

**Offre de stage Master 2 au sein d'une plateforme technologique
année 2025-2026**

**Sujet: Production et caractérisation de protéines recombinantes différentiellement
O-glycosylées pour le ciblage thérapeutique**

Durée du stage: 6 mois

Laboratoire d'accueil: Laboratoire Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques (AFMB, CNRS/AMU), Campus Luminy, UMR7257 CNRS, Aix-Marseille Université, Case 932, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille cedex 9

Responsable(s) du stage : Claire Debarnot, Ingénieure d'études, resp. de la plateforme d'expression de protéines recombinantes en systèmes cellulaires eucaryotes de PBSIM – claire.debarnot@univ-amu.fr
Stage en collaboration avec Frédéric Bard, resp. de l'équipe GLYcosylation and New THERApies (GLYNThERA), Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM, CNRS/Inserm/AMU), Institut Paoli Calmette (IPC), Marseille - frederic.bard@inserm.fr

Site web : <https://www.afmb.univ-mrs.fr/facility/biologie-structurale/>

Contexte : Les N- et O- glycosylations des protéines sont des modifications post-traductionnelles critiques qui influencent le repliement, la stabilité, le trafic intracellulaire et les interactions protéiques. Une glycosylation altérée est une caractéristique distinctive de nombreux cancers, influençant la croissance tumorale, l'échappement immunitaire et la propagation des cellules cancéreuses¹.

La découverte de l'activation des GALNTs (voie GALA) a montré que la relocalisation des GALNT depuis l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique conduit à l'augmentation de la O-glycosylation de protéines clés dans les cellules tumorales². Comprendre et exploiter cette voie offrirait de nouvelles opportunités pour le développement de thérapies anticancéreuses ciblées.

Objectif du stage : l'objectif de ce stage est de produire, dans des cellules HEK293 de type sauvage et génétiquement modifiées, des protéines solubles (secrétées) recombinantes portant des motifs de glycosylation variés. Ces 'glycoformes' serviront d'outils moléculaires pour des applications en aval, notamment la génération d'anticorps de type VHHs ('nanobodies') à même de cibler spécifiquement ces glycoformes dans un contexte d'immunothérapie anticancéreuse.

Séquences de travail :

1. Expression des protéines recombinantes : (a) Expression des protéines cibles, portant une étiquette 6xHis, à partir de cellules HEK293 de type sauvage ou modifiées, adhérentes et en suspension, (b) Vérification de l'expression par SDS-PAGE et western blot avec un anticorps anti-6xHis marqué.

2. Purification et caractérisation des protéines : (a) Purification des protéines recombinantes par chromatographies IMAC puis d'exclusion de taille avec suivi en SDS-PAGE/WB, (b) Caractérisation des profils de glycosylation par 'lectin blotting' et/ou spectrométrie de masse.

Profil attendu du candidat:

Compétences en biologie cellulaire et moléculaire : Connaissances en culture cellulaire (cellules adhérentes et en suspension), incluant les techniques d'asepsie, de comptage cellulaire et de suivi de croissance. Solides connaissances en biochimie des protéines et modifications post-traductionnelles.

Compétences en purification et analyse protéique : Familiarité avec les techniques de purification de protéines et l'optimisation de protocoles. Notions de spectrométrie de masse appliquée aux protéines (idéalement MALDI-TOF, ESI-MS) et en 'lectin blotting' ou techniques d'analyse des glycanes.

Qualités scientifiques : Rigueur expérimentale et capacité à suivre des protocoles. Esprit d'analyse pour interpréter des résultats. Capacité d'adaptation face aux imprévus techniques. Autonomie progressive dans la planification et l'exécution des expériences.

Qualités personnelles : Patience et persévérance (les manipulations peuvent être longues en laboratoire L2). Sens de l'organisation pour gérer plusieurs expériences en parallèle.

Modalités des candidatures : Merci de faire parvenir un CV, une lettre de motivation, une lettre de recommandation et les résultats de la licence 3 et du Master 1 (notes et classement), par mail à Claire.Debarnot@univ-amu.fr

Références bibliographiques :

NGuyen, A.T., Chia, J., Ros, M., Hui, K.M., Saltel, F. and Bard, F. Organelle specific O-glycosylation drives MMP14 activation, tumor growth and metastasis. **Cancer Cell** 2017 Nov 13;32(5):639–653.e6Ros M,

Ros M, Nguyen AT, Chia J, Le Tran S, Le Guezennec X, McDowall R, Vakhrushev S, Clausen H, Humphries MJ, Saltel F, Bard FA. ER-resident oxidoreductases are glycosylated and trafficked to the cell surface to promote matrix degradation by tumour cells. **Nat Cell Biol** Nov. 2020;