

Titre de la thèse/Thesis title : Génération et qualifications de cavéoles, nano objets biologiques calibrés et à façon pour le développement de biomédicaments et de micro dispositifs / Generation and qualifications of modular and calibrated biological nano objects, caveolae for biomedecine and microdevice developments

Laboratoire d'accueil / Host : Laboratory : FEMTO-ST / Département MN2S - Equipe BIND

Spécialité du doctorat préparé/Speciality :

Mots-clefs / Keywords : nano-objets, optique, protéines membranaires

Descriptif détaillé de la thèse / Job description

La thèse portera sur la génération de cavéoles, nano-objets biologiques calibrés et produits à façon pour le développement de micro dispositifs de détection et quantifications d'objets eucaryotes et procaryotes. Les cavéoles sont des nano-objets pouvant être utilisés en recherche fondamentale comme appliquée, notamment pour la caractérisation des protéines membranaires, cibles de plus de 70% des médicaments chimiques actuels et pour la production de biomédicaments. Ces nano-objets sont obtenus par expression de la protéine cavéoline dans la bactérie *Lactococcus lactis*. Ils présentent des tailles comprises entre 30 et 50 nm, équivalentes à celles des exosomes ou petits vésicules extracellulaires (EVs) eucaryotes et BEVs (EVs bactériennes). Il est nécessaire de mieux connaître et d'optimiser la production de ces cavéoles, mais aussi de simplifier l'isolement de celles-ci, en évitant le gradient de sucrose qui permet, actuellement, d'isoler ces éléments des autres vésicules membranaires.

La première partie concernera la génération de cavéoles fluorescentes. Cela passera soit par marquage avec des fluorochromes et / ou par expression de fluorochromes de façon constitutive directement dans les cavéoles. Ces fluorochromes seront étudiés par modélisation spectroscopique de leurs propriétés de fluorescence de manière à différencier et quantifier les cavéoles des autres vésicules membranaires également présentes dans les extraits protéiques après cassage des bactéries. Cela permettra d'optimiser les productions en facilitant la récupération des cavéoles. Des techniques biophysiques de caractérisation (DLS, MA-DLS et autres techniques dont la MET) permettront de mesurer la taille mais surtout la concentration d'éléments biologiques de très petite taille. Enfin, d'autres systèmes de tri pourront également être testés tels que la micro-cytométrie.

La seconde partie concernera la co-expression de protéines solubles ou/et membranaires dans ces éléments en milieu quasi-natif, leurs productions et leurs caractérisations multi-échelles et multi-techniques biochimiques et biophysiques (mesure de l'activité, interaction avec d'autres protéines, ...). Ces nano-éléments innovants permettront de faciliter la qualification de ces protéines et en particulier les protéines membranaires en évitant la reconstitution en protéoliposomes (étapes classiques de récupération des protéines membranaires très perturbantes/déstabilisantes : solubilisation et purification).

La troisième partie sera d'évaluer ces nano-objets biologiques calibrés et modulables à façon pour le développement de micro dispositifs, ces nano-objets n'existant pas dans le commerce actuellement. Cela passera par des analyses en flux / microfluidique (microscopies à fluorescence, QCM, ...) afin d'évaluer la capacité d'utiliser ces éléments. Ces nano-éléments serviront de modèles pour mettre en place les paramètres de détection et/ou quantifications par les micro-dispositifs des EVs eucaryotes et bactériens plus difficiles à produire et à isoler. La reconnaissance sur surface sera facilitée par la connaissance d'anticorps généralistes permettant de reconnaître ces éléments. Les analyses en flux s'appuieront sur les expertises de l'équipe BIND (chercheurs et ingénieur).

Cette thèse permettra d'apporter des connaissances aussi bien fondamentales qu'appliquées en environnement-santé mais aussi en sciences de l'ingénieur. Ce sujet permettra par la suite de recruter d'autres personnes sur le projet (thèse CIFRE et/ou post doctorat).

Références bibliographiques / Bibliography

- [1] Frelet-Barrand A. Lactococcus lactis, an Attractive Cell Factory for the Expression of Functional Membrane Proteins. *Biomolecules*. 2022 Jan 22;12(2):180. doi: 10.3390/biom12020180.
- [2] Flourieuse A, Bourgeois P, Schenckbecher E, Palvair J, Legrand D, Labbé C, Bescond T, Avoscan L, Orłowski S, Rouleau A, Frelet-Barrand A. Formation of intracellular vesicles within the Gram+ *Lactococcus lactis* induced by the overexpression of Caveolin-1 β . *Microb Cell Fact*. 2022 Nov 17;21(1):239. doi: 10.1186/s12934-022-01944-9.
- [3] Welsh JA et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles*. 2024 Feb;13(2):e12404. doi: 10.1002/jev2.12404. Erratum in: *J Extracell Vesicles*. 2024 May;13(5):e12451. doi: 10.1002/jev2.12451.
- [4] Bernard Gauthier-Manuel, Chafia Benmouhoub and Bruno Wacogne, "Fluorescence spectra of prototropic forms of fluorescein and some derivatives and their potential use for calibration-free pH sensing", *Sensors* 2024, Vol. 24, N°5, Art. 1705. <https://doi.org/10.3390/s24051705>
- [5] Wacogne B, Vaccari N, Koubevi C, Azzopardi CL, Karib B, Rouleau A and Frelet-Barrand A. White light spectroscopy for sampling-free bacterial contamination detection during CAR-T cells production: towards an on-line and real-time system. *Biosensors* 2025, 15 (8) 512 (28 pp.). <https://doi.org/10.3390/bios15080512>
- [6] Chang Y-J, Yang W-T, Lei C-H. Identification and Quantification of Extracellular Vesicles: Comparison of SDS-PAGE Analysis and Biosensor Analysis with QCM and IDT Chips. *Biosensors*. 2024; 14(8):366. <https://doi.org/10.3390/bios14080366>

Profil demandé / Applicant profile

Le/la doctorant(e) devra posséder un Master 2 ou diplôme d'ingénieur en Biologie et Santé, Biochimie, Biotechnologie avec un intérêt pour les caractérisations de nano-éléments par des techniques biophysiques, optiques et en flux.

Critères de sélection:

- compétences en biochimie
- capacités de travail dans environnement multidisciplinaire
- Rigueur , adaptabilité
- Curiosité scientifique

Financement : MESRI Etablissement

Dossier à envoyer pour le **31/05/2026**

Début du contrat : 1^{er} Octobre 2025

Salaires mensuel brut : 2200€ (à partir du 1^{er} janvier 2026 : 2300€ brut)

Direction de la thèse:/ Thesis Supervisor

FRELET-BARRAND Annie / annie.frelet-barrand@femto-st.fr

Encadrement de la thèse : co-directeur(s) et co-encadrant(s)

WACOGNE Bruno (co-directeur) / bruno.wacogne@univ-fcomte.fr

Applicants are invited to submit their application to the PhD supervisors.

Application must contain the following documents:

- CV
- Cover letter
- At least 1 reference letter