



Avis de Soutenance

Monsieur Skander ABOUD

Chimie

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

Développement de méthodologies chimio-enzymatiques pour la synthèse de protéines par ligation chimique sur support solide

dirigés par Monsieur Vincent AUCAGNE

Ecole doctorale : Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant - SSBCV

Unité de recherche : CBM - Centre de Biophysique Moléculaire

Soutenance prévue le **jeudi 17 décembre 2020** à 14h00

Lieu : 3 Avenue de la recherche scientifique, 45100 Orléans

Salle : Amphithéâtre Charles Sadron

Composition du jury proposé

M. Vincent AUCAGNE	CNRS Orléans	Directeur de thèse
M. Vladimir TORBEEV	Université de Strasbourg	Rapporteur
Mme Muriel AMBLARD	CNRS Montpellier	Rapporteuse
M. Sébastien PAPOT	Université de Poitiers	Examineur
Mme Chrystel LOPIN-BON	Université d'Orléans	Examinatrice

Mots-clés : Peptides, Protéines, SPPS, SPCL, Bras enzymo-labile, Ligation chimique

Résumé :

La synthèse totale de protéines requiert l'assemblage de segments peptidiques déprotégés par des réactions de ligation, telle la native chemical ligation (NCL). Lorsque de nombreuses ligations successives sont mises en œuvre, la nécessité de purifier les intermédiaires réactionnels conduit souvent à de faibles rendements globaux. Une solution pour s'affranchir de ces étapes de purification est d'assembler les protéines par ligation sur support solide (SPCL). Cette approche a cependant été jusqu'à présent essentiellement limitée à des preuves de concept, l'une des raisons principales étant la difficulté d'immobiliser le premier segment peptidique sur un support adapté via un bras qui peut être coupé une fois les ligations effectuées. De nombreux bras ont été décrits, mais leur coupure nécessite des conditions incompatibles avec certaines protéines cibles. L'objectif principal de cette thèse était de développer une nouvelle génération de bras en explorant une approche enzymatique plutôt que purement chimique, afin d'induire une coupure douce et sélective. Un premier bras coupé par la beta-galactosidase a été étudié, mais les cinétiques de coupures sur support solide se sont avérées très lentes. Nous avons émis l'hypothèse que la grande taille de l'enzyme (540 kDa) ralentissait sa diffusion à l'intérieur du support. Par conséquent, un second bras conçu pour être coupé par des enzymes plus petites a été synthétisé. Dans le cas de la lambda-phosphatase (25 kDa), le rapport entre les vitesses de coupure en solution et sur support a été multiplié par un facteur 300, comparé au premier bras. Ces travaux ont aussi traité d'autres limites de la synthèse de protéines par ligation telle que la manipulation de segments peu solubles. Nous avons ainsi développé un tag solubilisant qui peut être introduit de façon automatisée sur une cystéine N-terminale, par l'intermédiaire d'un pont disulfure. Le segment ainsi modifié peut être facilement purifié, et le pont disulfure est ensuite coupé instantanément dans les conditions de NCL. Le développement de techniques plus efficaces de synthèse des segments a également été abordé, dans le cadre d'une étude approfondie d'un protocole décrit précédemment pour la synthèse de peptides crypto-thioesters N-Hnb-Cys, capables de former des thioesters in situ lors de la NCL. Ce travail a conduit à l'identification d'une variété de co-produits et à l'optimisation d'un protocole de synthèse facile à mettre en œuvre, automatisable et reproductible. L'utilité de toutes ces méthodes a été démontrée par la synthèse d'un polypeptide de 160 acides aminés, par ligation de trois segments sur support solide.