

## 1. le titre :

Biosynthèse et régulation de l'expression des cyclolipopeptides produits par *Pseudoalteromonas* hCg-6

## 2. l'unité de recherche et éventuellement l'équipe d'accueil

Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (EA 3884) – IUEM

## 3. l'encadrement, et le contact pour les candidats qui souhaitent des informations

Directeur de thèse : <b>Y. Fleury</b> (40%)	yannick.fleury@univ-brest.fr	tel 02.98.64.19.35
Co-directeur de thèse : <b>A. Bazire</b> (30%)	alexis.bazire@univ-ubs.fr	tel 02.97.87.45.91
Co-encadrant de thèse : <b>B. Brilllet</b> (30%)	benjamin.brillet@univ-brest.fr	tel 02.98.90.85.57

## 4. Vos coordonnées :

Yannick Fleury yannick.fleury@univ-brest.fr  
Laboratoire de Biotechnologie et de Chimie Marines (LBCM), EA 3884 tel 02.98.64.19.35  
Bâtiment G, IUT, 6 rue de l'Université, 29 000 Quimper

## 5. Contexte, intérêts scientifiques et objectifs

La souche *Pseudoalteromonas* hCg-6 a été isolée d'hémolymphes de l'huitre creuse, *Crassostrea gigas*, pour des activités antibactériennes. Elle produit une nouvelle famille de cyclolipopeptides (CLPs) présentant des activités antibactériennes puissantes (Brevet WO2014187993). Ces CLPs présentent une structure originale composée d'un cycle peptidique cationique contenant des résidus exotiques (Dab, Dhb et  $\beta$  HO-Dab), lié à une chaîne hydrocarbonnée variant en longueur, hydroxylation et insaturation. Seuls les CLP de *Pseudoalteromonas* possèdent le monomère  $\beta$ -HO-Dab.

Un groupe de 36 Coding DNA Sequences (CDS) semble responsable de la biosynthèse des CLPs. Deux CDS codent potentiellement des Non Ribosomal Peptide Synthetases (NRPS). L'analyse bioinformatique des 2 NRPS putatives révèle que :

- (i) les acides aminés incorporés sont de configuration (*L*),
- (ii) le premier domaine d'adénylation présente une séquence caractéristique indiquant la liaison d'un acide gras, et
- (iii) leurs domaines d'adénylation impliqués dans la sélection des acides aminés correspondent à la séquence des CLPs.

Les autres CDS situés en amont et en aval des 2 NRPS ont été également analysés pour définir les enzymes impliquées dans la biosynthèse des monomères exotiques composant les CLPs. Les analyses bioinformatiques montrent que :

- (i) deux CDS situés en amont des NRPS codent des protéines présentant des homologies de séquences avec les enzymes impliquées dans la biosynthèse d'un des acides aminés exotiques, la Dab et
- (ii) deux autres CDS participeraient à la synthèse de 3  $\beta$  HO-Dab par hydroxylation de la Dab.

Le projet de thèse « Biosynthèse et Régulation de l'Expression des CLP de *Pseudoalteromonas* hCg-6 » (BREx6) est consacré à l'analyse fonctionnelle des CDS impliquées dans la biosynthèse des CLPs et sa régulation. Il est articulé en 3 étapes indépendantes qui pourront être menées simultanément.

**- (i) dissection moléculaire des 2 NRPS impliquées dans la biosynthèse des CLP :**

La dissection fonctionnelle du système NRPS impliqué dans la production des CLP sera menée par différentes approches moléculaires. La fonction des différents modules sera également établie, en suivant une stratégie d'expression en système hétérologue.

**- (ii) caractérisation des enzymes responsables de la biosynthèse des  $\beta$ HO-Dab,**

La validation des activités hydroxylases des protéines identifiées est en cours à l'aide protéines recombinantes exprimées chez *E. coli*. Des analyses de LC/MS seront menées pour contrôler l'activité enzymatique dont les conditions d'activité optimales et les paramètres cinétiques seront définis.

**- (iii) élucidation des mécanismes de régulation de la production de CLP :**

Les conditions de culture de la souche hCg-6, notamment la température, influencent la production de CLP. Des analyses génomiques devront donc être entreprises pour identifier le(s) système(s) de régulation mis en jeux.

Le projet BREx-6 comporte donc à la fois un intérêt fondamental (écologie chimique, régulation et biosynthèse de peptides non-ribosomiaux des bactéries marines) mais également un important potentiel biotechnologique (renouvellement des antibiotiques en médecine humaine ou vétérinaire, production d'un nouveau monomère exotique pour la synthèse peptidique en phase solide). Par ailleurs, ce projet permettra d'identifier de nouveaux peptides non ribosomiaux contenant la  $\beta$ HO-Dab par exploration de génomes et d'étudier leurs activités biologiques après synthèse en phase solide.

## **6. Résumé du projet :**

Le foisonnement de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques entraîne des impasses thérapeutiques acculant les praticiens hospitaliers à ressusciter d'anciens antibiotiques tels que la colistine. Nous avons caractérisé une famille originale de cyclolipopeptides (CLP) produite par une bactérie marine du genre *Pseudoalteromonas* (Brevet WO2014187993). Ces CLP exercent une activité bactéricide puissante sur les bactéries à Gram négatif. Ils diffèrent par la nature de la chaîne hydrocarbonée liée à un cycle peptidique identique. Ce dernier contient des résidus d'acides exotiques, dont l'acide  $\beta$  hydroxy diamino butyrique ( $\beta$  HO-Dab) uniquement décrit dans ces CLP. Un système putatif de biosynthèse des CLP a été identifié, par analyse bioinformatique, incluant deux méga-enzymes de type Non Ribosomal Peptide Synthetase (NRPS) et des protéines impliquées dans la voie de biosynthèse des monomères exotiques, le transport membranaire ou la régulation de la production.

Les objectifs de ce projet sont de (i) valider et conduire la dissection moléculaire des 2 NRPS impliquées dans la biosynthèse des CLP, (ii) caractériser les enzymes responsables de la biosynthèse des  $\beta$  HO-Dab, (iii) élucider des mécanismes de régulation de la production de CLP et enfin (iv) établir la prévalence de ces résidus exotiques dans les métabolomes des bactéries marines par analyse de génome. Ce projet comporte à la fois un intérêt fondamental (biosynthèse de peptides non ribosomiaux et d'acides aminés exotiques) et des potentialités d'applications importantes (nouveaux antibiotiques et monomères non-usuels).

## **7. Partenariat, éventuellement international :**

Ce projet de thèse sera mené en collaboration avec l'équipe MDCEM « **Molécules de défense et de communication dans les écosystèmes microbiens** » de l'UMR 7245 CNRS/MNHN (Paris).