

## FICHE SUJET DE THESE

Sujet N° (à remplir par l'ED) :	<b>FINANCEMENT :</b> <input checked="" type="checkbox"/> Demandé <input type="checkbox"/> Acquis	Origine du financement :
Titre de la thèse : Développement de nouveaux outils enzymatiques pour la glycosylation régiosélective d'agents antioxydants		3 mots-clés : antioxydants, flavonoïdes, ingénierie enzymatique
Unité/équipe encadrante : <b>Unité Fonctionnalité et Ingénierie des Protéines (UFIP) – UMR 6286 CNRS</b>		
Directeur de thèse : <b>Corinne MIRAL</b>		N° de tél : 0251125731 Mail : <a href="mailto:corinne.miral@univ-nantes.fr">corinne.miral@univ-nantes.fr</a>
<p><u>Contexte socioéconomique et scientifique (env. 10 lignes) :</u></p> <p>D'origine naturelle, les flavonoïdes sont de puissants antioxydants dont les effets biologiques bénéfiques semblent être liés à leur capacité à moduler des cascades de signalisation cellulaire. Ces métabolites secondaires sont naturellement présents en abondance chez les végétaux et font l'objet d'une fonctionnalisation lors de l'étape finale de leur biosynthèse. La modulation et le contrôle de la fonctionnalisation de ces composés sont essentiels afin d'augmenter leurs potentialités notamment pour des applications dans le domaine thérapeutique. Néanmoins ces composés fonctionnalisés sont difficiles d'accès en quantité pour des applications industrielles. La synthèse chimique de flavonoïdes fonctionnalisés présente des difficultés importantes notamment en terme de régiosélectivité. Les voies enzymatiques bio-inspirées s'avèrent être de très bonnes alternatives du fait de la spécificité des enzymes et de leur caractère "eco-friendly". Très peu d'équipes dans le monde travaillent sur ce sujet pourtant porteur scientifiquement et économiquement. En effet, maîtriser la régiosélectivité de couplage des systèmes enzymatiques demeure un défi méthodologique pour les chercheurs.</p>		
<p><u>Hypothèses et questions posées (env. 8 lignes) :</u></p> <p>Le sujet proposé ici a pour finalité la fonctionnalisation « à façon » de ces agents antioxydants en utilisant des enzymes spécifiques, les sucrose phosphorylases. La mise en œuvre d'un tel procédé permettra d'augmenter la solubilité et de développer la biodisponibilité de flavonoïdes fonctionnalisés originaux notamment pour des applications biologiques.</p> <p>Les enjeux de la glycosylation enzymatique des flavonoïdes sont les suivants : un système enzymatique adapté et adaptable, l'accès à un donneur de glucose peu cher, une régiosélectivité de couplage contrôlée et des rendements enzymatiques élevés. <i>In vitro</i>, les sucrose phosphorylases catalysent le transfert de la partie glucose du sucrose donneur sur un certain nombre d'accepteurs non naturels. L'utilisation de ces enzymes pour la synthèse de flavonoïdes glycosylés présente donc des avantages importants : un donneur peu cher et non activé, un mécanisme catalytique connu, une structure X-tri-dimensionnelle disponible et une preuve de concept démontrée. Néanmoins, pour qu'ils soient d'utilité en recherche et dans un cadre industriel, il est nécessaire de parvenir à un contrôle de la régiosélectivité de la glycosylation enzymatique de ces flavonoïdes. Pour le contrôle de la régiosélectivité, deux hypothèses seront étudiées : l'importance de l'orientation du groupement flavonoïde accepteur dans le site catalytique et la réactivité des groupements hydroxyyles.</p>		
<p><u>Grandes étapes de la thèse (env. 12 lignes) :</u></p> <p>Le projet de thèse peut être découpé en quatre grandes étapes :</p> <p>1. <a href="#">production d'une librairie d'enzymes</a> Le choix d'un panel d'enzymes candidates en vue des études expérimentales a été rationalisé au préalable par des approches de bioinformatique structurale. Deux approches complémentaires ont été développées : le crible de la biodiversité bactérienne et l'étude de mutations ciblées en s'appuyant sur le modèle de la sucrose phosphorylase de <i>Bifidobacterium adolescentis</i> décrite dans la littérature. Les enzymes identifiées seront au cours de ce projet produites et caractérisées expérimentalement par des approches de biologie moléculaire, biochimie et enzymologie.</p> <p>2. <a href="#">synthèse enzymatique et caractérisation des flavonoïdes fonctionnalisés</a> La capacité des sucrose phosphorylases produites à fonctionnaliser les flavonoïdes cibles sera étudiée <i>in vitro</i> sur des flavonoïdes cibles seuls et sur une librairie de mélanges de flavonoïdes issus de fruits et d'autres sources végétales fournis par le laboratoire SONAS (Université d'Angers). Les cinétiques enzymatiques seront suivies par différentes techniques chromatographiques (chromatographie sur couche mince, électrophorèse capillaire) et spectroscopique (FTIR-ATR - Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier - réflectance totale atténuée). Les flavonoïdes fonctionnalisés seront ensuite purifiés par HPLC préparative et les régioisomères obtenus caractérisés par spectrométrie de masse (SM) et résonance magnétique nucléaire (RMN).</p> <p>3. <a href="#">Mesure de l'activité biologique des flavonoïdes fonctionnalisés obtenus</a> Les activités biologiques des composés synthétisés seront évaluées. En collaboration avec le laboratoire SONAS (Université d'Angers) le pouvoir antioxydant des flavonoïdes alpha-glycosylés obtenus sera mesuré et leur activité neuroprotectrice testée par l'équipe du Pr Muccillo-Baisch de l'Institut des Sciences Biologiques (Universidade Fédéral do Rio Grande, Brésil) sur modèle cellulaire et sur modèle animal.</p> <p>A l'issue de la thèse, nous prévoyons de disposer d'une boîte à outils enzymatiques originaux pour la fonctionnalisation régiosélective de flavonoïdes pouvant, à terme, être utilisés dans un cadre industriel. Par ailleurs, l'utilisation de ces outils ciblés permettra d'obtenir des <b>flavonoïdes originaux alpha-glycosylés non-naturels</b> avec des <b>propriétés physicochimiques et biologiques potentiellement améliorées</b> par rapport aux isomères naturels bêta-glycosylés.</p>		

Compétences scientifiques et techniques requises par le candidat (2 lignes) :

**Le candidat devra posséder des compétences en biologie moléculaire, biochimie, synthèse enzymatique et techniques analytiques.**

3 publications de l'équipe d'accueil relatives au domaine (5 dernières années) :

1. Arbo BD, **André-Miral C**, Nasre-Nasser RG, Schimith LE, Santos MG, Costa-Silva DG, Muccillo-Baisch AL, Hort MA., Resveratrol derivatives as potential treatments for neurodegenerative diseases., *Frontiers in Aging Neurosciences*, **Acceptée**
2. Teze D., Coines J., Raich L., Kalichuk V., Solleux C., Tellier C., **André-Miral C.**, Svensson B., Rovira C., A Single Point Mutation Converts GH84 O-GlcNAc Hydrolases into Phosphorylases. Experimental and Theoretical Evidence., *Journal of the American Chemical Society*, **142**, 5, 2120-2124 (2020); DOI: 10.1021/jacs.9b09655
3. Verhaeghe T, De Winter K, Berland M, De Vreese R, Dhooghe M, **OFFMANN B**, Desmet T (2016) Converting bulk sugars into prebiotics: semi-rational design of a transglucosylase with controlled selectivity. *Chem. Commun. (Camb.)* 52:3687–3689

Collaborations nationales et internationales :

**Collaborations nationales sur le sujet :**

- **Laboratoire CEISAM (Nantes)** – Equipe ModES – Etude de la réactivité des flavonoïdes en vue de la constitution d'une librairie de composés cibles, suivi des cinétiques enzymatiques par FTIR-ATR
- **Laboratoire SONAS (Angers)** – Mise à disposition de mélanges de flavonoïdes, caractérisation par Spectrométrie de Masse-LDI des flavonoïdes fonctionnalisés, mesure de leur pouvoir antioxydant

**Collaborations internationales sur le sujet :**

- **Equipe du Pr Tom Desmet**, Centre for Industrial Biotechnology and Biocatalysis, Faculty of Bioscience Engineering (Ghent University, Belgique) - Mise à disposition des gènes de sucrose phosphorylases
- **Equipe du Pr Ana Luiza Muccillo-Baisch**, Instituto de Ciências Biológicas, (Universidade Federal do Rio Grande, Brésil) - Mesure *in vitro* et *in vivo* de l'activité neuroprotectrice des flavonoïdes glucosylés synthétisés