

Titre du stage (en français et en anglais):

Régulation de la voie de signalisation Hedgehog : caractérisation structurale et biophysique du récepteur Patched.

Regulation of the Hedgehog signaling pathway : structural and biophysical characterisation of the Patched receptor.

Résumé du projet:

Problématique

La voie de signalisation Hedgehog contrôle la différenciation des cellules souches au cours de l'embryogénèse, donnant naissance au tube neural dans le système nerveux central et à de nombreux organes. Des dysfonctionnements engendrent une maladie génétique, l'holoprosencéphalie, et sont impliqués dans de nombreux cancers. De nombreuses études cellulaires ont permis de tracer la voie de signalisation, et la cryo-microscopie électronique vient de mettre à jour les interactions mises en jeu. Nous étudions l'aspect structural de plusieurs de ces protéines au laboratoire. En particulier, nous avons mis au jour la fixation de zinc sur la protéine Suppressor of Fused et caractérisé sa structure en solution (Jabrani et al, 2017, Makamte, 2019).

Nous abordons l'étude structurale du récepteur Patched, une grosse protéine membranaire qui fixe la protéine Hedgehog et transporte du cholestérol. Elle est aussi responsable de l'efflux de drogues de chimiothérapies, ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante. La structure de la protéine humaine a été publiée en 2018 (voir figure), mais de nombreuses questions restent ouvertes, particulièrement concernant sa stoechiométrie, l'affinité avec ses ligands et les sites de fixation de ceux-ci. Nous l'exprimons en cellule eucaryote afin de résoudre sa structure par cristallographie ou cryo-microscopie électronique, seule et avec plusieurs ligands. Nous collaborons avec plusieurs équipes de biologistes spécialisés sur la voie Hedgehog.

Sujet du stage

Pendant son stage, l'étudiant(e) devra purifier et caractériser cette protéine de 150 kDa, et tester la fixation de ligands par différentes méthodes biophysiques et de microscopie électronique, dans le but de résoudre la structure du complexe entre Patched et les molécules activatrices ou inhibitrices.

Ce stage M2 allie donc biologie structurale, biophysique et biochimie et constitue une formation étendue sur un sujet de haute importance scientifique et médicale. Il peut naturellement déboucher sur une thèse au cours de laquelle ces étapes seront poursuivies.

Le laboratoire de biologie physico-chimique des protéines membranaires est leader dans l'étude des protéines membranaires, particulièrement dans la production de polymères amphiphiles stabilisant les protéines en solution. Nous bénéficions de cet environnement et des plates-formes de l'IBPC pour la spectrométrie de masse, la cristallisation et la diffusion de lumière. Nous avons aussi accès aux microscopes électroniques des Institut Curie et Pasteur.

Méthodologies

- expression de protéines en cellule d'insecte, solubilisation, purification, cristallisation
- caractérisation par des méthodes biophysiques et imagerie (dichroïsme circulaire, diffusion de lumière, diffusion des rayons X aux petits angles, microscopie électronique)

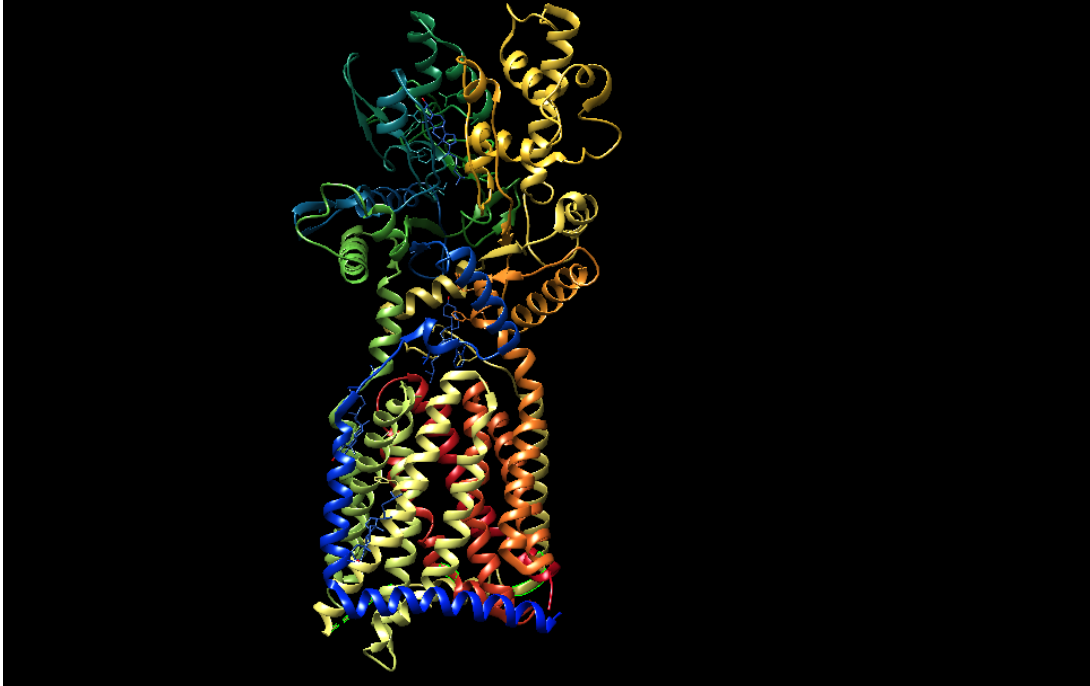
Références de l'équipe sur le sujet et utilisant les techniques citées

Jabrani, A., Makamte, S., Moreau, E., Gharbi, Y., Plessis, A., Bruzzone, L., Sanial, M., and Biou, V. (2017). Biophysical characterisation of the novel zinc binding property in Suppressor of Fused. *Scientific Reports* 7, 11139.

Aizel, K., **Biou, V.**, Navaza, J., Duarte, L.V., Campanacci, V.r., Cherfils, J., and Zeghouf, M. (2013). Integrated Conformational and Lipid-Sensing Regulation of Endosomal ArfGEF BRAG2. *PLoS Biol* 11, e1001652

Biou , V., Aizel, K., Roblin, P., Thureau, A., Jacquet, E., Hansson, S., Guibert, B., Guittet, E., van Heijenoort, C., Zeghouf, M., J. Perez, J. Cherfils (2010). SAXS and X-ray crystallography suggest an unfolding model for the GDP/GTP conformational switch of the small GTPase Arf6. *J Mol Biol* 402, 696-707.

Makamte et al, A trans-species Solution study of Suppressor of Fused shows an increase in dynamics from fly to human. 2019, en révision



Structure par cryo microscopie electronique de hPtc complexée à des molécules de cholesterol. Coloration du bleu au rouge selon la chaine polypeptidique.