



## **Sujet de thèse:**

# **Enveloppe cellulaire des procaryotes et rôle dans les interactions minéral / vivant**

### **Contexte de la recherche :**

Les enveloppes cellulaires des procaryotes se situent à l'interface avec leur environnement externe. Elles sont constituées de la membrane lipidique et de la paroi cellulaire, y compris les couches de surfaces (couches S). Largement répandues chez les procaryotes (bactéries et archées), les couches S forment une structure ordonnée rigide à la surface des cellules, et jouent un rôle important dans l'intégrité de l'enveloppe cellulaire, la protection face aux pressions environnementales, et les interactions biotiques et abiotiques. Les protéines de couches S arborent de nombreuses modifications post-traductionnelles, en particulier la glycosylation, qui altèrent leurs propriétés physico-chimiques. La nature des constituants lipidiques et protéiques (couche S) des enveloppes cellulaires varie en fonction des conditions environnementales, mais les rôles fonctionnels de ces modifications ne sont que peu explorés.

Le sujet de thèse 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. Le projet se focalisera sur deux types de microorganismes: (1) des archées halophiles présentes dans les inclusions fluidiques de cristaux d'halite, et (2) les bactéries de genre *Lysinibacillus*, souches métallotolérantes. Dans les deux cas, une « mue » ou élimination de la couche S se produit en réponse aux stress environnementaux. Les objectifs du projet de thèse sont (1) d'examiner le lien entre glycosylation des protéines de couche S et les interactions microorganismes / minéraux, et (2) d'étudier les variations structurales des lipides membranaires après une « mue » de la couche S. Ce projet résolument interdisciplinaire fera appel à des méthodes de microbiologie, biochimie et chimie analytique afin d'évaluer les adaptations moléculaires des enveloppes cellulaires des procaryotes en réponse aux changements environnementaux.

### **Programme de recherche:**

Pour mieux comprendre les mécanismes adaptatifs microbiens, deux organismes modèles bien connus seront étudiés : une bactérie du genre *Lysinibacillus* et une archée du genre *Haloferax*. Ce projet fera appel à des méthodes de microbiologie 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) ; analyse des lipides membranaires (acides gras et tétraéthers de glycérol) par chromatographie gazeuse ou liquide couplée à la spectrométrie de masse. Le projet de thèse se déroulera selon trois axes principaux :

#### ***I Analyse glycoprotéomique des protéines de couche S de Lysinibacillus***

La nature de la glycosylation sera déterminée pour les couches S des trois souches de *Lysinibacillus* sp., cultivées en milieu riche (LB). L'analyse protéomique des couches S sera conduite par deux approches complémentaires : top-down (analyse des protéines intactes) et bottom-up (analyse des peptides issus d'une digestion enzymatique), sur un instrument de type ESI-Q-TOF avec module ETD (Maxis II ETD, Bruker Daltonics) utilisable en couplage chromatographie liquide nano (nanoLC) ou ultra haute performance (UHPLC). Des essais préliminaires ont montré la faisabilité de l'analyse top-down des couches S de *Lysinibacillus* sp. Les modes de dissociation CID (collision induced dissociation) et ETD (electron transfer dissociation) seront utilisés, du fait de leur complémentarité pour l'analyse de modifications post-traductionnelles. Les O-glycannes obtenus par beta-élimination seront également caractérisés par LC-MS/MS et RMN.

## **II Analyse des modifications de l'enveloppe cellulaire au cours de la « mue » chez *Lysinibacillus***

L'évolution de la glycosylation des couches S au cours du processus de biominéralisation / « mue » sera examinée par glycoprotéomique menée sur les cellules biominéralisées ou non, au cours du temps. Les conditions de biominéralisation / « mue » seront reproduites afin de faire le lien entre phénotype observé en fonction du temps et profil de glycosylations. Les modifications structurales des lipides membranaires (acides gras) au cours de la « mue » seront suivies par GC-MS, après extraction à l'aide de solvants organiques. Afin d'examiner séparément les cellules biominéralisées (et les couches S biominéralisées fantômes) des cellules non biominéralisées, une séparation sera réalisée par centrifugation en gradient de densité. Les deux fractions seront déminéralisées et ensuite extraites et soumises à une analyse glycoprotéomique bottom-up selon les conditions définies dans l'axe I.

## **III Analyse des modifications de l'enveloppe cellulaire d'*Haloferax* en fonction de la salinité**

Les variations du nombre et de la nature des N-glycosylations des protéines de couche S en fonction de la salinité sont connues, mais leur influence sur la dissolution de la couche S observée pour les haloarchées présente dans les inclusions des cristaux d'halite reste inconnue. Des cultures d'*Haloferax volcanii* seront partiellement évaporées afin d'induire la cristallisation. La perte de la couche S des haloarchées sera évaluée en examinant la morphologie des cellules (sphères pour les cellules sans couche S) par microscopie de fluorescence. Les cellules seront récupérées par dissolution douce des cristaux d'halite dans l'eau de mer. Les couches S seront ensuite extraites et les glycoprotéines seront analysées selon les conditions définies dans l'axe I. Après extraction aux solvants, les lipides membranaires d'*H. volcanii* (éthers de glycérol) seront analysés par LC/MS.

### **Description des laboratoires d'accueil :**

Afin de mener à bien ce travail, une collaboration originale sera initiée entre l'équipe de géochimie organique de l'UMR METIS (Département Biogéochimie, Sorbonne Université) et l'équipe Molécules de défense et de communication dans les écosystèmes microbiens (MDCEM) de l'UMR MCAM (Département Adaptations du vivant, Muséum National d'Histoire Naturelle). La thèse s'intègre parfaitement dans les activités des deux équipes, aux approches distinctes et complémentaires. L'UMR METIS possède au sein de son département Biogéochimie une expertise reconnue dans l'analyse des lipides microbiens. L'UMR MCAM a l'ensemble des compétences nécessaires pour l'analyse des peptides et protéines microbiens, et maîtrise les techniques de culture des procaryotes extrêmophiles. La présente thèse propose une approche innovante, combinant techniques de microbiologie environnementale, géochimie organique, biochimie des interactions minéral/vivant et chimie analytique (glycoprotéomique). Ce projet apportera des informations fondamentales sur les mécanismes d'adaptation des procaryotes aux changements environnementaux, permettant de mieux comprendre les interactions procaryotes/minéral. Les résultats obtenus pourront servir de base à de futures études sur la bioremédiation des métaux par les microorganismes.

### **Profil du candidat recherché:**

Nous recherchons un(e) candidat(e) motivé par des projets interdisciplinaires, prêt(e) à apprendre des nouvelles techniques. Master Chimie analytique, Biochimie ou Microbiologie avec expérience en spectrométrie de masse. Des compétences en microbiologie et biochimie des protéines seraient un atout.

**Candidature:** CV, lettre de motivation **avant le 30 avril 2018** aux encadrants.

### **Encadrants:**

|  |   |
|--|---|
| Muséum national d'Histoire naturelle<br>Dr Adrienne KISH et Dr Séverine ZIRAH<br>Email : <a href="mailto:adrienne.kish@mnhn.fr">adrienne.kish@mnhn.fr</a> , <a href="mailto:severine.zirah@mnhn.fr">severine.zirah@mnhn.fr</a> | Sorbonne Université<br>Dr Arnaud HUGUET<br>Email : <a href="mailto:arnaud.huguet@sorbonne-universite.fr">arnaud.huguet@sorbonne-universite.fr</a> |
|--|---|