



Projet de thèse : **Rôle biologique et structure/fonction des enzymes du Métabolisme HALogéné dans les INteractions algues-bactéries.**

Laboratoire de Biologie Intégrative des Modèles Marins, UMR 8227, CNRS-UPMC, Station Biologique de Roscoff

Equipe « Biologie des algues et interactions avec l'environnement »

Directeur de thèse :

Catherine LEBLANC (CR CNRS, HdR)
catherine.leblanc@sb-roscoff.fr

Co-encadrant :

Ludovic DELAGE (IR CNRS)
ludovic.delage@sb-roscoff.fr

École Doctorale 227 UPMC-MNHN - «Sciences de la nature et de l'homme : évolution et écologie »

Descriptif du sujet :

Dans leur environnement marin, les grandes algues marines utilisent les halogénures, tels que le bromure et l'iode naturellement présents dans l'eau de mer, pour la production d'une large variété de composés halogénés, qui contribuent aux processus de défense et de signalisation. L'halogénéation permet d'augmenter les activités biologiques des molécules. Chez les algues brunes, les laminaires présentent un métabolisme de l'iode unique dans le monde vivant, qui leur permet de se défendre très efficacement contre les agressions biotiques et de contrôler le biofilm bactérien à leur surface [1]. Certains organismes épiphytes peuvent tolérer ces conditions de vie très particulières, comme la flavobactérie marine *Zobellia galactanivorans*, capable de dégrader la paroi des macroalgues brunes. Nous avons ainsi découvert qu'elle possédait des haloperoxydases à vanadium (vHPO) spécifiques de l'oxydation de l'iode, tout comme l'algue brune *Laminaria digitata* à laquelle cette bactérie est inféodée [2]. La présence de vHPO et de plusieurs gènes de déhalogénases semble indiquer un métabolisme halogéné actif chez cette bactérie [3,4]. Cependant l'origine, le rôle et les fonctions des enzymes de l'halogénéation sont quasiment inexplorés dans le compartiment bactérien marin, qui pourrait jouer un rôle important dans les transferts des composés halogénés à la surface des algues. Dans ce contexte, les objectifs de ce projet de thèse visent à (i) poursuivre la **caractérisation biochimique et structurale d'enzymes du métabolisme halogéné** pour décrypter les bases moléculaires de l'halogénéation et de la déhalogénéation chez les bactéries marines, (ii) **étudier les fonctions biologiques des vHPO *in vivo*** en développant des mutants fonctionnels et en caractérisant leurs phénotypes, (iii) **analyser les régulations du métabolisme halogéné lors des interactions algue-bactérie** au travers d'expériences de physiologie couplées à l'analyse des régulations transcriptomique et protéique.

Une première phase de ce projet visera à exprimer dans des systèmes hétérologues plusieurs gènes candidats de *Z. galactanivorans* (vHPO-like, déhalogénases) à partir des ADNc complets, et étudier les fonctions biochimiques des protéines recombinantes obtenues *in vitro*. Des études structure/fonction seront poursuivies sur les enzymes caractérisées, par des approches de mutagenèse dirigée couplée à l'analyse de la structure tridimensionnelle des protéines, pour déterminer les bases moléculaires des spécificités de chaque enzyme. Ces analyses seront d'abord conduites sur les vHPO recombinantes déjà disponibles au laboratoire. Après optimisation des conditions de cristallogenèse, l'analyse des cristaux par diffraction aux rayons X sera menée sur un synchrotron (Soleil ou ESRF) et la structure 3D sera résolue par remplacement moléculaire en utilisant comme modèle des structures proches, comme celle de la première vHPO de *Zobellia* [2].

Pour étudier les fonctions des vHPO *in vivo*, des mutants incapables d'exprimer le ou les gènes d'intérêt seront isolés, et leurs phénotypes caractérisés dans différentes conditions physiologiques et par profilage métabolique. Une banque de mutants d'*Ectocarpus siliculosus* (Tilling), l'algue brune modèle du laboratoire, pourra ainsi être criblée pour rechercher des phénotypes intéressants, potentiellement

affectés dans la voie de biosynthèse des composés halogénés. Chez *Z. galactanivorans*, un outil génétique, récemment développé au laboratoire, sera adapté pour éteindre de façon ciblée l'expression des vHPO. Une approche globale sera ensuite développée pour étudier la régulation de l'ensemble des gènes liés au métabolisme halogéné chez *Z. galactanivorans* et les mutants générés, en lien avec l'activation de certaines activités enzymatiques et la production de composés halogénés. Des cultures bactériennes axéniques soumises à différentes conditions contrôlées, en présence ou non d'algues, seront échantillonnées pour analyser les variations de transcrits par RNAseq, de protéines par western blot et de métabolites halogénés par GC-MS sur la plateforme Metabomer de Roscoff.

Ces travaux conduiront à établir les fonctions biochimiques de certaines enzymes clés du métabolisme halogéné, et à explorer leur rôle biologique au sein des bactéries et en réponse aux facteurs externes. Ils devraient également permettre de mieux comprendre l'importance du métabolisme halogéné dans les interactions entre les algues et leurs bactéries associées dans le milieu marin.

Références.

1. La Barre S., Potin P., Leblanc C., and Delage L. (2010). The Halogenated Metabolism of Brown Algae (Phaeophyta), Its Biological Importance and Its Environmental Significance. **Mar. Drugs**, 8(4), 988-1010.
2. Fournier J.-B., Rebuffet E., Delage L., Grijol R., Meslet-Cladière L., Rzonca J., Potin P., Michel G., Czjzek M., Leblanc C. (2014). The Bacterial Vanadium Iodoperoxidase from the Marine Flavobacteriaceae *Zobellia galactanivorans* Reveals Novel Molecular and Evolutionary Features of Halide Specificity in the Vanadium Haloperoxidase Enzyme Family. **Appl. Environ. Microbiol.**, 80(24): 7561-7573.
3. Leblanc C., Vilter H., Fournier J.-B., Delage L., Potin P., Rebuffet E., Michel G., Solari P. L., Feiters M. C., Czjzek M. (2015). Vanadium haloperoxidases: from the discovery 30 years ago to X-Ray crystallographic and V K-edge absorption spectroscopic studies. **Coord. Chem. Rev.**, 301–302, 134–146.
4. Barbeyron T, Thomas F, Barbe V, Teeling H, Schenowitz C, Dossat C, Goesmann A, Leblanc C, Glöckner FO, Czjzek M, Amann R and Michel G. (2016) Habitat and taxon as driving forces of carbohydrate catabolism in marine heterotrophic bacteria: example of the model algae-associated bacterium *Zobellia galactanivorans*. **Environ. Microbiol.**, 18(12), 4610–4627.

Profil du candidat recherché :

Master 2 biochimie et/ou biologie structurale des protéines

Bases solides en biologie moléculaire, expression hétérologue bactérienne et biochimie/enzymologie. Des connaissances dans l'un ou plusieurs domaines suivants seront appréciées : génétique bactérienne, phylogénie, transcriptomique, métabolomique, cristallographie.

Financement :

Demi-financement de thèse acquis de la Région Bretagne (ARED Objet d'Excellence – 2017) – Obtention du complément via le concours de l'ED227.

Plus d'information sur le sujet :

<https://apps.mnhn.fr/DepotSujetThese/sujetcandidature.xhtml?tk=51>

Candidature en ligne jusqu'au 21 mai 2017 sur le site :

<http://enseignementsuperieur.mnhn.fr/fr/enseignement-superieur/doctorat/concours-ed227>

Contacts et informations :

catherine.leblanc@sb-roscoff.fr, ludovic.delage@sb-roscoff.fr