

DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **21 décembre 2023**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Monsieur JEANROY Frédéric**

Titre de la thèse : « *Identification de motifs oligosaccharidiques ciblant des protéines thérapeutiques par nanoLC-MS* »



Résumé

Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont des polysaccharides linéaires fortement chargés. Ils sont composés d'unités disaccharidiques constituées d'un acide uronique et d'une hexosamine. Ils sont situés principalement dans la matrice extracellulaire et sont impliqués dans de nombreux processus biologiques grâce à leurs interactions avec de multiples protéines. Un exemple très étudié est l'interaction de l'héparine avec l'antithrombine III, protéine inhibitrice de facteurs de coagulation. La caractérisation de ces interactions est donc une clé vers de nouveaux traitements thérapeutiques plus efficaces et présentant moins d'effets secondaires comme l'a montré le fondaparinux, pentasaccharide d'interaction de l'héparine avec l'antithrombine III. Toutefois, l'identification de la structure d'un GAG est un réel challenge analytique compte-tenu de leur grande hétérogénéité. Ce projet de thèse repose donc sur le développement d'une méthodologie pour la caractérisation de ces interactions, impliquant de la chromatographie d'affinité et de la spectrométrie de masse, sur le modèle antithrombine III-héparine. Pour cela, une phase stationnaire contenant une protéine immobilisée (l'antithrombine III) a été développée. Trois voies de fonctionnalisation ont été identifiées qui ont pu permettre d'immobiliser jusqu'à $1,3 \pm 0,2$ pmol cm^{-1} de protéine. Cette colonne a été utilisée pour l'identification par MALDI-TOF MS de séquences oligosaccharidiques d'affinité après relargage avec de l'ammoniaque 0,1 M pH 11. Cela a permis d'identifier des séquences de dp4 à dp6 très sulfatées, ce qui est cohérent avec le modèle connu. Enfin, la chromatographie d'affinité a été utilisée pour une autre application : l'évaluation de l'affinité de ligands issus d'un mélange complexe et dynamique de chimie combinatoire pour une lectine, la concavaline A. Ces ligands (glycoclusters) sont la combinaison de monosaccharides (mannose ou fucose) autour d'une brique élémentaire. Les affinités de glycoclusters de mannose M3 et M4 en mélange ont pu être déterminées à $46 \mu\text{M} \pm 17\%$ et $44 \mu\text{M} \pm 13\%$. De plus, un classement d'affinité a pu être établi entre plusieurs glycoclusters de mannose et/ou de fucose issus d'un mélange plus complexe. Le potentiel de la chromatographie d'affinité pour l'isolement et l'enrichissement de ligands de haute affinité a pu être démontré dans cette thèse, les prochaines étapes consistant à l'analyse structurale par spectrométrie de masse MS/MS des ligands isolés.

Mots clés : glycosaminoglycane (GAG), chromatographie d'affinité, antithrombine III, héparine, fondaparinux, spectrométrie de masse