

Sujet de thèse: Protéines de couche S des procaryotes : glycosylation et rôle dans les interactions minéral / vivant

Directeur de thèse:
ZIRAH

severine.zirah@mnhn.fr

Co-directeur(s) titulaire(s) HDR:

Co-directeur(s) non-titulaire(s) HDR:

KISH

Equipe:

MDCEM (Molécules de Défense et de Communication dans les Ecosystèmes Microbiens)

Publications récentes des directeurs de thèse avec leurs anciens doctorants:

1. Mevaere J, Goulard C, Schneider O, Sekurova ON, Ma H, Zirah S, Rebuffat S, Zotchev SB, Li Y. An orthogonal system for heterologous expression of actinobacterial lasso peptides in *Streptomyces* hosts, en révision, *Sci. Rep.*
 2. Bauvais C, Bonneau N, Blond A, Pérez T, Bourguet-Kondracki ML, Zirah S. *Metabolites* 7:27 (2017)
 3. Bauvais C, Zirah S, Piette L, Chaspoul F, Domart-Coulon I, Chapon V, Gallice P, Rebuffat S, Pérez T, Bourguet-Kondracki ML. *Mar. Environ. Res.* 104: 20-30 (2015)
- A. Kish : co-publication avec M1/M2 :
1. M.Bourreau M1 2016
Miot J, Bernard S, Bourreau M, Guyot F, Kish A. *Sci. Rep.* 7:16984 (2017)
 2. A Chandramohan M2 2017
Chandramohan A, Chapon V, Remusat L, Duprat E, Kish A. Novel mechanism for surface layer shedding and regenerating in bacteria exposed to metal-contaminated conditions, en révision, *Front. Microbiol.*

Descriptif du sujet de thèse et méthodes envisagées:

Largement répandues chez les procaryotes, les couches S forment une matrice paracrystalline rigide à la surface cellulaire et jouent un rôle important dans l'intégrité de la paroi cellulaire, la protection face aux pressions environnementales et les interactions biotiques et abiotiques [1]. Elles sont constituées d'un auto-assemblage régulier de protéines de masse moléculaire > 120 kDa qui arborent de nombreuses modifications post-traductionnelles, et en particulier la glycosylation [2]. La glycosylation des protéines de couche S montre une diversité remarquable et contribue largement à la fonction des couches S en modifiant la solubilité, la stabilité et les propriétés physico-chimiques des protéines de couche S. Les protéines de couche S d'archées portent le plus souvent des N-glycosylations. Chez l'archée halophile *Haloferax volcanii*, la concentration saline a révélé une incidence sur la nature et la localisation des N-glycosylations, suggérant un rôle de la glycosylation dans l'adaptation aux conditions environnementales [3]. Lorsque la salinité atteint sa saturation, les cristaux de sels (halite) piègent des cellules viables sur des temps géologiques longs, sous forme sphérique qui suggère une élimination de la couche S [4]. Les protéines de couche S de bactéries portent le plus souvent des O-glycosylations. Contrairement aux archées, le lien entre glycosylation et adaptation aux conditions environnementales n'a été que peu exploré chez ces organismes. Le sujet de thèse proposé vise à examiner, à l'échelle moléculaire et cellulaire, le rôle des couches S dans les interactions minéral/vivant chez des bactéries et archées extrémophiles.

De nombreuses bactéries du genre *Lysinibacillus* montrent une tolérance à des concentrations élevées en métaux. Une collection de souches de niveaux de tolérance contrastés a été constituée en collaboration avec le CEA de Cadarache. Une de ces souches produit une couche S fortement glycosylée et a révélé en présence de fer une biominéralisation à la surface de la bactérie, suivie d'une « mue » où la couche S minéralisée est rejetée (article en révision).

L'objectif du projet de thèse est de caractériser la glycosylation de trois souches de *Lysinibacillus* issues de prélèvements de sols contaminés dans la zone d'exclusion de Tchernobyl et montrant des taux de glycosylation contrastés, et d'examiner le lien entre glycosylation et interactions bactéries / métaux. Ce projet s'articule autour de deux axes principaux dont les questions sont les suivantes :

- (1) Séquençage et analyse des génomes des trois souches de *Lysinibacillus* issues de Tchernobyl montrant des profils de glycosylation contrastés. Technologie PacBio. Assemblage et annotation par équipe collaboratrice au CEA de Cadarache.
> Diversité des protéines de couche S et systèmes de glycosylation chez *Lysinibacillus*.
- (2) Analyse glycoprotéomique et glycomique des couches S
 - a. Nature des glycosylations de la couche S au sein du genre *Lysinibacillus*
 - b. Influence des conditions environnementales sur la glycosylation (en particulier, variations de la concentration en métaux : Fe, Cu, Zn)
 - c. Evolution de la glycosylation au cours du processus de biominéralisation / « mue » observé en présence de fer.
 Si la durée impartie par la thèse le permet, nous examinerons dans un second temps le lien entre glycosylation et interactions minéral/vivant chez deux archées halophiles : *Halobacterium salinarum* (halophile extrême, croit en présence de concentrations en NaCl de 2,5 à 5 M) et *Haloferax volcanii* (halophile modérée, croit en présence de concentrations en NaCl de 0,7 à 5 M). Les génomes, couches S et leurs glycosylation sont bien caractérisés pour ces organismes. Notre objectif sera d'examiner le lien entre glycosylation et concentration saline, et la potentielle « mue » de couche S en conditions saturantes en NaCl.

Ce projet fait appel à des méthodes de microbiologie et observations pas microscopique électronique ainsi que des méthodes de biochimie et de chimie analytique : glycoprotéomique par couplage chromatographie liquide / spectrométrie de masse ; glycomique par spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire (RMN). Il fait appel à trois plateaux techniques de la Plateforme Analytique du Muséum : Microscopie électronique, Spectrométrie de masse bio-organique et RMN.

Références :

- [1] Sleytr UB, et al. *FEMS Microbiol. Rev.*, 38:823 (2014)
- [2] Schaffer C, et al. *FEMS Microbiol. Rev.*, 41:49 (2017)
- [3] Kaminski L, et al. *Biochem Soc Trans*, 41:432 (2013)
- [4] Fendrihan S et al. *Geobiology* 10: 424 (2012)

Stratégie de publication:

Au moins deux articles sont envisagés dans le cadre de la thèse : l'un sur l'analyse des génomes et la caractérisation des glycosylations en conditions standard chez les trois souches de *Lysinibacillus*, l'autre sur l'effet des conditions environnementale sur la glycosylation et/ou le suivi des glycosylations au cours de processus de biominéralisation / « mue ».

Réorientation possible du sujet si échecs:

Les conditions de culture, de biominéralisation / « mue », d'extraction des couche S et d'observation ont été optimisées pour une des bactéries du genre *Lysinibacillus*. L'accent sera mis sur une ou plusieurs des trois souches sélectionnées selon les difficultés rencontrées.

L'étude des archées halophiles est envisagée comme un objectif secondaire de la thèse ou bien comme une stratégie de ré-orientation en cas de difficulté pour la caractérisation moléculaire des couches S de *Lysinibacillus*.

L'analyse glycoprotéomique des couches S sera conduite par deux approches: top-down et bottom-up. Des essais préliminaires ont montré la faisabilité de l'analyse top-down des couches S de *Lysinibacillus* sp. L'une ou l'autre des approches sera privilégiée en fonction des difficultés.

Faisabilité sur 3 ans (échancier):

Année 1 :

' Extraction ADN > Envoi pour séquençage

' Analyse glycoprotéomique des protéines de couche S des 3 souches de *Lysinibacillus*. Les séquences des protéines ont été déterminées par PCR inverse > peut débiter même en l'absence des génomes.

' Analyse des glycanes (spectrométrie de masse et RMN)

Année 2 :

' Analyse des génomes : recherche de gènes putatifs de S-layer et de systèmes de glycosylation.

' Analyse de la glycosylation en fonction de la concentration en métaux / au cours de la « mue »

' Rédaction article 1

Année 3 :

' Finalisation des expériences

' Rédaction article 2

' Rédaction de la thèse

Profil du candidat recherché:

Master Chimie analytique, Biochimie ou Microbiologie avec expérience en spectrométrie de masse.