

**APPEL A CANDIDATURES pour des stagiaires en Master 2 Recherche  
sur des projets communs aux Unités de Recherche de la Fédération FRABio**

**- Gratifications de Stages -**

Dans le cadre de sa mission en matière de formation à et par la recherche, et dans le but de promouvoir les collaborations entre ses quatre unités de recherche (UGSF/UMR8576 CNRS ; MSAP/USR3290 CNRS ; PHYCEL/U1003 INSERM ; PRISM/U1192 INSERM), la **Fédération de Recherche FRABio** (<http://frabio.univ-lille1.fr/>) met en place un dispositif permettant d'offrir des **gratifications** à des **stagiaires en Master 2 Recherche** pour l'**année scolaire 2016-2017**. Le montant de ces gratifications est fixé à 560€ par mois sur une période de 6 mois.

Les deux projets de recherche pouvant faire bénéficier au stagiaire de ces gratifications sont présentés ci-après. Vous êtes dès à présent priés de contacter directement les tuteurs et cotuteurs de ces deux projets afin de leur soumettre vos candidatures.

Bien cordialement,

Dominique Legrand

Directeur FR3688 CNRS-Lille1 FRABio

Villeneuve d'Ascq, le 29/03/2016

# Protéomique d'un unique grain d'amidon

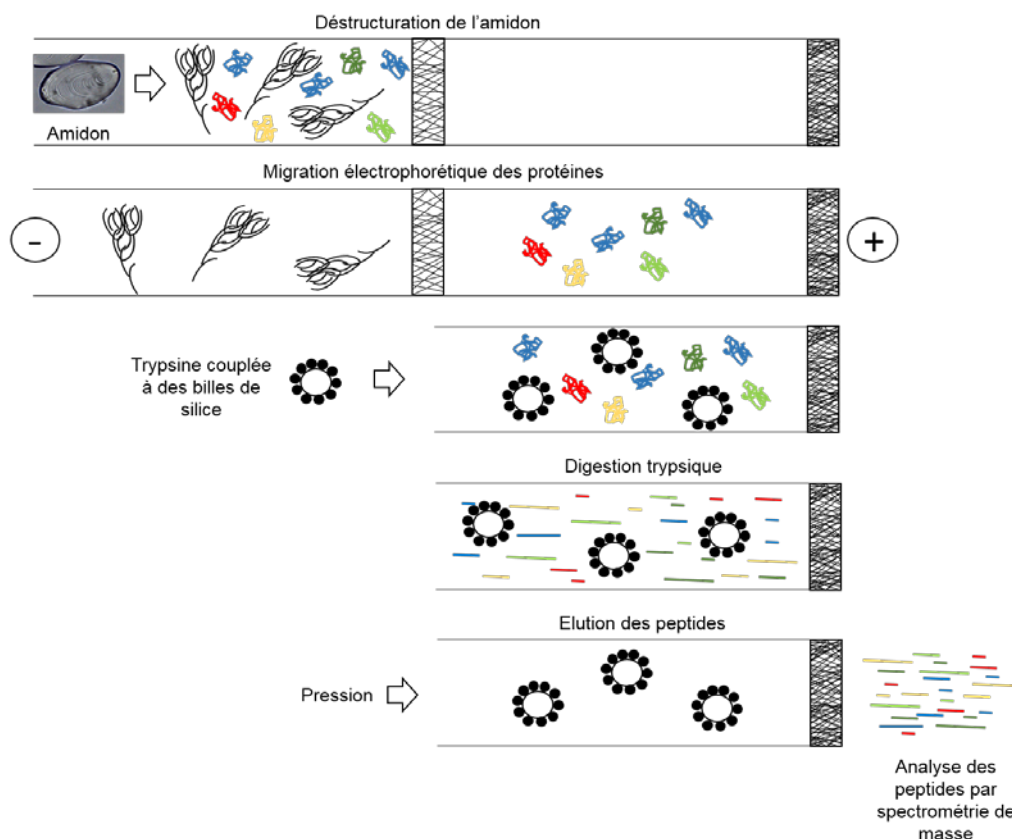
Miniaturisation pour la Synthèse l'Analyse et la Protéomique (MSAP, USR3290 CNRS – Université Lille 1, Bât. C4) / Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF, UMR8576 CNRS – Université Lille 1, Bât. C9).

## Tuteurs :

Nicolas Szydowski – MSAP – 03 20 43 47 18 – [nicolas.szydowski@univ-lille1.fr](mailto:nicolas.szydowski@univ-lille1.fr)

Christophe D'Hulst – UGSF – 03 20 33 61 41 – [christophe.dhulst@univ-lille1.fr](mailto:christophe.dhulst@univ-lille1.fr)

L'amidon est un polymère de glucose synthétisé, entre autres, dans les organes de réserve (graines, tubercules,...) des végétaux pour stocker le carbone et l'énergie qui seront restitués ultérieurement (en particulier lors de la germination). Ce polymère est complexe tant du point de vue de la structure des polysaccharides qui le composent, que de son contenu en composés minoritaires comme les protéines. Les protéines sont naturellement présentes dans le grain d'amidon. On en trouve plusieurs dizaines qui y sont associées de manière plus ou moins spécifique et peuvent pour certaines d'entre elles avoir une fonction dans le métabolisme de l'amidon. Il apparaît que l'abondance des protéines associées au grain d'amidon répond à un principe stoechiométrique probablement à l'origine de la régulation des processus d'initiation, de synthèse, de dégradation et du contrôle du nombre et de la taille des grains dans les cellules. Dans ce projet, notre ambition est de dévoiler ce principe et pour ce faire, nous élaborerons une stratégie originale d'analyse protéomique sur un seul grain d'amidon (figure 1).



**Figure 1 : Stratégie d'analyse protéomique d'un grain d'amidon.** Les grains d'amidon ( $\varnothing = 75 \mu\text{m}$  en moyenne) sont piégés dans un capillaire ( $\varnothing = 100 \mu\text{m}$ ) avant d'être déstructurés par chauffage à  $100^\circ\text{C}$  pendant 10 min. Les glucanes (noir) et les protéines (couleurs) de l'amidon sont séparés par électrophorèse avant rupture du capillaire en aval du premier fritté. Des billes de silice couplées à la trypsine sont introduites afin de digérer les protéines et les peptides résultants sont élués par application d'une pression à l'extrémité du capillaire. Le mélange de peptides est ensuite analysé par nanoLC-nanoESI-MS/MS et les protéines sont identifiées par interrogation de bases de données.

Dans un premier temps, les analyses seront réalisées sur 10 grains d'amidon et optimisées dans le but d'étudier un grain unique. Le modèle végétal choisi est la pomme de terre puisque ses grains d'amidon sont les plus grands (30  $\mu\text{m}$  de diamètre en moyenne et jusqu'à 100  $\mu\text{m}$  pour les plus grands) comparé aux autres espèces végétales (8  $\mu\text{m}$  de diamètre en moyenne pour le riz par exemple ; 2-3  $\mu\text{m}$  pour les grains d'amidon de l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* ou la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*). La procédure décrite dans la figure 1 ainsi que l'interrogation des banques de données seront réalisées au MSAP. Les résultats seront analysés à l'UGSF (équipe « glycobiochimie végétale ») dans un contexte de recherche consacré à l'élucidation du métabolisme de l'amidon. L'identification des protéines (analyse qualitative) se poursuivra par la mise au point d'analyses quantitatives pour comparer les protéomes d'amidons provenant de lignées de pomme de terre aux phénotypes d'intérêt (modification de la morphologie des grains, de la structure des polysaccharides,...) disponibles à l'UGSF.

Les données préliminaires obtenues au cours du stage de Master serviront de base pour une thèse visant à étudier le métabolisme de l'amidon à l'échelle d'un grain dans une série de plantes mutantes (approche de génétique inverse) et non mutantes. Dans ce dernier cas, une étude cinétique de l'association polysaccharides / protéines au cours de la maturation des grains d'amidon sera effectuée ou encore le protéome du grain d'amidon sera identifié selon la taille des grains étudiés (existe-t-il un protéome spécifique selon la taille des particules ?). Une approche « peptide AQUA » (Absolute QUAntification) et une approche SILAC (Stable Isotope LABELing in Cell culture) seront mises en œuvre. Pour l'approche SILAC, les plants de pomme de terre seront cultivés sur un milieu enrichi ou non en  $^{15}\text{N}$  (quantification relative des protéines) dans des structures de culture végétale *in vitro* disponibles à l'UGSF. L'approche « peptides AQUA » consistera à identifier les peptides ayant les meilleures sensibilités et comportement chromatographique afin d'en produire une version synthétique marquée par un isotope stable. Une quantité connue de ces peptides sera ajoutée au mélange de protéines après sa préparation permettant leur quantification dans l'échantillon.

## **Titre du projet de recherche:** MECANISMES DE REGULATION POST-GENOMIQUE DU CANAL SODIQUE NALCN DANS L'INVASION DES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES

**Unités impliquées dans le projet:** i) Laboratoire de Physiologie Cellulaire (PHYCEL), INSERM U1003, bât. SN3; ii) Unité de glycobiologie structurale et fonctionnelle (UGSF), bât. C9

**Cotuteurs:** Dr. V'yacheslav LEHEN'KYI, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, tél: 03 20 33 70 78, mail: [vyacheslav.lehenkyi@univ-lille1.fr](mailto:vyacheslav.lehenkyi@univ-lille1.fr); Dr. François FOULQUIER, Unité de glycobiologie structurale et fonctionnelle, tél: 03 20 43 44 30, mail: [francois.foulquier@univ-lille1.fr](mailto:francois.foulquier@univ-lille1.fr)

### **Présentation du projet**

**Introduction:** L'influx de Na<sup>+</sup> par les canaux sodiques a été récemment identifié comme un acteur majeur dans la motilité cellulaire et l'invasion (1). Cependant, les mécanismes précis entre la signalisation de Na<sup>+</sup> et le phénotype des cellules cancéreuses restent à élucider. Récemment, un membre de la famille des canaux ioniques 4x6TM, le canal de fuite non-sélectif sodique (NALCN), a été identifié comme étant significativement muté/dérégulé dans un certain nombre de cancers humains (2,3). Pourtant, rien n'est encore connu à propos du rôle du canal NALCN dans la physiologie saine et dans les maladies humaines de la prostate.

**Données préliminaires:** NALCN est fortement exprimé dans les lignées cellulaires avancées PCa: DU 145, PC-3, et PC-3M, mais pas dans les lignées cellulaires à faible potentiel métastatique: LNCaP et C4-2. Alors que son rôle dans les cellules PC-3 et PC-3M est de promouvoir la migration et l'invasion, son rôle dans les cellules DU-145 (issues de métastases de cerveau) est de les diminuer. Les données sur la localisation intracellulaire à partir de microscopie confocale et de centrifugation différentielle montrent les différents modèles d'expression/trafic intracellulaire de ce canal dans les différentes lignées étudiées (cf. Figure 1).

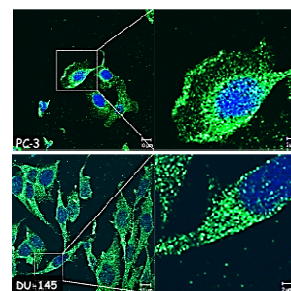


Figure 1

**Buts et phases du projet:** Le but principal de ce projet de M2R est de trouver si NALCN est soumis à différentes régulations post-génomiques dans ces lignées cellulaires afin d'exercer des fonctions différentielles dans l'invasion/migration des cellules cancéreuses prostatiques. Les buts spécifiques sont:

- 1) L'étude du trafic intracellulaire de NALCN dans la membrane plasmique en utilisant des méthodes de température pulse-chase ainsi que des inhibiteurs spécifiques aux organelles pour voir si et où la protéine est retenue (UGSF). Pour vérifier l'expression de NALCN à la surface des cellules, des techniques de biotinylation de protéine seront effectuées (PHYCEL).
- 2) Montrer si la protéine NALCN, portant les sites de N-glycosylation consensus, est glycosylée différemment dans les deux lignées cellulaires qui mènent à leurs fonctions opposées *in vitro* (UGSF).
- 3) Démontrer qu'il y a une altération de la signalisation médiée par NALCN à cause des protéines partenaires potentielles comme UNC70-80 (5) en utilisant des approches de siRNA, Co-IP et des tests de proximité de ligase (PHYCEL).

**Faisabilité du projet:** Le projet sur le rôle de NALCN dans le cancer est actuellement étudié dans le laboratoire. Tous les outils nécessaires, comme l'anticorps, pNALCN-GFP, les clones stables, sont disponibles au labo. L'équipe PHYCEL possède toutes les compétences nécessaires dans le domaine de biologie cellulaire et d'imagerie, et l'équipe UGSF a ses compétences dans le trafic protéique/modifications posttraductionnelles telles que la N-glycosylation. L'étudiant va commencer à travailler cet été jusqu'à juin 2017.

**Données attendues:** Le canal NALCN est jusqu'ici connu comme un canal sodique membranaire dans d'autres modèles cellulaires (1,3). Nous allons démontrer l'altération de post-génomique (trafic/modifications posttraductionnelles) menant à une altération de la localisation intracellulaire et à une régulation différentielle dans la migration/invasion des cellules cancéreuses prostatiques avec la perspective d'un diagnostic clinique et d'une thérapie associée dans le cas du cancer de la prostate.

**Perspectives de poursuite du projet:** Si l'hypothèse de l'altération de modification posttraductionnelles et du trafic cellulaire est confirmée, ce projet sera davantage développée dans le projet de these, où l'expertise de l'équipe du Dr. FOULQUIER sera essentielle.

### **Liste des références:**

1. Brackenbury, W. J. Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. *Channels (Austin)*, 2012. 6(5): 352–361.
2. Lee, Y., et al., Prognostic implications of genetic variants in advanced non-small cell lung cancer: a genome-wide association study. *Carcinogenesis*, 2012. 34(2): p. 307-13.
3. Senatore, A., et al., NALCN ion channels have alternative selectivity filters resembling calcium channels or sodium channels. *PLoS One.*, 2013. 8(1)
4. Wang, H., and Ren, D. UNC80 functions as a scaffold for Src kinases in NALCN channel function. *Channels (Austin)*, 2009. 3, 161–163.
5. Lu, B., et al. Extracellular calcium controls background current and neuronal excitability via an UNC79-UNC80-NALCN cation channel complex. *Neuron*, 2010. 68, 488–499.