

**Altérocine, protéine anti-biofilm :**  
**Étude des relations séquence-activité et de sa structure**  
**(Acronyme : ALTESS)**

**Unités de recherche :**

Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM), EMR CNRS 6076, Université Bretagne-Sud, CS7030, 56321 Lorient Cédex

Centre de Biophysique Moléculaire (CBM), CNRS UPR 4301, Rue Charles SADRON, CS80054, 45071 ORLEANS cedex 02

La thèse aura lieu dans les deux unités de recherche, avec un début à Lorient et une poursuite à Orléans (au moins un an dans chaque unité, hors période de rédaction du manuscrit de thèse).

**Encadrement :**

Co-directeurs : Pr. Alain Dufour (LBCM) ; Dr. Céline Landon (CBM)

Co-encadrants : Dr. Sophie Rodrigues, Dr. Clément Offret, Dr. Alexis Bazire (LBCM) ; Mélanie Chenon, Dr. Stéphane Charpentier, Dr. Laurence Jouvensal, Dr. Vincent Aucagne (CBM).

Contact : Alain Dufour : [alain.dufour@univ-ubs.fr](mailto:alain.dufour@univ-ubs.fr)

**Contexte, objectifs et intérêts scientifiques :**

La bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 est étudiée au LBCM du fait de son activité antibiofilm. Cette activité est due à une protéine sécrétée, nommée altérocine, dont nous avons identifié le gène *alt* (Jouault et al. 2020. Appl Environ Microbiol 86, e00893-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00893-20>). L'originalité de l'altérocine est qu'elle est dénuée d'activité bactéricide ou bactériostatique vis-à-vis des bactéries planctoniques et qu'elle agit donc spécifiquement sur les biofilms. Elle prévient la formation de biofilm d'un large spectre de bactéries, dont des pathogènes pour l'Homme ou des animaux. Aucune protéine apparentée à l'altérocine n'a jamais été étudiée, mais il en existe des variants naturels dans les bases de données puisqu'environ 30% des génomes de *Pseudoalteromonas* contiennent un gène *alt* codant pour une protéine similaire à l'altérocine de la souche 3J6. La comparaison des séquences en acides aminés montre que la partie C-terminale de l'altérocine est très conservée contrairement à sa partie N-terminale. L'altérocine (119 acides aminés, 13 kDa) contient 4 cystéines conservées à 100% qui pourraient former des ponts disulfure. Ce projet de thèse a pour objectif général de comprendre le fonctionnement de l'altérocine en étudiant les relations entre sa séquence en acides aminés et son activité, en déterminant sa structure tridimensionnelle et en recherchant ses cibles moléculaires. Les tâches du projet seront les suivantes (les tâches 1 et 2 sont en cours, le (la) doctorant(e) devra les finaliser, et réalisera l'essentiel des tâches 3 à 6) :

1. Comparer les niveaux d'activité de variants naturels de l'altérocine et de variants obtenus par mutagenèse dirigée (la construction de ces variants est en cours), afin d'étudier la relation séquence-activité et d'examiner s'il est possible de tronquer la partie N-terminale variable tout en conservant son activité. L'altérocine naturelle la plus active et éventuellement une forme tronquée active seront retenues pour la suite des travaux. [LBCM]

2. Améliorer la production d'altérocine par des souches de *Pseudoalteromonas* sauvages et recombinantes et purifier à homogénéité l'altérocine et ses variants. [LBCM]
3. Mettre au point la production d'altérocine dans un système hétérologue approprié, en s'appuyant sur l'expertise au CBM de production de protéines riches en ponts disulfure. [CBM]
4. Comparer l'altérocine recombinante à l'altérocine naturelle, notamment en terme d'activité. [LBCM]
5. Adapter le protocole de production hétérologue de l'altérocine pour permettre son marquage 15N et 13C et déterminer sa structure 3D par RMN. [CBM]
6. S'appuyer sur l'expertise au CBM dans les modifications chimiques sélectives de protéines recombinantes pour proposer l'introduction de sondes originales utiles à l'exploration fine du mécanisme d'action. [CBM et LBCM]

Les tâches décrites ci-dessus apporteront de nouvelles connaissances fondamentales sur le fonctionnement de l'altérocine, qui seront essentielles pour appréhender son mode d'action et envisager des applications dans différents domaines (médical, aquaculture, ...). Ces résultats seront publiés dans des journaux scientifiques internationaux à comité de lecture et feront l'objet de communications dans les congrès nationaux et internationaux.

#### **Résumé du projet :**

L'altérocine, protéine sécrétée par la bactérie *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, possède l'originalité de prévenir la formation de biofilms bactériens tout en étant dénuée d'activité bactéricide vis-à-vis de bactéries planctoniques. Le gène *alt* codant l'altérocine a été identifié au LBCM. Aucune protéine apparentée à l'altérocine n'a jamais été étudiée, mais il en existe des variants naturels, 30% des génomes séquencés de *Pseudoalteromonas* portant des gènes similaires au gène *alt*. L'altérocine contient 4 cystéines susceptibles de former des ponts disulfure déterminants pour son activité. Dans ce projet, le LBCM (Université Bretagne Sud, Lorient) et le CBM (Orléans) mettront en commun leurs expertises complémentaires pour initier une collaboration inter-disciplinaire visant à étudier les relations entre la séquence de l'altérocine et son activité, à déterminer sa structure 3D et à rechercher ses cibles. Les résultats seront essentiels au niveau fondamental pour appréhender le mode d'action de l'altérocine, et pour envisager des applications dans différents domaines.

#### **Partenariat :**

Il s'agit d'une nouvelle collaboration entre le LBCM (EMR 6076, INEE) et le CBM (UPR 4301, INC). Le LBCM apporte le modèle altérocine et son expertise dans l'étude des biofilms bactériens (culture des biofilms, tests d'activité anti-biofilm), en microbiologie (culture et transformation de *Pseudoalteromonas*, utilisation de souches cliniques de *P. aeruginosa*), biologie moléculaire (mutagenèse dirigée), biochimie (purification de protéines). Le CBM est parfaitement complémentaire puisqu'il apporte au projet des expertises dans les domaines de la production de protéines riches en ponts disulfure, de la détermination de structures tridimensionnelles de protéines par RMN, et de la création de modifications chimiques sélectives dans des protéines recombinantes.