

Titre du stage :

Stage N° 1.

Sélection de peptides antimicrobiens par microfluidique / Selection of antimicrobial peptides using microfluidics

Encadrement :

Innis Axel

Tel : 0540006149

Email : axel.innis@inserm.fr

INSERM - Laboratoire ARNA

Contexte :

Les peptides antimicrobiens ciblant les ribosomes sont très prometteurs pour lutter contre les bactéries résistantes aux antibiotiques (Charon et al. (2019) *Biochemistry* 58, 75). L'équipe Innis, en collaboration avec le groupe de J.-C. Baret (CRPP, Bordeaux) et le laboratoire Suga (Université de Tokyo), développe une méthode d'évolution dirigée basée sur la microfluidique pour identifier des peptides inhibiteurs de la traduction bactérienne. Le ou la candidat(e) adaptera le système Flexible In vitro Translation (FIT) développé par le laboratoire Suga (Goto et al. (2011) *Nature Protocols* 6, 779) pour permettre l'identification par microfluidique de peptides macrocycliques capables de pénétrer et de neutraliser les bactéries Gram-négatives. Les peptidiques thérapeutiques macrocycliques présentent de nombreux avantages par rapport à leurs homologues linéaires, notamment une meilleure liaison à leur cible, une plus grande stabilité in vivo et une meilleure résistance aux protéases. Ce projet interdisciplinaire visera à identifier de nouveaux peptides inhibiteurs de la traduction bactérienne et permettra de développer de nouveaux composés pour lutter contre les bactéries pathogènes résistantes.

Ribosome-targeting antimicrobial peptides show great promise as a means to tackle drug resistant bacteria (Charon et al. (2019) *Biochemistry* 58, 75). The Innis group, in collaboration with J.-C. Baret's group (CRPP, Bordeaux) and the Suga laboratory (University of Tokyo), is developing a microfluidics-based directed evolution approach to identify peptides that block bacterial translation by targeting the ribosome. The M2 candidate will adapt the Flexible In vitro Translation (FIT) system developed by the Suga lab (Goto et al. (2011) *Nature Protocols* 6, 779) to enable the microfluidics-based identification of macrocyclic peptides capable of penetrating and neutralizing Gram-negative bacteria. Macrocyclic peptide drugs present numerous advantages relative to their linear counterparts, including superior binding to their target, greater in vivo stability and improved protease resistance. This interdisciplinary project will aim to identify novel peptide-based inhibitors of bacterial translation and will help develop compounds to overcome resistant pathogenic bacteria.

Objectifs :

Le but de ce projet est de modifier un système commercial de traduction in vitro PURExpress (New England Biolabs) pour permettre la production de peptides macrocycliques par l'utilisation de la technologie flexizyme. Les peptides macrocycliques identifiés par nos collaborateurs du laboratoire Suga (Université de Tokyo) se lient au ribosome bactérien et l'inhibent à des concentrations micromolaires. Des variantes de ces peptides seront codées génétiquement dans une bibliothèque d'ADN et traduites in vitro à l'aide du système PURExpress modifié en vue d'une sélection ultérieure des peptides ayant des propriétés antimicrobiennes grâce à un système de sélection basé sur la microfluidique en gouttes. Le projet permettra à terme de développer de nouveaux composés antimicrobiens ciblant le ribosome bactérien.

The aim of this M2 project will be to modify a commercial PURExpress in vitro translation system (New England

Biolabs) to enable the production of macrocyclic peptides through the use of the flexizyme technology. Macrocyclic peptides identified by our collaborators in the Suga laboratory (University of Tokyo) bind to and inhibit the bacterial ribosome at micromolar concentrations. Variants of these peptides will be genetically encoded in a DNA library and translated in vitro using the modified PURExpress system for subsequent selection of peptides with antimicrobial properties using a droplet microfluidics-based selection system developed in house. The project will lay the ground for the future identification and development of novel antimicrobial compounds targeting the bacterial ribosome.

Méthodes employées :

(i) Biologie moléculaire (PCR, transcription in vitro, purification et analyse des acides nucléiques), (ii) aminoacylation des ARNt assistée par Flexizyme, (iii) biochimie (traduction in vitro), et (iv) microfluidique à base de gouttelettes (traduction in vitro de peptides macrocycliques dans des compartiments de réaction de quelques picolitres).

(i) Molecular biology (PCR, in vitro transcription, nucleic acid purification and analysis), (ii) Flexizyme-assisted aminoacylation of tRNAs, (iii) Biochemistry (in vitro translation), and (iv) Droplet-based microfluidics (in vitro translation of macrocyclic peptides inside picoliter-sized reaction compartments).

Prérequis :

(i) Intérêt pour la résistance aux antibiotiques et le développement de nouveaux antibiotiques, (ii) Anglais courant, (iii) Compétences de base en biologie moléculaire.

(i) Interest in antibiotic resistance and development, (ii) Conversational English, (iii) Basic skills in molecular biology.

mots clés : Antibiotiques; peptides antimicrobiens; ribosome; microfluidique; traduction in vitro

Titre du stage :

Stage N° 2.

Implication du système ubiquitine protéasome dans la régulation du métabolisme mitochondrial

Encadrement :

Bénard Giovanni

Email : giovanni.benard@inserm.fr

université de bordeaux

Contexte :

Le système ubiquitine protéasome régule une multitude de processus cellulaires, une exception notable semble être le métabolisme énergétique mitochondrial. Or, notre laboratoire a récemment mis en évidence l'implication d'une famille de E3 ubiquitine ligases dans la production d'ATP par la mitochondrie.

Une de ces E3 est responsable d'une pathologie mitochondriale mais le rôle des autres membres de cette famille reste énigmatique.

Objectifs :

L'objectif du stage sera d'étudier la régulation de certaines E3 ubiquitine ligase que nous avons identifiées.

Il s'agira de générer des mutations impliquées dans la régulation de ces E3s, d'étudier l'impact sur la localisation cellulaire et les fonctions de ces enzymes.

Méthodes employées :

biologie moléculaire

Culture cellulaire

Microscopie haute résolution

Immunoprécipitation

Prérequis :

Bases de biochimie des protéines

mots clés : mitochondrie , ubiquitine métabolisme

Titre du stage :

Stage N° 3.

Analyse des interactions entre protéines de la famille de Bcl-2 par thermophorèse à microéchelle

Encadrement :

Priault Muriel

Tel : 0556999038

Email : muriel.priault@ibgc.cnrs.fr

IBGC CNRS UMR5095, Université de Bordeaux

Contexte :

Nous voulons déterminer l'effet de la modification post-traductionnelle par déamidation de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL sur son interaction avec la protéine pro-apoptotique Bak. Cette question se pose lorsque les deux protéines sont solubles, et quand elles sont insérées dans les membranes.

Objectifs :

Nous voulons étudier l'interaction de Bcl-xL native avec son partenaire Bak, et comparer ces données avec celles obtenues lorsqu'un mutant monodéamidé de Bcl-xL est utilisé, et lorsque le mutant double déamidé est utilisé. Pour cela, nous travaillons avec des protéines recombinantes produites par expression bactérienne, ou produites en système acellulaire. Les protéines sont étudiées à l'état soluble, ou insérées dans des membranes artificielles reconstituées (nanodisques). Les interactions sont analysées par thermophorèse à microéchelle.

Méthodes employées :

Expression bactérienne de protéines recombinantes; expression de protéines en système acellulaire; purification de protéines par méthodes chromatographiques; analyses d'interactions protéiques par thermophorèse à microéchelle.

Prérequis :

Des connaissances solides en biochimie des protéines sont nécessaires. Une pratique préalable de robots de purification de protéines sera un plus.

mots clés : Protéines membranaires; interactions protéine-protéine; méthodes chromatographiques de séparation et purification de protéines; analyse biophysique d'interactions protéine-protéine.

Titre du stage :

Stage N° 4.

Caractérisation d'un complexe protéique mitochondrial impliqué dans l'architecture de la mitochondrie

Encadrement :

Tetaud Emmanuel

Tel : 0557574805

Email : emmanuel.tetaud@u-bordeaux.fr

Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité UMR 5234

Contexte :

Les mitochondries sont des organelles dynamiques, mobiles, qui fusionnent et se divisent et pouvant apparaître comme un réseau de filaments allongés et interconnectés. La longueur et l'interconnectivité des mitochondries est déterminée par l'équilibre des réactions de fusion et de fission, réactions gouvernées par des protéines de la super-famille des dynamines. Chez les trypanosomes, il n'existe qu'une seule mitochondrie géante, qui se divise qu'une fois par cycle cellulaire, juste avant la cytokinèse. Cependant, la mitochondrie des trypanosomes se présente sous deux formes principales, une forme pleinement active et ramifiée et une forme fonctionnelle et morphologiquement réprimée correspondant à un simple tube, ce qui suggère la présence de processus régulant sa structure. Nous avons identifié, chez ce parasite, le premier facteur impliqué dans la fusion mitochondriale qui se révèle être une dynamine atypique appartenant, contrairement aux dynamines de mammifères ou de levure, à une nouvelle famille de dynamine ancestrale. Cette dynamine forme, dans la membrane de la mitochondrie, un ou des complexes protéiques impliquant une douzaine de protéines différentes.

Objectifs :

Nous proposons de caractériser le ou les complexes protéiques impliqués dans les modifications de la structure mitochondriale au cours du cycle cellulaire des trypanosomes. Cela consistera à étudier les différentes protéines identifiées de ce ou ces complexes et de confirmer leur rôle dans la structuration de la mitochondrie.

Méthodes employées :

La première partie du projet consistera à confirmer l'appartenance de ces différentes protéines aux complexes de structuration mitochondriale par des approches de biochimies telles que le BioID (proximity-dependent biotinylation identification) et/ou par immunoprécipitation. La deuxième partie consistera à inactiver et sur-exprimer, chez le parasite, les gènes codants les protéines identifiées et d'en mesurer l'impact sur la structure mitochondriale et sur la biologie du parasite. L'inactivation sera réalisée en utilisant le système CRISPR/Cas9 ou par RNAi dans le cas de gène essentiel et la sur-expression par un système d'induction permettant une expression contrôlée.

Prérequis :

Ce sujet s'adresse à un/une biologiste ayant une bonne formation théorique en microbiologie, génétique et/ou biochimie. Le candidat devra avoir aussi une bonne connaissance des techniques classiques de biologie moléculaire (PCR, qPCR, clonage, western-blot, etc) et de culture cellulaire.

mots clés : -Complexes membranaires -Modifications des génomes (CRISPR/Cas9 et RNAi) -Dynamique mitochondriale -Microbiologie -Trypanosomes

Titre du stage :

Stage N° 5.

Etude d'un candidat médicament dans des modèles cellulaires et murin d'une maladie mitochondriale (le syndrome de Barth)

Encadrement :

Tribouillard-Tanvier Déborah

Tel : 05 56 99 90 39

Email : deborah.tribouillard-tanvier@ibgc.cnrs.fr

Université de Bordeaux, IBGC, UMR 5095

Contexte :

La mitochondrie fournit l'essentiel de nos besoins en ATP, soit la principale source d'énergie cellulaire, par le processus des oxydations phosphorylantes (OXPHOS). Des altérations de ce processus induisent des pathologies (les maladies mitochondriales) affectant préférentiellement les tissus et organes à forte demande énergétique comme les muscles et le cerveau. Bien que rares, ces pathologies sont nombreuses (>300 ont déjà été décrites), ce qui s'explique par la complexité structurale et génétique des mitochondries, avec >1000 espèces protéiques différentes. Le projet est dédié à l'étude de l'une de ces pathologies, appelée le syndrome de Barth (BTHS). Il s'agit d'une cardiomyopathie résultant de mutations dans le gène TAZ localisé sur le chromosome X. Il encode une acyltransférase (appelée Taffazine) impliquée dans la maturation de la cardiolipine, un phospholipide aux multiples fonctions dans la mitochondrie qui optimisent l'organisation et le fonctionnement du système OXPHOS. Il n'existe pour l'heure aucun traitement réellement curatif pour cette maladie. Pour aider la recherche de candidats médicaments, nous avons construit une souche de levure où le gène orthologue a été éliminé (*taz1*). A l'instar des cellules de patients BTHS, les cellules de levure *taz1* ont montré des anomalies dans la biogenèse et le fonctionnement du système OXPHOS. Leur croissance à partir de substrats carbonés requérant obligatoirement des mitochondries fonctionnelles pour pouvoir être métabolisés est de ce fait fortement ralentie. Nous avons isolé plusieurs molécules améliorant cette croissance -et donc le fonctionnement mitochondrial- à partir de chimiothèques constituées de composés au moins en phase II de tests cliniques pour la plupart déjà utilisés dans le domaine de la santé humaine, soit une approche de repositionnement thérapeutique. Bien des étapes doivent être encore franchies avant d'envisager une utilisation de ces molécules directement sur des patients. C'est dans cette perspective que s'inscrit le stage.

Objectifs :

Les composés identifiés à partir d'un modèle levure du syndrome de Barth seront testés sur des cellules humaines déficientes en tafazzine et sur un modèle murin de cette maladie. Les mécanismes d'action des composés et leurs cibles cellulaires seront étudiés. Ils peuvent être très différents de ceux impliqués dans leur usage thérapeutique premier, surtout lorsque la nouvelle activité curative s'observe à des dosages très différents, ce qui est souvent le cas dans une approche de repositionnement thérapeutique.

Méthodes employées :

Nous avons au laboratoire des fibroblastes, myoblastes et iPS de patients BTHS différenciés en cardiomyocytes. Ces cellules présentent des défauts divers et variés, dont un déficit de prolifération dans des milieux où la croissance est fortement dépendante de l'activité énergétique mitochondriale, des ralentissements dans la consommation d'oxygène et la production d'ATP, une plus forte production d'espèces réactives de l'oxygène, et des niveaux d'accumulation de protéines mitochondriales moins importants, comparativement aux cellules contrôles. Nous disposons également d'un modèle murin du syndrome de Barth. A la naissance, ces souris présentent une perte de poids importante et on note des défauts mitochondriaux dans leur tissu cardiaque. Ils présentent également un déficit cardiaque (échocardiographie) et une diminution de la force musculaire (griptest) et de l'endurance (tapis de course). L'étudiant(e) devra tester la capacité d'un candidat médicament à corriger ces phénotypes. A cette fin, les mitochondries seront extraites des cœurs de souris et des différents modèles cellulaires humains traités avec le candidat médicament, et leurs propriétés fonctionnelles

seront caractérisées par oxygraphie et spectrofluorométrie, et des analyses en gel non-dénaturant pour évaluer l'état d'assemblage et l'abondance des complexes OXPHOS. Par ailleurs, la localisation cellulaire et les cibles du candidat seront cherchés grâce à la technologie de la chimie click.

Prérequis :

Le (la) candidat(e) devra être motivé(e), rigoureux (se), organisé (e), autonome, aimant travailler en équipe et idéalement avoir des connaissances solides sur le fonctionnement des mitochondries.

mots clés : maladies mitochondriales ; levure ; cellules humaines ; souris ; chimie click ; traitement pharmacologique

Titre du stage :

Stage N° 6.

Etude d'un facteur d'assemblage de l'ATP synthase impliqué dans une maladie mitochondriale et test de candidats médicaments dans des modèles cellulaires et murins.

Encadrement :

Godard François

Tel : 05 56 99 90 49

Email : godard@ibgc.cnrs.fr

Université de Bordeaux

Contexte :

L'essentiel de nos besoins en ATP est produit dans la mitochondrie par l'ATP synthase. Il s'agit d'un complexe de 17 sous-unités différentes présentes en une ou plusieurs copies. Les gènes de ces protéines sont localisés dans les génomes nucléaire et mitochondrial. Du fait de cette compartimentation génétique, deux machineries de synthèse protéique, l'une dans le cytosol et l'autre à l'intérieur de la mitochondrie, sont nécessaires à la formation de l'ATP synthase. Après synthèse, les sous-unités d'origine nucléaire sont importées dans l'organelle et s'assemblent avec celles encodées par le génome mitochondrial. Il s'agit d'un processus particulièrement complexe impliquant des protéines qui ne font pas partie du complexe final mais qui sont nécessaires à son assemblage. Nous avons au laboratoire identifié l'une de ces protéines d'assemblage chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, que nous avons appelée Fmc1 (pour Formation of Mitochondrial Complexes 1). Nous avons trouvé qu'elle intervient spécifiquement dans la formation du sous-domaine catalytique ($\alpha_3\beta_3$) de l'ATP synthase où l'ATP est synthétisé. Récemment, un équivalent de cette protéine a été trouvé chez l'homme, indiquant que le mécanisme de formation de cette enzyme est, à tout le moins en partie, conservé de la levure à l'homme. Des déficiences spécifiques dans l'hexamérisation des sous-unités α et β ont été décrites chez certains patients souffrant d'atteintes neuromusculaires. Il n'existe pas pour l'heure de thérapies réellement curatives contre ces maladies.

Objectifs :

Le travail proposé vise à mieux comprendre les mécanismes d'assemblage de l'ATP synthase impliquant la protéine Fmc1 et à identifier des molécules capables de compenser les défauts énergétiques induits par des perturbations dans ce processus d'assemblage. De telles molécules seront recherchées à partir d'un mutant de levure (déjà disponible) où le gène de la protéine Fmc1 a été éliminé du génome nucléaire ($fmc1\Delta$). Ces dernières seront testées sur une lignée cellulaire humaine où le gène FMC1 a été invalidé par la méthode CRISPR/cas9, afin de tester leur capacité à améliorer également la fonction mitochondriale dans ces cellules.

Méthodes employées :

Nous disposons au laboratoire d'une lignée de cellules humaines dans laquelle le gène nucléaire FMC1 a été invalidé par la technologie CRISPR/CAS9. L'étudiant-e fera une caractérisation biochimique complète de la lignée. Pour cela, les mitochondries seront isolées de cette lignée cellulaire et leurs activités de consommation d'oxygène et de production d'ATP seront mesurées. L'état d'assemblage et l'abondance de l'ATP synthase seront évalués par des techniques d'analyse en gel non-dénaturant avec des anticorps spécifiques. Pour la recherche de molécules capables de compenser le défaut en ATP synthase induit par la perte du gène FMC1 chez la levure, nous utilisons des chimiothèques constituées de composés au moins en phase II de tests cliniques pour la plupart déjà utilisées dans le domaine de la santé humaine, soit une approche de repositionnement. Les cellules mutantes seront étalées en tapis dense à la surface d'un milieu gélosé contenant une source de carbone non-fermentescible (sur lequel elles poussent très lentement) puis exposées aux molécules de la chimiothèque déposées sur des petits disques de papier. L'apparition autour de ceux-ci de halo de croissance identifiera les molécules actives. Les effets bénéfiques de celles-ci sur l'activité énergétique et la biogenèse des mitochondries dans des cellules de levure et humaines dépourvues du gène FMC1 seront caractérisés.

Prérequis :

Le (la) candidat(e) devra être motivé(e), rigoureux (se), organisé (e), autonome, aimant travailler en équipe et idéalement avoir des connaissances sur la mitochondrie et des solides notions en biochimie et en biologie moléculaire.

mots clés : 1 : maladies mitochondriales ; 2 : ATP synthase ; 3 : levure ; 3 : cellules humaines ; 4 : souris

Titre du stage :

Stage N° 7.

Analyses of the Protein-RNA interactions between SPN-4 and the 3'UTR of its target mRNAs

Encadrement :

Gomes José Eduardo

Email : jose-eduardo.gomes@u-bordeaux.fr

Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires; CNRS UMR 5095 - Université de Bordeaux

Contexte :

SPN-4 is a conserved RNA-binding protein, identified in *C. elegans*, containing a single RRM - RNA Recognition Motif. Results in the literature indicate SPN-4 binds the 3'UTR of four different mRNAs, regulating their expression in vivo. Preliminary results from the host laboratory identified two further target mRNAs. Nonetheless more targets remain to be identified. Importantly the Biochemistry of the SPN-4/mRNA interaction is poorly understood, and in particular the mRNA sequence and/or structure recognised by SPN-4 remains elusive.

Objectifs :

The goal of this internship is to characterise in detail the SPN-4/RNA interaction through structure/function approaches and in particular the RNA sequence and/or structure recognised by SPN-4.

Méthodes employées :

Electrophoresis Mobility Shift Assay; Isothermal Titration Calorimetry; Nuclear Magnetic Resonance; Protein production; In vitro transcription

Prérequis :

Knowledge in Protein Structure and Molecular Biology; Curiosity; Autonomy; Rigour; Team working / collaborative skills

mots clés : RNA-binding; RRM; RNA; EMSA; NMR

Titre du stage :

Stage N° 8.

Compréhension mécanistique des enzymes de type zeta-crystalline et mise en place de stratégies d'évolution dirigée en vue de leur optimisation

Encadrement :

Stines-Chaumeil Claire

Tel : 05 56 84 56 65

Email : claire.stines@crpp.cnrs.fr

Centre de Recherche Paul Pascal UMR 5031

Contexte :

Les enzymes de la famille des zeta-crystallines ont été identifiées dans les lentilles de chameau ou plus généralement dans les yeux des mammifères ou amphibiens. Peu d'informations sont disponibles dans la littérature au niveau du mécanisme enzymatique de ces enzymes. Elles catalysent la réduction de quinones en présence de NADPH et ont la propriété d'effectuer un transfert à un seul électron sur la quinone. Cette propriété présente un intérêt pour la mise au point d'immunocapteurs développés par notre collaborateur François Mavré au Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire à Paris. Classiquement est utilisée la diaphorase mais à l'heure actuelle, le transfert à deux électrons qu'elle catalyse est liée à l'étape limitante lors du processus d'amplification du signal. Plusieurs enzymes modèles sont déjà disponibles au Centre de Recherche Paul Pascal.

Objectifs :

L'objectif est double : 1) comprendre le fonctionnement des enzymes de type zeta cristalline à transfert à 1 électron en vue de 2) optimiser ces enzymes pour un fonctionnement optimal dans des capteurs à autoamplification exponentielle. Les points critiques pour leur optimisation sont : 1) la spécificité de substrat vis-à-vis de quinones d'intérêts ; 2) le maintien de leur activité à pH alcalin ; 3) leur stabilité sur plusieurs heures à 25°C ; 4) leur insensibilité à l'O₂ par mesure de leur activité NAD(P)H oxydase et 5) leur spécificité de cofacteur NADP⁺/NAD⁺ et NADPH_H⁺/NADH_H⁺. Il faut donc connaître les caractéristiques clés de chacun de nos biocatalyseurs modèles afin d'envisager des optimisations de type mélange de leur ADN ou création de banques de variants. L'objectif ultime sera le criblage de bibliothèques de variants par la technique de microfluidique.

Méthodes employées :

Les techniques utilisées iront du génie génétique (par exemple mutagenèse, clonage ou sous-clonage, réalisation de construction(s) génétique(s) à l'apprentissage des techniques de production purification d'enzymes sur automate AKTA et à leurs caractérisations biochimiques (gels SDS-PAGE ou natif, Dichroïsme circulaire, DLS, fluorimétrie) et enzymatiques par la réalisation de cinétiques enzymatiques à l'état stationnaire et/ou pré-stationnaire (utilisation d'un spectrophotomètre UV-visible et/ou d'un appareil de type stopped-flow). Des stratégies de mise en place de bibliothèques de variants seront envisagées (error-prone PCR et/ou DNA shuffling). Et enfin à la bio-informatique par la recherche de séquences dans les banques et leur alignement linéaires et 3D ou encore l'utilisation de la technique PROSS pour créer des variants plus stables. La mise au point de tests d'activité en gouttes par la technique microfluidique sera envisagée sur les enzymes purifiées puis sur des lysats bactériens.

Le stage sera précédé d'une étude bibliographique et un état de la technique antérieure dès la rentrée universitaire et consistera à faire un état des connaissances disponibles dans la littérature sur cette famille d'enzyme aussi bien dans les publications que dans la base de données brevet.

Prérequis :

Biochimiste et biologiste moléculaire de formation, attrait pour les techniques de génie génétique, production purification de protéines et caractérisation biochimique et enzymatique d'enzyme.

mots clés : Enzymologie Moléculaire/ Enzymologie appliquée/ Evolution dirigée / Production et purification d'enzymes/ Génie génétique/ Microfluidique/ Quinone oxydoréductase

Titre du stage :

Stage N° 9.

Interplay between DNA replication and gene expression

Encadrement :

Wu Pei-Yun Jenny

Tel : 0556999062

Email : pei-yun.wu@ibgc.cnrs.fr

University of Bordeaux, Institute of Biochemistry and Cellular Genetics (IBGC)

Contexte :

The faithful duplication and transfer of the genetic material is achieved by a tight coordination of DNA replication with cell cycle events, along with multiple pathways that promote genome integrity. This gives rise to a spatial and temporal organization of DNA replication, referred to as the replication program (RP). The proposed project investigates how the RP is altered in challenging conditions, which may have important implications for cell fate decisions. In particular, we have established unique models in the fission yeast *S. pombe* that allow us to evaluate the interplay between DNA replication, transcription, and genome maintenance in changing environments. For this work, we will take a multidisciplinary strategy that combines a variety of state-of-the-art approaches, from genome-wide to single-cell methodologies. The findings from this study will provide novel insight into how the architecture of genome duplication may contribute to the cellular response to adverse conditions.

Objectifs :

The objectives of this project are to understand how cells regulate the process of DNA replication in different contexts and the importance of this regulation for key aspects of cellular physiology.

Méthodes employées :

For our work, we have developed unique models using the powerful fission yeast system. Fission yeast is a well-known genetic model that has played a pioneering role in our understanding of central aspects of cell biology, including cell proliferation, genome dynamics, epigenetics and gene expression. Our studies will take advantage of diverse approaches, including state-of-the-art methods in genomics and bioinformatics, live-cell fluorescence microscopy, and standard methods in yeast genetics, molecular biology, cell biology, and biochemistry.

Prérequis :

We are seeking applicants with a strong interest in discovery research and a solid training in genetics and molecular biology. The student will work in an international and interactive scientific environment, attend seminars, and present their work during lab meetings. The candidate should be motivated and work well with other team members. A good level of written and spoken English is required, as all meetings and discussions in the team are held in English.

mots clés : Genome dynamics, DNA replication, gene expression, chromatin, genome integrity

Titre du stage :

Stage N° 10.

Monitoring intracellular biophysics during aging

Encadrement :

Coudreuse Damien

Tel : 0689025187

Email : damien.coudreuse@ibgc.cnrs.fr

Institute of Biochemistry and Cellular Genetics (UMR 5095)

Contexte :

Cell growth and proliferation are central to all living species. However, eukaryotic cells can also exit the cell cycle and enter a non-dividing state known as quiescence. Remarkably, the capacity of quiescent cells to re-enter the cell cycle and proliferate when exposed to favorable conditions slowly diminishes with time. This common phenomenon is referred to as chronological aging and has a strong impact on cell biology in both normal and pathological contexts. However, how cellular lifespan is shaped by the physiological changes that occur during aging remains poorly understood. Intriguingly, our unpublished data suggest that the biophysical properties of aging cells play a key role in defining cellular lifespan, revealing an unanticipated dimension in the regulation of chronological aging in eukaryotic cells.

Intracellular biochemistry and the reactions that underlie cellular processes are shaped by physical parameters such as diffusion and molecular crowding. These features of both the cytoplasm and nucleus affect virtually all aspects of cellular function. Remarkably, when yeast cells exit the cell cycle and age, they undergo a drastic rigidification of their cytoplasm and a reduction of its diffusivity. This project will take advantage of multi-disciplinary approaches to map different aspects of intracellular fluidity in non-dividing aging cells.

This research will be based on fission yeast models that were developed in the team using a synthetic biology strategy. Importantly, these unique models will allow us to address questions that cannot be investigated in other complex systems. Given the ubiquitous nature of chronological aging and the conservation of the processes that regulate cell proliferation among eukaryotes, our findings will provide novel insight into the way the physical chemistry of the cells impacts decision-making processes in changing environments and help us better understand the mechanisms of cellular aging that lie at the interface of biology and physics.

Objectifs :

Upon quiescence entry, yeast cells experience a drastic reduction in their metabolic activity and volume, together with a remarkable and conserved decrease in the fluidity of their internal space. Interestingly, our preliminary data suggest that cells exiting the cell cycle and aging with different biophysical properties display an aging pattern that is dramatically altered compared to that of wild type. However, the complexity of cytoplasmic and nuclear rheology makes it difficult to unravel the key physical parameters that critically modulate the metabolism and function of aging cells and may thereby delineate their lifespan. This project will take an unprecedented approach, coupling unique aging models in fission yeast with state-of-the-art imaging methods to monitor changes in intracellular fluidity that occur as cells age. The main objectives of this work will be to:

- 1) Implement the high-throughput measurement of single-cell volume using dedicated microfluidic devices.
- 2) Establish imaging, microfluidic and analysis tools to quantitatively and dynamically assess molecular crowding at the subcellular level through monitoring local phase separation.

3) Take advantage of the methods developed above to evaluate for the first time how molecular crowding may change as cells exit the cell cycle, age and resume growth in yeast strains that show distinct aging patterns.

This work will not only reveal a potential link between intracellular crowding and aging, but also improve our understanding of the fundamental biophysical properties of eukaryotic cells, with a broad range of implications that go beyond the study of aging.

Méthodes employées :

In addition to yeast genetics and molecular biology, this research will employ a range of state-of-the-art methods for which training will be provided. These include a microscopy-based method for determining the volume of individual yeast cells previously developed in the lab, advanced fluorescence and confocal microscopy approaches coupled with high-throughput microfluidic technologies, live-cell imaging, automated image analysis, and quantification of the phase separating properties of genetically engineered markers.

Prérequis :

We are seeking applicants with a strong interest in discovery research. We welcome students with various backgrounds that are motivated by cell biological research. Students with a training in biophysics are also encouraged to apply. The student will work in an international and interactive scientific environment, attend seminars, and present their work during lab meetings. The candidate should be motivated and work well with other team members. A good level of written and spoken English is required, as all meetings and discussions in the team are held in English.

mots clés : Aging, Chronological lifespan, Intracellular biophysics, Cell volume, Molecular Crowding, Yeast

Titre du stage :

Stage N° 11.

Recherche d'inhibiteurs pharmacologiques de l'Annexine-A2 pour lutter contre l'invasion tumorale et le processus de métastase

Encadrement :

Bouter Anthony

Email : anthony.bouter@u-bordeaux.fr

UMR5248 CBMN / CNRS, Université de Bordeaux

Contexte :

La métastase cancéreuse résulte d'une cascade d'évènements qui entraînent l'essaimage de la maladie, par voie sanguine ou lymphatique, à partir de la tumeur d'origine vers d'autres organes. Les cellules cancéreuses invasives sont soumises à des contraintes mécaniques importantes, en particulier des forces de compression et de cisaillement lors des processus d'intra- et d'extravasation, pour l'entrée et la sortie de la circulation sanguine, afin d'atteindre des organes distants (Wirtz et al., 2011).

Nous faisons l'hypothèse que ces contraintes mécaniques importantes au cours de la métastase engendrent des ruptures de la membrane plasmique des cellules cancéreuses invasives. Ces cellules possèderaient une machinerie de réparation membranaire exacerbée qui leur permettrait de réparer rapidement les nombreux dommages membranaires subis. Vérifier une telle hypothèse permettrait de révéler le « talon d'Achille » des cellules cancéreuses métastatiques et d'ouvrir la voie à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant d'annihiler la métastase.

Nous avons récemment apporté des preuves de concept validant cette hypothèse de travail in cellulo (Bouvet et al., Sci Rep. 2020) et in vivo (Gounou et al., *biol cell* 2023, *Research square* 2022). Nous avons montré que la migration de cellules MDA-MB-231 (adénome mammaire métastatique) sur du collagène fibrillaire induit des ruptures de la membrane plasmique. Ces cellules sont capables de réparer ces ruptures grâce notamment à l'annexine-A5 (ANXA5) et l'ANXA6, protéines connues pour leur implication dans la réparation membranaire, qui sont fortement exprimées dans les cellules cancéreuses invasives. Nous avons montré que l'inhibition de ces annexines conduit à la mort des cellules MDA-MB-231 au cours de leur migration, à cause d'un défaut dans leur machinerie de réparation membranaire (Bouvet et al., 2020). Nous avons montré également que l'inhibition de l'ANXA2 (Gounou et al., 2022) ou de l'ANXA5 et ANXA6 (Gounou et al., 2023) freine la progression tumorale chez la souris et le poisson zèbre.

Objectifs :

Nous cherchons à développer des outils moléculaires capables d'inhiber la réparation membranaire dans les cellules cancéreuses invasives. Nous souhaitons tester l'effet d'anticorps anti-ANXA2 sur la réparation membranaire des cellules cancéreuses soumises à des contraintes mécaniques. Nous faisons l'hypothèse que les anticorps pénétreront dans les cellules endommagées, bloquant la réparation membranaire et conduisant ainsi à la mort des cellules cancéreuses. Dans ce contexte, nous avons établi une collaboration avec l'équipe de Pierre Martineau (IRCM, U1194, Montpellier) qui est spécialisée dans la sélection et la production d'anticorps humains utilisés pour l'immunothérapie du cancer. Il s'agira de réaliser des tests fonctionnels sur des cellules établies à partir de cancer du sein (MDA-MB-231) et du pancréas (AsPC1), soumises à des forces de cisaillement en présence de différents anticorps candidats. Les anticorps qui auront été sélectionnés à partir des tests fonctionnels seront ensuite expérimentés in vivo chez la souris et le poisson zèbre.

Méthodes employées :

Ce projet requiert la culture des lignées cancéreuses MDA-MB-231 et AsPC1. Le test fonctionnel consistera à analyser le taux de cellules endommagées et non réparées après passage à travers une aiguille de 30 Gauges (diamètre interne = 160 μm) fixée sur une seringue (Gounou et al, *research square*, 2022). Le pourcentage de cellules non réparées sera quantifié par analyse en microscopie de fluorescence, à l'aide marqueurs nucléaires spécifiques des cellules nécrotiques.

La capacité des anticorps à pénétrer dans les cellules endommagées sera évaluée par imagerie en microscopie électronique à transmission. Les tests in vivo seront réalisés par le service commun des animaleries de Bordeaux (souris) et la plateforme Aderafish (poisson). La capacité des cellules cancéreuses à coloniser les organes chez la souris ou le poisson zèbre seront évaluées par imagerie en bioluminescence ou de fluorescence, respectivement, comme décrit précédemment (Gounou et al, research square, 2022). La préparation des cellules et l'analyse histologique post-mortem pour les expériences sur souris seront réalisées au laboratoire.

Ce projet requiert la culture des lignées cancéreuses MDA-MB-231 et AsPC1. Le test fonctionnel consistera à analyser le taux de cellules endommagées et non réparées après passage à travers une aiguille de 30 Gauges (diamètre interne = 160 μm) fixée sur une seringue (Gounou et al, research square, 2022). Le pourcentage de cellules non réparées sera quantifié par analyse en microscopie de fluorescence, à l'aide marqueurs nucléaires spécifiques des cellules nécrotiques. La capacité des anticorps à pénétrer dans les cellules endommagées sera évaluée par imagerie en microscopie électronique à transmission. Les tests in vivo seront réalisés par le service commun des animaleries de Bordeaux (souris) et la plateforme Aderafish (poisson). La capacité des cellules cancéreuses à coloniser les organes chez la souris ou le poisson zèbre seront évaluées par imagerie en bioluminescence ou de fluorescence, respectivement, comme décrit précédemment (Gounou et al, research square, 2022). La préparation des cellules et l'analyse histologique post-mortem pour les expériences sur souris seront réalisées au laboratoire.

Prérequis :

L'étudiant(e) doit avoir des connaissances solides en imagerie cellulaire et un intérêt fort pour des recherches dans le domaine de la santé humaine. Une bonne connaissance du traitement et d'analyse d'image numérique (par exemple avec ImageJ) et du traitement statistique des données expérimentales sont requises. L'étudiant(e) sera formé(e) à l'ensemble des techniques nécessaires au projet. Une première expérience en microscopie de fluorescence et en culture cellulaire est souhaitée.

mots clés : Cancer, métastase, invasion, réparation membranaire, annexines

Titre du stage :

Stage N° 12.

Organisation génomique de *cagA* chez la bactérie *Helicobacter pylori* : impact sur l'expression de l'oncoprotéine CagA et sur la virulence.

Encadrement :

Dumay-Odelot Hélène

Tel : 05 57 57 56 91

Email : helene.dumay-odelot@u-bordeaux.fr

Université de Bordeaux Laboratoire ARNA INSERM U1212-CNRS UMR 5320

Contexte :

Helicobacter pylori est une bactérie fréquente qui colonise la muqueuse gastrique. Cette infection bactérienne touche plus de 50% de la population mondiale. Acquisée principalement durant l'enfance, elle persiste toute la vie si elle n'est pas traitée. Alors que l'infection reste asymptomatique dans la majorité des cas, 10 à 15 % des personnes infectées développeront une maladie ulcéreuse gastroduodénale comme des gastrites (inflammation de la paroi de l'estomac) ou des ulcères digestifs. Dans certains cas, l'infection chronique engendra des pathologies gastriques sévères telles que des cancers gastriques : adénocarcinomes ou lymphomes de type MALT (Atherton, 2006). Il faut noter que les cancers gastriques représentent la troisième cause de décès par cancer dans le monde. Déclaré comme agent carcinogène de classe I par l'OMS, *Helicobacter pylori* a causé en 2018 au moins 810 000 cas de cancer (de Martel et al, 2020).

Chez *Helicobacter pylori*, le facteur de virulence majeur impliqué dans le risque de cancer gastrique est l'îlot de pathogénicité *cag* (*cag*-PAI). Cette région génomique de 40 kb contenant une trentaine de gènes, code pour un système de sécrétion de type IV (SST4) responsable de la translocation de l'oncoprotéine CagA dans les cellules de l'hôte (Backert et al, 2015). Après sa translocation dans la cellule épithéliale gastrique, CagA interagit avec des facteurs de l'hôte et perturbe les voies de signalisation cellulaire, induisant la carcinogénèse gastrique. Différentes études ont montré que la sévérité des symptômes associés à *H. pylori* est très fortement influencée par la diversité génétique des souches infectantes. Récemment des analyses génomiques comparatives ont mis en évidence que certaines souches pathogènes de *Helicobacter pylori*, auraient subi un réarrangement génomique de la région *cag*-PAI divisant les souches bactériennes en deux grands types (type A et type B). De cet événement chromosomique, résulte une organisation génomique du gène *cagA* différente dans l'îlot de pathogénicité suivant le type A ou B des souches. Ce phénomène confère une hétérogénéité de séquence et de nombre de copie du gène *cagA* (Su et al, 2019).

L'impact de cette organisation génétique de *cagA* sur la pathogénicité de la bactérie n'est pas connu mais des données récentes de la littérature ainsi que les résultats de notre équipe suggèrent que la quantité de protéine CagA produite dépend de la souche de *H. pylori* infectante et pourrait être régulée. Notre projet d'étude porte sur l'influence des souches bactériennes *H. pylori* dans l'oncogénèse gastrique et pourrait potentiellement permettre d'identifier un marqueur de prédiction de risque de cancer suite à une infection à *H. pylori*.

Objectifs :

Actuellement, plusieurs questionnements se posent à nous. Après avoir caractérisé les souches 26695 (type A) et B128 (type B) notamment pour leur nombre de copies du gène *cagA* et son organisation, nous nous demanderons si ces différences de contexte génomique influencent la synthèse de la protéine CagA dans les différentes bactéries. Nous devrons évaluer ensuite, l'effet de cette organisation de type A versus type B sur la pathogénicité de *Helicobacter pylori* ainsi que sur l'acquisition de caractères tumoraux par les cellules gastriques suite à l'infection par les différentes souches bactériennes.

Méthodes employées :

Les techniques utilisées sont des techniques courantes de la biologie moléculaire, biochimie et de biologie cellulaire microbienne et humaine.

Quatre aspects sont importants dans ce projet et sont résumés brièvement ci-dessous. Suivant l'avancement de notre travail et en accord avec l'étudiant(e), le projet de master portera plus particulièrement sur certains de ces aspects.

1-caractérisation de souches permettant l'étude du contexte génomique de cagA :

Disposant au laboratoire de souches 26696 (type A) et différentes B128 (type B), nous devons les caractériser et définir notamment le nombre de copie de cagA. Nous utiliserons principalement des techniques de PCR et qPCR. Afin de s'affranchir de la contribution d'éléments génomiques extérieurs au cag-PAI dans l'expression de CagA, nous pourrons construire de nouvelles souches en remplaçant l'ensemble du cag-PAI de la souche B128 par celui de la souche 26695, et inversement. Cet aspect permettra de sélectionner les souches qui détermineront la suite de l'étude.

2-Etude de l'impact du contexte génomique de cagA sur l'expression de la protéine bactérienne :

L'analyse de l'expression de l'ARNm cagA sera effectuée par Northern et/ou RT-qPCR. Celle de l'expression de la protéine CagA par western blot dans les différentes souches.

3-Etude de l'impact du contexte génomique de cagA sur l'infection de la bactérie :

L'infection d'une lignée de cellules épithéliales gastriques humaines (AGS) avec les différentes souches de *H. pylori* pourra être suivie en mesurant l'activation de NFκB et la production de l'interleukine 8 (qui contribuent à la réponse inflammatoire (Brandt et al, 2005)). L'analyse du phénotype morphologique appelé « hummingbird » correspondant à un allongement cellulaire suite à une infection pourra aussi être utilisée (Segal et al, 1999),

De plus, nous sommes particulièrement intéressés pour développer au laboratoire un système rapporteur permettant de mesurer le phénomène de translocation de l'oncoprotéine CagA. Ce système pourra s'inspirer d'un système récemment publié par Lettl et al, 2021, basé sur la reconstitution de l'activité luciférase lors de la translocation de la protéine CagA étiquetée d'un motif du gène luciférase.

4-Etude de l'impact du contexte génomique de cagA sur l'acquisition des caractères carcinogènes des cellules gastriques épithéliales après infection des différentes souches bactériennes :

Pour cela, nous mettrons en place au laboratoire des tests cellulaires : (i) Analyse de la croissance sans ancrage (ou formation de tumorsphères en agar mou), (ii) Analyse de la migration cellulaire par insert de culture cellulaire (transwell), (iii) Analyse de la capacité invasive à travers un gel de matrice extracellulaire (matrigel transwell).

Prérequis :

L'étudiant devra avoir des connaissances solides en biochimie -biologie moléculaire, et porter un intérêt pour les mécanismes de régulation de l'expression génique et protéique. Une motivation forte pour le travail à la paillasse sera apprécié.

mots clés : *Helicobacter pylori*, Régulation de l'expression génique et protéique, oncoprotéine CagA, Infection cellulaire , tumorigénèse

Titre du stage :

Stage N° 13.

Development of assays for the quantitative analysis of fusion in normal and pathological contexts

Encadrement :

Rojo Manuel

Tel : 05 56 99 90 30

Email : manuel.rojo@ibgc.cnrs.fr

Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires

Contexte :

Mitochondria are essential organelles that play a central role in cellular metabolism and are notably involved in the oxidation of nutrients and the synthesis of ATP by oxidative phosphorylation (OXPHOS). Mitochondrial bioenergetics are essential for the function of all post-mitotic tissues that, like neurons and striated muscle, have significant energy demands. During development, the rewiring of cellular bioenergetics from cytosolic glycolysis to mitochondrial OXPHOS is involved in the transition from a proliferative to a differentiated cell state. Interestingly, the reversal of this metabolic reprogramming (from OXPHOS to glycolysis) is often associated to oncogenic transformation.

Mitochondria are dynamic organelles that move, fuse and divide. The fusion and fission of their double membranes are mediated by specific machineries that include large GTP-binding proteins of the dynamin superfamily. The equilibrium between antagonistic fusion and fission determines overall mitochondrial morphology: they appear as a collection of separate entities at high fission rates or form a network of elongated and branched filaments when fusion is prevalent. In addition, the fusion/fission dynamics modulate their metabolic and bioenergetic properties and are essential for their maintenance, transmission and degradation. Accordingly, the mutation of fusion and fission factors is linked to severe hereditary diseases, notably neuropathies like Dominant Optic Atrophy (DOA) or Charcot-Marie-Tooth disease (CMT). In addition, alterations of mitochondrial dynamics also appear involved in neurodegenerative diseases like Alzheimer's Disease (AD) and Parkinson's disease (PD). More recently, it has been established that alterations of mitochondrial bioenergetics and/or fusion/fission dynamics can play a role in oncogenesis, cancer and/or chemoresistance.

Objectifs :

The characterization of fusion/fission dynamics and of the enzymes involved will shed light on these biological processes and will also improve our understanding of the diseases that are linked to their alterations. The goal of this project is to develop and validate an assay for the precise and quantitative characterization of mitochondrial fusion in vitro. It will allow the thorough characterization of the fusion process under normal conditions and, later on, in different pathological contexts.

At present, most studies on mitochondrial fusion/fission dynamics are based on the visualization of mitochondrial morphology and dynamics by fluorescence microscopy, both in fixed or in living cells. However, the analysis of morphology and dynamics by microscopy is often qualitative and quantitative measures can be time-consuming and labor-intensive.

The goal of this project is to develop a quantitative mitochondrial fusion assay based on the measurement of a fluorescent or luminescent signal generated by the complementation between dimerization-dependent fluorescent proteins (ddFPs) or fragments of a Luciferase (NanoLuc). Ultimately, we seek to dispose of a quantitative fusion assay that allows (1) to obtain a quantitative measure of fusion efficacy in different cellular and pathological contexts (cells expressing wild-type or mutant fusion factors; normal or transformed cells, etc.) and (2) to search and characterize pharmacological modulators of the fusion process that can regulate fusion/fission dynamics. The identification of the latter shall allow to explore novel therapeutic strategies.

Méthodes employées :

We will generate vectors for the expression and mitochondrial targeting of (1) dimerization-dependent fluorescent proteins (ddFPs) and/or (2) fragments of Nanoluc luciferase (NLuc-fragments) and we will generate cells that express these molecules separately. Of note, these molecules/fragments are inactive when expressed alone and only become fluorescent or luminescent when they associate to each other.

Next, we will establish assays enabling the fusion of mitochondria carrying complementing ddFPs and/or NLuc-fragments, the assembly of functional FPs and/or NLuc and thus, the measurement of a fluorescent or luminescent signal proportional to the fusion reaction. For the fusion of mitochondria within cultured cells, we will co-plate different cell populations and induce cell fusion with polyethylene glycol (PEG) or the Glycoprotein of Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G). For fusion in vitro, isolated mitochondria will be mixed and incubated under appropriate conditions. In order to confirm the validity of the assay, we will also use cells that are devoid of essential fusion factors and carry fusion-incompetent mitochondria. Fusion and concomitant assembly of ddFPs will be first observed by fluorescence microscopy. The quantitative analysis of fluorescence and luminescence will be performed with dedicated plate readers.

Prérequis :

Knowledge of molecular and cellular biology and interest in mitochondrial biology. Curiosity and ambition to acquire experimental skills and to develop novel tools and strategies based on fluorescence and luminescence. The student will choose whether she/he wishes to perform the internship in English or in French.

mots clés : mitochondria, fusion, fission, oxidative phosphorylation,

Titre du stage :

Stage N° 14.

DBHS proteins and RNA recognition

Encadrement :

Fribourg Sebastien

Tel : 0557571511

Email : sebastien.fribourg@inserm.fr

ARNA UMR5320

Contexte :

The Drosophila behavior/human splicing (DBHS) proteins have been described as multifunctional (mostly) nuclear proteins, implicated in subnuclear body formation (paraspeckles), transcription initiation, coactivation and co-repression, constitutive and alternative splicing, DNA repair, innate immunity sensing against HIV-2 and contributing to circadian rhythm regulation, tumor suppression etc ... This multiple involvement in various processes within the cell makes them very attractive but also difficult to address in vivo. A common theme in their function is nucleic acid recognition, however despite the presence of classical RNA binding domain their ability to recognize different targets implicate a non-classical mechanism of interaction to be discovered.

Here, we propose a project aiming at understanding the molecular basis driving RNA/DNA recognition by DBHS proteins.

Mammalian genomes encode three paralogous proteins (NONO, SFPQ and PSPC1) whereas invertebrates encode only one or two. All DBHS proteins have a common architecture with a core conserved region of ~300 amino acids. Their N- and C-terminal extensions differ in size giving total lengths of 400 residues (NONO) to more than 700 residues for SFPQ. This extra polypeptide consists primarily of polyproline/glutamine-rich low-complexity regions and functional sequences including nuclear localization signals (at the C-termini). The DBHS core consists of defined structural domains: two tandem RNA recognition motif (RRM) domains, a NONA/paraspeckle (NOPS) domain and a coiled-coil region. DBHS proteins form obligate homo- and heterodimers via their core domains and have been shown to interact with nucleic acids.

Despite the presence of classical RRM domains it appears that the mechanism of RNA recognition deviates substantially from other RRM domains. This is the question lying at the heart of this project and the subject of this proposed internship.

Objectifs :

The objectives are to map down the minimal region of each protein able to bind efficiently RNA and DNA targets and to explore the potential role of N- & C- terminal extensions.

Méthodes employées :

This project includes molecular biology, biochemistry and structural biology techniques aiming at analyzing and defining the domain contribution to nucleic acid binding of DBHS proteins. You will be trained and apply classical molecular biology cloning techniques (Gibson Assembly) in order to clone the regions of interest of our favorite proteins. You will overexpress various proteins fragments and mutants in a prokaryotic host. You will purify the expressed proteins/domains by chromatography techniques in order to obtain ultra-pure samples. You will use these purified samples to obtain a complete analysis of nucleic acid binding properties (EMSA, ITC) and determine K_ds. The most promising samples will be used to screen for crystallization conditions aiming at solving the RNA/DNA complexes structure. Altogether this will provide a molecular description of the elusive interaction between DBHS proteins and nucleic acids at the heart of their function.

Prérequis :

Strong interest in the molecular basis of biological events (biochemistry, structural biology).

mots clés : DBHS, Structure, RNA

Titre du stage :

Stage N° 15.

Structure et ciblage d'ARN G4 dans les virus

Encadrement :

AMRANE Samir

Tel : 0540002224

Email : samir.amrane@u-bordeaux.fr

Université de Bordeaux

Contexte :

RNA sequences are able to adopt unusual nucleic acid structures such as G-quadruplexes (or G4s), I-motifs or triplexes. These structures are involved in precise biological processes but also in several infectious or neurodegenerative diseases and cancers. For instance, DNA or RNA G4s are emerging as a promising target for the design of new antiviral molecules against HIV-1, Covid-19 or Ebola viruses.

Objectifs :

In this project, the candidate will use several biophysical and biochemical techniques to study : 1) The 3D structure adopted by the RNA G4s derived from Ebola virus (Techniques: Circular Dichroism, UV-absorbance spectroscopy, Nuclear magnetic resonance) and 2) The interaction of these G4s with small chemical compounds or proteins (Techniques: Microcalorimetry and fluorescence spectroscopy) that can be used as new anti-Ebola molecules.

Méthodes employées :

Circular Dichroism, UV-absorbance spectroscopy, Nuclear magnetic resonance, Microcalorimetry and fluorescence spectroscopy

Prérequis :

Biochemistry, Biophysics, Chemistry

mots clés : RNA structure, new antiviral molecules, biophysics, viruses

Titre du stage :

Stage N° 16.

RNA binding by intrinsically disordered proteins

Encadrement :

Mackereth Cameron

Email : cameron.mackereth@inserm.fr

Inserm U1212 / Univ. Bordeaux

Contexte :

Not all proteins are found as a completely folded structure. In fact, a large part of human proteins have disordered regions that function in this disordered state. There is increasing evidence that the disordered regions can be scaffolds for other proteins to bind to, they can contribute to the formation of condensates in the cell thanks to a process called liquid-liquid phase separation, and they are also shown to interact with nucleic acids. We are particularly interested in the characterization of new protein-RNA interactions that involve these intrinsically disordered regions of proteins. NMR spectroscopy is one of the main tools to study these interactions, since NMR does not require a protein to be structured in order to obtain residue-specific details. Our preliminary data already show that we can carefully observe protein-RNA interactions of disordered proteins at the atomic level. These interactions would be important for health, for cancer, and for other diseases.

Objectifs :

The goal is to express and purify intrinsically disordered proteins that are isotopically-labelled for a complete study by NMR spectroscopy. The proteins will be studied alone, and also with a variety of RNA oligonucleotides to see which RNA are the best ligands, and to determine precisely which amino acids in the disordered proteins are binding to the RNA. These residues will be mutated to confirm that they are important for binding to RNA. Depending on the amount of experiments that are completed, additional tests will be planned to test the function of these protein-RNA interactions using several assays.

Méthodes employées :

Molecular biology, cloning, protein expression, protein purification, NMR spectroscopy, electrophoretic mobility shift assays, FRET, protein biochemistry, additional biophysics techniques

Prérequis :

Molecular biology or structure biology

mots clés : Intrinsically disordered proteins, RNA, NMR spectroscopy, biochemistry, molecular biology

Titre du stage :

Stage N° 17.

Biophysical characterization and role of MYBL2 DNA G-quadruplexes in cancer

Encadrement :

Salgado Gilmar

Tel : +33 5 4000 2224

Email : gilmar.salgado@u-bordeaux.fr

Université de Bordeaux / ARNA laboratory

Contexte :

The MYBL2 (V-Myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 2), also known as B-MYB, is a proto-oncogene located on chromosome 20, locus GRCh38.p14. This gene is responsible for encoding a 21 kDa transcription factor essential in the regulation of expression of multiple genes regulating cell cycle progression, cell survival and cell differentiation. In the malignant transformation of tumor cells, these properties are dysregulated by the MYBL2 oncogene that mediates these alterations. Bioinformatic analysis of the human genome showed that promoter regions of several oncogenes are highly rich in guanine nucleotides thus allowing the formation of non-canonical structures called G-quadruplexes (G4). In this context, the main aim of this work is to characterize the G4 structures in the promoter region of the MYBL2 oncogene as a possible target for anticancer therapy.

Objectifs :

Perform biophysical and structural studies on the DNA G-quadruplex. Probe ligands that may act and disrupt the interaction of the G-quadruplex with key regulatory proteins.

Méthodes employées :

RMN (1D/2D) , HPLC, CD, FRET, PAGE, ITC and MST

Prérequis :

Interested in Biophysics and structural biology

mots clés : DNA structures, structural biology, NMR, cancer

Titre du stage :

Stage N° 18.

Rôle de l'environnement lipidique membranaire sur les propriétés biophysiques et pharmacologiques du récepteur dopamine D2

Encadrement :

ALVES Isabel

Tel : 0540006849

Email : i.alves@cbmn.u-bordeaux.fr

CBMN, UMR 5248 CNRS

Contexte :

Le récepteur dopaminergique D2 (RD2) est une cible thérapeutique majeure du fait de sa dérégulation dans de nombreuses pathologies psychiatriques, et la schizophrénie en particulier. Des altérations au niveau de la composition lipidique de la membrane sont impliquées dans ces pathologies, notamment concernant le taux des acides gras polyinsaturés (AGPI). Des résultats obtenus par notre laboratoire montrent que l'environnement lipidique membranaire – est plus spécifiquement celui en AGPI - permet de réguler l'affinité du récepteur pour certains ligands et/ou modifier l'activation de certaines voies de signalisation.

Objectifs :

Il reste maintenant à explorer les mécanismes au niveau moléculaire responsables de l'impact des AGPIs sur l'activation et signalisation du RD2. D'une part il est possible que les APs modulent l'organisation et propriétés des lipides membranaires, et indirectement le récepteur. Cette hypothèse sera testée avec des approches biophysiques en utilisant des systèmes lipidique modèles. D'autre part les changements de conformation du RD2 dans différents environnements lipidiques seront explorés par des approches de spectroscopie de fluorescence et transfert d'énergie.

Méthodes employées :

Fluorescence (FRET, BRET), calorimétrie, spectroscopie de fluorescence, purification de protéines, SDS gel, western blot.

Prérequis :

Connaissances de la biochimie des protéines et lipides

mots clés : Lipides, récepteurs, approches biophysiques

Titre du stage :

Stage N° 19.

Rôle de l'environnement lipidique membranaire sur l'hétéromérisation des récepteurs couplés aux protéines G

Encadrement :

RASCOL ESTELLE

Tel : 0540006821

Email : estelle.rascol@u-bordeaux.fr

UB, UMR 5248, CBMN

Contexte :

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent la plus grande famille de protéines membranaires, et jouent un rôle majeur dans la signalisation intercellulaire. Ils font également partie des principales cibles thérapeutiques. Comme ils sont enchâssés dans la membrane, nous nous intéressons aux propriétés de la membrane et au rôle des composants membranaires sur leur activité. Une des propriétés qui nous intéresse est la capacité des RCPG à interagir entre eux, ce qui pourrait moduler la réponse intracellulaire de ces récepteurs.

Objectifs :

Dans ce projet, nous nous intéressons notamment aux paramètres pouvant impacter les propriétés de la membrane, et notamment la composition lipidique, sur l'interaction du récepteur dopaminergique D2 (RD2) avec d'autres RCPG. Pour cela des essais sur des modèles cellulaires et membranaires seront réalisés. Pour les essais sur modèles membranaires, des étapes de purification et reconstitution des récepteurs d'intérêt seront nécessaires. Les investigations seront alors menées à l'aide de différentes techniques biophysiques : spectroscopie de fluorescence, Transfert d'Energie par Résonance de type Forster (FRET), Résonance Plasmonique aux ondes guidées (PWR), thermophorèse micro-échelle (MST), etc. Sur modèles cellulaires, les expériences pourront consister en la caractérisation de différentes voies de signalisation (flux calcique, dosage AMPc).

Méthodes employées :

Fluorescence, bioluminescence, calorimétrie, purification de protéines, SDS gel, western blot.

Prérequis :

Connaissances de la biochimie des protéines et lipides, signalisation intracellulaire des RCPG

mots clés : Lipides, récepteurs, approches biophysiques

Titre du stage :

Stage N° 20.

Evaluation d'une forme oculaire sur des modèles in vitro et ex vivo

Encadrement :

VACHER Gaëlle

Email : gaelle.vacher@unige.ch§

Genève

Contexte :

Ce stage s'inscrit dans le cadre d'une thèse basée sur le développement d'une nouvelle plateforme galénique ophtalmique pour la délivrance de molécules au niveau de la rétine. En effet, les pathologies ophtalmiques invalidantes responsables de déficience oculaire et de cécité touchaient en 2019 au moins 2,2 milliards de personnes dans le monde. La mise au point de formulations adéquates reste néanmoins un challenge majeur du fait des caractéristiques spécifiques de l'œil. Pour le développement d'une nouvelle forme pharmaceutique ophtalmique, le stagiaire, au sein du laboratoire de biopharmacie à Genève, travaillera sur différents modèles cellulaires représentatifs de l'œil (cornée, conjonctive, rétine mais aussi coculture et modèles organotypiques). Les objectifs principaux sont l'évaluation de la toxicité des formulations sur ces modèles, ainsi que l'évaluation du passage du principe actif au sein des différentes couches oculaires sur des modèles in vitro (coculture) et ex vivo.

Objectifs :

Dans le respect des procédures et des règles de sécurité propres au laboratoire, l'étudiant-e développera, optimisera et analysera les différents modèles mis en place au laboratoire lors d'un précédent stage (coating, seeding, réalisation des cocultures, comptage cellulaire, microscopie, coupes histologiques, etc).

Méthodes employées :

Il évaluera in vitro et ex vivo la toxicité oculaire de différentes formulations nanotechnologiques (mesure de la viabilité cellulaire - WST-1, coupes histologiques, etc). Il évaluera également le passage de la substance active à travers différentes couches cellulaires (dosage du principe actif par fluorescence, microscopie confocale, mesure de TEER, etc). Les données engendrées doivent permettre, entre autres, de valider l'innocuité de la formulation en vue d'un passage en vivo. Les résultats des travaux expérimentaux pourront faire l'objet d'un article scientifique.

Prérequis :

Une connaissance en culture cellulaire serait appréciée.

La maîtrise de l'anglais est fortement recommandée.

mots clés : forme ophtalmique, œil, culture cellulaire, cocultures, modèles in vitro, ex vivo, toxicité, passage oculaire

Titre du stage :

Stage N° 21.

Rôle du calcium dans la signalisation de l'immunité antivirale chez les plantes

Encadrement :

MONGRAND Sébastien

Tel : 0663266000

Email : sebastien.mongrand@u-bordeaux.fr

Université de Bordeaux

Contexte :

Le stage se déroulera dans l'équipe « Microdomaines et Signalisation membranaire » dirigée par Sébastien Mongrand (DR CNRS) et Véronique Germain (MCU). <https://www.biomemb.cnrs.fr/thematique/microdomaines-membranaires-et-signalisation/>

Le changement climatique entraîne l'émergence de maladies chez les végétaux dont 50% sont liées à des virus. Les virus des plantes sont des pathogènes intracellulaires obligatoires qui menacent la sécurité alimentaire et entraînent des milliards de dollars de pertes agroéconomiques chaque année. Par exemple, le Potexvirus pepino mosaic virus est devenu ces dernières années un virus pandémique dans la culture de la tomate.

Les virus détournent les machineries de la cellule hôte pour réaliser leur cycle. À partir des premières cellules infectées, les particules virales se déplacent de cellule en cellule à travers les plasmodesmes (PD), des canaux de communication intercellulaire reliant les cellules végétales. Ils sont ensuite chargés dans les tissus vasculaires et se propagent ainsi dans toute la plante en systémie.

Les protéines codées par le virus détournent les Plasmodesmes et augmentent leur taille pour permettre la translocation du virus vers la cellule voisine. La compréhension de la nature moléculaire de la résistance de l'hôte et des mécanismes de défense antiviraux est cruciale pour développer des cultures résistantes aux virus pour une sécurité alimentaire durable. Lors de la reconnaissance plante-pathogène, l'augmentation rapide du calcium cytoplasmique (Ca^{2+}), un messager secondaire de signalisation, est fréquemment observée comme essentielle à l'activation des réponses de défense des plantes lors d'infections bactériennes ou fongiques. Nous ne connaissons toujours pas son rôle précis pendant l'infection virale, ni comment le virus va manipuler cette signalisation pour pouvoir contourner les défenses. Il a été démontré que plusieurs types de canaux Ca^{2+} , tous codés par des familles multigéniques, contribuent à la libération cytoplasmique de Ca^{2+} , notamment les canaux à déclenchement par nucléotides cycliques (CNGC), les récepteurs du glutamate (GLR) et les canaux à augmentation réduite du Ca^{2+} induite par l'hyperosmolalité (OSCA)⁹. Il est intéressant de noter que le Ca^{2+} régule les protéines kinases telles que les protéines kinases dépendantes du calcium (CPK) qui sont capables de moduler l'activité des NADPH oxydases et de constituer un nœud complexe entre les voies de signalisation liées au calcium et aux ROS (reactive oxygen species). Lors de nos travaux, nous avons précédemment montré que l'isoforme CPK3 régule le mouvement du potexvirus. Cette kinase doit être activée par une élévation de la concentration calcique.

Le stage visera à déterminer par une approche de génétique inverse parmi les gènes codant des canaux calciques, quels sont ceux qui sont impliqués dans la réponse antivirale de la plante et comprendre le rôle du calcium dans l'activation de CPK3.

Rocher M, Simon V, Jolivet MD, Sofer L, Deroubaix AF, Germain V, Mongrand S & German-Retana S (2022). Remorins of group 1 play an agonistic role in potyvirus cell-to-cell movement in *N. benthamiana*. *Viruses*.

Perraki A., Gronnier J, Gouguet P, Boudsocq M, Deroubaix AF, Simon V, German-Retana S, Zipfel C, Bayer E, Mongrand M, Germain V. REM1.3 phospho-status defines its plasma membrane nanodomain organization and activity in restricting PVX cell-to-cell movement. *PLoS Pathogens*. 2018 Nov 12;14(11)

Gouguet P., Gronnier J., Legrand A., Perraki A., Jolivet M.-D., Deroubaix A.-F. German-Retana S., Boudsocq M., Habenstein B., Mongrand S., Germain V. Connecting the dots : from nanodomains to physiological functions of REMORINs. *Plant Physiol.* -2021-185(3):632-649

Gronnier J, Gerbeau-Pissot P, Germain V, Mongrand S, Simon-Plas F. Divide and Rule: Plant Plasma Membrane Organization. *Trends Plant Sci.* 2018 Oct;23(10):899-917

Gronnier J, Crowet JM, Habenstein B, Nasir MN, Bayle V, Hosy E, Platre MP, Gouguet P, Raffaele S, Martinez D, Grelard A, Loquet A, Simon-Plas F, Gerbeau-Pissot P, Der C, Bayer EM, Jaillais Y, Deleu M, Germain V (avant dernier auteur, deux co-derniers auteurs), Lins L, Mongrand S. Structural basis for plant plasma membrane protein dynamics and organization into functional nanodomains. *eLife.* 2017 Jul 31;6.

Objectifs :

Méthodes employées :

Prérequis :

Intérêt pour la recherche

Profil biologie moléculaires/biochimie

Des prérequis en biologie végétale sont appréciés mais pas indispensables

mots clés : Virus, végétaux, défense, mutants, kinase, Calcium,

Titre du stage :

Stage N° 22.

Tracing the intracellular paths of targeted protein secretion

Encadrement :

Boutté Yohann

Email : yohann.boutte@u-bordeaux.fr

LBM UMR5200

Contexte :

Targeted protein secretion is a process crucial to eukaryotic cells to drive protein localization at the right place and at the right moment. Plants use this process to adapt to environmental changes and coordinate their growth. Identifying the intracellular paths that targeted secretion is using is valuable in many aspects, not only to extend our basic knowledge but also to understand how plants deal with changing environment to adapt their growth. To reach this goal, two biological processes are particularly important to consider: 1) the cell-to-cell communication mediated by the plasmodesmata (PD) pores that localize at plasma membrane and which interconnect virtually all cells within the plant body, establishing direct membrane and cytoplasmic continuity, a situation unique to plants; 2) the establishment of polar domains at the plasma membrane that instruct a directionality to plant hormone or ions fluxes and allow to orient plant growth directionality and adapt this directionality upon environmental changes. In both cases, subsets of proteins are targeted to either PD or polar domains of the plasma membrane through unknown trafficking paths and cellular mechanisms.

The candidate will work at the interface of two research groups: the group of Yohann Boutté (polar domains) who lead a team of 5 people (2 CNRS researchers, 1 University professor, 2 PhD students) and the group of Emmanuelle Bayer (PD) who lead a team of 10 people. The LBM is a very international laboratory of around 50 people amongst which half are students, post-doc and contract engineers.

Objectifs :

To follow the dynamic trafficking of markers of either PD or polar domains of the plasma membrane and identify critical steps of this process, the host groups are currently establishing, in plants, the Retention Using Selective Hook (RUSH) system. This system allows to trap newly synthesized proteins at the ER using specific molecular hooks and selectively release them upon rapamycin induction to monitor their dynamics of trafficking from the ER using live confocal imaging. The host groups have already a proof-of-concept of the method for soluble proteins and are now developing new hooks to trap membrane proteins. The candidate will be involved in this methodology development and will be supervised by Yohann Boutté and one of the PhD student of the group.

Méthodes employées :

- Multisite Gateway molecular cloning
- Transient and stable transformation of Arabidopsis plants
- Live cell confocal microscopy, dynamic tracking
- Confocal microscopy quantification, statistics.

Prérequis :

- Be highly motivated and interested by cell and molecular biology
- Be able to work within a group (attentiveness and adaptability) and have a certain degree of autonomy
- Be able to communicate in English

mots clés : Cell biology, trafficking, targeted secretion, plants, cell-to-cell communication, cell polarity, cloning, confocal microscopy

Titre du stage :

Stage N° 23.

Modulation du processus de mitophagie par le Ca²⁺ dans les cellules hématopoïétiques primitives du sang périphérique.
Mitophagy modulation by Ca²⁺ in peripheral blood hematopoietic stem cells.

Encadrement :

DEBEISSAT Christelle

Tel : 0788025237

Email : christelle.debeissat@efs.sante.fr

EFS Nouvelle Aquitaine / U1211 MRGM

Contexte :

L'hématopoïèse est le processus qui assure la production et le renouvellement des cellules sanguines matures tout au long de la vie d'un individu. Elle se déroule dans la moelle osseuse, à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces CSH sont caractérisées par leur capacité à s'auto-renouveler, et cette propriété est essentielle au maintien de l'homéostasie hématopoïétique. Le métabolisme joue un rôle central dans le contrôle de l'auto-renouvellement, et le processus de mitophagie est nécessaire pour la conservation du caractère « souche » des CSH.

La greffe de CSH est utilisée dans le traitement de différentes pathologies, hématologiques et non-hématologiques. Le greffon est alors préparé à partir de la moelle osseuse ou du sang dit « mobilisé » du donneur. Le succès de la greffe repose notamment sur la capacité des cellules du greffon à reconstituer l'hématopoïèse du patient sur le long terme, c'est à dire sur leur capacité à auto-renouveler.

Hematopoiesis allow the lifelong production of hematopoietic mature cells. It takes place in bone marrow and is initiated from hematopoietic stem cells (HSCs). HSCs self-renewal is essential for hematopoietic homeostasis maintenance. Metabolism is essential for HSC's self-renewal, and mitophagy is required for their stemness maintenance.

Hematopoietic stem cell transplantation represents a curative therapy for several hematopoietic and non-hematopoietic disorders. Hematopoietic grafts currently originates from bone marrow or mobilized peripheral blood. Transplantation efficiency is partly linked to the capacity of HSC to reconstitute the hematopoietic system of the patient in the long term i.e. to self-renew.

Objectifs :

L'objectif de ce projet est de développer un greffon à partir d'une nouvelle source de CSH, le sang périphérique en homéostasie. La réalisation d'un greffon efficace implique l'expansion ex vivo des CSH du sang périphérique, pour augmenter leur quantité et leur capacité de greffe. Cette expansion ex vivo nécessite la mise en place de conditions de culture qui vont favoriser à la fois la prolifération des CSH, et le maintien de leur capacité « souche ».

Le projet de ce stage est de moduler la concentration extra-cellulaire en Ca²⁺ durant la culture et d'analyser l'effet de cette modulation sur (1) le processus de mitophagie et (2) l'expansion des CSH tout au long de la culture.

The goal of this project is to produce a new hematopoietic stem cell graft from steady-state peripheral blood.

Constitution of an effective graft require the expansion of HSCs in order to increase total number of HSCs, and graft capacity. Ex vivo expansion needs development of culture conditions that will simultaneously allow HSC proliferation together with their stemness maintenance.

During this internship, the project will be to modulate extra-cellular Ca²⁺ concentration during the ex vivo culture and to analyze effects of this modulation on (1) mitophagy process and (2) HSC expansion throughout culture.

Méthodes employées :

Culture cellulaire / Cell culture

Cytométrie en flux / Flow cytometry

Microscopie confocale / Confocal microscopy
Analyses transcriptionnelles par RT-PCR quantitative / RT-qPCR

Prérequis :

Connaissances en biologie cellulaire et biochimie
Motivation, esprit d'équipe

Knowledge in cell biology and biochemistry
Motivation, team spirit

mots clés : Cellules souches hématopoïétiques, mitophagie, Ca²⁺ / Hematopoietic stem cells, mitophagy, Ca²⁺

Titre du stage :

Stage N° 24.

Structure of a membrane-inserted protein involved in grapevine grafting by solid-state NMR

Encadrement :

Habenstein Birgit

Tel : 0540003029

Email : b.habenstein@iecb.u-bordeaux.fr

CBMN / IECB UMR5248

Contexte :

Joining two different plants together to create a single individual with the beneficial characteristics of both plants is called grafting. For European viticulture, grafting is essential to create species with necessary resistances against pathogens. Therefore, grape varieties are grafted onto roots of Phylloxera tolerant rootstocks since over 150 years. In light of adapting plants to climate changes, understanding the molecular mechanisms behind graft union formation will provide essential tools to develop future grafting strategies. An EARLY NODULIN/ENOD-like gene has recently been identified to play a key role during this process. Based on predictive algorithms and on their relationship to nodulins, ENOD-like proteins are hypothesized to act as membrane-embedded transporter proteins, lacking experimental evidence. Molecular mechanisms and protein structures of ENOD-like proteins remain to date unknown.

Objectifs :

This project aims at characterizing the molecular structure of an ENOD-like gene protein using solid-state Nuclear Magnetic Resonance (ssNMR). ssNMR is a powerful technology to study protein structure, interactions and dynamics at the atomic scale. It has the unique advantage that membrane-associated proteins are studied in their native bilayer environment. We aim at revealing first structural data and mechanistic insights on an ENOD-like protein involved in graft union formation.

Méthodes employées :

To study the ENOD-like protein structure by ssNMR, the Master 2 student will implement a purification protocol to produce ¹³C, ¹⁵N isotope-labeled ENOD-like protein, based on the purification methods used in the group. The student will then reconstitute the protein in liposomes of defined lipid composition to perform magic-angle spinning (MAS) solid-state NMR. The Master 2 student will be trained to apply state-of-the-art MAS ssNMR techniques to collect first structural data on the ENOD-like protein by ssNMR. The data will be analyzed using CCPNMR analysis software and will provide first molecular insights into the ENOD-like protein in a bilayer environment.

Prérequis :

The recruited candidate should have a major interest into protein structure with an emphasis on membrane proteins. She/he should be highly motivated to investigate in this challenging project to reveal first structural data on an ENOD-like protein. She/he should be curious to learn the versatile NMR technology and rigorous to analyze the obtained data. The project will be in tight collaboration with Sarah Cookson at INRAE to establish a structure-function relationship with the ENOD-like genes in vivo. The project could serve as basis for a subsequent PhD project.

mots clés : Membrane protein; protein structure; NMR; structure-function relationship; grafting

Titre du stage :

Stage N° 25.

Structure determination of the cancer related splicing factor SRSF7 bound to its RNA target

Encadrement :

Campagne Sébastien

Tel : 0623507270

Email : sebastien.campagne@inserm.fr

Université de Bordeaux, ARNA unit (IECB)

Contexte :

RNA splicing is an essential step of gene expression and aberrant splicing events were associated with numerous genetic diseases and cancer. The control of alternative RNA splicing is performed by RNA binding proteins called splicing factors. Among those, the SR protein family represents a family of splicing activators whose deregulations were linked with cancers. The SR protein SRSF7 is composed of two RNA binding domains, a RNA recognition motif (RRM) and a zinc finger, that will anchor the protein to specific sites on the pre-mRNA in order to stimulate the recruitment of the spliceosome. Here, we aim to determine the atomic details of specific RNA recognition by SRSF7. In order to determine the structure of the SRSF7 RRM bound to its RNA target, we develop a protocol for the expression of the protein and identified a strong affinity RNA target (CUCUUUG). All these tests have been already performed and were very promising.

Objectifs :

The recruited student will produce the recombinant protein for NMR spectroscopy and perform RNA binding assays using NMR spectroscopy. The main objective of the M2 training is to solve the structure in solution of the complex formed by the RRM of SRSF7 and its RNA target. If the candidate is successful, we plan to validate the molecular mechanisms of RNA recognition by SRSF7 in a cellular context.

Méthodes employées :

Recombinant protein production and purification, RNA binding assays, structure determination using NMR spectroscopy, cell based assays

Prérequis :

Production of recombinant proteins, structural analysis, RNA recognition by proteins.

mots clés : RNA splicing, RRM, Protein-RNA interactions, SR proteins, cancer

Titre du stage :

Stage N° 26.

Etude des interactions entre la protéine pro-apoptotique Bax et le récepteur mitochondrial Tom22 reconstitués en nanodisques

Encadrement :

MANON Stéphen

Tel : 05569999045

Email : manon@ibgc.cnrs.fr

Université de Bordeaux, CNRS, Institut de Biochimie et de Génétique Cellulaires

Contexte :

Au cours de l'apoptose, la protéine Bax est relocalisée vers la membrane mitochondriale externe. Des données cellulaires ont montré que le récepteur mitochondrial Tom22 était impliqué dans cette relocalisation. Nous avons reconstitué ce processus sur un système simple, en combinant la synthèse protéique *in vitro* et la technologie des nanodisques. Nous avons ainsi pu identifier des mutations de Bax et de Tom22 qui affectent ce processus. Certaines de ces mutations sont présentes dans des tumeurs (adénocarcinomes).

Objectifs :

L'objectif du stage est d'utiliser notre approche de synthèse *in vitro* en présence de nanodisques à la mutagenèse dirigée, afin d'identifier comment Bax et Tom22 interagissent, et comment cette interaction permet à Bax de s'insérer dans les membranes.

Méthodes employées :

Mutagenèse dirigée - Synthèse protéique *in vitro* - Chromatographie (SEC, affinité) - Electrophorèse - Western-Blot - Analyses structure/fonction *in silico* -

Prérequis :

Licence et Master 1 BBM, ou équivalent

mots clés : apoptose, Bax, Tom22, synthèse protéique *in vitro*, nanodisques, biochimie des protéines membranaires, analyses structure/fonction

Titre du stage :

Stage N° 27.

Analyse moléculaire et métabolique des étapes de différenciation des globules rouges

Encadrement :

BRUNET DE LA GRANGE PHILIPPE

Tel : 0556905434

Email : philippe.brunet-de-la-grange@efs.sante.fr

Etablissement Français du Sang, U1211 MRGM, Université de Bordeaux

Contexte :

La principale mission de l'Etablissement Français du Sang (EFS) est d'assurer l'autosuffisance nationale en produits sanguins labiles (PSL), notamment en globules rouges (GR) et en greffons de cellules souches hématopoïétiques (CSH) à des fins de transfusion et de thérapie cellulaire respectivement. Dans ce contexte, le Département Scientifique de l'EFS conduit des recherches à la fois fondamentales et appliquées, dans le but d'améliorer l'efficacité des traitements reposant sur les produits sanguins.

L'un des challenges aujourd'hui est de parvenir à compléter les stocks en globules rouges issus des dons de sang par une production de globules rouges ex vivo, soit pour palier un manque éventuel de GR pendant les périodes où les dons de sang sont moins fréquents, soit pour palier un manque de GR chez des individus de groupes sanguins rares et pour lesquels les solutions de transfusion de GR sont très restreintes.

Notre laboratoire utilise une stratégie de différenciation in vitro de GR reposant sur une culture cellulaire en 3 phases à partir de cellules hématopoïétiques non différenciées CD34+ issues du sang. En dépit de l'efficacité démontrée de cette procédure pour produire des globules matures, le rendement doit, quant à lui, être amélioré pour atteindre la production d'une quantité de globules rouges suffisamment importante pour être applicable en transfusion.

Objectifs :

Objectifs

Le présent projet vise à mesurer les marqueurs moléculaires et certains paramètres métaboliques de cellules hématopoïétiques induites en différenciation érythrocytaire in vitro. Cela comprend une évaluation de ces marqueurs et des paramètres métaboliques aux différents stades de différenciation et de maturation des cellules depuis l'implantation des CD34+ naïves en culture jusqu'aux précurseurs érythrocytaires, en passant par les progéniteurs.

En effet, la connaissance de la cinétique de ces paramètres permettra de mieux répondre aux besoins métaboliques des cellules à chaque étape de leur différenciation, notamment en adaptant en conséquence les conditions de culture à chaque étape, ce qui devrait permettre d'améliorer le rendement de production ex vivo de globules rouges.

Le principe sera le suivant : préalablement à leur mise en culture dans le protocole de production de globules rouges, les cellules CD34+ fraîchement isolées seront soumises à une phase d'expansion qui permet de générer une sous-population de cellules de phénotype CD34+CD133neg ayant un fort potentiel érythrocytaire. Les cellules CD34+CD133neg seront ainsi triées puis placées dans le protocole de production de globules rouges afin de générer des progéniteurs (CD34+CD71+GPAneg) et des précurseurs (CD34negCD71+GPA+) érythrocytaires, et in fine des globules rouges.

Ainsi, aux différents stades de différenciations depuis les cellules CD34+ naïves, en passant par les cellules CD34+CD133neg, les progéniteurs CD34+CD71+GPAneg et les précurseurs CD34negCD71+GPA+, seront évalués :

- 1) Les niveaux d'expression des transcrits (ARNm) de gènes impliqués dans la différenciation érythrocytaire tels que les récepteurs à l'érythropoïétine (Epo-R) et à la transferrine (cd71), la Ferroportine, le transporteur VDAC1, le transporteur du Glucose (GLUT1)
- 2) La production d'ATP, le ratio ATP/ADP, le ratio Glutathion réduit/Glutathion oxydé, le niveau de ROS intracellulaire (total et mitochondrial), la masse et l'activité mitochondriale, l'absorption du glucose
- 3) Les niveaux d'expression protéiques de régulateurs clé du système REDOX (par Western Blot) en fonction du stade de différenciation et donc de l'apparition des marqueurs membranaires de différenciation érythrocytaire CD71 puis GPA.

Méthodes employées :

Sur le plan expérimental, ce projet nécessite l'extraction de cellules mononucléées à partir de sang placentaire et de sang périphérique, la purification immunomagnétique de cellules CD34+, le tri cellulaire par cytométrie de sous-population CD34+CD133neg, la culture cellulaire des cellules CD34+ et des cellules CD34+CD133neg triées, des analyses par PCR quantitative en temps réel, des analyses par Western Blot et par cytométrie en flux. Un recours à la plateforme CLLOMET sera probablement proposé pour certaines de ces analyses.

Prérequis :

Motivé(e), intérêt pour l'hématologie, sens du travail en équipe, curiosité intellectuelle

mots clés : Production ex vivo de Globules rouges, Culture Cellulaire, Métabolisme, Différenciation, Analyses moléculaires, Cytométrie en flux

Titre du stage :

Stage N° 28.

Generating bioenergetic activities with mitochondria in minimal cells

Encadrement :

ARBAULT Stéphane

Tel : 0540006851

Email : stephane.arbault@u-bordeaux.fr

Université de Bordeaux, Institut CBMN, CNRS UMR5248

Contexte :

Biomimetic, minimal cells grow exponential interest and development because of their wide range of applications. Our project is to develop to develop giant biomimetic liposomes in which bioenergetic enzymes and mitochondria will be integrated. Cell-isolated mitochondria will provide minimal cells the ability to produce biochemical energy, namely ATP generation, in order to fuel other membrane, metabolic, proteic or genetic activities.

Objectifs :

Preliminary results obtained by CBMN and IBGC teams showed the possibility to manipulate, monitor and energize individual mitochondria within micro-compartments. Giant biomimetic liposomes will be prepared from synthetic-natural lipids (GUVs) and from microvesicles produced at cell plasma membranes, i.e. GPMVs, which directly integrate protein (enzyme, pore, etc.) and lipid components of the original cell membrane. Fuelling of the oxidative phosphorylation will be achieved owing to substrates enzymatic production and transport at the membrane and monitored by electrochemistry (Clark), fluorescence and chemi-luminescence methods. This work takes part to the development of autonomous, long-term working, biocompatible, bioenergetic minimal cells.

Méthodes employées :

Mitochondria activities measurements by Clark electrode, spectro-photometry assays; Formation of liposomes; fluorescence microscopy; cell culture

Prérequis :

knowledge in bioenergetics, biochemistry theory and assays

mots clés : biomimetism; mitochondria; bioenergy; liposome; minimal cell; fluorescence microscopy; electrode

Titre du stage :

Stage N° 29.

Conséquences fonctionnelles liées à la dérégulation des transporteurs d'acides aminés chez la truite

Encadrement :

BEAUMATIN Florian

Email : florian.beaumatina@inrae.fr

UMR1419 NuMÉA (Nutrition Métabolisme Aquaculture)

Contexte :

L'essor mondial que connaît l'aquaculture depuis 3 décennies rencontre désormais de nouveaux défis écologiques et économiques. Il devient impératif de les relever afin de pérenniser et développer de façon durable cette activité et ainsi alimenter une population humaine à la démographie exponentielle. L'un de ces défis provient de la dépendance de l'aquaculture vis-à-vis de la pêche minière pour l'approvisionnement en farines et huiles de poissons nécessaires à l'alimentation des poissons d'élevage. Depuis de nombreuses années, la communauté scientifique s'affaire à identifier des alternatives à ces farines de poissons. Actuellement, l'alternative la mieux considérée, à savoir la substitution des farines de poissons par des farines végétales, ne permet toujours pas d'assurer une croissance optimale des poissons et notamment des espèces carnivores telle que la truite arc-en-ciel.

Nos résultats suggèrent qu'un défaut d'absorption des acides aminés (AA), associé à des dérégulations de l'expression des transporteurs d'acides aminés (TAA), est à l'origine de ces moindres performances chez des poissons nourris avec des régimes à base de végétaux. Nous tâchons désormais de comprendre les mécanismes d'absorptions et de régulations des TAA et d'identifier les conséquences métaboliques induites par des déséquilibres en AA chez la truite.

Objectifs :

Parmi la liste, établie au laboratoire, des TAA les plus dérégulés par des déséquilibres en AA, l'objectif est désormais de comprendre le(s) rôle(s) fonctionnel(s) de ces transporteurs qui, au-delà même de l'absorption des AA, sont connus chez d'autres espèces pour orienter de nombreuses voies métaboliques par l'intermédiaire du contrôle des principales voies de signalisations dépendantes des AA (mTOR, GCN2 et l'autophagie).

Méthodes employées :

A travers l'utilisation de lignées cellulaires de truite dans lesquelles l'expression des TAA ciblés sera transitoirement réprimée (siARN), l'étudiant(e) pourra conduire des expérimentations variées afin d'évaluer les conséquences fonctionnelles de cette perte spécifique d'expression. Par exemple, l'étudiant(e) pourra analyser 1) le pool intracellulaire d'AA (UPLC), 2) l'activation des voies mTOR, GCN2 et autophagiques (western blot et RT-qPCR) et 3) le niveau de stress oxydant associé (WB, RT-qPCR) à la perte d'expression du TAA ciblé. Les conséquences sur les capacités prolifératives des cellules (Compteur de cellules Nexcellom K2) ainsi que sur la mortalité induite par la carence en AA (Nexcellom K2 et test biochimique LDH) pourront également être évaluées.

Prérequis :

L'étudiant(e) doit être motivé(e) et passionné(e). De solides connaissances de biochimie et biologie cellulaire sont également requises. Des notions de culture cellulaire seraient un plus.

mots clés : Acides Aminés, Métabolisme, Signalisation, Culture cellulaire

Titre du stage :

Stage N° 30.

Virus-like particles for the selection of aptamer ligands to GPER receptor / Préparation de « virus-like particles » pour la découverte de nouveaux ligands aptamères du récepteur GPER

Encadrement :

LEBLOND CHAIN Jeanne

Tel : 33 (0)5 57 57 13 84

Email : jeanne.leblond-chain@inserm.fr

INSERM U1212 ARNA

Contexte :

Le récepteur aux estrogènes couplés aux protéines G (GPER) est un récepteur à 7 domaines transmembranaires qui est activé par l'estradiol et médie la réponse cellulaire rapide aux estrogènes ou à ses analogues synthétiques. Ubiquitaire, il joue un rôle clé dans l'hypertension, certains cancers, le remodelage vasculaire, l'athérosclérose, la reproduction, les maladies métaboliques, etc. En particulier, il est présent dans plus de 60% des cancers du sein, dont les cancers triple négatifs (TNBC), ce qui en fait une bonne cible thérapeutique. Il pourrait être responsable de la mauvaise réponse des TNBC à certains traitements hormonaux comme le tamoxifène, raloxifène ou fulvestrant, car ces ligands désactivent le récepteur aux estrogènes dans la cellule mais activent le GPER sur la membrane. Notre hypothèse de travail est que l'identification de ligands spécifiques au GPER pourrait être utilisé comme traitement dans le cancer du sein triple négatif.

Objectifs :

C'est pourquoi nous voulons identifier des nouveaux ligands du GPER qui lient de façon spécifique le GPER sur la membrane cellulaire. Pour cela, nous voulons développer des vésicules de petite taille, appelées « Virus-Like Particles » qui exposeraient GPER sur leur membrane. Les protéines sera insérée dans la membrane dans sa forme native, ce qui la stabilisera et permettra de cribler des ligands dans sa conformation physiologique.

Méthodes employées :

Dans un premier temps, l'étudiant de M2 sera amené à concevoir et préparer des « virus-like particles » (VLP) en utilisant des techniques de culture cellulaire dans des cellules HEK293. Les plasmides seront modifiés pour y incorporer la protéine GPER puis transfectés et les vésicules seront récoltées et purifiées. La qualité et la quantité de protéine GPER en surface des VLP sera quantifiée par microscopie et western blot, respectivement. Dans un second temps, une sélection d'aptamères pourra être réalisée par SELEX pour identifier les ligands du GPER. Finalement, un essai fonctionnel sera incorporé dans les VLP afin de déterminer si les ligands obtenus sont des agonistes ou antagonistes du GPER.

Prérequis :

Master en biochimie.

Une expérience en culture cellulaire serait un avantage.

mots clés : Estrogen receptor, aptamer, Virus-like particles, cell culture, récepteur couplé aux protéines G

Titre du stage :

Stage N° 31.

Comprendre le fonctionnement structural des protéines kinases dans la santé et les maladies humaines.

Encadrement :

Maisonneuve Pierre

Email : p.maisonneuve@iecb.u-bordeaux.fr

Institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets

Contexte :

Les protéines kinases sont impliquées dans presque tous les processus du vivant et constituent la deuxième classe de protéines la plus ciblée en clinique. La compréhension des mécanismes structuraux des protéines kinases est donc un enjeu majeur, non seulement pour améliorer nos connaissances fondamentales sur le fonctionnement des cellules, mais aussi pour ouvrir de nouvelles voies pour le développement des traitements cliniques de demain.

Dans ce contexte, l'objectif du stage est de comprendre les mécanismes de régulation des protéines kinases dans les voies de signalisation humaines. Le ou la candidat.e rejoindra l'équipe jeune et dynamique du Dr. Maisonneuve, qui s'est récemment installé à l'Institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets (CBMN). Le ou la candidat.e acquerra une expérience dans l'expression et la purification de protéines recombinantes et dans la biologie structurale telle que la cristallographie aux rayons X et/ou la cryo-microscopie électronique (cryo-ME). Le laboratoire dispose de tous les équipements nécessaires pour l'expression, la purification et l'étude structurale des protéines ainsi qu'à leur caractérisation biochimique (mesure de l'activité catalytique et de l'interaction avec des ligands). Le laboratoire a plusieurs collaborations académiques internationales auxquelles le ou la candidat.e pourrait être impliqué.e.

Objectifs :

- Expression de protéines recombinantes en cellules procaryotes (bactéries) et eucaryotes (cellules d'insectes ou humaines).
- Purification de protéines en quantité et pureté suffisantes pour la biologie structurale.
- Criblage des conditions de cristallisation et cryo-congélation des protéines purifiées.
- Résolution de structures de protéines par cristallographie aux rayons X ou microscopie électronique.
- Développement et réalisation d'essais fonctionnels in vitro et en cellule (Enzymologie, Interaction protéine-protéine, interaction protéine-ligand).

Méthodes employées :

- Culture cellulaires de bactéries, de cellules d'insectes ou de cellules humaines.
- Purification de protéines (par affinité, échange d'ions et gel filtration).
- Cristallogénèse et cristallographie aux rayons X.
- Microscopie électronique cryogénique à particules uniques (cryo-EM).
- Enzymologie (mesure d'activité catalytique)

Prérequis :

- Des connaissances théoriques en biochimie des protéines (expression et purification) sont fortement recommandées.
- Des connaissances théoriques en biologie structurale sont souhaitées.
- Une expérience expérimentale en expression et purification de protéines est préférable mais pas obligatoire.

mots clés : Biochimie des protéines, biologie structurale, Cryo-EM, Cristallographie aux rayons X.

Titre du stage :

Stage N° 32.

Rôle des protéines de choc du froid et des protéines serpins dans l'induction de la tolérance contre le stress hypothermique lors de l'état d'hibernation des cellules CD34+

Encadrement :

Vlaski-Lafarge Marija

Email : marija.vlaski@efs.sante.fr

Université de Bordeaux

Contexte :

La conservation des cellules hématopoïétiques est critique pour la réussite de la greffe qui est utilisée comme traitement de pathologies malignes variées. Récemment, nous avons montré que le pré-conditionnement des cellules primitives hématopoïétiques CD34+ en atmosphère hypoxique (basse en oxygène)/hypercapnique (élevée en dioxyde de carbone) et en hypothermie modérée (30°C) active les mécanismes protecteurs permettant une survie prolongée lors de leur stockage en hypothermie sévère et lors de leur réchauffement à une température physiologique. Cette approche induit l'état d'hypométabolisme régulé similaire à l'hibernation, non pas seulement chez les cellules hématopoïétiques mais également chez les cellules de différentes lignées. Puis, avec l'analyse protéique nous avons révélé que l'induction de l'hibernation cellulaire est associée à une stimulation particulière des protéines de choc du froid, (« cold shock proteins, CSP ») ainsi que des protéines de la famille des Serpin, qui sont des inhibiteurs de serine-protéases.

Objectifs :

Pour ce but, le projet proposé consiste à caractériser le rôle des protéines CSP et des protéines serpins dans la protection contre l'hypothermie sévère lors de l'induction de l'état d'hypo-métabolisme («hibernation-like»). Les résultats obtenus donneront accès à des données utilisables en médecine régénérative et ingénierie cellulaire chaque fois qu'il est nécessaire de ralentir le métabolisme pour préserver les produits cellulaires.

Méthodes employées :

A cet effet, les cellules de sang placentaire CD34+ qui regroupent des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques seront isolées par tri immuno-magnétique. Ensuite, les cellules CD34+ natives ou transduites par des vecteurs lentiviraux exprimant des ARN interférant avec l'expression des CSP (cold-inducible RNA binding protein , CIRP et RNA-binding motif protein 3, RBM3), incubées dans l'air ambiant pendant 24 à 48h en hypothermie modérée (30°C) en milieu de conservation seul ou supplémenté avec des protéines serpins recombinantes. Puis, les cellules sont conservées dans une hypothermie sévère à 4°C pendant encore 7 jours. Enfin, les cellules sont réchauffées à 37°C pendant 2h et leur viabilité et fonctionnalité sont estimées par : évaluation de l'apoptose/nécrose; capacité de prolifération; étude du métabolisme énergétique; détection de progéniteurs clonogéniques.

Techniques : Récupération des cellules CD34+ par une sélection immuno-magnétique; Conservation des cellules CD34+ en hypothermie (Vlaski et al, 2014); Evaluation de l'apoptose/nécrose par le test annexine V/iodure de propidium par cytométrie en flux ; Capacité d'expansion de cellules CD34+ après la conservation (Vlaski et al, 2014); Evaluation du métabolisme énergétique en utilisant la technologie non-invasive Seahorse ; Détection de progéniteurs clonogéniques en utilisant le test « Colony Forming Cells » (CFC) dans le méthylcellulose ;. Transduction lentivirale des cellules CD34+ ; La qPCR (réaction de polymérisation en chaîne quantitative).

Prérequis :

Connaissance en biologie cellulaire, intérêt pour l'étude du métabolisme des cellules souches, sens du travail en équipe, curiosité intellectuelle.

mots clés : cellules souches hématopoïétiques, métabolisme, hibernation, hypothermie.

Titre du stage :

Stage N° 33.

Remobilisation de gouttelettes lipidiques suite à un stress abiotique: aspect protéomique

Encadrement :

BOUCHNAK IMEN

Tel : 0782234714

Email : imen.bouchnak@u-bordeaux.fr

Laboratoire de Biogenèse Membranaire

Contexte :

Lors d'un stress environnemental, tel qu'une carence ou des températures élevées, les plantes déclenchent différents mécanismes de survie. Parmi ces mécanismes, nous avons notamment remarqué l'apparition de gouttelettes lipidiques (GL) dans les feuilles. Les GL sont des structures de stockage de lipides neutres qui sont présentes dans les graines pour stocker l'huile. Leur rôle dans les feuilles suite à un stress reste peu connu. Des mutants d'*Arabidopsis* impactés dans la biogenèse des GL sont moins résistants au stress, suggérant un rôle important de ces GL dans le mécanisme de résistance de la plante. Ces GL disparaissent rapidement lorsque les conditions de culture sont à nouveau favorables, or les mécanismes responsables de leur disparition (remobilisation) sont totalement inconnus. Nous cherchons à comprendre la fonction de ces GL dans la réponse de la plante à un stress environnemental, et aussi à identifier les mécanismes responsables de la remobilisation des GL dans les feuilles.

Objectifs :

Le stage consistera à identifier des protéines susceptibles d'être impliquées dans la remobilisation des gouttelettes lipidiques de feuilles par une analyse protéomique de gouttelettes lipidiques purifiées (pendant et après une carence en azote), puis à confirmer la localisation de ces protéines par microscopie confocale. En parallèle, le rôle de certaines protéines candidates préalablement identifiées sera caractérisé par analyse (phénotypage, analyses biochimiques dont analyses de lipides) des mutants affectés dans l'expression de ces candidats potentiels.

Méthodes employées :

Culture des plantes (*Arabidopsis*) sur milieu MS, purification de GL, analyses de lipides (TLC, GC-FID, LC-MS), extraction d'ADN et PCR, clonage, SDS-PAGE et immunodétection, microscopie confocale.

Prérequis :

Titre du stage :

Stage N° 34.

Caractérisation des changements structuraux associés à l'assemblage de la pompe à efflux OprM-MexA-MexB impliquée dans la résistance aux antibiotiques.

Characterization of structural changes associated to the assembly of the OprM-MexA-MexB efflux pump involved in antibiotic resistance.

Encadrement :

Giraud / Fichou Marie-France / Yann

Tel : 0610619203

Email : marie-france.giraud@u-bordeaux.fr; y.fichou@iecb.u-bordeaux.fr

Université de Bordeaux / CBMN

Contexte :

La résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique. Chez la bactérie pathogène *Pseudomonas aeruginosa*, cette résistance peut résulter d'un export accru des antibiotiques par des systèmes d'efflux comme la pompe tripartite OprM-MexA-MexB. Celle-ci est constituée:

- d'un trimère de MexB, localisé dans la membrane interne de cette bactérie gram négative,
- d'un trimère d'OprM ancré dans la membrane externe par sa région en tonneau beta, qui se prolonge dans l'espace périplasmique par un domaine comportant de longues hélices alpha
- de six protéines MexA qui connectent les trois sous-unités MexB aux trois sous-unités OprM.

Dans la structure de la pompe obtenue par cryo-microscopie, les boucles des hélices organisées en coiled-coil de MexA et situées dans la partie apicale de cette protéine interagissent avec les boucles à la base du domaine en hélices alpha d'OprM. Cette organisation, appelée "tip-to-tip" crée un long conduit, pouvant exister en conformation ouverte ou fermée. Les antibiotiques sont excrétés par celui-ci lorsqu'il se trouve en conformation ouverte. Le basculement des hélices d'OprM vers le centre du conduit aboutit à sa fermeture.

/

Antibiotic resistance is a major public health concern. In the pathogenic bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, this resistance could arise from an increased export of antibiotics by efflux systems, such as the OprM-MexA-MexB pump. This tripartite efflux pump consists of

- a MexB trimer located in the inner membrane of this gram-negative bacterium
- a trimer of OprM anchored through its beta barrel domain in the outer membrane and extending long alpha helices into the periplasm,
- six MexA proteins that connect the three MexB subunits to the three OprM subunits.

The interface generated between MexA and OprM, called "tip-to-tip", results from the interaction between the loops of coiled-coil helices of MexA located in the apical part of this protein, and the loops at the base of the alpha-helical domain of OprM. This organization creates a long conduit, which can exist in open or closed conformations, thereby modulating antibiotics excretion.

Objectifs :

Objectifs/Objectives

Une des stratégies pour lutter contre les phénomènes de résistance aux antibiotiques est de bloquer l'assemblage des pompes à efflux. Cependant, peu de données ont été recueillies sur leur processus d'assemblage. OprM-MexA-MexB peut être reconstitué *in vitro* en mélangeant le trimère d'OprM à MexA et MexB. Les structures du trimère d'OprM montrent qu'en absence des autres composantes, ses hélices sont en conformation fermée alors qu'en présence de MexA et MexB, elles sont en conformation ouverte. Le diamètre, décrit par les six protomères de MexA fixés sur MexB, est compatible avec une forme ouverte d'OprM et non avec sa forme fermée. Une des étapes clés de l'assemblage est donc

l'ouverture du trimère d'OprM. Bloquer le passage de la forme fermée à la forme ouverte permettrait d'empêcher l'assemblage de la pompe. Il est donc crucial d'établir toutes les étapes conduisant à l'ouverture du trimère d'OprM.

/

One strategy to combat antibiotic resistance is to block the assembly of efflux pumps. However, little data have been collected on their assembly process. OprM-MexA-MexB can be reconstituted in vitro by mixing the OprM trimer with MexA and MexB. Structures of OprM trimer show that in the absence of the other components, its helices are in the closed conformation while in the presence of MexA and MexB, they are in the open conformation. The diameter described by the six protomers of MexA that are bound to MexB, is compatible with an open form of OprM but not with its closed form. One of the key steps in the assembly is therefore the opening of the OprM trimer. Blocking the transition from the closed form to the open form would prevent the assembly of the pump. It is hence crucial to establish all the steps leading to the opening of OprM trimer.

Méthodes employées :

Ce stage de M2 vise à suivre les étapes d'ouverture d'OprM par résonance paramagnétique électronique (RPE). La RPE offre une approche innovante pour mesurer des variations de distances suite à l'ajout des protéines partenaires et ainsi observer directement les mouvements des hélices impliquées dans l'ouverture d'OprM. Pour cela, il conviendra de produire et de purifier des variants d'OprM dans lesquels des résidus cystéine auront été introduits à des positions stratégiques afin de pouvoir fixer des sondes paramagnétiques.

La production, la purification, les reconstitutions des pompes seront effectuées au CBMN, sous l'encadrement de Marie-France Giraud. Les différents degrés d'assemblage et d'ouverture des différents complexes seront analysés par microscopie électronique avec Olivier Lambert (CBMN) et les expériences de RPE seront réalisées sous la supervision de Yann Fichou (CBMN-IECB).

/

This Master 2 internship aims at following the steps of OprM opening using electronic paramagnetic resonance (EPR). EPR provides an innovative method to probe the distance variations following the addition of partner proteins and thus provides information on the conformational changes involved in OprM opening. To achieve this goal, we will produce and purify OprM variants in which cysteine residues have been introduced at strategic positions in order to be able to bind paramagnetic probes.

Production, purification and reconstruction of the pumps will be carried out at CBMN, under the supervision of Marie-France Giraud. The different degrees of assembly and opening of the different complexes will be analyzed by electron microscopy with O. Lambert (CBMN) and the EPR experiments will be carried out under the supervision of Yann Fichou (CBMN-IECB).

Prérequis :

Nous recherchons un(e) étudiant(e) motivé(e) avec une solide formation en biochimie et un intérêt prononcé pour la biologie structurale/biophysique. Ce stage de M2 pourrait déboucher sur un projet de thèse.

/

We are looking for a highly motivated student with a strong background in biochemistry and a strong interest in structural biology/biophysics. This M2 thesis might lead to a PhD project.

mots clés : Résistance aux antibiotiques/Pompe à efflux/Résonance paramagnétique électronique/Purification de protéines membranaires/Microscopie électronique. Antibiotic resistance/Efflux pump/Electronic Paramagnetic Resonance/Membrane protein purification/Electron Microscopy.

Titre du stage :

Stage N° 35.

Functional analysis of new proteins localized in the lipid droplets of African trypanosomes

Encadrement :

Rivière Loïc

Tel : 0557574805

Email : loic.riviere@u-bordeaux.fr

Université de Bordeaux

Contexte :

Lipid droplets are highly dynamic cellular compartments, produced from the endoplasmic reticulum and surrounded by a single layer of phospholipids. They constitute a metabolic platform of great plasticity in close relationship with other energetic compartments such as peroxisomes and mitochondria. Thus, they are involved in energy metabolism, lipid metabolism, membrane remodeling, cell signaling, autophagy etc... Although known for a very long time, their importance has been largely underestimated justifying a growing interest in these compartments during the last 5 years. African trypanosomes are unicellular parasites with a great capacity of adaptation. Indeed, they evolve during their parasitic cycle between an arthropod (the tsetse fly, insect vector) and a mammal (man or wild or farmed animals depending on the species) and must adapt their metabolisms, their morphologies, their antigenic properties in order to survive in very different environments. Recently we found a phospholipase localized in lipid droplets and therefore its expression seems to be closely linked to these compartments. We are currently trying to understand the role of this enzyme and more broadly the role of lipid droplets in trypanosome biology. In general, little is known about lipid droplets in these parasites. The project consists therefore in studying in more detail these cellular compartments.

Objectifs :

We have identified by different approaches (experimental, bioinformatics), candidate proteins that can be localized in lipid droplets and we propose to study them by functional genomics approaches. We will confirm their localization by different approaches such as in situ labeling or the use of plasmids allowing overexpression and we will study the potential interaction between these proteins by proximity-labeling biotinylation (BioID). We will inactivate the candidate genes by reverse genetics approaches such as RNA interference ("Knock down") or CRISPR/CAS9 ("Knock-out") and study the obtained strains under different aspects, notably phenotypic and metabolic, using targeted (Cellular imaging..) and global (Lipidomics, Proteomics..) approaches.

Méthodes employées :

- Molecular biology (PCR, cloning, RNA interference, CRISPR/CAS9)
- Cellular biology (Parasites cultivation, transfection, cell imaging)
- Immunochemistry(Western Blot..)

Prérequis :

Strong background on cellular and molecular biology and biochemistry.

mots clés : Lipid droplets / African Trypanosomes / Lipid metabolism / Functional Genomics

Titre du stage :

Stage N° 36.

Résistance des bactéries aux antibiotiques : Inactivation d'un système d'efflux multidrogues impliqué dans la résistance aux antibiotiques, en utilisant de l'ARN antisens.

Encadrement :

GERBOD-GIANNONE et HOCQUELLET Marie-Christine et Agnès

Tel : 0540006816

Email : marie-christine.gerbod-giannone@u-bordeaux.fr et Agnes.Hocquellet@bordeaux-inp.fr

Univrsité Bordeaux, CBMN UMR5248

Contexte :

Les systèmes d'efflux membranaires multidrogues rejettent à l'extérieur de la bactérie les antibiotiques avant qu'ils n'atteignent leur cible, et constituent de ce fait l'un des mécanismes clés permettant aux bactéries de résister aux antibiotiques. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, le système d'efflux tripartite RND MexA-MexB-OprM est exprimé constitutivement chez la bactérie et forme un canal traversant la double paroi bactérienne permettant d'exporter un grand nombre de drogues dont plusieurs classes d'antibiotiques à l'extérieur de la cellule. Il est composé d'un transporteur, MexB, ancré dans la membrane interne, d'une porine, OprM, ancrée dans la membrane externe et d'une protéine adaptatrice périplasmique, MexA, ancrée dans la membrane interne et reliant les deux partenaires transmembranaires pour former un canal continu. Du fait de sa localisation dans la membrane externe, OprM est une cible de choix pour développer de nouvelles stratégies de lutte contre l'antibiorésistance. L'une d'elles serait de rétablir la sensibilité des bactéries aux antibiotiques classiques en bloquant l'assemblage de la pompe. Celle-ci ne serait alors plus fonctionnelle pour rejeter les antibiotiques hors de la cellule, et ainsi les antibiotiques pourraient atteindre à nouveau leurs cibles.

Objectifs :

L'objectif du stage est d'identifier des molécules capables de bloquer l'assemblage de la pompe à efflux d'antibiotiques MexAB-OprM. Il existe différentes stratégies pour interférer avec l'assemblage de la pompe. L'une d'elles serait d'empêcher l'expression d'OprM en utilisant des RNA anti-sens dirigés contre l'ARNm d'OprM. En collaborant avec des chimistes, nous avons accès au laboratoire à de tels ARN. Nous disposons également d'anticorps mono-domaine dirigés contre OprM, appelés Nanobodies. L'un d'eux a été fusionné à la GFP, formant un chromobody dirigé contre OprM. Ce chromobody permettra de quantifier la protéine OprM dans différentes souches bactériennes dont l'expression aura été inhibée par les ARN anti-sens.

Méthodes employées :

Les protéines (notamment OprM, nanobodies et chromobody) seront produites chez *E coli*, puis purifiées par chromatographie d'affinité suivie d'une chromatographie d'exclusion. L'interaction d'OprM avec le chromobody sera caractérisée par des méthodes biophysiques (BLI, SPR...). Un test ELISA utilisant le chromody sera mis au point pour quantifier la protéine OprM dans différents extraits bactériens après traitement avec les ARN anti-sens. De plus, la fixation du chromobody à OprM évaluée en fluorimétrie et par cytométrie en flux pourra être corrélée à la quantité de protéines OprM présentes dans différentes souches bactériennes dont *Pseudomonas aeruginosa* Enfin la détermination de Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'antibiotiques utilisés contre *Pseudomonas aeruginosa* en présence d'ARN antisens anti-OprM sera envisagée.

Prérequis :

Formation Biochimie et Biologie Moléculaire, expression de protéines, analyses biochimiques.
Formation Microbiologie, techniques immunologiques.

mots clés : Résistance aux antibiotiques, protéines membranaires, Nanobody

Titre du stage :

Stage N° 37.

Structure determination of pro-apoptotic death receptor DR5 bound to a dimeric peptide agonist

Encadrement :

odaert benoit

Tel : +33540006835

Email : b.odaert@cbmn.u-bordeaux.fr

CBMN UMR5248 – Université de Bordeaux

Contexte :

The death receptors DR4 and DR5 constitute interesting therapeutic targets to kill cancerous cells while sparing normal ones by the activation of the extrinsic pathway of apoptosis. They are recognized and oligomerized by the TNF-related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL), Fab fragments of antibodies or multivalent agonist peptides. In order to determine the structure of the extracellular domain of DR5 [DR5(ECD)] bound to multivalent peptides, we have developed a protocol for the expression, isotopic labelling and purification of the protein and identified strong affinity peptides by using SPR and NMR Spectroscopy. We have also mutated the residues and regions (chimeric DR4/DR5 proteins) that are important for peptide binding and have shown by SPR the formation of a ternary complex DR5/Dimeric peptide NO2-102/TRAIL.

Objectifs :

The recruited student will produce, label or not, and purify the recombinant protein for NMR spectroscopy and cristallogenesis for X-Ray cristallography. The main objectif of the M2 training is to solve the structure in solution of the binary complex DR5/dimeric peptide by NMR spectroscopy, to crystallize the ternary complex DR5/dimeric peptide/TRAIL, and if feasible, to solve its structure by using molecular replacement and X-Ray cristallography.

Méthodes employées :

Recombinant protein production, labeling and purification; structure determination using NMR spectroscopy and X-Ray cristallography.

Prérequis :

The recruited candidate should have a major interest into protein structure determination. She/he should be highly motivated, curious to learn NMR and X-Ray technologies and rigorous to analyze the obtained data. The project is in tight collaboration with Gilles Guichard at IECB/CBMN, Clément Morgat at INCIA and Majid Khatib at BRIC to establish a structure-function relationship with radio-lanthanide-containing DR5 targeting Peptide for theranostics.

mots clés : Protein structure; NMR; X-Ray; structure-function relationship; cancer.

Titre du stage :

Stage N° 38.

Conformational dynamics of disordered tail of eIF4B

Encadrement :

AZNAURYAN Mikayel

Tel : 0540002537

Email : m.aznauryan@iecb.u-bordeaux.fr

Universite de Bordeaux, Unite ARNA. IECB

Contexte :

Translation initiation in eukaryotes is an early step in protein synthesis, requiring multiple factors to recruit the ribosomal small subunit to the mRNA 5' untranslated region. One such protein factor is the eukaryotic translation initiation factor 4B (eIF4B), which increases the activity of the eIF4A RNA helicase, and is linked to cell survival and proliferation.

The full length human eIF4B can be putatively divided into 4 regions: the N-terminal tail that is predicted to be disordered (residues 1-96), the structured RNA recognition motif (RRM: residues 97-175), the low complexity region enriched in Asp, Arg, Tyr and Gly amino acids, so called DRYG region, that is predicted to be disordered and was previously mapped to the self-association domain of eIF4B (residues 214-327) and the C-terminal half of the protein (residues 327-611) that is also predicted to be disordered and encompasses the previously mapped RNA binding region enriched with Arg residues (Arginine-rich motif (ARM) region, residues 367-423). Each of these regions have their unique interaction partners in the biological context and are crucial for the function of the protein.

This internship project will focus on investigation of the conformational dynamics of the N-terminal tail of eIF4B and its interplay with the RRM domain and interaction with RNA. This project is part of a larger collaborative research focused on the dynamics and interactions of eIF4B and RNA and thus the successful results of this project will be included in the future manuscript.

Objectifs :

This project will be focused on investigation of the conformational behaviour and dynamics of an intrinsically disordered tail of eIF4B

and its intra- and intermolecular interaction. The aim is to obtain a detailed quantitative description on how the conformational dynamics encoded by the disordered tail modulate the function of the protein in mRNA translation.

The project will involve preparation of proteins (purification, fluorescent labeling) and designing and carrying out their characterization with single-molecule FRET spectroscopy.

Méthodes employées :

- Molecular biology and biochemistry
- Gel electrophoresis, EMSA
- Liquid chromatography (FPLC, HPLC)
- Biophysical methods: spectrophotometry, fluorescence, circular dichroism, etc
- Single-molecule fluorescence spectroscopy, Forster resonance energy transfer (FRET)

Prérequis :

Previous knowledge and/or experience with some of above techniques.

Good command in English.

mots clés : intrinsically disordered proteins, protein-RNA interactions, single-molecule FRET

Titre du stage :

Stage N° 39.

Développement de stratégies thérapeutiques pour le passage de la barrière hémato-encéphalique par des antidotes anti-neurotoxiques.

Encadrement :

Babin Patrick

Tel : 05 40 00 87 76

Email : patrick.babin@u-bordeaux.fr

Laboratoire Maladies Rares : Génétique et Métabolisme (MRGM), Université de Bordeaux, INSERM U1211, Allée Geoffroy St-Hilaire, Bat. B2, 2ème étage, CS 50023,

Contexte :

Laboratoire Maladies Rares : Génétique et Métabolisme (MRGM), Université de Bordeaux, INSERM U1211, Allée Geoffroy St-Hilaire, Bat. B2, 2ème étage, CS 50023, 33615 Pessac cedex, France. Responsable : Professeur Patrick J. Babin. Email : patrick.babin@u-bordeaux.fr

Le laboratoire d'accueil est spécialiste de l'utilisation du modèle poisson zèbre pour l'élucidation des mécanismes physiopathologiques liés à la santé humaine. Ceci concerne en particulier l'implication de défauts d'origine génétique et/ou liés à l'exposition à des molécules toxiques qui perturbent le maintien de l'intégrité fonctionnelle du système nerveux central et périphérique.

Les organophosphorés (OPs) constituent une classe de molécules de synthèse largement utilisés comme insecticides et retardateurs de flamme et éventuellement comme armes chimiques.

Les OPs interfèrent avec l'activité d'estérases essentielles pour la dégradation de certaines molécules actives au sein des organismes biologiques. La plus étudiée est l'acétylcholinestérase (AChE) qui hydrolyse l'acétylcholine. Ce neurotransmetteur est essentiel dans la transmission cholinergique de l'influx nerveux périphérique (SNP) et central (SNC) dont la défaillance entraîne un syndrome cholinergique majeur qui associe des manifestations périphériques et des crises épileptiques. En cas d'empoisonnement par un OP, le traitement conventionnel médical d'urgence consiste en l'injection d'antidotes composés de pyridinium oxime pour la réactivation de l'AChE et de substances contrant les effets de l'excès d'acétylcholine. Cependant, le pyridinium oxime demeurent inefficace pour la réactivation de l'AChE du SNC en raison de son faible passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE).

Le sujet du stage proposé s'inscrit dans les travaux réalisés dans le cadre du projet BHE-OP-Antidotes financé par l'ANR ASTRID (2022-2024) et du projet européen PARC (European Partnership on the Assessment of Risks from Chemicals), Horizon Europe (2022-2029) ainsi que le projet européen RESILIENCE (2024-2026). Ces travaux visent, entre autres, à découvrir des traitements d'ouverture transitoire de la BHE ou les systèmes de délivrance de médicaments vectorisés à utiliser pour faciliter le passage de la BHE par les molécules réactivatrices de l'AChE du SNC. Le laboratoire d'accueil utilise la larve de poisson zèbre comme modèle in vivo. Ce modèle est prédictif pour des applications chez l'humain étant donné la très forte conservation évolutive des processus biologiques étudiés. Ces travaux sont en continuité de ceux précédemment réalisés au sein de l'équipe d'accueil (Babin et al., *Progress in Neurobiology* 118C, 36-58, 2014 ; Faria et al., *Scientific Reports* 5, 15591, 2015 ; Knoll-Gellida et al., *Toxicological Sciences* 180, 160-174, 2021 ; Dubrana et al., *ACS Chemical Neuroscience* 12, 15, 2865–2877, 2021).

Objectifs :

Le travail réalisé au cours du stage sera de participer à l'identification des solutions thérapeutiques pour faciliter le passage de la BHE par les antidotes conventionnels et nouveaux afin de restaurer la fonctionnalité du SNC suite à l'empoisonnement aux OPs. Le poisson zèbre ouvre la possibilité de réaliser de nombreuses combinaisons d'expériences. Ces travaux pourront également permettre de découvrir des stratégies thérapeutiques pour vectoriser des

principes actifs pour traiter d'autres pathologies (e.g. cancer).

Pour atteindre cet objectif général, trois objectifs spécifiques de recherche sont mis en œuvre :

- Tester l'ouverture pharmacologique transitoire de la BHE chez la larve de poisson zèbre exposées à des OPs cholinergiques sur la réactivation, par les pyridinium oximes conventionnels ou par de nouveaux antidotes, de l'activité AChE du SNC.
- Evaluer la toxicité et l'efficacité de NPs lipidiques biomimétiques vectorisés et chargées en antidotes à base de pyridinium oxime ou de nouveaux antidotes sur l'activité AChE du poisson zèbre.
- Evaluer et comparer l'efficacité des traitements pharmacologiques et de l'injection systémique de NPs biomimétiques à antidotes sur la fonctionnalité du SNC évaluée selon une approche biochimique, cellulaire et comportementale.

Méthodes employées :

Biochimie (e.g. tests d'activité enzymatique de l'acétylcholine estérase in vitro et en « whole-mount »). Neurobiologie et analyse du comportement locomoteur (tests in vivo, i.e. EFPMRT, VMRT). Toxicologie. Pharmacologie. Biologie moléculaire et cellulaire du développement.

Prérequis :

Excellente formation en biologie. Motivation pour la recherche, curiosité et capacité de travail.

mots clés : Biochimie, neurobiologie, toxicologie, pharmacologie, organophosphorés neurotoxiques, pesticides, contre-mesures médicales, antidotes, barrière hémato-encéphalique, ré-activateurs de l'acétylcholine estérase, tests locomoteurs, larve de poisson zèbre, nanoparticules biomimétiques.

Titre du stage :

Stage N° 40.

Structure of a membrane-inserted protein involved in grapevine grafting by solid-state NMR

Encadrement :

Habenstein Birgit

Tel : 0540003029

Email : b.habenstein@iecb.u-bordeaux.fr

CBMN / IECB UMR5248

Contexte :

Necrosis and ethylene-inducing peptide 1 (Nep1)-like proteins (NLPs) constitute a superfamily of proteins that are secreted by several phytopathogenic microorganisms, comprising bacteria, oomycetes and fungi. NLPs trigger leaf necrosis and stimulate immunity-associated responses in dicotyledonous plants. They specifically interact with the outer leaflet of the plant plasma membrane by targeting a molecular receptor, a lipid called Glycosylinositol phosphorylceramide (GIPC). GIPCs are major constituent of membranes, comprising up to 40% of plasma membrane lipids located exclusively in the outer leaflet. How NLPs execute their necrotic effect remains to be demonstrated on the molecular level and the structure. Heterologous production and purification of NLP proteins has been achieved in the group using the yeast *Pichia pastoris* as expression host, as well as extraction and purification of GIPCs.

Objectifs :

This project aims at optimizing production and purification of NLP proteins in *Pichia pastoris* and to perform a first characterization of the molecular structure using solution Nuclear Magnetic Resonance (NMR). NMR is a powerful technology to study protein structure, interactions and dynamics at the atomic scale. GIPCs shall further be extracted and purified. Through monitoring the NMR spectral fingerprint in solution NMR in presence or absence of GIPCs, interactions of the GIPCs with the NLPs in solution should be probed and the structural details of the interactions (influence of GIPC concentration, pH, temperature) can be assessed.

Méthodes employées :

In a first place the Master 2 student will learn and optimize the established expression and purification protocol to produce NLP proteins in the yeast *Pichia pastoris*. The student will then extract and purify the required amount of GIPCs in order to perform solution NMR experiments. The Master 2 student will be trained to apply NMR techniques to collect first structural data on the NLP proteins. GIPC lipids will then be added in a concentration range to monitor the potential intermolecular contacts by pseudo-contact shifts. NMR data will be analyzed using CCPNMR analysis software.

Prérequis :

The candidate should have a pronounced interest into protein and membrane lipids and their interactions. Protein structure-mechanism relationship and protein-lipid interactions will be in the focus of this project. She/he should be highly motivated to produce proteins and purified lipids to reveal structural and mechanistic data on an NLP protein. The candidate should be highly willing to learn biophysical techniques with an emphasis on NMR and rigorous to analyze the obtained data. The project will be in collaboration with Majid Noubhani (CBMN) and under co-supervision. The project could serve as basis for a subsequent PhD project.

mots clés : membrane protein; GIPC, protein-lipid interactions; NMR; plant protein; plant cellular necrosis; structure-function relationship;