

## Caractérisation structurale et fonctionnelle du complexe protéique de l'hyaluronidase

### Lieu du stage – Université d'Orléans / CNRS :

- Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), Pr R Nehmé [reine.nehme@univ-orleans.fr](mailto:reine.nehme@univ-orleans.fr)
- Centre de Biophysique Moléculaire (CBM), Dr M Cadène [martine.cadene@cnrs-orleans.fr](mailto:martine.cadene@cnrs-orleans.fr)

**Mots-clés :** Spectrométrie de masse (MLADI TOF MS), électrophorèse capillaire (UV/HRMS), fluorimétrie, caractérisation structurale de protéines/enzymes.

**Niveau recherché :** Master 2 Chimie Analytique ou Biochimie.

**Pour postuler :** Envoyer par mail votre CV, lettre de motivation et relevés de notes

**Résumé:** Dans ce projet, nous souhaitons continuer nos recherches portant sur la compréhension de l'hyaluronidase (Hyal) en tant que complexe protéique peu décrit dans la littérature et en tant qu'enzyme ayant un mode de fonctionnement qui reste incomplètement compris. Nos premiers résultats sur l'analyse de l'hyaluronidase, dans des conditions natives, obtenus par électrophorèse capillaire (CE) avec une détection UV ou par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse, ont montré un comportement moléculaire et structural de l'hyaluronidase difficilement explicables. Ce projet contribuera à élucider les zones d'ombres qui subsistent sur cette protéine en récoltant des données complémentaires basées sur (i) une méthodologie originale décrite récemment au CBM nommée NALIM (Native Liquid MALDI) - TOF MS ; (ii) le pouvoir résolutif des techniques séparatives (CE et LC) et (iii) la confirmation et la caractérisation de l'activité enzymatique de l'Hyal par CE-UV/HRMS.

**Objectifs généraux et intérêt :** L'hyaluronidase (Hyal) est une glycosidase responsable de la dépolymérisation de l'acide hyaluronique (HA), un glycosaminoglycane (GAG) non sulfaté, en saccharides de plus petite taille. L'hyal est également capable de reconstruire les chaînes de GAG en catalysant une réaction de transglycosylation (*Weissmann B., 1955*). L'acide hyaluronique est un constituant principal de la matrice extracellulaire et est également impliqué dans un grand nombre de processus. L'hyaluronidase et les produits de dégradation de l'HA sont ainsi impliqués voire responsables de plusieurs dérèglements biologiques tels que le vieillissement de la peau, l'inflammation des tissus conjonctifs et certains cancers tel que le cancer de la prostate (*Papakonstantinou E., 2012 ; Benitez A., 2011*). Malgré l'intérêt croissant que présente l'Hyal, peu d'études décrivent sa structure protéique, sa conformation spatiale, ses propriétés physico-chimiques ou la relation entre son activité catalytique et les conditions de sa préparation et de son analyse. Par ailleurs, peu d'information existe dans la littérature quant à la qualité des échantillons étudiés et l'impact de cela sur les résultats obtenus *in vitro* (*Khorlin A.Ya., 1973*) ce qui appui le caractère indispensable de caractériser finement cette protéine avant toute analyse ultérieure.

**Programme du stagiaire :** Ce projet de stage est basé sur des outils analytiques disponibles dans nos laboratoires et qui sont singulièrement complémentaires.

- 1- Mise en place de la méthode NALIM pour la caractérisation de l'hyaluronidase. En fonction du temps disponible, une formation au QC de protéine intacte par ESI-UHR-QTOF MS avec dessalage en ligne et/ou par MALDI-TOF MS sera envisagée.
- 2- Etude en parallèle par CE-UV/MS et LC-UV/MS de l'empreinte des mêmes échantillons analysées par NALIM afin de corrélérer les résultats obtenus avec et sans étape d'ionisation dans la source du spectromètre de masse afin d'identifier un potentiel impact sur les complexes protéiques.
- 3- Etude de l'activité enzymatique de l'Hyal par CE-UV et par spectrofluorimétrie afin d'établir une corrélation claire et précise avec les informations structurales obtenus par NALIM.

**Références :** \* Benitez A., *Cancer Res.* 2011; 71: 4085. \* Khorlin A.Ya., Vikha I.V., Milishnikov A.N., *FEBS letters*, 1973; 31: 107. \* Papakonstantinou E., Roth M., Karakiulakis G., *Dermato-Endocrinology* 2012; 4: 253. \* Weissmann B., *J. Biol. Chem.* 1955; 216: 783.