

Proposition de stage

Parcours Master 2 « Microbiologie, Environnement, Santé »

1. Laboratoire / Entreprise d'accueil :

Intitulé : Institut de Minéralogie, Physique des Matériaux et Cosmochimie (IMPMC)

Adresse : IMPMC, Case 115, 4 Place Jussieu 75252 Paris cedex 05

Responsable du Laboratoire / Entreprise : Guillaume Fiquet

Responsable de l'encadrement : Dezi Manuela

Téléphone : 01 44 27 98 17

E-mail : manuela.dezi@upmc.fr

Co-encadrant : Karim Benzerara

2. Titre, description du sujet, approches utilisées, références (1 page maximum) :

Caractérisation des protéines impliquées 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 sont parmi les plus anciennes traces de vie connues. Pourtant, les mécanismes de cette précipitation minérale par les cyanobactéries restent mal connus.

La calcification chez les cyanobactéries a longtemps été considérée comme un processus purement extracellulaire (Riding, 2006). Pourtant, nous avons récemment découvert plusieurs espèces de cyanobactéries que nous cultivons au laboratoire et qui produisent les carbonates de calcium intracellulairement (Couradeau et al. 2012 ; Benzerara et al., 2014), remettant en question le paradigme d'une biominéralisation forcément extracellulaire. Les mécanismes moléculaires à l'origine de cette biominéralisation intracellulaire restent totalement inconnus à ce jour. Ces mécanismes sont d'autant plus intéressants qu'il existe une espèce capable de piéger massivement le strontium, un élément pouvant être très toxique, notamment comme polluant dans les déchets nucléaires. La compréhension de ce mécanisme pourrait, donc, à terme permettre de concevoir des stratégies de bioremediation des eaux polluées.

Nous avons identifié, par une approche de génomique comparative, quelques gènes que seules les espèces cyanobactériennes formant des carbonates intracellulaires possèdent (in prep). Ces gènes sont orphelins, c'est-à-dire distants en séquence des gènes dont la fonction est connue. Ils restent donc entièrement à caractériser.

Dans ce stage, nous proposons de purifier les protéines d'intérêt et de les caractériser d'un point de vue structural et fonctionnel. Deux gènes ont été choisis pour démarrer l'étude car appartenant à deux espèces de cyanobactéries qui font de la biominéralisation intracellulaire avec des phénotypes légèrement différents. Ces gènes ont été clonés et les protéines surexprimées avec un rendement suffisant pour valider une approche d'analyse structurale. La taille des particules nous permettra d'entreprendre une approche par cryo-microscopie électronique sur particule isolée grâce à l'accès privilégié aux deux MET de l'IMPMC (200kV FEG et LaB6).

Des premiers essais de cristallogenèse ont permis d'identifier des conditions intéressantes pour l'une des protéines, très prometteuses pour la réussite du projet. L'étudiant/e explorera les aspects fonctionnels en identifiant 1) des partenaires potentiels par co-immunoprecipitation, 2) les possibles interactions avec la membrane lipidique via des expériences de reconstitution en liposomes et 3) en utilisant les méthodes de biophysique à disposition au laboratoire.

Le but du stage présente un double intérêt : 1) définir la structure et la fonction des protéines codées par les gènes d'intérêt, pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en oeuvre ; 2) caractériser la structure d'une protéine pour laquelle il n'existe pas de modèle d'homologie et qui pourrait permettre de découvrir des nouveaux repliements structuraux.

Au final, le stage passera par un apprentissage des techniques de culture de bactéries, le suivi de leur croissance ainsi que l'apprentissage de techniques de Biologie moléculaire, de Biochimie et de microscopie pour exprimer, purifier et caractériser des protéines nouvelles. Les encadrants ont déjà collaboré fournissant un cadre parfaitement 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.

Jansson, C. and Northen, T. (2010) Calcifying cyanobacteria—the potential of biomineralization for carbon capture and storage. **Curr. Opin. Biotechnol.** 21: 365–371.

Riding, R. (2006) Cyanobacterial calcification, carbon dioxide concentrating mechanisms, and Proterozoic/Cambrian changes in atmospheric composition. **Geobiology** 4: 299–316.

Couradeau, E., Benzerara, K., et al. (2012) An early-branching microbialite cyanobacterium forms intracellular carbonates. **Science** 336: 459–462.

Benzerara, K., Skouri-Panet, F., et al. (2014) Intracellular Cacarbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 111: 10933–10938.

Dezi, M.; Di Cicco, A.; Bassereau, P.; et al. (2013) Detergent-mediated incorporation of transmembrane proteins in giant unilamellar vesicles with controlled physiological contents. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 110, 7276-7281.

Verchere, A.; Dezi, M.; Adrien, V.; et al. (2015) In vitro transport activity of the fully assembled MexABOprM efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*. **Nature Comm.** 6, 6890

Skouri-Panet F, Benzerara K, et al. (2018) *In vitro* and *in silico* evidence of phosphatase diversity in the biomineralizing bacterium *Ramlibacter tataouinensis*. **Front. Microbiol.** 11, 8:2592.

Cam N, Benzerara K, et al. (2018) Active biomineralization of intracellular carbonates by high Ca uptake in cyanobacteria. **Geobiology**, 16, 49-61.