

Internship form
(ON ONE PAGE MAXIMUM)
Course M2 BBRT 2023-24

Laboratory: CR2TI, INSERM UMR 1064

Team No: 1

Supervisor's full name: Dorian McILROY

Email of the supervisor: dorian.mcilroy@univ-nantes.fr

Prospective candidate: -

Internship Title: Identifying alternative receptors for BK polyomavirus

Summary of proposed project:

The BK polyomavirus (BKPyV) is a small non-enveloped DNA virus with >90% seroprevalence, that persists in the kidney and can cause problems in kidney transplant recipients. We recently reported the crystal structures and binding properties of capsid variants observed in patients with persistent genotype I BKPyV viremia (Sorin et al. Cell Reports 2023). One variant, carrying the K69N and E82Q mutations, lost the ability to bind to sialic acid, but retained infectivity in 293TT cells, implying the existence of an alternative receptor responsible for attachment and infectious entry of this variant. Preliminary results from colleagues in London (Y. Liu group, UCL) indicate that VP1 pentamers carrying the K69N E82Q mutations only bind to one particular glycan, which has not so far been implicated in polyomavirus entry. Interestingly, gIV (but not gI, gII, or gIII) VP1 pentamers also bound to this specific glycan.

The aim of the internship is to confirm that this glycan is a functional receptor for the K69N E82Q variant and gIV BKPyV, using lectins to block the glycan, and glycosidases to remove specific sugar residues from the surface of 293TT cells. Fluorescence-labeled VLPs and reporter-gene pseudotypes will then be used to quantify capsid binding and infectious entry of the different variant viruses into cells with and without expression of the glycan.

It is expected that the M2 student who works on this project will be listed as a co-author on the follow-up paper that we intend to submit in 2024.

Option with which this project is associated:

- Immuno-Intervention, Transplantation and Self-Immunity
- Infectious diseases

Internship form
(ON ONE PAGE MAXIMUM)
Course M2 BBRT 2023-24

Laboratoire : CR2TI ITUN

Intitulé/N° d'équipe : Equipe iTHINK

Nom-Prénom de l'encadrant : Lucile FIGUERES / Fabienne HASPOT

Courriel de l'encadrant : lucile.figueres@chu-nantes.fr / fabienne.haspot@univ-nantes.fr

Titre du stage :

Recherche de gènes candidats dans le diabète phosphaté, une maladie rare responsable de calculs rénaux et de néphrocalcinose

Résumé du projet proposé :

Le diabète phosphaté est une entité génétique rare, définie par une hypophosphatémie rénale associée à une hypercalciurie par hypervitaminose D et une maladie lithiasique rénale pouvant parfois se compliquer d'une néphrocalcinose, d'une insuffisance rénale chronique ou d'une ostéoporose. L'inactivation d'un des trois gènes suivants, *SLC34A1*, *SLC34A3*, *SLC9A3R1*, codant respectivement pour les protéines : NPT2a, NPT2c et NHERF1, exprimées dans le tubule contourné proximal, site responsable de la réabsorption du phosphate est responsable d'une proportion importante de diabètes phosphatés. Cependant, une majorité de patients reste sans diagnostic génétique. Récemment, les explorations par l'étude d'exomes ont mis en évidence un nouveau gène *SGK3* codant pour la protéine SGK3 impliquée dans l'expression du transporteur du phosphate NPT2a. Après avoir réalisé des séquençages d'exomes chez 26 patients atteints de diabète phosphaté, nous avons identifié de potentiels gènes candidats. Un des gènes candidats (muté chez trois patients) est intéressant car son inactivation partielle dans un modèle murin reproduit un phénotype proche du phénotype humain du diabète phosphaté. L'inactivation de ce gène n'a, jusqu'à présent, jamais été décrite chez l'Homme. Expérimentalement, l'inactivation de ce gène d'intérêt sur des cellules humaines RPTEC (Renal Proximal Tubule Epithelial Cells) par siRNA réduit l'expression de la protéine correspondante et diminue significativement la réabsorption du phosphate sans altération de la viabilité et de la prolifération cellulaire. Ces résultats préliminaires laissent suggérer que ce gène, joue bien un rôle dans la pathogénie du diabète phosphaté.

L'objectif du stage de master 2 est de réaliser une mutagénèse directe du gène candidat dans les cellules RPTEC/TERT1 grâce à la technologie CRISPR/Cas9. Avec cette technique en cours d'optimisation, nous espérons obtenir un modèle génétiquement proche de celui des patients. La réabsorption de phosphate et l'expression des différents transporteurs de phosphate seront évaluées sur ces cellules afin de savoir si la mutation du gène candidat est associée à une diminution de la réabsorption du phosphate.

Mots clés : génétique, tube contourné proximal, CRISPR/Cas9

Option with which this project is associated:

- Biotherapies of the locomotor system
- Cardiovascular & Risk Factors
- Immunology-Cancérology
- Immuno-Intervention, Transplantation and Self-Immunity
- Infectious diseases
- Physiopathologies of the brain-gut axis

Laboratoire : **INSERM UMR1229 Regenerative Medicine and Skeleton (RMeS), Nantes**
N° d'équipe : **Équipe REJOINT (Regeneration and pathophysiology of joints),
Groupe 3 – STRATOA (Immune cells and osteoarthritis personalized therapies)**
Nom-Prénom de l'encadrant : **Anaïs Cardon et Marie-Astrid Boutet**
Courriel de l'encadrant : anaïs.cardon@univ-nantes.fr / marie-astrid.boutet@univ-nantes.fr
Candidat pressenti : Aucun

Titre du stage : **Étude de l'hétérogénéité des lymphocytes dans la membrane synoviale de patients atteints d'arthrose**

Résumé du projet proposé :

L'**arthrose** (*osteoarthritis*, **OA**) est la plus commune des maladies rhumatismales, touchant plus de 500 millions de personnes dans le monde. Cette pathologie incurable et dégénérative conduit à la dégradation du cartilage, à du remodelage osseux et à une inflammation de la membrane synoviale (ou synovite) entraînant une perte de fonction articulaire.

La **synovite** joue un rôle important dans l'initiation et la progression de l'OA. Nos résultats préliminaires montrent que les patients atteints d'OA peuvent être divisés en 3 sous-groupes (ou pathotypes), basés sur des caractéristiques histopathologiques d'infiltration de la membrane synoviale, et ce de façon similaire aux patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (pathologie auto-immune articulaire). En particulier, plus de 50% des patients arthrosiques montrent une **accumulation de lymphocytes T et B** dans des structures particulières, semblables à celles observées dans la polyarthrite rhumatoïde. Puisque l'OA n'est pas une pathologie auto-immune, la présence de ces cellules et de ces structures est surprenante, soulevant la question du rôle de ces lymphocytes dans l'OA.

Dans ce contexte, nous souhaitons **étudier la diversité et la distribution des différentes populations de lymphocytes T et B au sein de la membrane synoviale des patients atteints d'OA**, en fonction de leur pathotype.

Cette étude sera réalisée grâce à la bio-collection de membranes synoviales de patients arthrosiques développée à RMeS, en partenariat avec le CHU de Nantes, et sera basée sur des analyses de **cytométrie spectrale**. Au cours de ce stage, nous proposons au candidat de :

- Participer à l'isolement et au marquage par anticorps fluorescents des lymphocytes, à partir d'échantillons de membranes synoviales de patients atteints d'OA
- Participer à l'acquisition de ces marquages en cytométrie spectrale
- Analyser le jeu de données obtenu afin de déterminer les différentes sous-populations de lymphocytes T et B présentes dans la membrane synoviale des patients arthrosiques, en fonction du pathotype
- Valider la localisation de ces populations au sein du tissu synovial grâce à des marquages multiples en immunofluorescence

L'ensemble de ces données permettra d'améliorer la compréhension du rôle des lymphocytes dans la pathogenèse de l'OA.

Option à laquelle est associée ce projet :

- Biothérapies de l'appareil locomoteur
- Cardiovasculaire et Facteurs de Risque
- Immunologie-Cancérologie
- Immuno-Intervention, Transplantation et Auto-Immunité
- Maladies infectieuses
- Physiopathologies de l'axe cerveau-intestin

Formulaire de stage
(SUR UNE PAGE MAXIMUM)
Parcours M2 BBRT 2023-24

Laboratoire : CR2TI

N° d'équipe : 4

Nom-Prénom de l'encadrant : Degauque Nicolas, Brouard Sophie

Courriel de l'encadrant : nicolas.degauque@univ-nantes.fr

Candidat pressenti : LASLANDES Manuel

Titre du stage : Modulation des fonctions effectrices des lymphocytes T CD8 TEMRA par les lymphocytes B régulateurs en transplantation rénale

Résumé du projet proposé :

Le rejet humoral demeure la principale cause de perte du greffon. Une meilleure compréhension de la réponse immunitaire résultant de la stimulation chronique déclenchée par un greffon allogénique est nécessaire pour identifier de nouveaux biomarqueurs du risque de lésion du greffon et des cibles thérapeutiques innovantes pour prévenir la perte du greffon. Ce projet a pour objectif d'enrichir les connaissances de la réponse immune du sujet transplanté en analysant la régulation des lymphocytes T CD8 effecteur mémoire exprimant le CD45RA (TEMRA) par les cellules régulatrices B exprimant le GZMb (GZMb-Breg) dans un modèle de coculture autologue chez les volontaires sains et des patients transplantés rénaux présentant une fonction stable de leur greffon ou un rejet de type ABMR (antibody mediated rejection) ou mixte. Des modèles de coculture cellulaires et des approches d'analyse transcriptionnelle et de cytométrie à haute dimension permettront de caractériser la modulation des fonctions effectrices des lymphocytes T CD8 TEMRA en présence de lymphocytes B activés ou régulateurs. L'analyse comparative des réponses obtenues chez le volontaire sain et les patients transplantés rénaux (normaux, rejet humoral, rejet mixte) permettra de définir la nature de cette interaction et d'identifier les mécanismes et les acteurs impliqués dans cette régulation. Nous chercherons ainsi à définir si l'accumulation des LT CD8 TEMRA résulte d'un défaut des fonctions régulatrices des GZMb-Breg. L'étude de ces interactions est motivée par des découvertes récentes rapportées par l'équipe 4 du CR2Ti: la fréquence augmentée de cellules TEMRA CD8 circulantes à 1 an de la transplantation est associée à une majoration du risque de dysfonction du greffon rénal au cours du suivi, les greffés rénaux immuno-tolérants présente un nombre accru de lymphocytes B régulateurs exprimant le Granzyme B, les cellules B sont capables de présenter des antigènes aux cellules T CD8 et de sécréter des cytokines clefs régulant leurs fonctions. L'ensemble des échantillons de l'étude seront sélectionnés dans la biocollection DIVAT-biocoll.

Option à laquelle est associée ce projet :

Immuno-Intervention, Transplantation et Auto-Immunité

Formulaire de stage
(SUR UNE PAGE MAXIMUM)
Parcours M2 BBRT 2023-24

Laboratoire : CR2TI (INSERM UMR 1064)
N° d'équipe : 2
Nom-Prénom de l'encadrant : Giraud Matthieu
Courriel de l'encadrant : matthieu.giraud@univ-nantes.fr
Candidat presenté :

Titre du stage :

Contrôle de l'expression du soi pour la sélection des lymphocytes T dans le thymus

Résumé du projet proposé :

Les cellules épithéliales médullaires du thymus (mTECs) ont la caractéristique unique d'exprimer un très grand nombre de protéines "du soi" (TSA). Cette expression dans le thymus permet la maturation des lymphocytes T et l'élimination de ceux qui sont autoréactifs (réactifs contre le soi) empêchant ainsi la survenue de maladies autoimmunes. Une protéine unique Aire (Autoimmune Régulator) a été montrée capable d'induire l'expression d'une part importante des TSAs dans les mTECs. Cependant les facteurs contrôlant l'expression des TSA indépendamment de l'action de Aire restent encore inconnus. Un travail récent du laboratoire a montré que les interactions entre les mTECs et les lymphocytes T en développement dans le thymus activent une pléiade de facteurs de transcription susceptibles de jouer un rôle majeur dans la capacité des mTECs à exprimer les TSA.

Le candidat testera l'implication et l'effet des facteurs de transcription identifiés par le laboratoire dans l'induction des TSA dans d'une lignée cellulaire de TECs en activant l'expression de ces facteurs par une stratégie CRISPR d'activation (CRISPRa). La lignée de mTECs sera infectée par des lentivirus ultra-concentrés portant des constructions KRAB-dCas9/sgRNA dirigées contre les facteurs que nous voulons activer. Le réséquençage à haut débit (RNAseq) sera effectué sur l'ARN isolé des mTECs infectées et non-infectées afin de déterminer le nombre de TSA dont l'expression est contrôlée par les facteurs testés ainsi que leur impact sur la maturation des mTECs.

Les résultats attendus devraient ainsi répondre à une des questions les plus fondamentale en immunologie : quels sont les mécanismes d'induction soi dans le thymus qui permettent l'établissement de la tolérance immunologique.

Option à laquelle est associée ce projet :

- Biothérapies de l'appareil locomoteur
- Cardiovasculaire et Facteurs de Risque
- Immunologie-Cancérologie
- Immuno-Intervention, Transplantation et Auto-Immunité
- Maladies infectieuses
- Physiopathologies de l'axe cerveau-intestin

Formulaire de stage
(SUR UNE PAGE MAXIMUM)
Parcours M2 BBRT 2023-24

Laboratoire : CR₂TI

N° d'équipe : 3

Nom-Prénom de l'encadrant : HASPOT FABIENNE

Courriel de l'encadrant : fabienne.haspot@univ-nantes.fr

Candidat pressenti :

Titre du stage : **Étude des conséquences de l'engagement d'HHLA2 sur les lymphocytes T et les cellules NK.**

Résumé du projet proposé :

HHLA2 est un membre récemment identifié de la famille B7. Exprimée faiblement par certaines cellules épithéliales, son expression est fortement augmentée dans de nombreuses tumeurs. HHLA2 possède un ligand activateur CD28H exprimé par les Lymphocytes T et les cellules NK, et les pDC et un ligand inhibiteur KIR3DL3 exprimé par les LT et les cellules NK. Ainsi HHLA2 a la capacité d'induire une stimulation ou une inhibition selon le récepteur engagé.

Nous avons développé des cellules exprimant artificiellement HHLA2 et avons commencé à décrire les conséquences que cette expression engendrait sur les LT et les cellules NK.

Lors de votre stage de master 2 vous serez amené à établir les conditions permettant l'expression naturelle d'HHLA2 par les cellules épithéliales saines et tumorales. Vous vérifierez si l'expression naturelle d'HHLA2 induit les mêmes modifications sur les LT et les cellules NK que celles que nous avons déjà observées. Vous serez formé à la culture cellulaire, à l'utilisation de la cytométrie en flux, aux analyses par ELISA et Western blot et serez amené à faire des analyses de biologie moléculaire. L'équipe d'accueil a développé différents anticorps anti-CD28H qui pourront éventuellement être utilisés lors du projet de recherche. Vous serez amené à travailler en collaboration avec une étudiante en 3^{ième} année de thèse.

Option à laquelle est associée ce projet :

- Biothérapies de l'appareil locomoteur
- Cardiovasculaire et Facteurs de Risque
- Immunologie-Cancérologie
- Immuno-Intervention, Transplantation et Auto-Immunité
- Maladies infectieuses
- Physiopathologies de l'axe cerveau-intestin

Formulaire de stage
(SUR UNE PAGE MAXIMUM)
Parcours M2 BBRT 2023-24

Laboratoire : CRTI / INSERM U1064

N° d'équipe : 1

Nom-Prénom de l'encadrant : Aurélie MOREAU

Courriel de l'encadrant : aurelie.moreau@univ-nantes.fr

Candidat pressenti : Aucun

Titre du stage : Caractérisation d'un modèle d'étude des cellules myéloïdes de l'environnement tumoral

Résumé du projet proposé :

Les cellules myéloïdes, que ce soit les cellules dendritiques ou les macrophages, sont impliquées dans l'immunité mais également dans l'induction de la tolérance. Ces cellules myéloïdes de la tolérance sont présentes dans le microenvironnement tumoral de certains cancers et favorisent l'échappement tumoral. A l'inverse dans certaines pathologies où il est souhaitable d'induire une tolérance (en transplantation ou dans le traitement des maladies auto-immunes), ces cellules myéloïdes peuvent être générées in vitro puis utilisées en thérapie cellulaire pour promouvoir la tolérance.

Nous avons ainsi généré des cellules tolérogènes humaines in vitro et réalisé un essai clinique pour démontrer l'innocuité et l'efficacité de cette thérapie cellulaire en transplantation rénale (Sawitzki et al., Lancet, 2020 ; Moreau et al., Kidney International, 2023). Ces travaux nous ont également permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme régulateur des cellules myéloïdes tolérogènes. Elles peuvent ainsi réguler les LT par leur forte sécrétion de lactate. Ce lactate réduit la glycolyse des LT et par conséquent inhibe leur activation et leur prolifération (Marin et al. Cell Metabolism 2019). En parallèle de nos découvertes, il a été montré que le lactate est une molécule fortement produite au sein des tumeurs. De plus, les cellules myéloïdes du microenvironnement tumoral possèdent des propriétés tolérogènes similaires à celles générées in vitro.

En se basant sur ces observations, nous souhaitons utiliser nos cellules myéloïdes tolérogènes dérivés in vitro comme modèle d'étude pour comprendre les cellules myéloïdes du microenvironnement tumoral. Nous analyserons ainsi leur développement et approfondirons leurs mécanismes d'action. La compréhension de la différenciation et des mécanismes d'action des cellules tolérogènes présentes dans les tumeurs est une étape indispensable au développement de nouvelles thérapeutiques pour les cibler et les contrôler.

Dans ce projet, l'étudiant sera amené à réaliser de la culture cellulaire, de la cytométrie de flux, des tests fonctionnels et des analyses métaboliques (expériences in vitro).

Option à laquelle est associée ce projet

Immuno-Intervention, Transplantation et Auto-Immunité

Internship form
(ON ONE PAGE MAXIMUM)
Course M2 BBRT 2023-24

Laboratory: CR2TI

Team No: 4

Supervisor's full name: MAI Le Hoa

Email of the supervisor: le.hoa-mai@univ-nantes.fr

Prospective candidate:

Internship Title: Targeting CD9 on regulatory B cells as a player in cancer.

Summary of proposed project:

Despite significant progress over the last 20 years, the therapeutic management of cancer diseases remains an important public health issue. Most of the chemotherapies used in therapeutic protocols target the tumor cell, and the mechanism of action of the compounds used consists essentially in stopping their uncontrolled cell proliferation. This results in a significant exposure of healthy cells to these cytotoxic substances, with a significant short-term toxicity and a real medium-term implication in the development of other tumors or "recurrences". The understanding of the immune processes of the tumor microenvironment is fundamental and allows to identify the different mechanisms involved in the escape of tumor cells from the surveillance of the immune system. The objective of this project is to study the use of tetraspanin 29 (Tspan29) or CD9 as a potential target on regulatory B cells (Bregs), important actors in the anti-tumor response. Indeed, on the one hand, the CD9 protein is involved in many fundamental cellular processes such as adhesion, fusion/internalization, migration, communication and the formation of extracellular vesicles (EVs). Several teams have also described the involvement of Tspans and in particular CD9 in the regulation of the mobility and invasiveness of tumor cells. The pro- or anti-migratory activity of Tspans has been linked to their effect on the adhesive and signaling function of integrins and on metalloproteinases. On the other hand, CD9 is a molecule widely present on Bregs, which has been shown to play a fundamental role in the development and propagation of the tumor process. Blocking this target specifically on these cells should therefore allow to block the tumor process at several levels, which is what we wish to study. This project is an interdisciplinary project involving biology and medicinal chemistry. The medicinal chemistry approach used to identify drug-like structures and including screening of chemical libraries is conducted in a parallel CGO / Regions project. Several molecules specifically targeting CD9 have already been identified in this framework, which will be tested in this project in vitro in two human and mouse models of GZMB and IL10 regulatory B cell suppression. This work will allow us to identify potential pharmacophores and to study the consequences of this targeting on the anti-tumor cellular response.

Option with which this project is associated:

- Biotherapies of the locomotor system
- Cardiovascular & Risk Factors
- Immunology-Cancérology
- Immuno-Intervention, Transplantation and Self-Immunity
- Infectious diseases
- Physiopathologies of the brain-gut axis