

Proposition de stage

Parcours Master 2 « Microbiologie, Environnement, Santé »

1. Laboratoire / Entreprise d'accueil :

Intitulé : Institut de Mineralogie, Physique des Matériaux et Cosmochimie (IMPMC), CNRS, MNHN et UPMC. Equipe Géobiologie,

http://www.imPMC.upmc.fr/fr/equipes/geobiologie_geobio/membres.html

Adresse : 4 Place Jussieu 75005 Paris

Responsable du Laboratoire / Entreprise : Guillaume Fiquet

Responsable de l'encadrement : Karim benzerara

Téléphone :

Fax :

E-mail : karim.benzerara@upmc.fr

Co-encadrant éventuel : Corinne Cassier-Chauvat (CEA Saclay)

Perspectives de poursuite de thèse :

oui

non

avec une bourse spécifique

oui

non

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

Mécanismes moléculaires impliqués dans la biominéralisation intracellulaire de carbonates de calcium par des cyanobactéries

Les cyanobactéries sont des bactéries omniprésentes à la surface de la Terre depuis des milliards d'années. En réalisant la photosynthèse, elles influencent de façon majeure le cycle biogéochimique du carbone d'une part en transformant le CO₂ en carbone organique et d'autre part en l'immobilisant sous la forme de minéraux de carbonates de calcium (Jansson and Northen, 2010). La précipitation de carbonates de calcium conduit à la formation de sédiments et de roches carbonatées dont certaines nommées stromatolites sont parmi les plus anciennes traces de vie connues. Pourtant, les mécanismes de cette précipitation de carbonates de calcium par les cyanobactéries restent mal connus.

Ainsi, la calcification chez les cyanobactéries a longtemps été considérée comme un processus purement extracellulaire (Riding, 2006). Pourtant, nous avons récemment découvert que plusieurs espèces de cyanobactéries que nous cultivons au laboratoire (9 souches à ce jour) produisent des carbonates de calcium intracellulairement (Couradeau et al. 2012 ; Benzerara et al., 2014), remettant en question le paradigme de la biominéralisation forcément extracellulaire chez les cyanobactéries. Les mécanismes moléculaires à l'origine de cette biominéralisation intracellulaires restent totalement inconnus à ce jour. Certaines des espèces biominéralisant intracellulairement sont

ancrées profondément dans l'arbre phylogénétique des cyanobactéries suggérant que c'est peut être un processus ancien. Ces cyanobactéries ont été retrouvées dans des environnements variés à travers le monde (Ragon et al., 2014). Nous avons montré que chez certaines espèces, la formation de carbonate de calcium intracellulaire se faisait en lien avec la division cellulaire et que dans tous les cas, cette biominéralisation conduisait au piégeage d'une très grande quantité de Ca (Li et al., 2016). Nous avons également mis en évidence que les diverses espèces formant des carbonates de calcium intracellulaires ont des besoins relativement élevés en calcium pour pousser par rapport aux espèces ne formant pas de carbonates intracellulaires même s'il reste à comprendre à quoi exactement ce calcium leur sert.

Enfin, récemment nous avons identifié par une approche de génomique comparative quelques gènes que seules les espèces cyanobactériennes formant des carbonates intracellulaires possèdent. Ces gènes sont orphelins, c'est-à-dire distants au niveau de leur séquence des gènes dont la fonction est connue et restent donc entièrement à caractériser.

Dans ce stage, nous proposons d'étudier ces cyanobactéries formant des carbonates de calcium intracellulaires afin de caractériser et comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus de biominéralisation. L'identification de ces processus est indispensable si l'on veut comprendre l'éventuel avantage sélectif apporté à ces souches par la biominéralisation intracellulaire, son histoire évolutive au cours des milliards d'années d'évolution des cyanobactéries ou encore identifier un possible lien avec la biominéralisation de carbonates de calcium chez les eucaryotes.

Deux types d'approche seront menés au cours du stage.

Une partie du stage consistera à suivre l'incorporation du calcium ou d'autres éléments alcalino-terreux (Sr, Ba) par ces cyanobactéries dans différentes conditions environnementales et physiologiques (notamment carence en Ca, quantité de lumière, alternance jour-nuit, teneur en carbone, ou présence de poisons des transporteurs du Ca etc...) afin de mieux comprendre les modalités d'incorporation du calcium par ces cyanobactéries et quantifier leurs besoins précisément. La croissance cellulaire, l'activité physiologique des cellules et les modifications chimiques de la solution environnante seront suivies. Des sondes fluorescentes pourront être utilisées en parallèle pour mesurer les concentrations intracellulaires en Ca des cellules. Ces différentes analyses seront complétées par des observations en microscopie (optique et électronique) permettant de relier l'observation des particules intracellulaires de carbonate de calcium aux mesures chimiques faites sur le milieu extracellulaire.

D'autre part, la séquence (synthétique optimisée pour les biais de codon...) de quelques gènes (au moins deux) trouvés uniquement chez les cyanobactéries formant des carbonates de calcium intracellulaires sera clonée, introduite puis exprimée (sous divers promoteurs régulés ou constitutifs) dans deux souches de cyanobactéries modèles qui ne font pas de carbonates de calcium intracellulaires et pour lesquelles les outils génétiques performant ont été développés depuis de nombreuses années et. Ce travail se fera dans le groupe de Corinne Cassier-Chauvat, spécialiste de la génétique et du métabolisme des cyanobactéries, au CEA Saclay. Le phénotype des mutants sera caractérisé, notamment vis-à-vis de l'incorporation du calcium afin de déterminer le rôle de ces gènes dans la biominéralisation intracellulaire et les effets sur la croissance dans diverses conditions. Parallèlement et dans le but de purifier les protéines d'intérêt et de les caractériser fonctionnellement, ces mêmes gènes seront clonés dans des vecteurs bactériens permettant la surexpression chez *E.coli* puis la purification des protéines. Ces techniques biochimiques aideront, elles aussi à mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en œuvre.

Au final, le stage passera par un apprentissage des techniques de culture de ces bactéries, le suivi de leur croissance et de la chimie des solutions ainsi que l'apprentissage de techniques de Biologie moléculaire, de Biochimie et de microscopie. Les encadrants ont déjà collaboré et publié ensemble fournissant un cadre bien établi au sein duquel l'étudiant effectuera son stage. De plus, l'étudiant(e) sera épaulé(e) par un groupe comprenant des microbiologistes, des chimistes, des bioinformaticiens qui lui permettra de se familiariser au travail sur un sujet interdisciplinaire.

Encadrants :

Karim Benzerara, DR2 CNRS, IMPMC, <http://www.researcherid.com/rid/J-1532-2016>

Bibliographie

- Benzerara, K., Skouri-Panet, F., Li, J., Férard, C., Gugger, M., Laurent, T., et al. (2014) Intracellular Ca-carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 10933–10938.
- Couradeau, E., Benzerara, K., Gerard, E., Moreira, D., Bernard, S., Brown, G.E., and Lopez-Garcia, P. (2012) An early-branching microbialite cyanobacterium forms intracellular carbonates. *Science* **336**: 459–462.
- Jansson, C. and Northen, T. (2010) Calcifying cyanobacteria—the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**: 365–371.
- Li, J., Margaret Oliver, I., Cam, N., Boudier, T., Blondeau, M., Leroy, E., et al. (2016) Biomineralization Patterns of Intracellular Carbonatogenesis in Cyanobacteria: Molecular Hypotheses. *Minerals* **6**: 10.
- Ragon, M., Benzerara, K., Moreira, D., Tavera, R., and López-García, P. (2014) 16S rDNA-based analysis reveals cosmopolitan occurrence but limited diversity of two cyanobacterial lineages with contrasted patterns of intracellular carbonate mineralization. *Front. Microbiol.* **5**: 331.
- Riding, R. (2006) Cyanobacterial calcification, carbon dioxide concentrating mechanisms, and Proterozoic/Cambrian changes in atmospheric composition. *Geobiology* **4**: 299–316.