Avis de Soutenance

Monsieur Damien BRETAGNE

Biologie

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

Conception rationnelle de S-Glycosyltransférases à façon issues d'Arabidopsis thaliana : de la modélisation aux applications thérapeutiques et cosmétiques.

dirigés par Monsieur Pierre LAFITE et Monsieur Richard DANIELLOU

Ecole doctorale : Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant - SSBCV
Unité de recherche : ICOA - Institut de Chimie Organique et Analytique

Soutenance prévue le ***mardi 13 décembre 2022*** à 9h00
Lieu : IRD - 5 Rue du Carbone - 45100 Orléans
Salle : AMPHI

Composition du jury proposé

M. Pierre LAFITE	Université d'Orléans	Directeur de thèse
Mme Christelle BRETON	Université de Grenobles Alpes	Rapporteure
Mme Corrine MIRAL	Université Nantes	Rapporteure
Mme Céline LANDON	CNRS	Examinatrice
M. Richard DANIELLOU	AgroParisTech	Co-directeur de thèse
M. Gerd WAGNER	Queen's University of Belfast	Examinateur

Mots-clés : Enzyme, Chimere, S-glycosyltransferases

Résumé :

L'ingénierie enzymatique dans la synthèse des glycosides a été utilisée avec succès pour améliorer la vitesse, la sélectivité, voire modifier le mécanisme enzymatique vers de nouvelles réactions (transglycosidase, thioglycoligase, …). Cependant, lorsque la structure du produit glycosidique visé doit être modifiée (structures du sucre et/ou de l'aglycone, nature de la liaison glycosidique), cela nécessite souvent l'identification d'une nouvelle enzyme, qui doit ensuite être modifiée par ingénierie protéique pour fournir le biocatalyseur désiré. Dans le cadre de ce projet, nous visons à fournir une approche modulaire pour générer des biocatalyseurs sur mesure, basés sur la structure du glycoside ciblé. Pour répondre à cet objectif, nous avons basé cette méthodologie sur la structure particulière des glycosyltransférases de la famille GT-B, qui sont composées de deux domaines séparés se faisant face ; chacun d'eux se liant sélectivement au donneur de sucre (C-ter) ou au composé accepteur (N-ter). En nous appuyant sur des travaux fondateurs qui ont prouvé la faisabilité d'échanger des domaines et de générer des chimères actives, nous avons cherché à proposer une approche modulaire complète basée sur la co-expression de domaines séparés et à leur assemblage dans l'hôte d'expression. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la production de domaines de GT-B à partir de 4 enzymes (UGT74B1, UGT74C1, UGT51, UGT78G1) issues de 3 organismes différents. En réalisant la co-expression des différents domaines, 8 enzymes sous forme de dimères ont été conçues. La mise au point et l'optimisation des différentes étapes de clonage, production, et purification ont permis l'obtention de 6 des 8 enzymes dimériques. Parmi ces dernières, la N(B1)//C(C1) composée des domaines accepteurs N-terminal UGT74B1 et du domaine C-terminal UGT74C1 est la seule à avoir présenté une activité catalytique. Cette enzyme a été caractérisée, criblée pour la glycosylation de nombreux substrats, modélisée et comparée avec l'enzyme UGT74B1. À la suite du criblage et de la modélisation, N(B1)//C(C1) présentait une sélectivité de substrat plus large qui pourrait être attribuée à une interface plus flexible entre les deux domaines. De même, la non-activité d'une des enzymes dimériques N(B1)//C(B1) est due à une reconformation des domaines démontrée par des analyses de dénaturation thermique. Enfin, l'étude de l'influence du lien inter-domaines a été étudiée en réalisant l'enzyme N(B1)-C(C1) et en comparant les différentes caractéristiques enzymatiques et de synthèse de S- et O-glycoside. Ces premiers essais préliminaires s'avèrent très prometteurs pour la validation du concept de formation de GT modulaires par co-expression de domaine afin de générer des biocatalyseurs sur mesure et ouvrent la voie à une nouvelle approche d'ingénierie biocatalyseur pour la synthèse des glycosides. Mots clés : Glycosyltransférase, glycoconjugué, échange de domaine, chimère, co-expression.