



Titre de la thèse : Synthèse et caractérisation de nouvelles conotoxines isolées de cônes polynésiens

Synthesis and characterization of new conotoxins isolated from Polynesian cones

Etablissement Université de Perpignan Via Domitia
École doctorale Energie et Environnement

Spécialité Chimie

Unité de recherche Centre de recherches insulaires et observatoire de l'environnement

Encadrement de la thèse Nicolas INGUIMBERT et Sébastien DUTERTRE

Financement

du 01-10-2021 au 30-09-2024 ½ financement CNRS complément en cours. (1400 € net/mois)
Employeur Université de Perpignan via Domitia

Début de la thèse

le 1 octobre 2021

Date limite de candidature

11 juin 2021

Candidature sur le portail ADUM :

https://www.adum.fr/as/ed/voirproposition.pl?langue=&site=ede2&matricule_prop=36103

Mots clés

Peptides, Disulfure, conotoxin, transcriptomique

Keywords

Peptide, disulfide, conotoxine, transcriptomic

Profil et compétences recherchées

Nous recherchons pour mener à bien ce projet un chimiste organicien titulaire d'un master 2 ou d'un diplôme d'ingénieur chimiste intéressé par un travail pluridisciplinaire alliant analyse chimique, synthèse peptidique et biochimie. Une expérience en synthèse peptidique et une connaissance des techniques d'analyse HPLC/MS seront appréciées.

Profile and skills required

We are looking for an organic chemist with a master 2 or chemical engineering degree interested in a multidisciplinary work combining chemical analysis, peptide synthesis and biochemistry. Experience in peptide synthesis and knowledge of HPLC/MS analysis techniques would be appreciated.

Description de la problématique de recherche

Les cônes sont des animaux venimeux marins qui ont développé au cours de l'évolution des venins puissants leur permettant de se nourrir et se défendre contre les prédateurs.(1) Ces venins sont constitués de centaines de petits peptides riches en ponts disulfures appelés conotoxines. Parmi ceux-ci, le Prialt dérivé de l'oméga-conotoxine MVIIA est utilisé dans le traitement des douleurs chroniques intenses et pharmacorésistantes aux traitements antalgiques de type opioïdes. Ainsi, les conotoxines constituent une ressource d'une richesse remarquable pour l'étude des cibles moléculaires impliquées dans la nociception, mais aussi pour le développement de nouveaux traitements contre d'autres pathologies. L'amélioration des techniques d'analyse, de purification et de synthèse a permis une accélération fulgurante de l'identification de nouvelles conotoxines. Au-delà de leur utilisation directe pour faciliter l'étude de cibles thérapeutiques, les conotoxines peuvent constituer des prototypes qui après modulation de leurs biodisponibilité et toxicité peuvent conduire à de nouveaux candidats médicaments.(2)

Project description



Conesnails are venomous marine animals that have developed powerful venoms over the course of evolution that allow them to feed and defend themselves against predators.(1) These venoms are made up of hundreds of small peptides rich in disulfide bridges called conotoxins. Among these, Prialt derived from the omega-conotoxin MVIIA is used in the treatment of intense chronic pain that is pharmaco-resistant to opioid-type analgesic treatments. Thus, conotoxins constitute a remarkably rich resource for the study of molecular targets involved in nociception, but also for the development of new treatments against other pathologies. The improvement of analysis, purification and synthesis techniques has allowed a lightning acceleration of the identification of new conotoxins. Beyond their direct use to facilitate the study of therapeutic targets, conotoxins can constitute prototypes which, after modulation of their bioavailability and toxicity, can lead to new drug candidates.(2)

Thématique / Domaine / Contexte

Cette thèse s'inscrit dans la problématique générale du laboratoire intitulé : « Les récifs coralliens de demain ». Elle s'intégrera, plus particulièrement, dans le programme de recherche 'interactions et médiations chimiques' demandant des compétences en chimie et biochimie. A l'issue de la thèse le doctorant maîtrisera les protocoles de prélèvement d'échantillon dans le milieu naturel, d'extraction, de caractérisation, de synthèse de dérivés peptidiques..

Un des axes de recherche du CRIOBE USR 3278 porte sur l'étude de peptides d'origine marine et leur valorisation à des fins thérapeutiques. Les producteurs primaires de ces peptides sont divers. Après nous être intéressés aux peptides issus d'ascidies, de cyanobactéries, nous souhaitons valoriser dans une démarche écoresponsable une ressource particulière constituée par les mollusques de la famille des cônes de mer. Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet « Integrated and sustainable regulation of cones in Eastern Polynesia – PolyCone – ANR-20-BFOC-0005 » financé jusqu'au 31/05/2024 dans le cadre Belmont forum. Les 900 espèces de cône ont la particularité de produire des venins, les conotoxines, riches en peptide. Or la polynésie française concentre 10% des espèces de cône dont 20 sont endémiques. Le CRIOBE constitue un acteur clé dans le développement de ce programme, car les cônes pourront être prélevés sur Moorea et les venins analysés sur la plateforme Bio2Mar à Perpignan.

Objectifs

Un des challenges dans l'étude des venins est la faible quantité de venin produit et la disponibilité du mollusque.(3) Ainsi, dans le cadre du projet international Polycône centré sur l'étude de la diversité des cônes polynésiens,(4) plusieurs espèces endémiques ont été collectées et acclimatées en aquarium afin de permettre le prélèvement du venin selon une technique évitant de sacrifier l'animal, ce qui assure de disposer de quantité suffisante pour :

- 1) Analyser par une approche de métabolomique (5) le venin au sein des plateformes Bio2Mar et Analyse et Caractérisation du pôle chimie Balard situées respectivement à Perpignan et Montpellier dont les instrumentations sont complémentaires. Cette approche sera corrélée avec une étude de protéomique. (6 mois)
- 2) Sélectionner une dizaine de séquences originales parmi les nouvelles séquences identifiées pour chaque espèce au travers de l'étude couplée de métabolomique et protéomique. (1 mois)
- 3) Synthétiser par voie chimique ces séquences afin d'obtenir plusieurs milligrammes de produit pur. La taille des peptides (10 à 30 acides aminés) rend ces synthèses tout à fait réalisables par SPPS.(6,7) La principale difficulté réside dans l'agencement des ponts disulfures, mais des approches permettant la formation sélective de ces ponts existent.(8) (18 mois)
- 4) Caractériser pharmacologiquement ces conotoxines sur une suite de canaux ioniques par électrophysiologie. (5 mois)
- 5) Caractériser la structure des conotoxines par RMN, collaboration avec B Legrand de l'IBMM.
- 6) Améliorer la biodisponibilité des peptides les plus prometteurs pour qu'ils résistent à la dégradation enzymatique après administration in vivo. (6 mois)

Ces différents points pouvant être menés en parallèle constituent les différentes tâches à réaliser lors du projet de thèse.

Méthode

En relation avec les objectifs précédents les méthodes et outils utilisés seront les suivants :



Objectif 1 : Analyse et comparaison des conotoxines, par protéomique couplé à une analyse métabolomique. Cet aspect fera appel à des connaissances en instrumentation HPLC/MS et bioinformatique.

Objectif 2 : Synthèse des séquences peptidiques sélectionnées

Les conotoxines seront synthétisées par synthèse peptidique en phase solide sous irradiation microonde. Les composés seront purifiés par HPLC semi-préparative et leur structure sera extensivement étudiée par RMN, LC/MS.

Objectif 3 : Caractérisation pharmacologique des conotoxines sur une suite de canaux ioniques par électrophysiologie.

Résultats attendus - Expected results

Les cônes de mer sont considérés comme des trésors pharmacologiques car leur venin est riche en composés pouvant trouver des applications thérapeutiques pour le traitement de l'hypertension, la douleur, les cancers, certaines maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer), l'épilepsie. En 2004, le Prialt a été le premier dérivé de conotoxine commercialisé pour le traitement des douleurs résistantes aux opioïdes. Or seulement 1% des 100 000 conotoxines existantes ont été caractérisées et travailler sur des espèces endémiques renforce la possibilité de découverte de structures originales et non exploitées jusqu'à présent. Un des buts du projet est de constituer une banque de donnée accessible à la communauté scientifique pour laquelle une stratégie de protection sera mise en place en collaboration avec la SATT.

Précisions sur l'encadrement - Details on the thesis supervision

Le travail sera encadré par N Inguibert pour les aspects concernant la synthèse peptique (50%) et S Dutertre spécialiste des conotoxines (50%). N Inguibert encadre actuellement trois thèses dont les soutenances sont prévues en septembre 2021, janvier 2022 et septembre 2022. Le suivi de la thèse se fera sur la base d'une réunion mensuelle, donnant lieu à un compte rendu, fixant les objectifs de travail pour le mois à venir. Le comité de suivi individualisé se réunissant annuellement veillera au bon déroulement de la thèse, au respect de la convention individuelle de formation et à l'aide à la réalisation du projet professionnel du doctorant.

Conditions scientifiques matérielles et financières du projet de recherche

Une partie du travail expérimental sera effectué à la station biologique de Moorea pourvue de tout le matériel d'aquariologie nécessaire.

Les produits (aminoacides, autres réactifs et solvants), le matériel et l'accès aux bases de données (Reaxys, bibliovie ...) nécessaires au début du projet sont disponibles dans le laboratoire. Plus particulièrement, l'étudiant disposera d'un automate de synthèse peptidique sous champ micro-onde, des outils de purification HPLC, d'analyse RMN 1H et 13C et LC/MS.

Objectifs de valorisation des travaux de recherche du doctorant : diffusion, publication et confidentialité, droit à la propriété intellectuelle,...

En terme de diffusion scientifique le doctorant réalisera au cours de sa thèse à minima une présentation dans un congrès national et une présentation dans un congrès internationale. Une publication dans un journal impact facteur >1 sera exigée pour la soutenance. 100h de formations transversales dispensées par l'ED 305 ou le collège doctoral LR compléteront la formation du doctorant. Propriété intellectuelle : selon la nature des activités biologiques et de séquences peptidiques mises en évidence la prise d'un brevet sera envisagée en collaboration avec la SATT.

Ouverture Internationale

Le projet 'Syntpolycone' est intégré au projet 'polycone' financé par le Belmont forum. Il bénéficiera à ce titre des collaborations initiées pour la réalisation de ce projet. <http://www.criobe.pf/recherche/recherche-projets/polycone/>

Références bibliographiques

(1) Jin, A.-H. et al. Conotoxins: Chemistry and Biology. Chem. Rev. 2019, 119 (21), 11510–11549. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00207>.

(2) Giribaldi, J.; Dutertre, S. α -Conotoxins to Explore the Molecular, Physiological and Pathophysiological Functions of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. Neuroscience Letters 2018, 679, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.11.063>.



- (3) Bordon, K. de C. F. et al From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. *Front. Pharmacol.* 2020, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01132>.
- (4) Integrated and sustainable regulation of cones in Eastern Polynesia <https://anr.fr/Projet-ANR-20-BFOC-0005> (accessed Dec 2, 2020).
- (5) Reverter, M. et al. Insights into the Natural Defenses of a Coral Reef Fish Against Gill Ectoparasites: Integrated Metabolome and Microbiome Approach. *Metabolites* 2020, 10 (6), 227. <https://doi.org/10.3390/metabo10060227>.
- (6) Darcel, L. et al Trichormamide C Structural Confirmation through Total Synthesis and Extension to Analogs. *Org. Lett.* 2020, 22 (1), 145–149. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b04064>.
- (7) Giribaldi, J. et al . Synthesis, Pharmacological and Structural Characterization of Novel Conopressins from *Conus Miliaris*. *Marine Drugs* 2020, 18 (3), 150. <https://doi.org/10.3390/md18030150>.
- (8) Góngora-Benítez et al. Multifaceted Roles of Disulfide Bonds. Peptides as Therapeutics. *Chem. Rev.* 2014, 114 (2), 901–926. <https://doi.org/10.1021/cr400031z>.