

## Proposition de stage

### Parcours Master 2 « Microbiologie, Environnement, Santé »

#### 1. Laboratoire / Entreprise d'accueil :

Intitulé : **UMR 7245 MNHN/CNRS « Molécules de communication et adaptations des micro-organismes » - équipe « Cyanobactéries, cyanotoxines et environnement »**

Adresse : **12 rue Buffon 75005 Paris**

Responsable du Laboratoire / Entreprise : **Sylvie Rebuffat/Philippe Grellier (PRs MNHN)**

Responsable de l'encadrement : **Benjamin Marie (CR CNRS)**

Téléphone : **01 40 79 32 12**

E-mail : [bmarie@mnhn.fr](mailto:bmarie@mnhn.fr)

Co-encadrant éventuel : **Séverine Le Manach (doctorante)**

#### Perspectives de poursuite de thèse :

oui  
 non

avec une bourse spécifique

oui  
 non

#### 2. Titre, description du sujet, approches utilisées, références (2 pages maximum) :

##### **Diversité chimique des métabolites secondaires produits par les principaux genres de cyanobactéries d'eau douce**

Les cyanobactéries sont des micro-organismes photosynthétiques connus pour être capables de synthétiser par voie ribosomale ou non-ribosomale une grande diversité de métabolites secondaires, dont une partie est d'ores et déjà connue pour induire des effets toxiques pour les organismes qui y sont exposés. Parmi la liste des toxines naturelles connues pour être produites par des cyanobactéries, citons les microcystines, hépatotoxines notoires produites par synthèse non-ribosomale par une grande diversité de genre de cyanobactéries, et pour lesquelles des concentrations limites dans les eaux de boissons ont été préconisées par l'OMS, ou les saxitoxines, puissantes neurotoxines inhibant de manière irréversible l'activité des canaux sodium-dépendant des cellules nerveuses, provoquant des paralysies pouvant entraîner la mort.

On dénombre à ce jour près de 600 métabolites secondaires de cyanobactéries, dont une partie a d'ores et déjà pu être caractérisée comme molécules toxiques, et ayant pu être décrite par caractérisation fine de leur structure chimique suite à leur purification ou par simple détection de leurs formes ioniques par spectrométrie de masse. Cependant nos connaissances quant à la diversité chimique globale de l'ensemble des métabolites secondaires produits par les différents taxons de cyanobactéries restent encore largement incomplètes. Des études récentes ont pu mettre en évidence que d'autres molécules que les cyanotoxines classiquement décrites et restant à décrire pouvaient elles aussi avoir des effets délétères sur les

organismes aquatiques qui y sont exposés (Jonas et al. 2015). En parallèle, des travaux de génomique réalisés sur un large panel de taxons de cyanobactéries ont souligné la présence de nombreux opérons codant pour diverses machineries enzymatiques de type NRPS/PKS potentiellement impliquées dans la synthèse de nombreux métabolites dont presque une moitié reste encore non-identifiés (60-80% des opérons étant ainsi orphelins de produit) (Shih et al. 2013 ; Calteau et al. 2014). Il paraît crucial de mieux appréhender la diversité chimique des métabolites produits par l'ensemble des genres de cyanobactéries qui sont susceptibles de proliférer dans les plans d'eau continentaux, afin de mieux évaluer leurs potentiels effets délétères et écologique pour mieux appréhender les risques écologiques et sanitaires associés.

*Quelle est la diversité chimique de métabolites produits par les différents genres de cyanobactéries ? Quelles nouvelles molécules restent encore à décrire ?*

Afin d'apporter des éléments de réponse à ces questions fondamentales, notre étude vise à développer une approche analytique globale de métabolomique, en tirant au mieux partie des avancées récentes en analyse des mélanges complexes par spectrométrie de masse à haute résolution, et en mettant en oeuvre un plan analytique intégré du traitement des données.

### **Méthodologies**

- **les cultures des 50 souches sélectionnées dans la collection vivante de cyanobactéries du MNHN** ont d'ores et déjà été produites et des aliquots ont été congelés en vue de leur analyse lors de ce stage.

- **Génotypage des 50 souches.** Extraction de l'ADN et amplification par PCR d'un fragment codant pour l'ARN 16s, vérification de l'unicité des amplicons et envoi au séquençage, puis alignement des séquences et reconstructions phylogénétiques. Recherche en parallèle de la présence de certains gènes de synthèse de certaines cyanotoxines tel *mcyB*, *anaE*, *cyrJ*, ...

- **Extraction des métabolites.** Optimisation du protocole d'extraction robuste et compatible d'une part avec l'ensemble des souches sélectionnées, mais également aux différentes classes de métabolites, tests effectués sur différents genres de références (*Microcystis*, *Anabaena*, *Phormidium*, *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon* *Spirulina*,...) et représentatives de la diversité connues des cyanotoxines car produisant spécifiquement certaines d'entre elles (microcystines, saxitoxines, anatoxines, cylindrospermopsines, ...). Pour ces mises au point, les échantillons seront analysés dans un premier temps grâce au spectromètre de masse MALDI-TOF du MNHN.

- **Analyses par spectrométrie de masse.** Les échantillons filtrés, lyophilisés et pesés feront l'objet d'une analyse par LC-qTOF et/ou -Orbitrap en mode MS/MS afin de permettre une détection rapide et à haute résolution des masses des formes ionisées pour l'ensemble des métabolites détectables. Une première étape d'optimisation, nous permettra de définir les paramètres compatibles à la fois avec la détection d'un très grand nombre de métabolites (colonne C18, HILIC ou F5) et également avec une durée raisonnable d'analyse de l'ensemble des souches permettant leur traitement dans une même série d'analyses, limitant la variabilité analytique. Pour ce faire, 6 souches produisant des cyanotoxines de références seront utilisées afin d'assurer le recouvrement d'une grande diversité chimique (molécules hydrophiles ou hydrophobes, petites ou grandes, alcaloïdes, peptides, ...).

### **Traitement de données :**

- **analyses de la diversité chimique en métabolites et comparaison à la diversité génétique.** Dans un premier temps nous mettrons en oeuvre une analyse métabolomique non ciblée. Cette étape sera mise en oeuvre à l'aide du package XCMS d'analyse métabolomique de profils LC-MS. Les diversités chimiques observées pour chaque souche seront comparées souche par souche afin de générer des matrices de distance et de comparer les profils de diversités en métabolites (phénotypes chimiques) à ceux obtenus par PCR à partir de l'analyse de marqueurs génétiques.

- **Recherche des métabolites connus.** A partir de ce même jeu de données MS et MS/MS, les cyanotoxines connues seront recherchées et identifiées par comparaison des temps de rétention, masses moléculaires, massifs isotopiques et spectres MS/MS avec les molécules standards disponibles. Une identification des composés sera menée par interrogation de bases de données généralistes des composés chimiques à l'aide des outils libre accès METLIN et METFRAG.

- **Recherche ciblées de cyanotoxines connues.** En parallèle, nous avons d'ores et déjà au laboratoire pu développer à partir des informations disponibles dans la littérature une base de données spécifique

contenant les ≈600 cyanotoxines et/ou variants décrits à ce jour, qui sera utilisée pour compléter les premières tentatives d'identifications non-ciblées. Les données de masses moléculaires, de temps de rétention, et formules brutes seront comparées à celles des composés présents dans les échantillons à l'aide du logiciel libre accès mzMINE.

- **Recherches de familles de fragmentation.** Les profils de fragmentations de l'ensemble des métabolites analysés seront compilés dans un seul jeu de données afin de mettre en œuvre une méta-analyse de l'ensemble des métabolites des cyanobactéries étudiées ici et de rechercher, via l'utilisation de l'outil online GNPS décrivant des regroupements de métabolites connus et inconnus selon leurs similitudes de profils de fragmentation MS/MS. Cette approche tout à fait originale, devrait nous permettre d'identifier à la fois des composés inconnus, mais qui sembleraient présenter des similitudes structurales avec d'autres molécules connues (à l'instar des 80 différents variants de microcystines qui partagent le fragment Adda de 135  $m/z$ ), ou mêmes des familles d'analogues structuraux, comprenant des molécules totalement inconnues et qui restent encore à caractériser pour la communauté scientifique.

### **Aspects novateurs**

Ce projet propose de tirer parti des avancées technologiques et analytiques en métabolomiques, avec l'utilisation de techniques innovantes de haut débit et de haute précision en matière de spectrométrie de masse (notamment UHPLC-LTQ Orbitrap), afin de permettre une analyse semi-quantitative et qualitative des métabolites d'une grande quantité d'échantillons, afin de pouvoir mettre en œuvre d'une approche globale robuste. Cette approche sans *a priori* présente le principal avantage de permettre d'analyser en une seule étape une grande partie de la complexité moléculaire de ces métabolites, de ne pas être « génome dépendante », et de pouvoir ainsi apporter la même qualité et quantité d'information pour toutes les espèces et souches étudiées.