

FORMULAIRE STAGE Recherche-M2 BBSG
(période de stage : du 8 janvier 2017 au 29 juin 2017)

Titre du stage : Dynamique des protéines : approches innovantes par incorporation d'acides aminés non naturels, marquage de spin et spectroscopie RPE

Laboratoire (intitulé, adresse, site web) :

Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (BIP), CNRS-AMU, UMR 7281
31 chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20
@ : bip.cnrs-mrs.fr

Equipe : Biophysique des métalloprotéines

Maitre de stage : Marlène Martinho

E-mail : mmartinho@imm.cnrs.fr

Téléphone : 04 91 16 44 14

Descriptif du stage : L'étude des transitions structurales dans les protéines est d'un intérêt crucial car ces transformations sont impliquées dans de nombreux processus biologiques essentiels : signalisation cellulaire, régulation d'activité enzymatique, reconnaissance moléculaire,... Au sein du laboratoire BIP, nous explorons ces processus de transition conformationnelle et leur rôle fonctionnel grâce à une approche originale, basée sur l'insertion de sondes magnétiques exogènes (marqueurs de spin), et sur l'analyse de leur mobilité par spectroscopie RPE (Résonance Paramagnétique Electronique)⁽¹⁻²⁾. Cette approche permet de dépasser les limitations des techniques structurales usuelles (RMN, RX...) pour les systèmes protéiques dynamiques, mais ses applications restent limitées par la nature des sites de greffages utilisés (acide aminé cystéine). Le sujet de stage que nous proposons portera sur le développement de nouvelles approches pour l'extension de cette méthodologie à des systèmes protéiques dans lesquels les cystéines sont engagées dans un rôle fonctionnel, et pour lesquels les approches classiques sont inopérantes. Notre stratégie sera basée sur l'insertion d'acides aminés non naturels sur lesquels nous grefferons des marqueurs de spin spécifiquement adaptés⁽³⁻⁵⁾. Elle sera développée sur des protéines modèles: l'acide 1-aminocyclopropane carboxylique oxidase (ACCO)⁽⁵⁻⁶⁾ et un cytochrome P450 réductase, possédant une grande flexibilité et un nombre important de cystéines. Cette approche innovante permettra ainsi de généraliser l'étude par RPE de la dynamique protéique à des systèmes très variés en termes de taille et de fonctionnalité. Ces nouvelles stratégies visant d'une part, l'incorporation d'acides aminés non naturels et d'autre part, le greffage de marqueurs de spin spécifiques sont, pour l'instant, très peu développées au niveau international. Leur maîtrise permettra d'étendre le champ d'application de la RPE biostructurale à de très nombreux systèmes biologiques actuellement inaccessibles. Ce projet interdisciplinaire s'inscrit clairement à l'interface de la Chimie et de la Biologie.

L'étudiant(e) en stage réalisera les expériences de marquage de spin et les études de dynamique des protéines par analyse des spectres RPE obtenus en mode continu ou pulsé (DEER, Double Résonance Electron-Electron). D'autres techniques spectroscopiques seront également utilisées (spectroscopie d'absorption UV-Visible, dichroïsme circulaire). Il(elle) pourra également être impliqué dans la préparation des échantillons biologiques (expression, purification et caractérisation des protéines).

Références bibliographiques :

1. N. Le Breton, M. Martinho, E. Mileo, E. Etienne, G. Gerbaud, B. Guigliarelli and V. Belle, *Front Mol Biosci*, **2015**, 2, 21.
2. N. Le Breton, T. Adrianaivomananjaona, G. Gerbaud, E. Etienne, E. Bisetto, A. Dautant, B. Guigliarelli, F. Haraux, M. Martinho and V. Belle, *Biochim Biophys Acta*, **2016**, 1857, 89-97.
3. C. C. Liu and P. G. Schultz, *Annu Rev Biochem*, **2010**, 79, 413-444.
4. M. R. Fleissner, E. M. Brustad, T. Kalai, C. Altenbach, D. Cascio, F. B. Peters, K. Hideg, S. Peucker, P. G. Schultz and W. L. Hubbell, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2009**, 106, 21637-21642
5. I. J. Clifton, M. A. McDonough, D. Ehrismann, N. J. Kershaw, N. Granatino and C. J. Schofield, *J Inorg Biochem*, **2006**, 100, 644-669
6. Z. Zhang, J. S. Ren, I. J. Clifton and C. J. Schofield, *Chem Biol*, **2004**, 11, 1383-1394