Offre de stage Master 2 au sein d'une plateforme technologique
année 2026-2027

Sujet : Ingénierie rationnelle d'une ProPME (pectine méthylestérase) végétale pour comprendre son activation

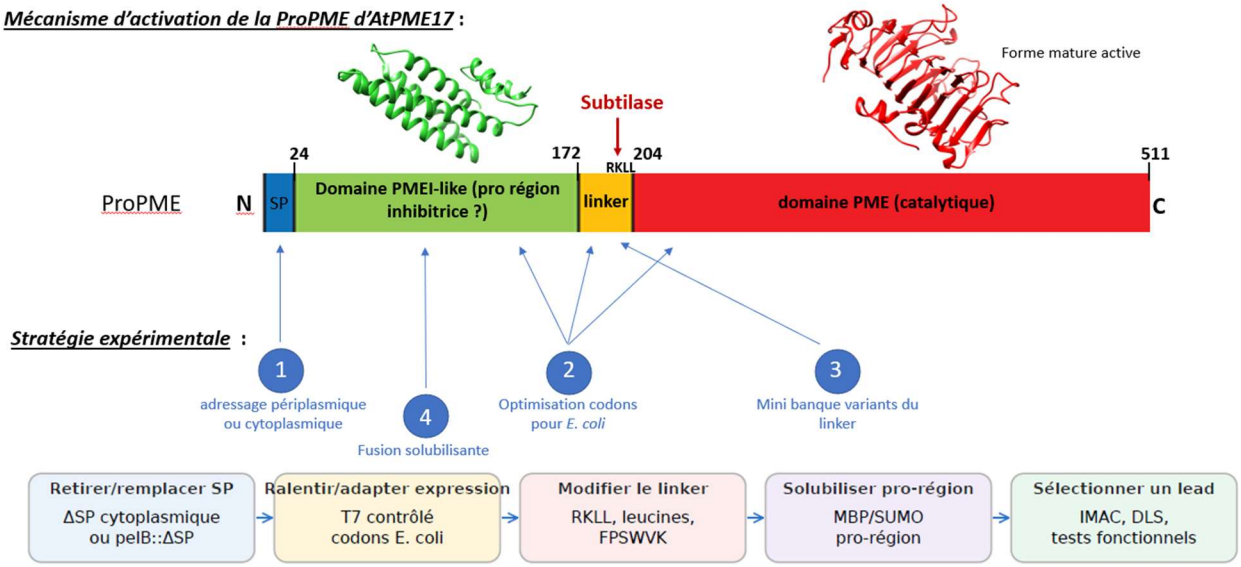
Durée du stage : 6 mois

Laboratoires d'accueil :
1) Plateforme Biomasse et Ingénierie des Protéines, IMM, UAR 2044, Campus Joseph Aiguier (CNRS), 31 Chemin Joseph Aiguier, 13009 Marseille.
2) Equipe BiosCiences, iSm2, Faculté des Sciences de Saint-Jérôme - Case 341, 52 Avenue Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille Cedex 20

Responsable(s) du stage : Agnès Amouric, Responsable technique de l'axe Ingénierie de la plateforme Biomasse et Ingénierie des Protéines.

Site web : https://www.imm.cnrs.fr/plateformes/biomasse-ingenierie-des-proteines/

Contexte :
La Plateforme Biomasse et Ingénierie des Protéines de l'IMM développe des stratégies de production de protéines recombinantes, depuis la conception des constructions génétiques jusqu'à l'expression chez *Escherichia coli*, la purification et le contrôle qualité des échantillons. Elle intervient notamment lorsque les approches standards ne suffisent pas : protéines instables, multi-domaines, produites en corps d'inclusion ou difficiles à obtenir sous une forme homogène.
Le stage s'inscrit dans ce cadre à partir d'un cas d'étude d'une protéine végétale, AtPME17. Cette enzyme appartient à la famille des pectine méthylestérases et est produite naturellement sous forme d'un précurseur multidomaine, appelé ProPME. Cette forme précurseur doit être activée par maturation protéolytique *via* des subtilases au niveau du linker séparant le propeptide du domaine catalytique. Cette enzyme est impliquée, entre autres, dans l'immunité des plantes.
Les équipes partenaires BiosCiences/Sapienza (AMU / Université de Rome) ont montré que la région N-terminale maintient la ProPME sous une forme inactive et pourrait aussi aider au bon repliement de la protéine. La difficulté actuelle est d'obtenir une forme pleine-longueur ProPME suffisamment stable, soluble et homogène pour poursuivre les analyses fonctionnelles et structurales. L'hypothèse est que cette difficulté résulte d'une expression bactérienne trop rapide, d'un repliement délicat de la pro-région riche en cystéines et d'un clivage prématuré au niveau du linker, ce qui empêche d'obtenir une forme pleine-longueur exploitable. Des travaux récents sur d'autres précurseurs végétaux suggèrent que certains motifs du linker peuvent favoriser des clivages par des subtilases, et que leur modification peut limiter cette maturation.
Le stage visera donc à transformer ce verrou expérimental en démarche raisonnée d'ingénierie protéique, utile pour AtPME17 mais aussi transférable à d'autres protéines difficiles accueillies sur la plateforme.



Objectif du stage :
L'objectif sera d'identifier une stratégie permettant de produire chez *E. coli* la ProPME stable et suffisamment homogène pour des analyses fonctionnelles et structurales. L'approche sera hiérarchisée autour de quatre axes : i) expression contrôlée, ii) compensation éventuelle des codons rares, ii) repliement oxydant de la pro-région, iv) mutagenèse ciblée du linker. Le travail combinera biologie moléculaire, expression bactérienne, purification et contrôles de qualité des échantillons.

Le/la stagiaire participera au design de constructions de la ProPME (mutations ciblées dans la région linker, version codon-optimisée, fusion à un tag solubilisant), qui seront exprimées dans différentes souches d'*E. coli* en conditions douces. Si l'expression cytoplasmique reste limitante, une stratégie périplasmique sera testée. Les meilleures conditions seront purifiées par IMAC et caractérisées (SDS-PAGE, Western blot anti-His, DLS), puis les candidats retenus (solubles et homogènes) seront validés fonctionnellement par l'équipe BiosCiences : activité PME, inhibition par la pro-région.

Le stage se déroulera principalement sur la plateforme, qui portera le développement technologique : du design des variants à leur étude expérimentale. L'équipe BiosCiences apportera la validation enzymologique et mécanistique. L'étudiant(e) sera ainsi formé(e) à une démarche complète allant de la conception de variants à l'interprétation fonctionnelle.

Profil attendu du candidat :
Formation en biochimie, et/ou biologie moléculaire, et/ou microbiologie, et/ou biotechnologies et/ou biologie structurale. Une première expérience sera appréciée que ce soit en clonage et/ou mutagenèse, et/ou culture bactérienne, et/ou purification IMAC ou analyse DLS.
Masters ciblés IM2B : Microbiologie IBM/MIF, BSG, CV ou BVBE. Les qualités attendues sont la rigueur, l'envie de comprendre les résultats expérimentaux, la prise d'autonomie progressive et l'intérêt pour le travail sur plateforme.

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 aamouric@imm.cnrs.fr, katia.duquesne@univ-amu.fr et thierry.giardina@univ-amu.fr.

Références bibliographiques :
Micheli 2001, PMID:11544130; Di Matteo 2005, PMID:15722470; Sénéchal 2014, PMID:24665109; Del Corpo 2020, PMID:33029918; Yang 2023, PMID:38049516; Wormit & Usadel 2018, PMID:30248977; Xiao & Anderson 2013, PMID:23543255.