 12 possèdent chacun un CE50 dix fois plus petit que celui de la FFA, et sont donc dix fois plus puissants.

\* CE50 : La CE50, ou Concentration Efficace 50, représente la concentration nécessaire à l'observation de 50% de l'effet. Plus la CE50 est faible, plus le composé est puissant. L'efficacité d'un composé est quant à elle représentée par l'effet maximal observé pour un composé donné.

Tous les composés testés ont ensuite été ancrés dans le modèle de TRESK obtenu par homologie, et parmi les différentes positions d'ancrages observées pour les ligands ouvreurs, une seule position rassemblait toutes les interactions identifiées comme nécessaires à l'activité ouvreur selon les résultats biologiques. Cette position d'ancrage se situe à une zone clé de la protéine, juste au-dessous de la boucle P formant le pore et implique une interaction avec 6 acides aminés de TRESK (voir la figure 4A de l'article en anglais) :

- La leucine 321, qui accepte la LH donnée par l'amine.
  
- Les thréonines 322 et 323, impliquées dans des liaisons hydrogènes avec la fonction acide portée par le « phényle de droite ».
  
- La leucine 138, l'isoleucine 141 et la proline 142, qui forment la poche hydrophobe occupée par le groupe lipophile situé en position *mé*ta de l'amine.

On note également que parmi les trois substituant lipophiles en *mé*ta capables d'entraîner un effet ouvreur, le tertio-butyle est bien celui qui occupe le mieux l'espace fourni par la cavité hydrophobe dans cette position d'ancrage (voir la figure 4 de l'article en anglais).

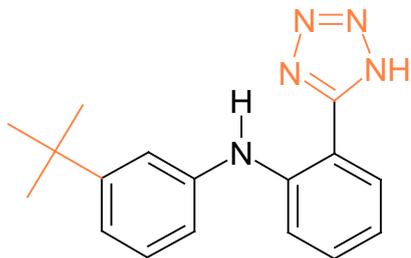
Enfin, les résultats des composés 4 et 5 suggèrent que plus on augmente la densité électronique du phényle de gauche, plus on obtient un effet bloqueur, révélant la possible implication d'une interaction de type  $\pi$ - $\pi$  entre le phényle de gauche et un autre phényle du site actif. Cette interaction pourrait également expliquer l'effet bloqueur observé chez les composés 8 et 9. Une interprétation de ces résultats pourrait être qu'en l'absence d'un groupement lipophile en *mé*ta capable d'occuper la cavité hydrophobe du site actif, le composé ne peut se positionner correctement pour avoir un effet ouvreur et va aller interagir avec d'autres acides aminés du site actif qui seraient responsables de l'effet bloqueur. Il se trouve que lorsque l'on effectue l'étude d'amarrage pour ces 4 composés

bloqueurs de TRESK, tous adoptent la même position dans laquelle le phényle de gauche est tourné vers le bas du site actif prédictif de l'effet ouvreur, où il peut établir des liaisons  $\pi$ - $\pi$  avec 3 résidus phénylalanines (Phe-145, Phe-352, Phe-355). Il est intéressant de noter que ces résidus phénylalanines ont été identifiés par Kim S. *et al.* comme faisant partie du site actif pour l'effet bloqueur<sup>8</sup>.

Il ne s'agit bien entendu que d'une vue prédictive du site actif et l'emploi d'un modèle par homologie pousse forcément à appréhender ces résultats avec une certaine prudence, mais la convergence générale de toutes les données permet un certain optimisme quant à la cohérence de ce site actif et des interactions dévoilées. La validation définitive de cette théorie ne sera possible que lorsque la structure 3D de la protéine sera enfin élucidée. En attendant, d'autres expériences pourraient venir soutenir, ou au contraire invalider ces résultats, comme notamment des expériences de mutagenèse ciblée qui permettraient de voir si le remplacement d'un de ces acides aminés par un autre altérerait l'effet d'un des ligands ouvreurs. La faisabilité de ce type d'expérience a été discutée, lors d'un déplacement fait à l'université d'Oxford pour présenter ce travail, à Stephen J. Tucker, spécialiste des canaux ioniques et de TRESK. Ce dernier a exprimé des craintes quant à l'interprétation des résultats d'une étude de mutagenèse sur des acides aminés situés à un endroit aussi critique pour le fonctionnement intrinsèque du canal. Il est selon lui presque impossible qu'une mutation d'un de ces acides aminés n'entraîne pas une modification du fonctionnement de TRESK, ce qui rendrait les résultats ininterprétables. Il n'est donc pas certain que cette étude soit réalisée dans le futur, et l'approche purement chimique réalisée durant ce travail sera pour l'instant privilégiée.

La cohérence des hypothèses présentées dans ce travail continue donc à faire l'objet d'investigations au sein de l'équipe d'électrophysiologie de Pfizer Neusentis, notamment par le test d'un composé (figure 4) reprenant les deux optimisations des composés 10 et 12

pour évaluer la puissance et l'efficacité qu'il est possible d'atteindre grâce à ces optimisations.



**Figure 4** : Composé 13, en cours d'investigation

TITRE :

**INVESTIGATION DE LA RELATION STRUCTURE ACTIVITE DE L'ACIDE  
FLUFENAMIQUE ET DE SES DERIVES EN TANT QU'ACTIVATEURS DU  
CANAL TRESK HUMAIN**

## CONCLUSION

---

L'association de données biologiques et de modélisation moléculaire a permis de proposer des hypothèses plausibles de mode d'action pour l'effet ouvreur et bloqueur de ligands de TRESK. La vue prédictive du site actif a notamment permis de souligner l'importance de 6 acides aminés potentiellement impliqués dans l'effet ouvreur, et 3 acides aminés dans l'effet bloqueur. Si l'existence des interactions sus-décrites s'avère confirmée par les prochains composés testés, alors cette vue prédictive du site actif de TRESK apportera un bon point de départ pour un développement rationnel de nouveaux candidats médicaments. Cela constituerait un grand pas en avant dans ce domaine où les méthodes de screening n'apportent pas pour l'instant de résultats satisfaisants.

Ce domaine de recherche est d'autant plus stimulant que l'apport d'une nouvelle classe de médicament, à la fois efficace et sûre, viendrait renforcer un arsenal thérapeutique qui reste insuffisant pour de nombreux patients victimes par exemple de douleurs osseuses métastatiques<sup>9</sup>, de douleurs neurogènes réfractaires, ou encore simplement de migraines où seuls 36% des patients sont satisfaits par leur prise en charge médicamenteuse<sup>10</sup>. Dans ce

contexte, un marché important semble disponible au premier industriel qui réussira à mener un tel médicament au bout du processus de mise sur le marché. Cependant, le faible taux de réussite des modulateurs de canaux ioniques en phases cliniques<sup>1</sup> et les difficultés rencontrées pour des composés pourtant prometteurs<sup>11</sup> tendent à tempérer l'optimisme des laboratoires et risque à terme de leur faire perdre confiance dans ce domaine de recherche si le succès tant attendu venait à trop tarder. Si les raisons de ces échecs ne sont pas toujours clairement identifiées, il s'agit souvent d'un manque d'efficacité\* et/ou d'effets indésirables imprévus, problèmes courants et malheureusement souvent imprévisibles lors du passage des phases précliniques aux phases cliniques.

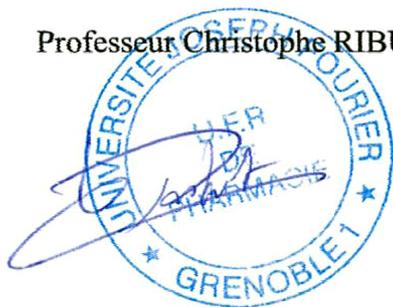
\* Exemple du Flindokalner, un modulateur de canaux potassiques développé comme traitement de l'accident vasculaire cérébral, et de CE-224535, un antagoniste du canal P2X<sub>7</sub> développé comme traitement de l'arthrite.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 05 Novembre 2013

LE DOYEN

Professeur Christophe RIBUOT



LE PRESIDENT DE LA THESE

Professeur AHCÈNE BOUMENDJEL

A handwritten signature in black ink, reading "AHCÈNE BOUMENDJEL".

# BIBLIOGRAPHIE

---

1. Bagal, S. K. *et al.* Ion Channels as Therapeutic Targets: A Drug Discovery Perspective. *J. Med. Chem.* (2012).
2. Marsh, B., Acosta, C., Djouhri, L. & Lawson, S. N. Leak K<sup>+</sup> channel mRNAs in dorsal root ganglia: Relation to inflammation and spontaneous pain behaviour. *Molecular and Cellular Neuroscience* **49**, 375–386 (2012).
3. Lafrenière, R. G. & Rouleau, G. A. Migraine: Role of the TRESK two-pore potassium channel. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 1533–1536 (2011).
4. Lafrenière, R. G. *et al.* A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat. Med.* **16**, 1157–1160 (2010).
5. Ferrari, U. *et al.* Calcineurin inhibitor-induced headache: clinical characteristics and possible mechanisms. *Headache* **45**, 211–214 (2005).
6. Guinamard, R., Simard, C. & Del Negro, C. Flufenamic acid as an ion channel modulator. *Pharmacol. Ther.* **138**, 272–284 (2013).
7. Yao, F. *et al.* Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* **9**, 1939–1950 (1998).
8. Kim, S. *et al.* Identification of blocker binding site in mouse TRESK by molecular modeling and mutational studies. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 1131–1142 (2013).
9. Laird, B. J. A. *et al.* Characterization of cancer-induced bone pain: an exploratory study. *Support Care Cancer* **19**, 1393–1401 (2011).
10. MacGregor, E. A., Brandes, J. & Eikermann, A. Migraine Prevalence and Treatment Patterns: The Global Migraine and Zolmitriptan Evaluation Survey. *Headache: The Journal of Head and Face Pain* **43**, 19–26 (2003).
11. Kort, M. E. & Kym, P. R. *Progress in Medicinal Chemistry* **51**, 57–70 (2012).

# ARTICLE EN ANGLAIS SUR LEQUEL REPOSE LA THÈSE

---

## Investigation of the structure activity relationship of flufenamic acid derivatives as human TRESK openers

*Aymeric Monteillier, Kiyoyuki Omoto, David C.Pryde, Edward B. Stevens*

Pfizer Neusentis, The Portway Building, Granta Park, Great Abington, Cambridge, CB21 6GS, U.K.

**Abstract:** TRESK (Twik Related Spinal cord K<sup>+</sup> channel) is a member of the Twin Pore Domain K<sup>+</sup> channel (K2P) family responsible for regulating neuronal excitability in dorsal root ganglion (DRG) and Trigeminal Neurons (TG), peripheral neurons involved in pain transmission. As channel opening causes an outward K<sup>+</sup> current responsible for cell hyperpolarisation, TRESK represents a new interesting target for pain treatment. However, as no crystal structure exists for this K2P, the mechanisms involved in the opening effect of some ligands are still poorly understood, making the conception of new potent selective openers challenging. In this work we propose a Structure Activity Relationship (SAR) of the known TRESK opener Flufenamic acid (FFA) and some derivatives, investigating the biological effects of chemical modifications and using a human-TRESK (hTRESK) homology model to support the biological results. A plausible binding mode resulted from this study for the tested openers, providing the first predictive view of a hTRESK opener binding site.

### Introduction:

Ion channels are transmembrane proteins forming a pore allowing an often highly selective passive flow of ions across the membrane of all cells in the human body. This transport is crucial to the establishment and control of potential difference across the membrane (resting potential), where changes in voltage can involve a wide range of cell responses, such as depolarisation or hyperpolarisation of sensory neurons. Their implication in many different clinical states such as pain hypersensitivity, insensitivity and migraine had made ion channels very interesting new targets for drug discovery.

Ion channels are classified regarding their ion selectivity, leading to five major classes: sodium, calcium, chloride, potassium and unspecific cation channels<sup>1</sup>. Among the potassium channel family are the Twin Pore Domain potassium channel subfamily, containing 15 members expressed in neurons, muscle cells and endocrine cells.

The work in this paper is focused on TRESK, a K2P channel mainly expressed in DRG neurons and TG neurons, peripheral sensory neurons having respectively a key role in pain transmission and migraine. Of all K2P's expressed in DRG's, TRESK has been shown to be the most abundant<sup>2</sup> where knockout leads to an enhancement of DRG neuron excitability in rat<sup>3</sup>. Activation of TRESK

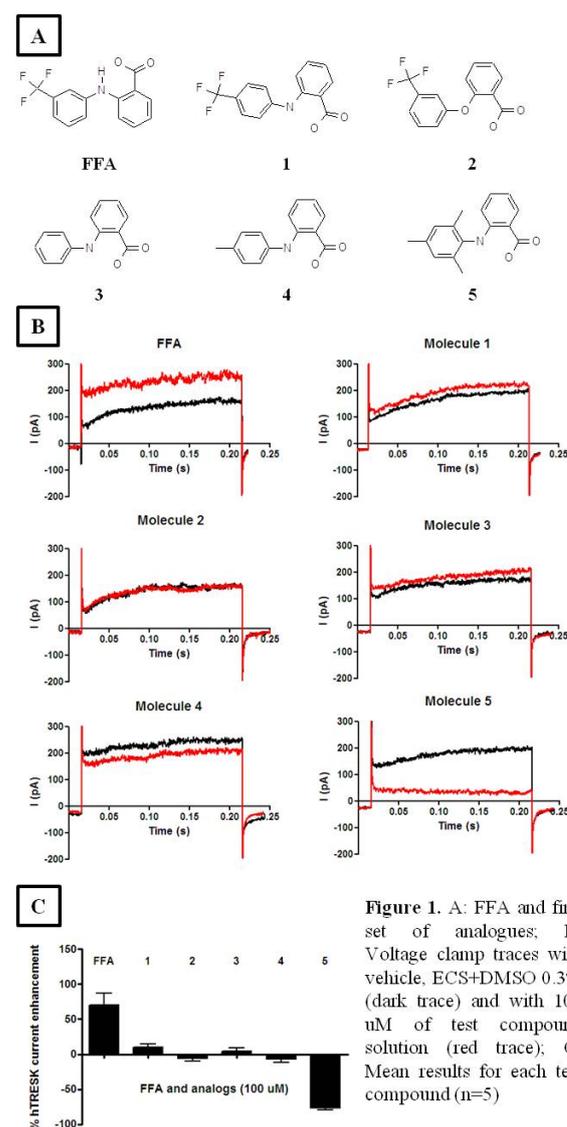
using pharmacological openers gives rise to outward currents responsible for a hyperpolarisation of the neuron cells, inhibiting its excitability and thus pain transmission. Moreover, a specific mutation of KCNK18, the gene coding for TRESK, has been related to a congenital form of migraine with aura<sup>4</sup>. Interestingly, an indirect long term inhibition of this K2P by cyclosporin A or tacrolimus, two immunosuppressant drugs administrated after organ transplant, have been shown to induce new migraine-like headache syndromes<sup>5</sup>. As most neurological pain condition still represents an unmet medical need, finding new potent and selective TRESK openers could provide an extremely interesting alternative to current pain treatments.

The physiological activation of TRESK is described in the literature as an indirect mechanism, mainly mediated by the intracellular Calcium concentration, as its elevation will activate calcineurin responsible for the dephosphorylation of two intracellular serine residues that downregulate the channel activity when phosphorylated<sup>6</sup>. However, this channel can also be modulated via direct interaction with either openers, such as flufenamic acid (FFA) or blockers, such as lidocaine, quinine or propafenone<sup>7</sup>. As the crystal structure of TRESK has not been elucidated yet, little is known about the binding site of these ligands, which makes the discovery of new interesting molecules difficult. In this context, it seems crucial to know more about the openers binding site and interaction mode, and a good way to obtain this knowledge is to build knowledge of structural modifications of known ligands and assess how these modifications affects their activity.

A list of diverse molecular analogues of FFA were designed and tested on hTRESK expressing cells using a voltage patch clamp assay. Finally, a hTRESK homology model was built and used to dock active compounds to provide support for building hypotheses of the molecular basis of the observed structure activity relationships.

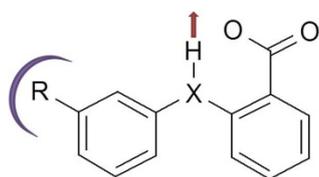
## Results:

The first step was to design analogues of FFA with simple modifications of the functional groups likely to be involved in opener activity. A first set of molecules was designed to explore hypotheses of binding that included the nature of the central heteroatom linker between the two aromatic rings and the aryl group substitution (Figure 1 A) and tested for their hTRESK opener activity (Figure 1 B and C).



Interestingly, the first results showed that minor modification can lead to important changes in the activity. Indeed, none of the initial set of analogues were openers, however, some compounds were acting as TRESK blockers. For instance, simply moving the trifluoromethyl group of FFA to the *para* position in molecule 1 or to remove

it in molecule 3 involved a dramatic loss of activity, suggesting the existence of a lipophilic cavity, which if filled appropriately, was crucial to opener activity. Swapping the amine linker with an oxygen atom removed the opener activity, suggesting that the amine was crucial to activity, hypothetically due to its hydrogen bond donor (HBD) properties. Finally, for the molecules that didn't have the trifluoromethyl group, it appeared that the more methyl substituents on the phenyl ring, the more blocking activity they produced. A preliminary SAR hypothesis resulted from this first set of molecules (Figure 2), involving at least one HB provided by the amine linker and a hydrophobic interaction provided by the *meta* substituent, and was developed by further investigations.



R: hydrophobic group (trifluoromethyl)  
X: hydrogen bond donor (amine linker)

Figure 2. Preliminary SAR hypothesis for fenamate TRESK openers

Therefore, a second set of analogues was designed (Figure 3 A) with structures aiming to rationalize the consistency of the SAR hypothesis. Molecules 6 and 7 were designed in order to understand whether the importance of the amine was due to its HBD properties with the binding site or within the molecule through an intramolecular hydrogen bond (HB) that could constrain its conformation. Molecules 8, 9, 10 and 11 were designed in order to support the hypothesis of a binding site cavity to be filled by a *meta* substituent and to investigate its depth.

According to the results (Figure 3 B and C), molecules 6 and 7 showed no activity at all, supporting that the FFA opener activity involves a HB with the binding site and that conformational constraint is not essential. Interestingly, molecules 8 and 9 showed a blocking activity, suggesting that the size of the opener cavity to be filled by a *meta* substituent is not big enough to accept a phenyl moiety. Molecules 10 and 11 both showed an opener effect, either equivalent to

FFA for molecule 11, or greater for molecule 10 with a 10 fold

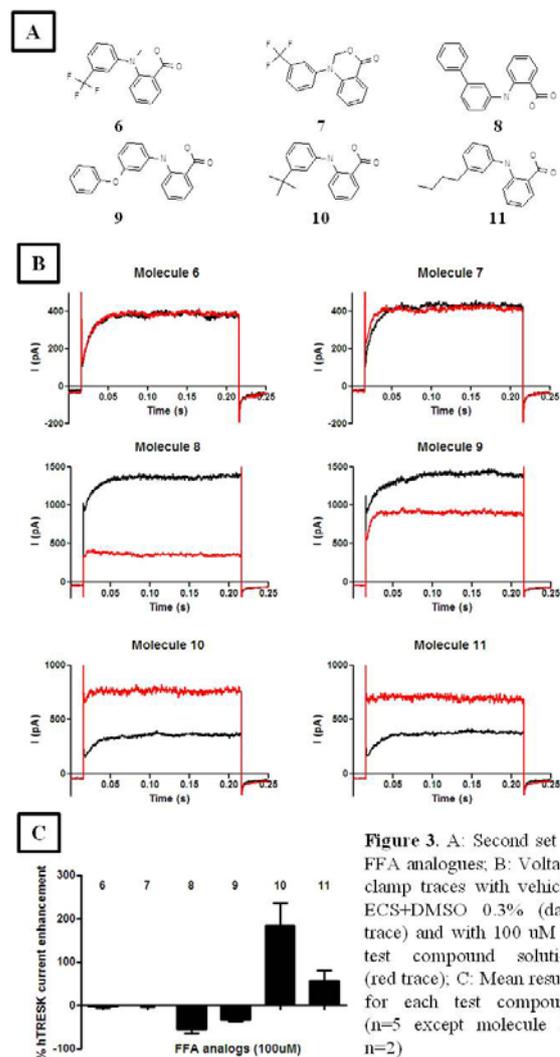


Figure 3. A: Second set of FFA analogues; B: Voltage clamp traces with vehicle, ECS+DMSO 0.3% (dark trace) and with 100 nM of test compound solution (red trace); C: Mean results for each test compound (n=5 except molecule 11 n=2)

increase in potency (Table 1), supporting the pocket theory by showing that the more the substituent matched the pocket, the greater the opener activity and that a *tert*-butyl group matched the pocket well.

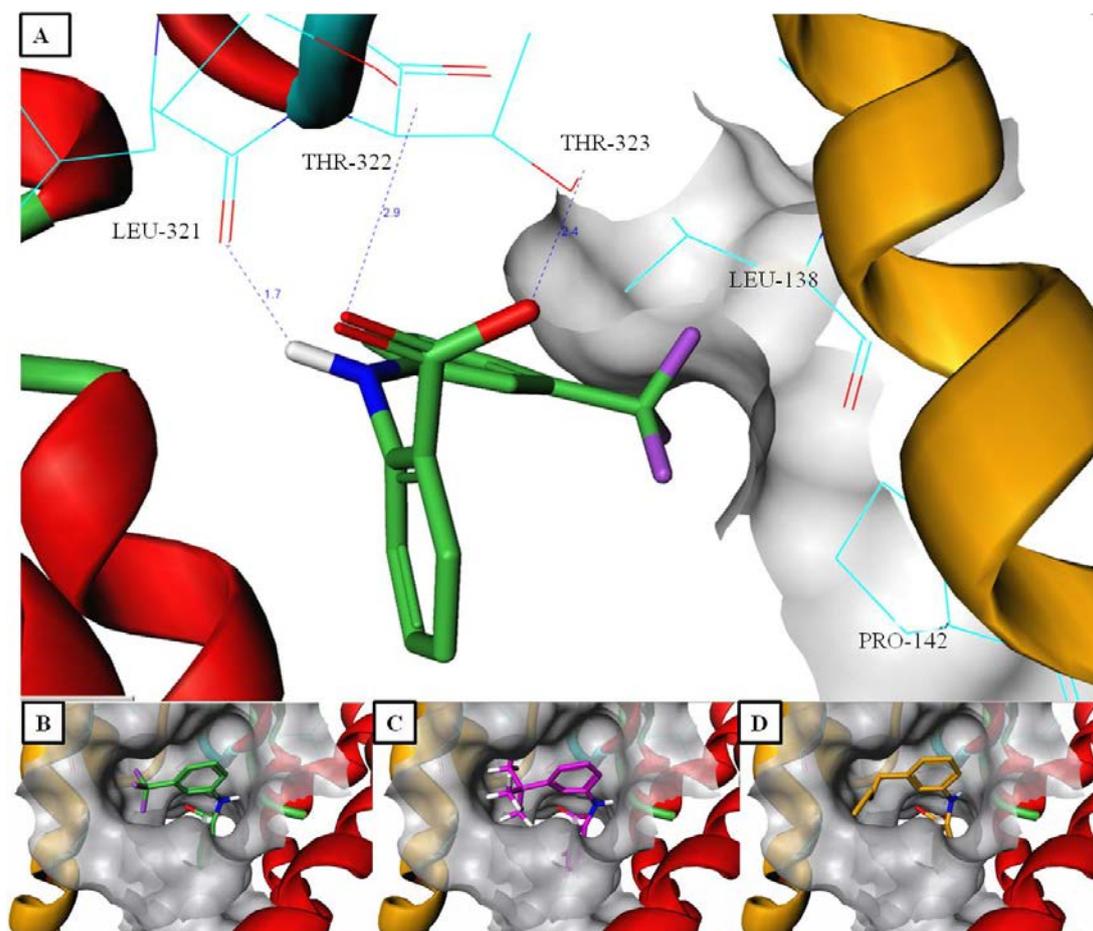
Name	EC50 (uM)
FFA	474.2
Molecule 10	49.87

Table 1. Comparison between molecule 10 and FFA EC50 (n=3)

To support these biological results, FFA and its derivatives were docked into a TRESK homology model built using the published structure of TRAAK and TWIK-1 in order to provide a better understanding of the binding site shape and the residues likely to be involved in the interaction with openers

(Figure 4). In this model, the molecules showing an opener

None of the other docked molecules were able to satisfy all such interactions. Using



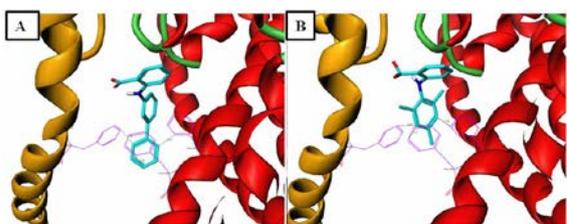
**Figure 4.** A: Representation of the predictive FFA binding mode with the different hTRESK residues (view from inside the pore); B, C, D: Focus on the binding site cavity filling for respectively FFA, Molecule 10, and Molecule 11.

effect on hTRESK docked similarly, highlighting possible key residues of a putative fenamate opener binding site located adjacent to Leu-321, involved in the HB provided by the amine linker, Thr-322 and Thr-323, both involved in HBs with the carboxylic acid moiety, and Leu-138, Ile-141, and Pro-142, forming the hydrophobic pocket filled either by the trifluoromethyl, the

this binding site hypothesis, a possible docking position was also highlighted that could explain the increase in blocking activity when the aromatic ring electronic density is increased, involving three phenylalanine residues Phe-145, Phe-352 and Phe-355 (Figure 5).

### Discussion and conclusion:

The combination of biological results and molecular modelling allowed a possible fenamates opener binding site to be proposed, showing good predictivity for ligands with improved efficacy compared to FFA. Although the opening mechanism is still poorly understood for TRESK, we can hypothesize that FFA and its opener derivatives act through a stabilization of an open state where the transmembrane (TM) domains TM4 (in red) and TM2 (in yellow)



**Figure 5.** Possible interaction mode for molecule 8 (A) and molecule 5 (B), two blockers FFA derivatives.

*tert*-butyl or the *n*-butyl groups (Figure 5).

of each subunit remain distant to each other. We also showed SAR suggesting that the opener binding site cavity had a limited size, potentially restricting the possibilities of further optimization at this region of the binding site. In addition, the six residues highlighted here are pretty well conserved in all K2Ps, especially in TREK-1, TRAAK, and TREK-2 where FFA's opener activity is described in literature<sup>8</sup>.

The blocking effect is more complicated to explain as a lot of different molecules act as blockers and may not share the same binding site. However, if they do so, as their structural similarity tends to suggest, it could be through a  $\pi$ - $\pi$  interaction with three phenylalanine residues Phe-145, Phe-352 and Phe-355, resulting in the bringing together of the TM4 and TM2 subunits, stabilizing the closed state. Interestingly, mutating both Phe-145 and Phe-352 shown an important decrease in lidocaine, bupivacaine and quinine blocker activity<sup>7</sup>, supporting the hypothesis of their involvement in the blocker activity.

In summary, a plausible homology model has been developed to provide good support of the experimental voltage clamp results through proposing a plausible fenamate opener binding site. In the future it would be interesting to further evaluate this model results with for example a mutagenesis study directed to the key residues highlighted above.

## Experimental section:

### Compound design and purchase

All compounds were obtained from the Pfizer General Compound Library. The different compound solutions were stocked in DMSO and diluted in ECS before patching with a final DMSO concentration fixed at 0.3%.

### Cell culture

The cells used for patching were from a HEK293 cell line with inducible hTRESK expression. Cells were plated out onto 12 mm coverslips one or two days prior to patching and induced at least 12 hours before patching with 1.5  $\mu$ L of a solution of Doxycycline at 1 mg/mL for each coverslip.

### Electrophysiology

Recordings were carried out at room temperature and currents were recorded using whole cell recording methods with a patch clamp amplifier (Axopatch 200, Axon Instruments, Union City, CA), digitized at 5 kHz and low pass filtered at 2 kHz. Analysis was performed with pCLAMP 10.2 (Axon Instruments) and Graphpad Prism version 5 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Series resistance was typically less than 10M $\Omega$  and compensated at 70%. Glass pipettes were prepared with a pipette puller NARISHIGE PC-10 and had a resistance of ~2-3 M $\Omega$ . Pipette solution contained (mM): 130 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 BAPTA, 5 MgATP, and 10 HEPES (pH 7.2-7.3; Osmolarity: 300-310 mOsm) and extracellular solution (ECS) contained (mM): 148 NaCl, 5 KCL, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 Glucose and 10 HEPES (pH: 7.2-7.3; Osmolarity: 320-330 mOsm). The voltage step protocol was run every 5 seconds and consisted from a depolarizing step from -80 mV to 0 mV, followed by and hyperpolarization to -100 mV and a ramp to 80 mV. The current was quantified at the end of the step to 0 mV. The current was always measured with first ECS only followed by ECS+DMSO 0,3 % in order to check the impact of DMSO on the recording. A selective hTRESK opener from Pfizer was used as a positive control and applied at first to be sure that each tested cell actually expressed hTRESK.

The enhancement was calculated using the following formula:

---

Where  $I_{test}$  is the K<sup>+</sup> current recorded before application of the test compound and  $I_{control}$  is the current recorded once stabilized after the compound is added.

The opening activity of FFA was tested on HEK293 cells in the absence of TRESK expression (non-induced), showing no significant differences of current amplitude before and after FFA application.

The EC<sub>50</sub>s determination were conducted in manual patch clamp like the other

experiments, with 5 concentrations (3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 300  $\mu$ M). The analysis and calculations were done on Graphpad Prism version 5 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

#### **Creation of Homology model of TRESK**

The sequences of all K2P channels were obtained from a search of UniProtKB. The sequences were aligned with the program MAFFT. Gaps in the helix regions were manually corrected. The crystal structures of TRAAK and TWIK-1 were used as templates for homology modelling of TRESK. Using the sequence alignment, 3D structure models were generated using the program Modeller. A total of 50 models were created, which differed from each other in the structure of a potential binding site, i.e., dihedral angle of residues. Considering that the structures of the family of channels have C2 symmetry, for all models the symmetric strain was applied. All models were subjected to minimization with OPLS-AA force field (Schrodinger BatchMin).

#### **Molecular docking study**

Grid files were generated for the 50 TRESK model structures. The center of the grid is located in the fenestration site, for which several studies have suggested that mutagenesis of some residues in the area affect activity for some potassium channel openers. 3D structures of ligands were docked to all 50 homology models with one docking trial creating 10 docking poses. As a result, at most 500 docking poses were generated. Confidence of docking poses were evaluated based on eyeball analysis for to what extent docking poses were conserved for the 10 top docking poses. Finally the best docking poses were selected, which were used for subsequent discussion.

#### **Corresponding author information:**

\*Phone: +33 (0) 683450300.

Email: [a.monteillier@gmail.com](mailto:a.monteillier@gmail.com).

**Note:** the authors declare no competing financial interest.

#### **Acknowledgment:**

The authors would like to thank Dr. Lishuang Cao, Dr. Alexandre Loucif, Dr. Pierre-Philippe Saintot, and all the electrophysiology team for their technical skills and support, and Dr. Prafulla Aryal for insightful discussion about K2P channel gating.

#### **Abbreviations used:**

K2P, Twin pore potassium channel; TRESK, twik related spinal cord K<sup>+</sup> channel; DRG, dorsal root ganglion; TG, trigeminal; SAR, structure activity relationship; FFA, flufenamic acid; hTRESK, human-TRESK; HB, hydrogen bond; HBD, hydrogen bond donor; TM domain, transmembrane domain.

#### **References:**

1. Hübner, C. A.; Jentsch, T. A. Ion Channel Diseases. *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11* (20), 2435-2445.
2. Marsh, B.; Acosta, C.; Djouhri, L.; Lawson, S. N. Leak K<sup>+</sup> channel mRNAs in dorsal root ganglia: Relation to inflammation and spontaneous pain behaviour. *Molecular and Cellular Neuroscience.* **2012**, *49* (3), 375-386.
3. Tulleuda, A.; Cokic, B.; Callejo, G.; Saiani, B.; Serra, J.; Gasull, X. TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury. *Mol Pain.* **2011**, *7*, 30.
4. Lafrenière, R. G.; Cader, M. Z.; Poulin, J-F.; Andres-Enguix, I.; Simoneau, M.; Gupta, N.; Boisvert, K.; Lafrenière, F.; McLaughlan, S.; Dubé, M-P.; Marcinkiewicz, M. M.; Ramagopalan, S.; Ansorge, O.; Brais, B.; Sequeiros, J.; Pereira-Monteiro, J-M.; Griffiths, L. R.; Tucker, S. J.; Ebers, G.; Rouleau, G. A. A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat.Med.* **2010**, *16* (10), 1157-1160.
5. Ferrari, U.; Empl, M.; Kim, K. S.; Sostak, P.; Förderreuther, S.; Straube, A. Calcineurin inhibitor-induced headache: clinical characteristics and possible mechanisms. *Headache.* **2005**, *45*, 211-214.
6. Czirják, G.; Tóth, Z. E.; Enyedi, P. The two-pore domain K<sup>+</sup> channel, TRESK, is activated by the cytoplasmic calcium

- signal through calcineurin. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (18), 18550-18558.
7. Kim, S.; Lee, Y.; Tak, H-M.; Park, H-J.; Sohn, Y-S.; Hwang, S.; Han, J.; Kang, D.; Lee, K. W. Identification of blocker binding site in mouse TRESK by molecular modelling and mutational studies. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, 1828 (3), 1131-1142.
  8. Takahira, M.; Sakurai, M.; Sakurada, N.; Sugiyama, K. Fenamates and diltiazem modulate lipid-sensitive mechano-gated 2P domain K(+) channels. *Pflugers Arch.* **2005**, 451 (3), 474-478.