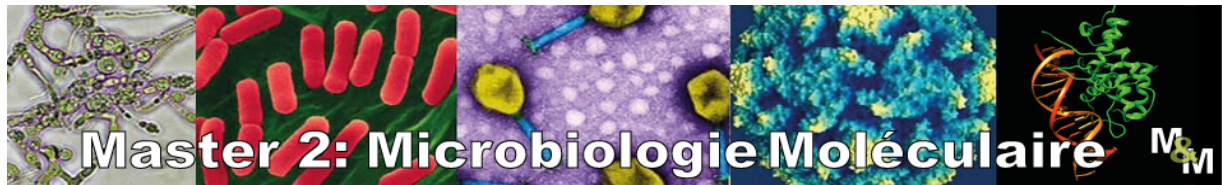




## Master 2 Microbiologie Moléculaire - Offres de stages - 2019-2020

Reconstitution d'une cible thérapeutique chez <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , le complexe Fatty Acid Synthase-II. ....	2
Etude de la réponse de <i>Mycobacterium smegmatis</i> au stress hypoxique au sein du macrophage .....	4
Bases moléculaires de l'adaptation à la symbiose au cours de l'évolution expérimentale des <i>rhizobia</i> .....	5
Caractérisation des nouveaux systèmes TACX (Toxine-Antitoxine dépendant de ClpX) chez <i>Escherichia coli</i> .....	6
Caractérisation des voies de régulation et du rôle de l'Hémolysine F chez les <i>Escherichia coli</i> pathogènes Extra-intestinaux (ExPEC). ....	7
Deux projets sont proposés et concernent les systèmes toxine-antitoxine ou la persistance aux antibiotiques.....	8
Conjugaison bactérienne dans le microbiome intestinal de <i>C. elegans</i> .....	10
Impact de la colibactine produite par des souches de <i>Escherichia coli</i> uropathogènes sur les mastocytes et la réponse précoce à l'infection urinaire. ...	11
Identification de protéines impliquées dans l'export des lipides d'enveloppe chez les mycobactéries. ....	12
Organisation de la capsule <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : Complexation de l'α - glucane avec des lipides et des antibiotiques.....	13
Criblage d'antagonistes de la Protéine-O-mannosyltransférase de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , pour la recherche de composés anti-tuberculeux de nouvelle génération .....	14
Le biologie des ARN chez les Archées: Caractérisation biochimique d'une nouvelle ribonucléase putative, RecJSOD, appartenant au réseau d'interaction du complexe aRNase J/ hélicase ASH-Ski2 chez les Thermococcales .....	15
Etude génétique de l'ARN Polymérase I de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	16
Etude de la production des bioplastiques (polyhydroxyalcanoates) par des cultures mixtes microbiennes .....	17
Les peptides antimicrobiens comme nouvel outil thérapeutique contre les infections pulmonaires.....	18
Implication des enzymes lipolytiques eucaryotes dans le métabolisme des granules lipidiques par des approches de « Gene silencing ».....	19
Coordination of envelope biogenesis in bacteria: coupling of an essential outer membrane assembly machinery with envelope integrity factors. ....	20



## SUJET N°1 (BOURSE FONROGA)

---

### Laboratoire, équipe:

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS)-CNRS, Université Toulouse III-UMR5089, équipe Enveloppes mycobactériennes: structure, biosynthèse et fonctions direction Dr M. Daffé

**Encadrant** (nom, tel, mail): Dr Fabienne Bardou- Email : [fabienne.bardou@ipbs.fr](mailto:fabienne.bardou@ipbs.fr)- tel : 05 61 17 55 75 et Dr Annaïk Quémard - Email: [annaik.quemard@ipbs.fr](mailto:annaik.quemard@ipbs.fr)

---

## Reconstitution d'une cible thérapeutique chez *Mycobacterium tuberculosis*, le complexe Fatty Acid Synthase-II.

La tuberculose reste aujourd'hui l'une des causes majeures de mortalité dues à un agent infectieux. Selon l'OMS, il est devenu urgent de développer une nouvelle génération de médicaments qui soient efficaces contre les souches de *Mycobacterium tuberculosis* multirésistantes et de mycobactéries non tuberculeuses. Le complexe *Fatty Acid Synthase* de type II (FAS- II) impliqué dans la biosynthèse de lipides essentiels et spécifiques des mycobactéries, les acides mycoliques, constitue une cible pharmaceutique pertinente et validée car il possède des caractéristiques uniques, a un rôle-clé dans la virulence et la persistance des bacilles et est la cible de médicaments anti-mycobactériens (1,2).

Le projet proposé s'inscrit dans une étude plus vaste visant à caractériser le système multienzymatique FAS-II mycobactérien à l'échelle du complexe. Ainsi, une approche intégrative est adoptée pour déchiffrer la composition protéique, la structure 3D et l'activité enzymatique de l'ensemble du complexe FAS-II purifié. Dans ce cadre, nous avons notamment identifié une nouvelle enzyme partenaire de FAS-II (3,4).

Le stage de M2R comportera trois axes principaux:

1) La reconstitution de (sous-)complexes grâce à la coexpression hétérologue des gènes connus de FAS-II, assemblés en quatre opérons distincts. Des plasmides complémentaires, en plus des huit déjà disponibles, devront être construits afin de pouvoir coexprimer des combinaisons variées de gènes FAS-II. La coexpression hétérologue de ces gènes chez *E. coli* sera ensuite optimisée.

2) La mise au point de la purification des sous-complexes FAS-II ou du complexe entier ainsi produits sera réalisée par chromatographie d'affinité à l'aide d'une large gamme protéines-appâts étiquetées correspondant à des sous-unités du cœur de FAS-II.

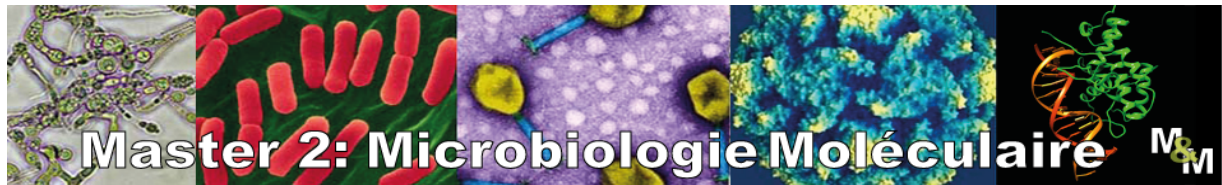
3) Amorcer l'analyse structurale de FAS-II, en collaboration avec des équipes de Biologie structurale. Les (sous-)complexes purifiés seront tout d'abord analysés par spectrométrie de masse native (collaboration IPBS) qui permet de préserver la structure quaternaire des complexes, afin d'obtenir des informations sur leur composition et les interactions entre protéines partenaires. Cette approche sera complétée par des analyses en microscopie électronique et par cristallographie (collaborations CBS, Montpellier et IPBS). Des résultats très prometteurs ont déjà été obtenus pour un hétérocomplexe de FAS-II (données non publiées).

---

### Techniques :

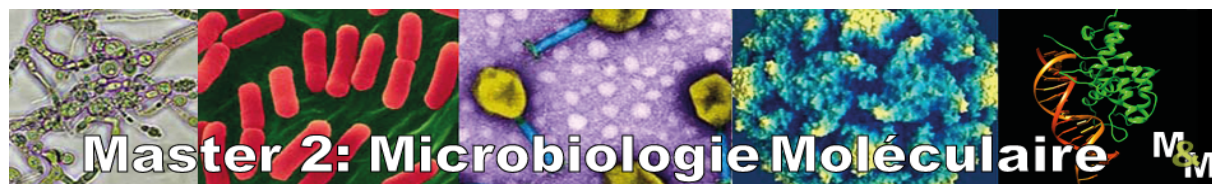
Cultures bactériennes, clonage d'opérons en vecteurs d'expression, coexpression hétérologue de gènes chez *E. coli*, préparation d'extraits bactériens, SDS-PAGE, Western-blot, purification de protéines par chromatographie d'affinité et d'exclusion de taille par FPLC. Spectrométrie de masse native, microscopie électronique.

Ce projet bénéficiera de toutes les infrastructures de l'IPBS, notamment de la plateforme de spectrométrie de masse (national IBSA facility, French Proteomics Infrastructure ProFI, Dr O. Schiltz).



**Références (5 max) :**

1. Quémard A. (2016) New Insights into the Mycolate-Containing Compound Biosynthesis and Transport in Mycobacteria. *Trends Microbiol.* **24**, 725-738.
  2. Daffé M., Quémard A., Marrakchi H. (2017) Mycolic acids: from Chemistry to Biology. In *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes - Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology Series*, ed Geiger O. (Springer, Cham)
  3. Bardou F., Quémard A. *et al.* (2017) HadD, a novel protein of the mycobacterial fatty acid synthase type II. Europe patent EP17306041.9.
  4. Lefebvre C., Boulon R., Ducoux M. *et al.* (2018) HadD, a novel protein of the mycobacterial fatty acid synthase type II, is essential for alpha- and epoxy-mycolic acid biosynthesis, cell envelope integrity and bacterial fitness. *Sci. Rep.* **8**: 6084.
-



## SUJET N° 2

**Laboratoire, équipe:** Institut de Pharmacologie et de Biologie structurale, Equipe Olivier Neyrolles

**Encadrants** (nom, tel, mail): Yannick Poquet, 0561175464, [yannick.poquet@ipbs.fr](mailto:yannick.poquet@ipbs.fr)

Florence Levillain, 0561175464, [florence.levillain@ipbs.fr](mailto:florence.levillain@ipbs.fr)

## Etude de la réponse de *Mycobacterium smegmatis* au stress hypoxique au sein du macrophage

La tuberculose, dont l'agent étiologique est *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), est une infection pulmonaire qui tue environ 1,7 million de personnes chaque année. La physiopathologie de la maladie est complexe au sein d'un microenvironnement inflammatoire particulier : le granulome. Hypoxique, pauvre en nutriments, et acide, celui-ci est constitué de cellules immunitaires et de mycobactéries qui peuvent persister dans un état de dormance ou de réplication à faible niveau pendant les phases latentes de la maladie. A l'intérieur du granulome, *Mtb* reprogramme son métabolisme pour soutenir à la fois sa croissance et sa survie. Un des axes de recherche de notre équipe vise à mieux comprendre la physiologie du bacille chez son hôte.

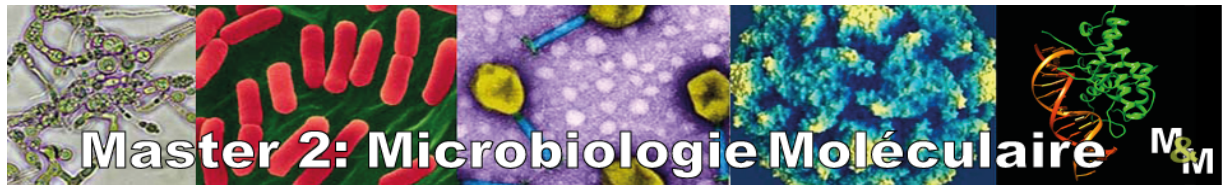
Afin d'identifier les voies métaboliques requises pour la survie du pathogène au sein de sa cellule hôte principale, le macrophage, en hypoxie, nous avons criblé une banque de mutants de *Mtb* par la technique de Tn-seq. Ceci nous a permis d'identifier plusieurs gènes candidats requis par la bactérie pour survivre en hypoxie au sein du macrophage. De façon intéressante, cet ensemble de gènes candidats est associé à plusieurs voies métaboliques impliquées notamment dans la réponse au stress redox.

Le but du stage que nous proposons sera de construire chez *Mycobacterium smegmatis* (mycobactérie modèle non pathogène) plusieurs mutants de délétion des gènes identifiés par Tn-seq chez *Mtb*. Parallèlement, après une étape préalable d'enrichissement des ARNs bactériens issus de cellules infectées, l'étude de l'expression des gènes candidats en hypoxie sera réalisée par RT-qPCR. La capacité de survie des mutants au sein du macrophage en normoxie ou en hypoxie sera également évaluée. Le manque d'oxygène conduisant à un stress redox pour la bactérie, l'étudiant sera aussi amené à développer des systèmes rapporteurs fluorescents pour visualiser et quantifier ce stress dans différentes conditions physiologiques. Pour cela, après avoir optimisé la construction des systèmes rapporteurs, ceux-ci devront être installés chez *M. smegmatis*. La réponse à différents stress chimiques (oxydants ou réducteurs) appliqués directement sur la bactérie sera ensuite caractérisée par microscopie confocale et cytométrie en flux. Par la suite, ces systèmes rapporteurs seront introduits chez les mutants de *M. smegmatis* construits afin de visualiser la réponse au stress redox des mutants lors de l'infection et ainsi d'identifier les étapes clés de la réponse au stress redox dans lesquelles sont impliqués les gènes candidats.

**Techniques :** Culture bactérienne, biologie moléculaire et génétique bactérienne, construction de mutants de délétion, construction et caractérisation de système rapporteurs fluorescents, RT-qPCR, culture cellulaire, infection de macrophage, microscopie confocale, cytométrie en flux

### Références (5 max)

- Levillain\*, Poquet\* et al. Horizontal acquisition of a hypoxia-responsive molybdenum cofactor biosynthesis pathway contributed to *Mycobacterium tuberculosis* pathoadaptation. **PLoS Pathogens** 2017 13(11):e1006752
- Gouzy, Poquet, Neyrolles. Nitrogen metabolism in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and virulence. **Nature Reviews Microbiology** 2014 12(11):729-37
- Gouzy et al. *Mycobacterium tuberculosis* exploits asparagine to assimilate nitrogen and resist acid stress during infection. **PLoS Pathogens** 2014 10(2):e1003928
- Gouzy et al. *Mycobacterium tuberculosis* nitrogen assimilation and host colonization require aspartate. **Nature Chemical Biology** 2013 9(11):674-6
- Peterson et al. Path-seq identifies an essential mycolate remodeling program for mycobacterial host adaptation. **Mol Syst Biol** 2019 15(3):e8584



### SUJET N°3

**Laboratoire, équipe:** LIPM, Equipe « Fonctions symbiotiques, génomes et évolution des rhizobia »  
**Encadrant (nom, tel, mail):** Delphine Capela, 0561285454, delphine.capela@inra.fr

---

## Bases moléculaires de l'adaptation à la symbiose au cours de l'évolution expérimentale des *rhizobia*

Les rhizobia, symbiotes mutualistes intracellulaires des légumineuses, ont évolué à partir du transfert horizontal de gènes symbiotiques essentiels dans diverses bactéries du sol. Une reprogrammation du génome d'accueil sous pression de sélection des légumineuses hôtes a ensuite dû opérer, permettant l'adaptation des bactéries à leur nouvel environnement endosymbiotique. Cette étape d'adaptation post-transfert a récemment été validée par une expérience d'évolution réalisée dans l'équipe et ayant permis la conversion progressive de la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum* en symbiotes intracellulaires de la légumineuse *Mimosa pudica*.

Pour cela, le plasmide symbiotique de *Cupriavidus taiwanensis*, un symbiote naturel de *Mimosa pudica*, a été transféré dans la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum*. La souche chimère ainsi obtenue a ensuite été évoluée au contact de la légumineuse hôte. Dans un premier temps, des variants nodulants de cette souche chimère ont été piégés par la légumineuse puis ces variants nodulants ont été soumis à des cycles sériés de nodulation sur *M. pudica*. Les premières étapes de la symbiose, nodulation et infection intracellulaire, ont été très rapidement obtenues et optimisées. Les mutations adaptatives associées à ces premières étapes ont été identifiées et caractérisées. Après 30 cycles de nodulation, un premier niveau de fixation d'azote associé à une meilleure persistance des bactéries dans les cellules des nodules a été détecté dans deux lignées indépendantes de clones évolués. Ce niveau de fixation d'azote, bien qu'insuffisant pour permettre le mutualisme, est prometteur pour espérer obtenir des clones évolués mutualistes au cours de l'expérience. L'objectif du stage de master sera 1) d'identifier les mutations adaptatives responsables du saut de fixation d'azote observé dans ces deux lignées, et 2) d'analyser les fonctions affectées par ces mutations pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués.

---

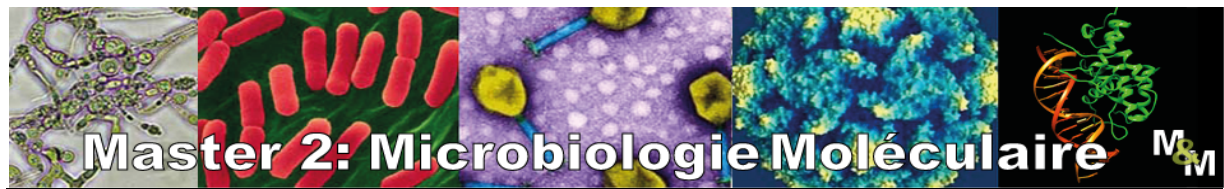
### Techniques :

- Les séquences génomiques des clones évolués étant disponibles, les mutations détectées seront reconstruites dans un clone ancestral à l'aide de la technique MuGent (Dalia et al. 2013) basée sur la capacité de transformation naturelle de *R. solanacearum*.
- La persistance des bactéries sera évaluée par cytologie des nodules et à l'aide d'un kit live/dead.
- La fixation de l'azote sera mesurée par un test de réduction d'acétylène en éthylène et une analyse par chromatographie en phase gazeuse
- Des techniques classiques de microbiologie, de génétique bactérienne et de culture *in vitro* des plantes seront utilisées.

---

### Références (5 max) :

- Clerissi, C. *et al.* Parallels between experimental and natural evolution of legume symbionts. *Nat Commun.* **9**(1), 2264. doi: 10.1038/s41467-018-04778-5 (2018).
- Masson-Boivin C, Sachs JL. Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia-the roots of a success story. *Curr Opin Plant Biol* **44**,7-15. doi: 10.1016/j.pbi.2017.12.001 (2018).
- Capela, D. *et al.* Recruitment of a lineage-specific virulence regulatory pathway promotes intracellular infection by a plant pathogen experimentally evolved into a legume symbiont. *Mol Biol Evol* **34**, 2503-2521 (2017).
- Marchetti, M. *et al.* Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont. *PLoS Biol* **8**(1):e1000280 (2010).
- Marchetti, M. *et al.* Experimental evolution of rhizobia may lead to either extra- or intracellular symbiotic adaptation depending on the selection regime. *Mol Ecol* **26**, 1818-1831 (2017).



---

## SUJET N°4

**Laboratoire, équipe:** LMGM, Equipe Pierre Genevaux

**Encadrant (nom, tel, mail):** Patricia Bordes, 0561335941, bordes@ibcg.biotoul.fr

---

### Caractérisation des nouveaux systèmes TACX (Toxine-Antitoxine dépendant de ClpX) chez *Escherichia coli*

Tous les génomes bactériens contiennent des systèmes toxine-antitoxine (TA) codés au sein d'un même opéron. Les toxines ciblent diverses fonctions cellulaires essentielles, entraînant de ce fait un ralentissement de la croissance qui peut aller jusqu'à la mort des bactéries. Pour les systèmes TA de type II, l'activité de la toxine est inhibée par l'antitoxine qui, contrairement à la toxine, est une protéine instable. Généralement, l'expression de l'opéron est contrôlée négativement par l'antitoxine seule ou en complexe avec la toxine. Ces systèmes ont un rôle de plus en plus évident dans les réseaux d'adaptation bactériens face aux stress. En effet, ils ont été montrés comme impliqués dans la résistance aux infections phagiques, la formation de biofilms et plus récemment la pathogénicité et l'entrée en persistance. Certains systèmes TA présentent un niveau de régulation supplémentaire grâce à la présence d'un chaperon moléculaire au sein du même opéron, comme le système TAC (Toxine-Antitoxine-Chaperon) de *Mycobacterium tuberculosis*. Ce projet porte sur la caractérisation d'une nouvelle famille de systèmes TA dont l'activité dépend du chaperon ClpX : la famille TACX (TA dépendant de ClpX). ClpX fait partie de la famille HSP100 et s'associe avec la peptidase ClpP pour former la protéase ATP-dépendante ClpXP. Notre objectif est d'identifier le rôle de ClpX dans l'inhibition de la toxine par l'antitoxine en nous focalisant sur le système TACX d'*E. coli* ABU 83972. Les résultats pourraient ainsi permettre de mettre à jour de nouveaux mécanismes antimicrobiens afin de développer de nouvelles cibles d'intérêt thérapeutique.

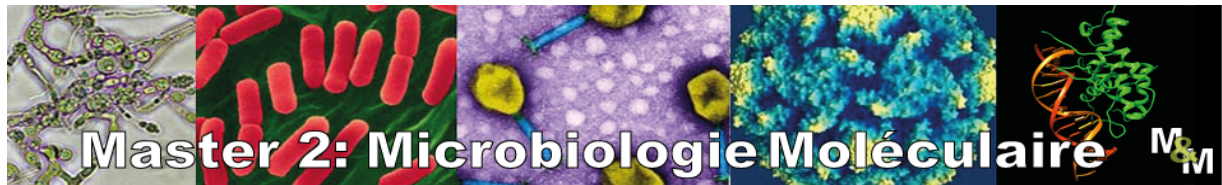
---

#### Techniques :

Biochimie pour les approches *in vitro* avec les protéines purifiées, biologie moléculaire pour la construction de mutants de ces protéines, génétique bactérienne pour tester la toxicité *in vivo*.

**Références (5 max) :** Sala *et al.*, 2014, Toxins. Multiple toxin-antitoxin systems in *Mycobacterium tuberculosis*. Akarsu *et al.*, 2019. PLoS Comput Biol. TASmania: A bacterial Toxin-Antitoxin Systems database. 15: e1006946. Baker & Sauer, 2012, Biochim Biophys Acta. ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine. 1823: 15–28.

---



## SUJET N°5

**Laboratoire, équipe:** Institut de recherche en santé digestive (IRSD), INSERM U1220 - INRA U1416, équipe Pathogénie et commensalisme des entérobactéries

<http://www.irsd.fr/equipe-2--pathogenie-et-commensalisme-des-enterobacteries.html>

**Encadrant** (nom, tel, mail): Priscilla Branchu, 05-62-74-45-25, [priscilla.branchu@inserm.fr](mailto:priscilla.branchu@inserm.fr)

## Caractérisation des voies de régulation et du rôle de l'Hémolysine F chez les *Escherichia coli* pathogènes Extra-intestinaux (ExPEC).

Les *Escherichia coli* (*E. coli*) sont des bactéries à Gram négatif faisant partie intégrante du microbiote intestinal des animaux à sang chaud. Parmi les *E. coli*, on distingue les « commensaux », les « pathogènes ». Au laboratoire, nous avons identifié un gène, *hlyF*, codé par un plasmide de virulence présent chez souches pathogènes responsable de méningites chez l'Homme et de colibacillose aviaire. Nous avons clairement démontré que la présence de *hlyF* chez les souches de *E. coli* est systématiquement associée à la production de vésicules extracellulaires appelées « Outer Membrane Vesicles » (OMV) qui sont associés à la virulence <sup>(1)</sup>. Une étude chinoise a montré que la diminution de pH dans une cellule eucaryote infectée par une souche *E. coli hlyF* positive active l'expression de ce gène *via* le système à deux composante PhoQ-PhoP <sup>(2)</sup>. Nos résultats préliminaires *in silico* nous ont permis d'établir une liste de régulateurs potentiels et des analyses *in vitro* nous ont permis de déterminer que l'activité promotrice de *hlyF* est induite dans des milieux pauvres en fer.

Dans ce contexte, l'objectif du stage sera de déterminer la cascade de régulation de l'expression du gène *hlyF* en répondant à ces questions :

- i) Quels sont les facteurs environnementaux favorisant l'expression de *hlyF* ?
- ii) Quels sont les régulateurs bactériens mis en jeu ?

Pour ce faire l'étudiant aura à déterminer les conditions optimales d'expression du gène *hlyF* à l'aide d'outils qu'il construira en plus de ceux déjà disponibles au laboratoire. Il les analysera grâce à des techniques de microbiologie et de microbiologie moléculaires. Une fois le(s) régulateur(s) identifiés ainsi que les conditions optimales de l'expression de *hlyF*, l'activité des OMV sera testée dans notre modèle de cellules HeLa et le ou les mutant(s) d'intérêt seront testés dans un modèle murin. Le but à long terme de cette étude est de déterminer le rôle de l'hémolysine F dans la pathogénicité des *E. coli*.

---

### Techniques :

Biologie Moléculaire : Extraction d'ADN, Mutagenèse dirigée – Clonage moléculaire – Fusion promoteur/gène rapporteur – PCR – qRT-PCR

Microbiologie classique : Cultures de bactéries en laboratoire de niveau 2 – Transformation de plasmides – Isolements de souches de *E. coli* – Cultures en chambres à hypoxie – Cinétique de croissance

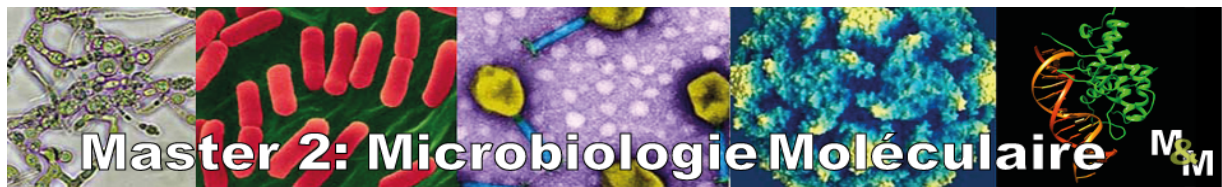
Culture Cellulaire : Infection de cellules HeLa

### Références (5 max) :

(1) Murase *et al.*, Journal of Infectious Disease, 2015

(2) Zhuge *et al.*, Frontiers of Immunology, 2018

---



---

## SUJETS N° 6&7

---

Laboratoire, équipe: Cellular and Molecular Microbiology, ULB, Brussels, Belgium Encadrant (nom, tel, mail): Laurence Van Melderen, [lvmelder@ulb.ac.be](mailto:lvmelder@ulb.ac.be), +3226509778

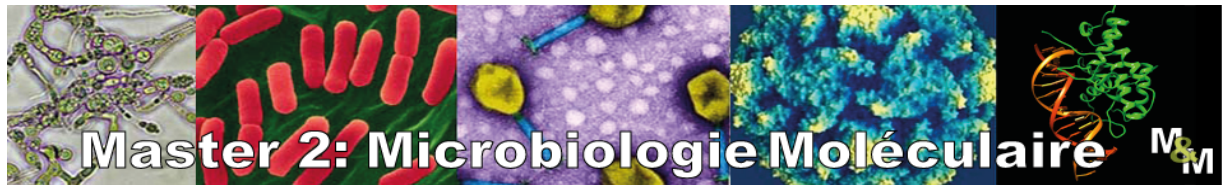
---

Deux projets sont proposés et concernent les systèmes toxine-antitoxine ou la persistance aux antibiotiques

Les systèmes toxine-antitoxine (TA): pourquoi autant et pourquoi faire ? Les systèmes TA sont de petits modules génétiques, extrêmement abondants dans les génomes bactériens. Les raisons de ce succès évolutif sont encore mal connues. Ils sont composés de deux gènes, codant respectivement pour une protéine toxique et son antitoxine. Ces systèmes montrent une très grande diversité, que ce soit au niveau de leur organisation génétique, de leur mode d'activation ou encore au niveau des cibles des toxines. La fonction de ces systèmes reste sujette à d'intense débat. Les objectifs sont · de découvrir de nouvelles toxines présentant de nouveaux modes d'action · d'étudier les mécanismes moléculaires nouvelles toxines · de comprendre leurs rôles biologiques · de comprendre la régulation de leur expression et les conditions enclenchant leur activation

Persistance chez *E. coli* Le phénomène de persistance est à la base des infections bactériennes chroniques. Il permet à une petite fraction de la population de tolérer la présence d'antibiotiques. Après le traitement, ces cellules reprennent une croissance normale pour donner naissance à une population identique à celle de départ. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à la persistance sont encore mal connus et sujets à controverse. Les objectifs sont · de comprendre comment au sein d'une population clonale, un petit nombre de bactéries se différencie vers un état de tolérance aux antibiotiques (hétérogénéité phénotypique) · d'identifier l'impact du métabolisme et des réponses au stress sur la persistance · de comprendre les mécanismes moléculaires permettant à la cellule persistante de reprendre une croissance normale après le traitement antibiotique Techniques : Le CM2 s'intéresse aux mécanismes adaptatifs présentés par les bactéries et répond à ces questions par une approche combinée et intégrative de techniques de microbiologie cellulaire (microscopie à fluorescence au niveau de la cellule unique ; cytométrie en flux, FACS), de microbiologie moléculaire (génétique

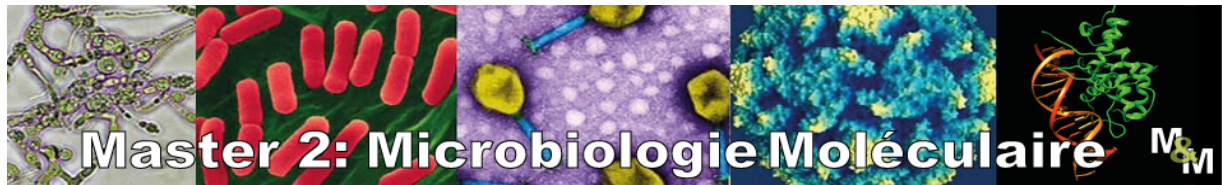




moléculaire, biochimie, biophysique et biologie structurale) et de modélisation mathématique.

**Références (5 max) :** 1. Goormaghtigh and Van Melderen (2019) Single-cell imaging and characterization of *Escherichia coli* persister cells to ofloxacin in exponential cultures. *Science Advances*, accepted 2. Jurenas, Van Melderen, Garcia-Pino (2019) Mechanism of regulation and neutralization of the AtaR-AtaT toxin-antitoxin system. *Nat Chem Biol.* 15(3):285-294. 3. Goormaghtigh, Fraikin, Putriņš, Hallaert, Hauryliuk, Garcia-Pino, Sjödin, Kasvandik, Udekwu, Tenson, Kaldalu, Van Melderen (2018) Reassessing the Role of Type II Toxin-Antitoxin Systems in Formation of *Escherichia coli* Type II Persister Cells. *MBio.* 9(3). 4. Jurėnas, Chatterjee, Konijnenberg, Sobott, Droogmans, Garcia-Pino, Van Melderen (2017) AtaT blocks translation initiation by N-acetylation of the initiator tRNA<sup>fMet</sup>. *Nat Chem Biol.* 13(6):640-46. 5. Tsilibaris, Maenhaut-Michel, Mine, Van Melderen (2007) What is the benefit for *E. coli* to have multiple toxin-antitoxin systems in their genomes? *J. Bacteriol.* 189(17):6101-8.

---



---

## SUJET N°8

### Laboratoire, équipe:

LMGM : Equipe Ségrégation active des génomes bactériens : mécanismes et diversité (J.-Y. Bouet)

CRCA: Équipe variabilité interindividuelle et plasticité émergente (R. Jeanson)

### Encadrants (nom, tel, mail): co-encadrement :

C. Guynet (CRN CNRS), 0561335928, [guynet@ibcg.biotoul.fr](mailto:guynet@ibcg.biotoul.fr) ou [cathyblabla@hotmail.fr](mailto:cathyblabla@hotmail.fr)

A. Pérez Escudero (CRN CNRS), [alfonso.perez.escudero@gmail.com](mailto:alfonso.perez.escudero@gmail.com)

---

## Conjugaison bactérienne dans le microbiome intestinal de *C. elegans*

La multirésistance chez les bactéries est une menace de plus en plus grave pour la santé publique mondiale. Les résistances aux antibiotiques résultent soit de mutations, soit de l'acquisition de nouvelles informations génétiques par transfert horizontal de gènes (HGT) par transformation, transduction, mais surtout par conjugaison (1). Au cours de la conjugaison bactérienne, l'ADN est transféré d'une cellule donneuse vers une cellule réceptrice par l'intermédiaire d'un pore conjugatif. Bien que le processus de conjugaison ait été largement étudié, les données sur les HGT et le devenir des plasmides conjugatifs dans des environnements naturels tels que le microbiote intestinal humain manquent. Nous proposons d'utiliser le nématode *Caenorhabditis elegans* comme modèle expérimental simple d'un système gastro-intestinal abritant des communautés bactériennes contrôlées. *C. elegans* est un bactérivore capable de se multiplier et de se reproduire avec divers régimes bactériens. Des études récentes indiquent que *C. elegans* porte un microbiome complexe pouvant être composé de différentes espèces, le groupe dominant comprenant plusieurs gammaprotéobactéries (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonaceae* et *Xanthomonadaceae*) (2). Le niveau élevé d'homologie entre de nombreux gènes de *C. elegans* et humains, ainsi que les nombreuses similitudes existant entre le métabolisme humain et celui de *C. elegans*, indiquent que les résultats obtenus à l'aide de ce modèle pourraient être globalement pertinents pour de telles études portant sur les HGT dans le microbiote intestinal humain (2). *C. elegans* est également un modèle de choix pour notre étude pour des raisons techniques (facilité de culture, cycle de vie court, hermaphroditisme permettant le maintien de cultures homozygotes, transparents en microscopie optique permettant la visualisation directe de cellules bactériennes *in vivo*). L'objectif du stage sera de construire des dérivés de notre plasmide conjugatif modèle R388 (3, 4) permettant de suivre le transfert conjugatif en direct, de déterminer les fréquences de transfert, et d'étudier le devenir des plasmides conjugatifs au sein d'une communauté microbienne de l'intestin de *C. elegans*.

---

### Techniques :

Biologie moléculaire, tests génétiques, microscopie de fluorescence, culture du nématode *C. elegans*

---

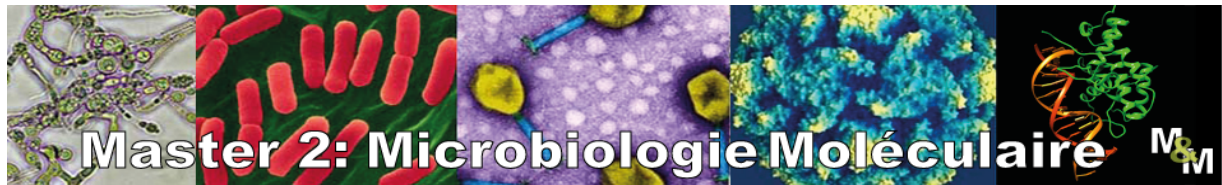
### Références :

M. Barlow (2009). *Methods Mol. Biol.* 532, 397-411. doi:10.1007/978-1-60327-853-9\_23pmid:19271198

F. Zhang, M. Berg, Dierking K., M.A. Félix, M. Shapira, B.S. Samuel and H. Schulenburg (2017) *Front Microbiol* 8:485. doi: 10.3389/fmicb.2017.00485. eCollection 2017

R. Fernández-López, M.P. Garcillán-Barcia, C. Revilla, M. Lázaro, L. Vielva and F. de la Cruz (2006). *FEMS Microbiol Rev*, 30, 942-966

C. Guynet, A. Cuevas, G. Moncalian and F. de la Cruz (2011). *Plos Genetics*, 7:e1002073



## SUJET N°9

Laboratoire d'accueil : Institut de Recherche en Santé Digestive (IRSD), Inserm Purpan

Equipe : Pathogénicité et commensalisme des Entérobactéries

Directeur du projet : Dr. Jean-Philippe Nougayrède (jean-philippe.nougayrede@inserm.fr)

### Impact de la colibactine produite par des souches de *Escherichia coli* uropathogènes sur les mastocytes et la réponse précoce à l'infection urinaire.

Les infections urinaires sont une des infections les plus fréquentes. Les bactéries responsables sont les *Escherichia coli* uropathogènes (UPEC) dont le réservoir naturel est le tractus gastro-intestinal. La résistance aux antibiotiques de *E. coli* augmente qui rend la prise en charge difficile. Il est donc urgent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

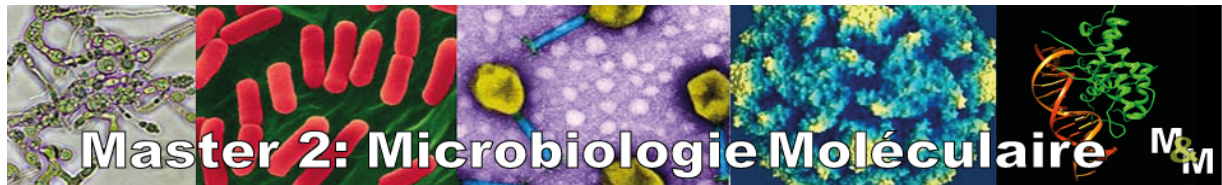
Près de 40% des UPEC portent un îlot de pathogénicité *pks* qui code pour la biosynthèse d'un peptide-polyketide génotoxique, la colibactine. Des infections *in vitro* ont montré que la colibactine induit des dommages à l'ADN très toxiques et mutagènes. Des résultats préliminaires du laboratoire indiquent que des dommages à l'ADN peuvent être détectés dans les cellules épithéliales de vessies d'animaux infectés expérimentalement avec une UPEC *pks+*.

Les mastocytes sont des cellules du système immunitaire inné de l'hôte qui contrôlent l'apoptose et l'exfoliation des cellules superficielles de l'urothélium infectées par les UPEC. Au cours de l'infection urinaire, les cellules urothéliales sécrètent l'IL-1b qui recrute des mastocytes au niveau de l'épithélium superficiel. Les mastocytes induisent alors cytolysse et l'exfoliation des cellules infectées. Les mastocytes recrutent d'autres cellules immunitaires au site de l'infection urinaire, et peuvent aussi stopper l'inflammation locale en sécrétant l'IL-10. Ce phénomène nécessaire à la régénération de l'urothélium superficiel, favorise également la persistance des UPEC au sein de l'urothélium. La réponse immune précoce et le recrutement des mastocytes sont donc des étapes clés dans l'établissement de l'infection ainsi que dans sa résolution ou sa persistance chronique.

Ce projet de recherche va étudier l'impact de la colibactine dans la physiopathologie des infections urinaires à *E. coli*, en particulier lors de l'étape du recrutement des mastocytes par les cellules urothéliales. Nous testerons l'hypothèse selon laquelle les dommages à l'ADN induits dans les cellules infectées par les UPEC, pourraient perturber le recrutement des mastocytes. Nous utiliserons une souche de référence de *E. coli* issue d'infections urinaires humaines, et un mutant isogénique qui sera construit par délétion d'un gène de l'îlot *pks* impliqué dans la synthèse de la colibactine. Les souris seront infectées par la souche sauvage ou par le mutant non génotoxique, et nous examinerons la colonisation des bactéries dans l'arbre urinaire. La vessie et les reins seront prélevés pour réaliser des études histologiques selon des protocoles d'immunomarquage et de western-blot afin de mettre en évidence les dommages à l'ADN, l'exfoliation et l'apoptose ainsi que le recrutement des cellules immunitaires.

Cette approche va nous permettre d'investiguer le rôle jusque-là non connu de la colibactine dans l'établissement d'une infection urinaire. In fine, si nous mettons en évidence un rôle pour la colibactine dans la pathogénicité des UPEC, les enzymes impliquées dans sa synthèse seraient des cibles potentielles dans le traitement des infections urinaires.

Techniques utilisées : Manipulation génétique de souches bactériennes, expérimentation sur modèle murin, histologie en immunofluorescence, western-blot

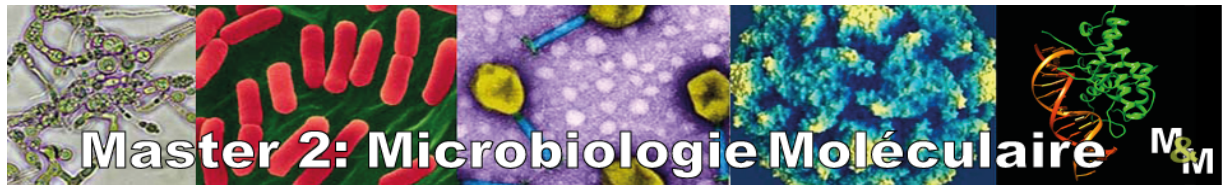


## SUJET N°10

Laboratoire, équipe: IPBS – Equipes Christophe Guilhot/Odile Schiltz Encadrant (nom, tel, mail): Christian Chalut, 0561175473, [christian.chalut@ipbs.fr](mailto:christian.chalut@ipbs.fr)  
Manuelle Ducoux-Petit, [manuelle.ducoux@ipbs.fr](mailto:manuelle.ducoux@ipbs.fr)

### Identification de protéines impliquées dans l'export des lipides d'enveloppe chez les mycobactéries.

Les mycobactéries regroupent plusieurs espèces bactériennes pathogènes, telle que *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent de la tuberculose humaine. Elles possèdent une enveloppe comportant une membrane plasmique et une membrane externe, dénommée mycomembrane, constituée de lipides de structures atypiques. Les voies de biosynthèse impliquées dans la production des lipides de la mycomembrane ont été largement décrites mais les mécanismes moléculaires responsables de leur export à travers l'enveloppe cellulaire restent inconnus (1). Notre objectif vise à identifier de nouvelles protéines impliquées dans l'export d'une famille de lipides de surface produits par la mycobactérie modèle *Mycobacterium smegmatis*, les polyphléates de tréhalose (TPP). Nous avons précédemment montré que le transport des TPP constitue un modèle pertinent pour décrypter les mécanismes d'export des lipides chez les mycobactéries (1,2). Pour répondre à cette question, nous souhaitons mettre en place l'approche membrane-SPINE, qui combine la réticulation (ou cross-linking) *in vivo* de complexes protéiques par le formaldéhyde et la purification par affinité de protéines appâts étiquetées avec un « Strep-Tag », pour rechercher des partenaires qui interagissent avec des protéines membranaires ou périplasmiques jouant un rôle clé dans la biosynthèse des TPP (3). L'objectif spécifique de ce projet est de développer une procédure qui permette l'isolement et la purification des complexes protéiques à partir de *M. smegmatis*, après traitement des bactéries au formaldéhyde. Au-delà du projet de stage, les protéines identifiées seront caractérisées par protéomique quantitative basée sur la spectrométrie de masse et les gènes codant pour ces protéines seront inactivés par recombinaison homologe chez *M. smegmatis* pour confirmer leur rôle dans l'export des TPP. Ces études apporteront des informations fondamentales sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la translocation des lipides entre les membranes interne et externe chez les mycobactéries et pourraient conduire à terme, à l'identification de cibles innovantes pour le développement de nouveaux traitements antibactériens. Le projet sera réalisé à l'IPBS en partenariat entre les équipes de C. Guilhot et d'O. Schiltz. **Techniques** : Microbiologie, génétique microbienne, biochimie, purification des protéines par affinité. **Références (5 max)** : 1. Chalut, C. (2016) *Tuberculosis* 100, 32-45, doi:10.1016/j.tube.2016.06.004 2. Burbaud, S. et al. (2016) *Cell Chem Biol* 23, 278-289, doi:10.1016/j.chembiol.2015.11.013 3. Muller, V. S. et al. (2011) *Proteomics* 11, 2124-2128, doi:10.1002/pmic.201000558



## SUJET N°11 (BOURSE FONRAGA)

---

Equipe : "Enveloppes mycobactériennes: structure, biosynthèse et rôles" (M. Daffé) Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale IPBS-CNRS UMR 5089

Nom de l'encadrante : Anne Lemassu, 05 61 17 55 68, anne.lemassu@ipbs.fr

---

### Organisation de la capsule *Mycobacterium tuberculosis* : Complexation de l' $\alpha$ -glucane avec des lipides et des antibiotiques

Le développement de nouveaux antibiotiques efficaces contre les souches résistantes est l'une des priorités des programmes de lutte contre la tuberculose. Cette démarche nécessite de développer solidement le socle des connaissances fondamentales sur *Mycobacterium tuberculosis*. Notre équipe a montré que la partie la plus externe de l'enveloppe, la capsule, est constituée majoritairement d'un polysaccharide, l' $\alpha$ -glucane, de lipides et de protéines. Son analyse par décapage, et son observation par microscopie, montrent qu'il s'agit d'un système organisé. La structure de l' $\alpha$ -glucane présente des analogies avec l'amylose de nombreux organismes cellulaires, qui est bien connu pour se structurer en hélice en formant un cœur hydrophobe permettant l'intégration de petites molécules, et aussi d'acides gras. Il est donc pertinent de chercher si l' $\alpha$ -glucane peut lui aussi présenter de telles structures, formant ainsi une matrice interagissant avec d'autres molécules : d'une part avec les acides gras constitutifs de lipides mycobactériens pour structurer la capsule, et d'autre part interagir avec de petites molécules de type antibiotiques pour faciliter ou ralentir leur diffusion.

Des études en cours, en collaboration avec Valérie Réat (équipe RMN Biologique Intégrative, IPBS) et Franck Jolibois (équipe LPCNO, Toulouse) ont permis de développer les outils de modélisation et d'analyse par RMN permettant d'étudier la formation de complexes amylose-lipides. L'étude est maintenant appliquée aux interactions  $\alpha$ -glucane-lipides et  $\alpha$ -glucane-antibiotiques. Il s'agit d'un polysaccharide de haut poids moléculaire. Bien qu'il soit constitué uniquement de résidus glucopyranosyles liés en  $\alpha$ 1-4, le taux de ramification en  $\alpha$ 1-6 que nous avons déterminé correspond à une moyenne et ne prend pas en compte les hétérogénéités de ramifications et de longueur de chaînes ramifiées. Il est donc important d'étudier la formation de « domaines » présentant des longueurs de chaînes et des taux de ramification variables susceptibles ou non d'interagir avec des lipides ou des antibiotiques.

L'objectif de ce stage est donc de réaliser des hydrolyses partielles de l' $\alpha$ -glucane avant ou après complexation, de séparer les produits d'hydrolyse et d'en déterminer la structure, afin de connaître les motifs requis à la complexation de lipides mycobactériens et d'antibiotiques.

---

#### Techniques

Extraction et purification de polysaccharide, formation de complexes, hydrolyses enzymatiques, chromatographie, MALDI, RMN.

---

#### Publications

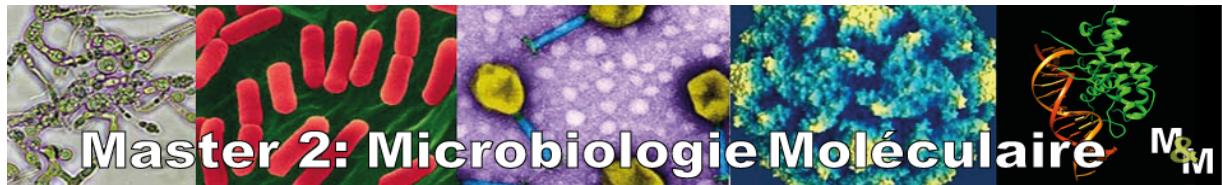
Lemassu A, Daffé M (1994) Structural features of the exocellular polysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Biochemical journal* 297 ( Pt 2): 351-357;

Ortalo-Magne A, Lemassu A, Laneelle MA, Bardou F, Silve G, Gounon P, Marchal G, Daffé M (1996) *Journal of bacteriology* 178: 456-461;

Dinadayala P, Sambou T, Daffé M, Lemassu A (2008). *Glycobiology* 18: 502-508 ;

Sambou T, Dinadayala P, Stadthagen G, Barilone N, Bordat Y, Constant P, Levillain F, Neyrolles O, Gicquel B, Lemassu A, Daffé M, Jackson M (2008). *Molecular microbiology* 70: 762-774

Sani M, Houben E, Geurtsen J, Pierson J, de Punder K, van Zon M, Wever B, Piersma S, Jiménez C, Daffé M, Appelmelk B, Bitter W, van der Wel N, Peters P (2010) *PLoS pathogens* 6



## SUJET N° 12 (BOURSE – Réponse avant Fin Juillet)

**Laboratoire, équipe:** Groupe Immunomodulation par les lipides et glycoconjugués mycobactériens, IPBS-UMR5089, 205 Route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex04.

**Encadrant** (nom, tel, mail): Dr Emeline Fabre, MCF UPS, 05 61 17 55 07, [Emeline.fabre@ipbs.fr](mailto:Emeline.fabre@ipbs.fr),  
Dr Michel Rivière, DR CNRS, 05 61 17 55 58, [Michel.Riviere@ipbs.fr](mailto:Michel.Riviere@ipbs.fr)

### Criblage d'antagonistes de la Protéine-O-mannosyltransférase de *Mycobacterium tuberculosis*, pour la recherche de composés anti-tuberculeux de nouvelle génération

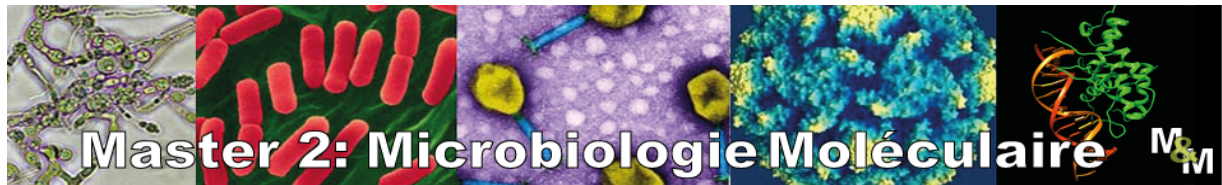
La résistance aux antibiotiques est la cause chaque année en France de près de 12 500 décès. Dans ce contexte, avec plus de 3 morts/minute, la tuberculose, causée par la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*, constitue la première cause mondiale de mortalité liée à un agent infectieux unique. En 2016, plus de 600 000 personnes ont contracté une tuberculose pharmaco-résistante à la rifampicine (le plus puissant des anti-tuberculeux de 1<sup>ère</sup> ligne), et l'émergence et la dissémination de souches «quasi totalement» résistantes à tout antibiotique constituent désormais une menace plus alarmante encore. De nombreux antibiotiques actuels ciblent des processus physiologiques essentiels à la survie des bactéries créant ainsi une forte pression de sélection et conduisant à l'émergence de microorganismes antibiorésistants. Aussi, pour éviter ces risques, les recherches actuelles s'orientent vers le développement d'agents thérapeutiques ciblant non pas directement la survie du microorganisme mais plutôt des facteurs de virulence bactériens nécessaires à la colonisation de l'hôte.

Dans ce contexte, nos travaux précédents ont démontré que la Protéine-O-MannosylTransférase (PMTub) de *Mycobacterium tuberculosis*, responsable de la mannosylation de certaines protéines mycobactériennes, est cruciale pour la virulence et le développement de la bactérie dans l'hôte<sup>6</sup>. Cette enzyme nous est donc apparue comme une cible thérapeutique prometteuse pour le développement d'anti-tuberculeux de nouvelle génération. Afin de confirmer cette hypothèse, nous proposons d'employer une souche mycobactérienne « rapportrice », permettant d'évaluer l'activité de PMTub sur bactéries vivantes. Ce bio-senseur cellulaire nous permettra alors de cribler une banque d'inhibiteurs pharmacologiques sur des micro-cultures mycobactériennes.

**Techniques :** Mutagénèse dirigée, construction de plasmides par Gibson Assembly, cultures bactériennes d'*E. coli* et *M. smegmatis*, purification de protéines par affinité, western-blot, Elisa, biologie de synthèse (incorporation métabolique d'acides aminés non naturels), spectrométrie de masse (optionnel).

#### Références (5 max) :

Liu C.F., Tonini L., Malaga W., Beau M., Stella A., Bouyssié D., Jackson M.C., Nigou J., Puzo G., Guilhot C., Burlet-Schiltz O., Rivière M. (2013) Bacterial protein-O-mannosylating enzyme is crucial for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 110(16), 6560-5.



## SUPET N° 13

**Laboratoire, équipe:** CBI-LMGM-RNA & Ribonucléases

**Encadrants (nom, tel, mail):** Béatrice Clouet-d'Orval & Marie Bouvier Tel (33) 5 61 33 5816

[Beatrice.Clouet-dOrval@ibcg.biotoul.fr](mailto:Beatrice.Clouet-dOrval@ibcg.biotoul.fr)

## Le biologie des ARN chez les Archées: Caractérisation biochimique d'une nouvelle ribonucléase putative, RecJSOD, appartenant au réseau d'interaction du complexe aRNase J/ hélicase ASH-Ski2 chez les Thermococcales

Les Archées, micro-organismes constituant le troisième domaine du vivant, sont ubiquitaires avec des signatures retrouvées sur tous les sites terrestres et présentes, également, dans le microbiome humain. Notre vision de ces micro-organismes a peu à peu évolué d'extrémophiles microbiens exotiques à des organismes d'une importance universelle pour élucider les questions fondamentales posées par la biologie du vivant. Les Archées, ayant des mécanismes moléculaires originaux souvent proches des eucaryotes, sont donc maintenant considérées comme des modèles d'une importance universelle pour déchiffrer les mécanismes moléculaires fondamentaux de la biologie et pour étudier l'évolution de la vie sur terre.

Le métabolisme de l'ARN est un processus fondamental et conservé dans l'évolution (Clouet d'Orval et al., 2018). Il est la partie centrale la plus conservée de la physiologie cellulaire. Il implique l'ensemble des réactions centrés autour des interactions ARN-protéine et ARN-ARN englobant la transcription, la maturation et la modification des transcrits, la biogenèse des ribosomes, la traduction et la dégradation des ARN. Les ARN polymérasés, le ribosome, les ribonucléases et les hélicases à ARN sont au cœur de ces processus et sont conservés dans tous les royaumes du vivant. L'objectif de notre équipe est d'identifier et de caractériser les machineries de dégradation et de maturation des ARN chez les Archées (Clouet d'Orval et al., 2015).

Nos premières données proviennent de nos études phylogénomiques récentes et de la caractérisation biochimique de deux ribonucléases  $\beta$ -CASP, aCPSF1 (Phung et al., 2013) et de aRNase J (Clouet-d'Orval et al., 2010). De manière remarquable, nous avons établi que la ribonucléase aRNase J, et la protéine ASH-Ski2 de *P. abyssi* forment un complexe à l'interface des machineries de traduction et de transcription. L'interactome de ce complexe révèle une nouvelle ribonucléase putative, RecJ-SOD, spécifique des Archées.

Le projet de Master proposé consiste à caractériser les activités biochimiques de RecJ-SOD. L'étudiant devra produire et purifier la protéine recombinante RecJ-SOD, tester *in vitro* son activité ribonucléolytique et sa capacité de liaison aux acides nucléiques, et construire des variants invalidés dans les motifs conservés du core catalytique putatif DDH.

### Techniques :

Techniques classiques de biologie moléculaire pour construire des vecteurs exprimant des variant protéiques (mutagenèse dirigée)

Production des protéines recombinantes à partir du système d'expression pET dans *E. coli*, purification, des protéines à homogénéité par chromatographie d'affinité/gel filtration

Test de l'activité ribonucléolytique et de liaison aux acides avec des protocoles établis (Phung & Clouet d'Orval, 2015)

### Références:

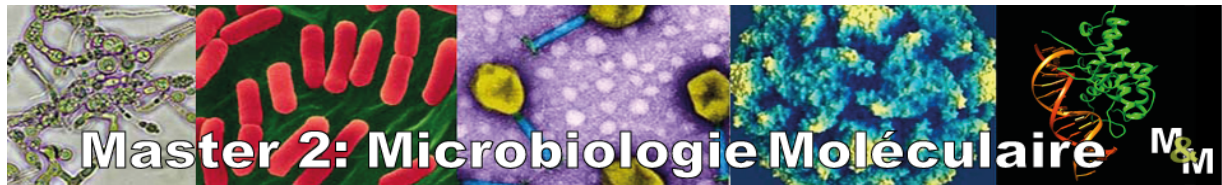
Clouet-d'Orval B., Batista M, Bouvier M., Quentin Y., Fichant G., Marchfelder A. & Maier L. Insights into RNA processing pathways and associated-RNA degrading enzymes in Archaea (2018) *K FEMS Microbiology Reviews*, fuy016, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy016>

Clouet-d'Orval B, Phung DK, Langendijk-Genevaux PS, Quentin Y (2015) Universal RNA-degrading enzymes in Archaea: Prevalence, activities and functions of beta-CASP ribonucleases. *Biochimie*

Clouet-d'Orval, B., D. Rinaldi, et al. (2010). "Euryarchaeal beta-CASP proteins with homology to bacterial RNase J Have 5'-to 3'-exoribonuclease activity." *J Biol Chem* **285**(23): 17574-17583.

Phung, D. K., D. Rinaldi, et al. (2013). "Archaeal beta-CASP ribonucleases of the aCPSF1 family are orthologs of the eukaryal CPSF-73 factor." *Nucleic Acids Res* **41**(2): 1091-1103.

Phung, D. K. and B. Clouet-d'Orval (2015). "Tips and Tricks to Probe the RNA-Degrading Activities of Hyperthermophilic Archaeal beta-CASP Ribonucleases." *Methods Mol Biol* **1259**: 453-466.



## SUJET N°14

**Laboratoire, équipe:** Organisation et dynamique nucléaire, LBME,

**Encadrant (nom, tel, mail):** Olivier Gadal, 0561335939, gadal@biotoul.fr

---

### Etude génétique de l'ARN Polymérase I de *Saccharomyces cerevisiae*

Ribosome biogenesis is the process leading to the production of the two mature ribosomal subunits responsible for the translation of mRNA into proteins. In eukaryotes, ribosome biogenesis is a process that requires more than 200 factors acting coordinately in time and space. It begins in the nucleolus, with the transcription of the rDNA by RNA Polymerase I and follows a complex assembly pathway leading to the release of mature subunits in the cytoplasm. Ribosome biogenesis is defective in several diseases called ribosomopathies. Thanks to the recent publications leading to the high resolution structure of Pol I (Engel et al., 2013; Fernandez-Tornero et al., 2013; Tafur et al., 2016), it is now possible to associate structural elements to specific domains of the enzyme like DNA interaction, RNA interaction and active site organization.

In the lab, we undergo a genetic screen to isolate specific mutants of RNA Pol I (Albert et al., 2011). We characterized several mutations localized at the interface between the two largest subunits of the enzyme.

This project should provide important functional insights on the RNA Pol I transcription and the comprehension of the synthesis of ribosomal RNA in the cell.

---

#### Techniques :

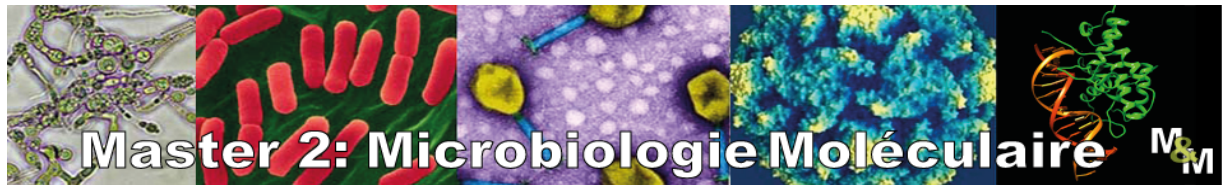
Yeast genetics, RNA biology (Northern-Blot, Pulse chase analysis)

---

#### Références (5 max) :

Darrière T, Pilsl M, Sarthou MK, Chauvier A, Genty T, Audibert S, Dez C, Léger-Silvestre I, Normand C, Henras AK, Kwapisz M, Calvo O, Fernández-Tornero C, Tschochner H, Gadal O. Genetic analyses led to the discovery of a super-active mutant of the RNA polymerase I. *PLoS Genet.* 2019 May 28;15(5) See also : <http://www.insb.cnrs.fr/fr/cnrsinfo/un-mutant-super-actif-de-larn-polymerase-dediee-la-synthese-des-ribosomes> Albert, B., Leger-Silvestre, I., Normand, C., Ostermaier, M.K., Perez-Fernandez, J., Panov, K.I., Zomerdijk, J.C., Schultz, P., and Gadal, O. (2011). RNA polymerase I-specific subunits promote polymerase clustering to enhance the rRNA gene transcription cycle. *J Cell Biol* 192, 277-293. Engel, C., Sainsbury, S., Cheung, A.C., Kostrewa, D., and Cramer, P. (2013). RNA polymerase I structure and transcription regulation. *Nature* 502, 650-655. Fernandez-Tornero, C., Moreno-Morcillo, M., Rashid, U.J., Taylor, N.M., Ruiz, F.M., Gruene, T., Legrand, P., Steuerwald, U., and Muller, C.W. (2013). Crystal structure of the 14-subunit RNA polymerase I. *Nature* 502, 644-649. Tafur, L., Sadian, Y., Hoffmann, N.A., Jakobi, A.J., Wetzels, R., Hagen, W.J., Sachse, C., and Müller, C.W. (2016). Molecular Structures of Transcribing RNA Polymerase I. *Mol Cell* 64, 1135-1143.





## SUJET N°15

---

**Laboratoire, équipe:** Toulouse Biotechnology Institute (TBI) anciennement LISBP

– EAD9 Symbiose

**Encadrant** (nom, tel, mail): Guillermina HERNANDEZ-RAQUET (05 61 55 99 77, [hernandg@insa-toulouse.fr](mailto:hernandg@insa-toulouse.fr)) et Emilie ALAUX ([ealaux@insa-toulouse.fr](mailto:ealaux@insa-toulouse.fr))

---

### Etude de la production des bioplastiques (polyhydroxyalcanoates) par des cultures mixtes microbiennes

Les matières plastiques produites à partir de carbone fossile sont largement utilisées du fait de leurs excellentes propriétés telles que leur durabilité et leur résistance aux dégradations. Cependant, ces plastiques non biodégradables s'accumulent dans l'environnement à une vitesse de 25 millions de tonnes par an.

Récemment, un intérêt croissant s'est porté vers le développement de polymères biodégradables. Parmi ces polymères, les Poly-Hydroxy-Alcanoates (PHAs) sont d'excellents candidats en tant que plastiques à la fois biosourcés et biodégradables, compatibles avec une gamme d'applications relativement large (améliorateur de propriété des polymères, fibres, textiles et films, adhésifs, emballages, prothèses, implants, fil de suture...).

Les PHAs sont déjà produits industriellement pour différentes applications. Cependant, leur coût élevé de production est un facteur limitant pour leur production à grande échelle. A l'heure actuelle, la production de PHA se fait principalement par des souches pures ce qui implique l'utilisation de conditions stériles et de substrats spécifiques. Une alternative à la production de PHA par des souches pures est l'utilisation de cultures mixtes telles que les boues activées. Cette alternative permettrait de travailler en conditions non stériles et d'utiliser une plus large gamme de sources de carbone, incluant des déchets, pour la production de bioplastiques.

**L'objectif** de cette étude est de connaître les conditions opératoires qui permettent de sélectionner des cultures mixtes microbiennes productrices de PHAs ainsi que la diversité fonctionnelle des microorganismes impliqués dans la production. L'objectif principal est de comprendre les interactions entre le substrat de production et les microorganismes producteurs sélectionnés.

**Moyens nécessaires à mettre en œuvre :**

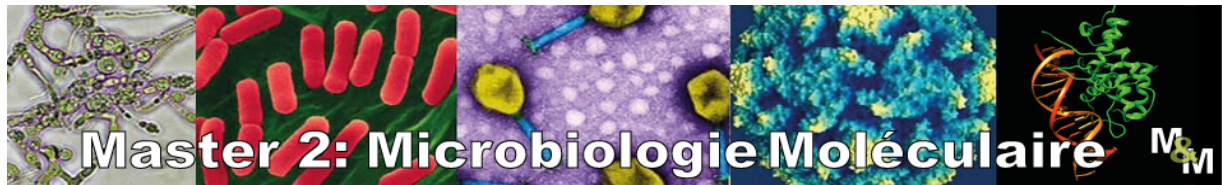
Bioréacteurs en mode fed batch et continu. Extraction ADN, ARN, analyse de la diversité, qPCR, séquençage.

---

**Techniques :**

**Le travail de recherche comprendra :**

- L'analyse en bioréacteurs de la production de PHA à partir de différents substrats
- L'analyse de la diversité microbienne au cours de la cinétique de production de PHA (qPCR-séquençage).
- L'analyse de la relation existant entre le substrat, les conditions opératoires et la diversité microbienne.



## SUJET N° 16

---

Laboratoire ou Unité d'accueil : LISM CNRS-UMR7255 (MARSEILLE)

Equipe d'accueil : Intitulé de l'équipe : Lipolyse et Pathogénie Bactérienne (Dr.

Stéphane Canaan) Nom de l'encadrant de l'équipe d'accueil : Dr. Magali

Casanova Tel : 04 91 16 40 93 ; e-mail : magali.casanova@univ-amu.fr ;

stephane.canaan@imm.cnrs.fr Site web : <http://tuberculosis->

[lbp.wixsite.com/tuberculosis-lbpteam](http://lbp.wixsite.com/tuberculosis-lbpteam)

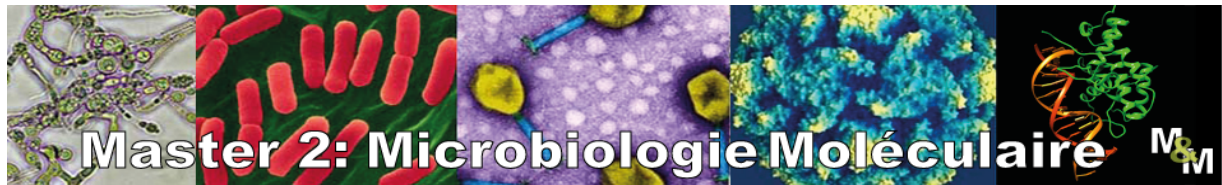
---

### Les peptides antimicrobiens comme nouvel outil thérapeutique contre les infections pulmonaires

Le traitement des infections dues à des mycobactéries (tuberculose ou infections opportunistes au cours de la mucoviscidose) est un réel problème de santé publique. En effet, aucun traitement n'est réellement satisfaisant en raison du coût, de la durée d'administration, de la toxicité et de l'apparition de plus en plus préoccupante de souches résistantes. Au laboratoire, des résultats préliminaires ont permis de montrer que des peptides antimicrobiens (PAM) seraient capables de bloquer la croissance *in vitro* de *Mycobacterium abscessus* mais également de *Pseudomonas aeruginosa*, une autre bactérie fréquemment associée à la mucoviscidose.

L'objectif de ce stage de Master 2 est de confirmer l'intérêt thérapeutique de ces PAM dans la lutte contre les infections pulmonaires liées à des mycobactéries. Pour cela, il est prévu d'évaluer leur efficacité thérapeutique à la fois sur des formes extracellulaires et intracellulaires de différentes espèces mycobactériennes, sensibles ou résistantes aux antibiotiques de référence, et en synergie ou non avec des molécules de référence. La cytotoxicité et l'activité hémolytique envers différentes cellules de mammifères seront également évaluées. Par la suite, il est prévu de produire, sous forme recombinante, à grande échelle et à moindre coût, les PAM les plus intéressants.

Mot clés: mycobactéries, peptides antimicrobiens, activité anti-infectieuse, cytotoxicité, clonages



## SUJET N° 17

---

Laboratoire ou Unité d'accueil : LISM CNRS-UMR7255 (MARSEILLE)  
Equipe d'accueil : Intitulé de l'équipe : Lipolyse et Pathogénie Bactérienne (Dr. Stéphane Canaan) Nom de l'encadrant de l'équipe d'accueil : Dr. Stéphane Canaan Tel : 04 91 16 40 93 ; e-mail : [stephane.canaan@imm.cnrs.fr](mailto:stephane.canaan@imm.cnrs.fr) Site web : <http://tuberculosis-lbp.wixsite.com/tuberculosis-lbpteam>

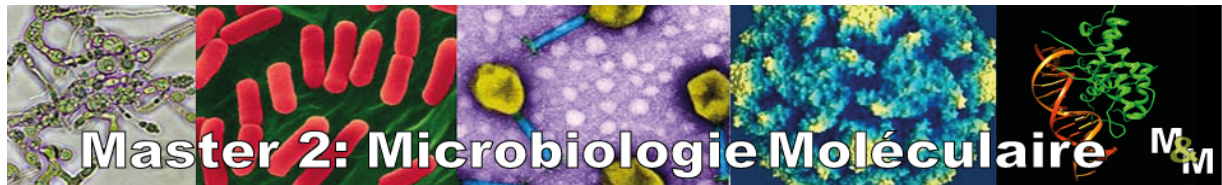
---

### Implication des enzymes lipolytiques eucaryotes dans le métabolisme des granules lipidiques par des approches de « Gene silencing »

La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse pulmonaire qui demeure à ce jour un problème de santé publique majeur. Cette dernière est principalement causée par l'espèce *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*), un pathogène intracellulaire capable de résister à différents mécanismes bactériolytiques mis en place par le système immunitaire, lui permettant ainsi de survivre au sein des cellules hôtes. Lors d'une infection, *M. tb* va persister au sein de macrophages dit « foamy », caractérisés par la présence de nombreuses granules lipidiques cytoplasmiques ou « Lipid Bodies (LB) ». Nous savons désormais que ces LB jouent un rôle essentiel dans le phénomène de persistance, en apportant une source d'énergie carbonée au bacille. Les mécanismes physiologiques de biogénèse et de dégradation des LB chez l'hôte demeurent à ce jour mal caractérisés et différentes enzymes lipolytiques eucaryotes semblent être impliquées dans ces phénomènes.

Afin d'étudier l'implication de ces enzymes dans la formation/dégradation des LB, nous proposons de réaliser des expériences de « gene silencing » par l'intermédiaire d'interférence à ARNm de type siRNA ou shRNA. Pour cela nous proposons de construire des plasmides permettant de bloquer les gènes codant pour les lipases de l'hôte, de mettre au point les conditions de transfection sur des lignées de macrophages au phénotype WT ou « foamy ». L'inhibition de production des différents ARNm d'intérêts au sein des macrophages pourra être vérifiée grâce à des études transcriptomiques (extraction des ARNm, qRT-PCR). Enfin la vérification de la présence de LB se fera grâce à des techniques de microscopie optique et/à fluorescence.

Mot clés : mycobactéries, lipases, biologie moléculaire, siRNA, culture cellulaire, fluorescence



## SUJET N° 18

**Laboratoire, équipe:** Regulation and Transport of Proteins across Cell Membranes (Group IEVA)( raffaele.ieva@ibcg.biotoul.fr)

**Encadrant** (Cécile Albenne, Anne Sarcos, Raffaele Ieva):

### Coordination of envelope biogenesis in bacteria: coupling of an essential outer membrane assembly machinery with envelope integrity factors.

Gram negative bacterial pathogens can survive a number of hostile conditions and successfully colonize their host thanks to at least two key features of their cellular envelope: i) the low permeability towards toxic compounds such as antibiotics and detergents; ii) the ability to efficiently form and remodel during the subsequent phases of the cell cycle and in response to environmental stresses (1,2). Distinct molecular machines build the three layers of the Gram-negative bacterial envelope, the inner membrane (IM), the peptidoglycan (PG) and the outer membrane (OM). By using a quantitative mass-spectrometry-based interactomic approach we have started to uncover a large network of protein interactions necessary to coordinate the development of the three envelope layers of *Escherichia coli*. We have discovered an unexpected protein crosstalk that coordinates OM biogenesis by the beta-barrel assembly machinery (BAM complex) with septal peptidoglycan hydrolysis during a late step of cell division (3).

Further BAM interactors include envelope proteins of unknown function. The M2 internship student will use both genetic and biochemical assays to investigate the role of BAM interacting factors during outer membrane biogenesis and remodeling. These methodologies include: a CRISPR-silencing approach to identify synthetic genetic interactions, phylogenetic analysis on complete proteobacterial genomes to identify evolutionary conserved protein motifs, site directed mutagenesis to identify protein functional domains, protein purification and reconstitution of native complexes in proteoliposomes to monitor BAM activity.

We expect to obtain insights into the mechanisms that coordinate the activity of multiple envelope biogenesis and remodeling machineries. Our results will help designing new pharmacological strategies to cure infectious diseases. The M2 student will integrate a young and dynamic group of the CBI/LMGM.

**Techniques :** CRISPR-base gene silencing screen; *E. coli* mutagenesis; Epifluorescence microscopy; Phylogenetic analysis of protein motifs; Protein mutagenesis; Site-directed photocrosslinking; *In vivo* protein proximity assays; Native protein immunoprecipitation; protein purification by affinity chromatography; Reconstitution of native complexes in proteoliposomes; Analyses of protein complexes by differential scanning fluorimetry, isothermal titration calorimetry, multi-angle laser light scattering.

#### Références:

- 1) Ranava D, Caumont-Sarcos A, Albenne C, Ieva R. Bacterial machineries for the assembly of membrane-embedded  $\beta$ -barrel proteins. *FEMS Microbiol Lett.* 2018;365.
- 2) Egan AJF. Bacterial outer membrane constriction. *Mol Microbiol.* 2018;107:676-687.
- 3) Ranava D, Orenday L, Yang Y, Turlan C, Rousset F, Cui L, Sarcos A, Albenne C, Bikard D, Ieva R. YraP promotes envelope integrity by linking the beta-barrel assembly machinery and the cytokinesis apparatus of *Escherichia coli*. *In preparation.*