

Master Biologie Santé
Paris Saclay
Proposition de stage 2017-2018

Fiche de proposition de stage de M2 :

- Pour faciliter le classement des propositions, vous pouvez indiquer le parcours de formation souhaité en M2 pour un étudiant qui rejoindrait votre équipe dans le cadre de ce stage :

M2 Gene Cell and Development: Génétique, Biologie Cellulaire, Biologie du Développement, Cellules Souches.

M2 Gen2Ev: Génétique, Génomes et Evolution.

(les deux parcours peuvent être cochés)

Plusieurs disciplines sont proposées pour identifier la formation initiale que vous attendez de l'étudiant. Supprimez les disciplines inutiles.

Pour faciliter la présentation de l'offre, **veillez à ce que la fiche tienne sur une feuille recto-verso** (sans modifier les marges).

Merci de nous renvoyer la fiche au format word en intitulant **IMPERATIVEMENT** le fichier sous le format suivant (pour pouvoir le classer): **Ne laisser que les parcours convenant à votre offre: GCD ou Gen2Ev ou GCD_Gen2Ev**

M2_GCD_Gen2Ev_2017_NOM du responsable de l'équipe-NOM du maître de stage.doc

Merci de renvoyer le fichier Pdf à Mme Fairhead, co-responsable de Gen2Ev, qui se charge de collecter les offres: **cecile.fairhead@u-psud.fr**

A noter pour information:

- les stages se déroulent pour la plupart de début ou mi janvier à fin juin, pour une durée d'environ 5.5-6 mois au total.
- Les étudiants de GCD et de Gen2Ev suivent l'UE Projet Scientifique qui consiste à faire une recherche bibliographique approfondie de leur future thématique de stage et d'en établir le contexte scientifique, les questions posées et les stratégies retenues à mettre en œuvre pendant la partie expérimentale du stage. Cela nécessite que vous accueilliez et encadriez l'étudiant pendant cette période qui se solde par un rapport écrit et une soutenance orale qui a lieu avant les vacances de Noël ou juste après.

Master Biologie Santé
Paris Saclay
Proposition de stage 2017-2018

Titre du stage : Introducing targeted mutations in MeLiM minipig melanoma cells

5 Mots clés

Genome engineering	Flow cytometry	Fluorescence microscopy	Melanoma models	tumorigenesis
--------------------	----------------	-------------------------	-----------------	---------------

Responsable de l'équipe d'appui :

Intitulé et adresse du laboratoire : UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, INRA AgroParisTech, équipe Génétique Immunité Santé
INRA, Centre de Recherche de Jouy-en-Josas, Domaine de Vilvert, F-78352 Jouy-en-Josas,

Maître de stage : Egidy Maskos, Giorgia Ph.D.

Email : giorgia.egidy-maskos@jouy.inra.fr

Tél : 0134652128

Description du stage :

Context : Melanoma derives from transformed melanocytes. It is the deadliest skin cancer. When metastases are present, prognosis is highly reduced as current therapies do not manage to reverse the outcome. Nonetheless, novel immune checkpoint blockers appear as promising therapeutic tools, although side effects are severe. This is quite important because it means that the immune system activation has been triggered at some stage, later blocked. Melanoma affects not only humans but also animals like horses, dogs, or minipigs. Among spontaneous mammalian models, MeLiM minipigs are interesting because their skin and melanomas are structurally similar to humans. In MeLiM, melanomas develop during the perinatal period and can metastasise (Egidy et al, 2008). What is particularly intriguing in this model is that melanomas spontaneously regress. Regression occurs from the third month of age onwards. The immune system seems to participate to this phenomenon (Rambow et al. 2008). Tumoral proliferation pathways identified in human melanomas are also found activated in MeLiM, although in the absence of the most frequent human's mutations, namely *BRAF*, *NRAS*, *NF1* (TCGA, 2015). These mutations lead to the constitutive activation of the proliferative MAPK pathway, and, for *NRAS* and *NF1*, to the additional activation of the mTOR survival pathway. As an example, the transgenic mouse with melanocytic targeted expression of the NRAs^{Q61K}, develops melanomas later in life that do not regress (used in Campagne et al, 2016, 2017). We have hypothesized that the MeLiM immune system is orchestrating the regression of melanomas, regardless of the genetic drivers. In order to test this hypothesis, we plan to introduce the targeted gene mutation *NRAS*^{Q61K} in MeLiM melanoma cells and to verify whether they regress equally to control cells. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated protein 9 (Cas9) endonuclease technology is increasingly becoming the most widely used genome engineering tool due to its ease of use and ability to cause double strand break to almost any locus of interest (Jinek et al., 2012). Yet the conditions for a maximum efficiency of the homologous recombination are still empirically determined.

Internship aims: 1) To test different sequences of single guide RNA (sgRNA) targeting the porcine *NRAS* locus by CRISPR/Cas9 technology, and 2) to determine the efficiency of homology-directed repair (HDR) introducing the Q61K mutation at this locus.

Methods: Fresh melanoma cells obtained from early excised lesions will be isolated and transfected with

Master Biologie Santé
Paris Saclay
Proposition de stage 2017-2018

different sequences of sgRNA targeting NRAS in a crRNA/tracrRNA molecule together with Cas9, a fluorescent reporter and the DNA donor oligo of homology arms to target the Q61K mutation. The assessment of the CRISPR/Cas9 on-target and off-target effects will be determined as well as the efficiency of the recombination. In vitro signs of proliferation and growth arrest will be analysed.

Applicants will work with fresh clinical samples from the MeLiM model to be used *in vitro* for CRISPR/Cas9 characterisation. They will practise tissue culture techniques, antibody powered strategies, from flow cytometry to structured illumination microscopy.

Références

- Campagne et al. RACK1 cooperates with NRAS^{Q61K} to promote melanoma in vivo. Cell Signal 2017 36:255-266
- Campagne et al. Haplosufficiency of PAX3 for melanoma development in Tyr: NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-} mice allows identification and sorting of melanoma cells using a Pax3^{GFP} reporter allele. Melanoma Res. 2016 26:12-20.
- Egidy et al. Transcription analysis in the MeLiM swine model identifies RACK1 as a potential marker of malignancy for human melanocytic proliferation. Mol Cancer. 2008 28;7:34.
- Jinek et al., A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity Science 2012 337:816-821.
- Rambow et al, Gene expression signature for spontaneous cancer regression in melanoma pigs. Neoplasia 2008 10:714-726
- TCGA : Cancer Genome Atlas Network. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. Cell. 2015 161:1681-96.

Parcours de M2 : GCD

Profil de l'étudiant recherché (formation initiale) :

- Biologie Cellulaire
- Biologie Moléculaire
- Développement
- Génétique

Ce stage peut-il se poursuivre par une thèse : OUI
Ecole Doctorale de Rattachement : SdV

Nom de la personne titulaire d'une HDR qui encadrerait la thèse : Giorgia Egidy (à passer en 2017)