



Projet de thèse : Rôle des vésicules membranaires dans le dialogue moléculaire entre probiotique, hôte et son microbiote intestinal.

Lieu de travail : Equipe Valmis, UMR PAM, Dijon, France.

Champs scientifiques : Interactions Hôte-Microorganismes, Microbiologie, Biologie cellulaire.

Mots clés : Vésicules membranaires, Biofilm, Microbiote intestinal, Probiotique, Epithélium intestinal.

Directeur de thèse HDR : Dr. Aurélie Rieu.

Co-directeur de thèse : Dr. Pierre Lapaquette.

Financement : contrat doctoral des universités

RESUME DU PROJET :

Le microbiote intestinal est au cœur de nombreuses recherches et applications en raison des rôles fondamentaux qu'il joue dans l'homéostasie de notre corps. De nombreuses pathologies (métaboliques, immunitaires ou bien encore tumorales) sont associées à des perturbations du microbiote intestinal, nécessitant le développement d'interventions thérapeutiques et/ou nutritionnelles capables de moduler positivement cet écosystème complexe. Dans ce contexte, les lactobacilles sont des bactéries non pathogènes, largement utilisées pour la production d'aliments fermentés et valorisées pour leurs effets bénéfiques en tant que probiotiques. Cette activité probiotique est souche spécifique et se caractérise par exemple par une inhibition des agents pathogènes, un renforcement de la barrière intestinale, ou bien encore la modulation du métabolisme et des réponses immunitaires de l'hôte. L'ensemble de ces actions peuvent permettre de moduler le microbiote intestinal résident et ainsi agir sur des pathologies liées à des dysbioses. Toutefois, les mécanismes de communication entre les bactéries probiotiques, le microbiote résident et l'hôte sont complexes et constituent un domaine de recherche en pleine expansion actuellement. Des études récentes ont révélé que les lactobacilles peuvent libérer dans le milieu extracellulaire des vésicules membranaires (MVs) et que celles-ci modulent l'activité des cellules immunitaires de l'hôte. Un travail récent

au sein de l'UMR PAM (équipe VALMIS) démontre une activité anti-biofilm des vésicules produites par la souche de *Lacticaseibacillus casei* BL23 contre des bactéries pathogènes (*Salmonella* et *Staphylococcus*). **Notre projet consiste (i)** à caractériser les MVs produites par les lactobacilles en condition de culture planctonique ou biofilm, **(ii)** à déterminer le rôle des MVs dans les différentes étapes de la formation de biofilm des lactobacilles et **(iii)** à élucider les effets des MVs produites par des lactobacilles sur des biofilms microbiens complexes tels que le microbiote associé à la muqueuse intestinale.

DESCRIPTIF DETAILLE DU PROJET :

Le microbiote intestinal est au cœur de nombreuses recherches et applications en raison des rôles fondamentaux qu'il joue dans l'homéostasie de notre corps. De nombreuses pathologies (métaboliques, immunitaires ou bien encore tumorales) sont associées à des perturbations du microbiote intestinal, nécessitant le développement d'interventions thérapeutiques et/ou nutritionnelles afin de moduler positivement cet écosystème complexe. Dans ce contexte, les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif largement utilisées depuis des siècles pour la production d'aliments fermentés (Makarova et al., 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103:15611-15616 ; Stiles et al., 1997, Int. J. Food Microbiol. 36:1-29) et étudiées/valorisées de nos jours pour leurs effets bénéfiques comme probiotiques (Kim et al., 2006, Microbes Infect. 8:994-1005 ; Dobrogosz et al., 2010, Adv. Appl. Microbiol. 72:1-41). Ces activités, qui sont spécifiques de certaines souches, se caractérisent par exemple par l'inhibition de la prolifération des agents pathogènes, le renforcement de la barrière intestinale, ou bien encore la modulation du métabolisme et des réponses immunitaires de l'hôte (Sanders et al., 2019, Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 16:605-616). Au niveau intestinal, les bactéries probiotiques se retrouvent en étroite interaction avec le microbiote résident, constitué majoritairement de bactéries mais également d'eucaryotes unicellulaires, d'archaeobactéries et de virus. L'ensemble de ces microorganismes forme un véritable écosystème, souvent considéré comme un biofilm protecteur, qui établit un dialogue permanent avec la muqueuse intestinale. Ce microbiote agit également comme un filtre biologique, modulant la biodisponibilité des nutriments et autres métabolites pour l'hôte. Les mécanismes de communication entre les bactéries probiotiques, le microbiote résident et l'hôte sont complexes et restent à définir de manière plus approfondie. Des études récentes, ainsi que des travaux de notre laboratoire, ont révélé que les lactobacilles peuvent libérer dans le milieu extracellulaire des vésicules membranaires (MV) (Dean et al., 2019, Sci Rep. 8:877). Une fois libérées, ces MVs se trouvent intégrées à la matrice des biofilms et peuvent moduler les activités des cellules immunitaires de l'hôte et celles du microbiote intestinal. En se basant sur cette littérature solide et des résultats de notre équipe, **nous proposons un projet de recherche innovant qui vise à décortiquer les mécanismes de communication entre les bactéries probiotiques, le microbiote résident et l'hôte, avec un focus particulier sur les interactions au sein des communautés microbiennes vivant en biofilm et l'implication des MVs comme médiateurs de ces interactions.**

Les MVs sont des structures lipidiques de 20 à 500 nm de diamètre contenant diverses macromolécules, telles que des phospholipides, des protéines, des lipopolysaccharides (LPS) et des acides nucléiques (Brown et al., 2015, Nat. Rev. Microbiol. 13:620-630). Elles représentent ainsi potentiellement des organelles de transport et de communication importantes au sein des communautés microbiennes. Les MVs produites par les bactéries participent à une multitude de rôles physiologiques comme la communication inter ou intra-espèces, le développement du biofilm, l'attaque des phages, le transfert horizontal des gènes et la virulence pour les bactéries pathogènes (Ellis et al., 2010, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 74:81-94). Les mécanismes de biogénèse ainsi que les rôles des MVs libérées par les bactéries à Gram positif, comme les lactobacilles, restent encore peu décrits dans la littérature, contrairement aux bactéries à Gram négatif qui représentent la majorité du travail de recherche sur les vésicules bactériennes. Néanmoins, une littérature croissante décrit et caractérise la production de MVs par les lactobacilles et a mis en évidence des rôles immunomodulateurs de ces MVs sur l'hôte (Mata Forsberg et al., 2019, Sci. Rep. 9: 17109 ; Molina-Tijeras et al., 2019, Nutrients 11). Un travail récent de l'équipe VAIMiS (UMR PAM) démontre que des MVs produites par la souche de *Lacticaseibacillus casei* BL23 présente une forte activité anti-biofilm contre des bactéries pathogènes comme par exemple celles appartenant aux genres *Salmonella* et *Staphylococcus*. A ce jour, les mécanismes moléculaires mis en jeu ne sont pas connus.

Le sujet de thèse que nous proposons sera de nature interdisciplinaire en combinant des approches de microbiologie moléculaire, de physiologie bactérienne, de biologie cellulaire avec l'utilisation de techniques d'imagerie, de microscopie et de méthodes biophysiques. Le doctorant devra réaliser ses travaux de recherche au sein de l'UMR PAM (équipe VAIMiS) et bénéficiera d'une formation à la recherche sur un sujet extrêmement porteur pouvant déboucher sur des valorisations aussi bien fondamentales qu'appliquées (sécurité microbiologie ou agroalimentaire). Des collaborations nationales et internationales de l'équipe d'accueil avec des laboratoires de référence ainsi que l'adossé à des plateaux techniques locaux (imagerie, protéomique) assureront un environnement propice à la réussite du travail de recherche du doctorant.

Concernant le programme de recherche, les lactobacilles (collection de souches disponibles au laboratoire) seront étudiés comme bactéries modèles pour explorer au niveau moléculaire les aspects fondamentaux d'interaction des MVs avec l'hôte et les communautés microbiennes associées.

Le projet se compose de 3 parties complémentaires :

- La caractérisation et la comparaison des MVs produites par les lactobacilles en condition de culture planctonique ou biofilm. Pour cela, les MVs seront purifiées à partir du surnageant de culture (planctonique) ou de la matrice du biofilm et seront caractérisées au niveau de leur taille, de leur concentration et de leur composition (protéique et lipidique). Une combinaison de différentes approches (AFM : Atomic Force Microscopy, TEM : Transmission Electron Microscopy, SEM : Scanning Electron Microscopy, NTA : Nanoparticle Tracking Analysis, Confocal Microscopy) sera utilisée afin d'observer, de dénombrer et de mesurer les MVs purifiées à l'aide d'un protocole déjà mis en place au laboratoire.

- La détermination du rôle des MVs dans les différentes étapes de la formation de biofilm des lactobacilles. Notre équipe dispose de l'ensemble des outils et méthodologies pour caractériser la formation des biofilms de lactobacilles par des méthodes biochimiques et d'imagerie (fluorescence et électronique). L'utilisation de mutants pour des gènes impliqués dans la biogenèse des MVs permettra de définir l'implication de ces organelles dans le développement du biofilm. De plus, nous générerons des souches modifiées génétiquement pour produire des MVs traçables en microscopie à fluorescence afin de visualiser la dynamique de diffusion de ces MVs dans le biofilm.

- La compréhension des effets des MVs produites par des lactobacilles sur des biofilms microbiens d'autres espèces (mono et multi-espèces) ou en condition in vivo (microbiote résident d'organismes modèles : souris et poissons zèbres). Les résultats préliminaires générés au laboratoire suggèrent en effet que ces MVs pourraient avoir des impacts forts sur les communautés microbiennes organisées en biofilm.

En conclusion, ce projet de thèse, se basant sur des premiers résultats solides du laboratoire et des méthodologies maîtrisées, sera réalisable sur trois années et devrait permettre une valorisation importante des résultats obtenus compte tenu de l'originalité des connaissances qui seront apportées.

PROFIL DU CANDIDAT :

Afin d'aborder dans les meilleurs conditions ce projet de thèse, le candidat recherché devra dans l'idéal avoir des connaissances et compétences sur les méthodes suivantes :

- culture bactérienne planctonique et biofilm.
- les techniques d'imagerie, en particulier l'imagerie à fluorescence.
- les techniques d'étude de l'expression de gènes (PCR quantitative).
- les techniques d'étude de protéines (gel de protéines, Western blotting, ect...).
- la culture de cellules (lignées cellulaires).

Bien entendu, il n'est pas rédhibitoire pour un candidat de ne pas disposer déjà de l'ensemble de ces compétences, mais la multidisciplinarité de ce projet nécessitera de sa part d'être ouvert aux échanges pluridisciplinaires afin de se former à de nouvelles compétences et interagir avec les collaborateurs qui seront associés à ce projet.

Le candidat devra savoir travailler en équipe, être rigoureux dans son travail, présenter de bonnes capacités de communication et de rédaction, avoir un esprit critique et être force de proposition dans le développement de son projet de recherche.

CANDIDATURE ET DEMANDE D'INFORMATIONS :

Envoi d'un CV détaillé à :

Aurélié Rieu : aurelie.rieu@u-bourgogne.fr

Pierre Lapaquette : pierre.lapaquette@u-bourgogne.fr

Envoi d'un dossier de candidature à l'école doctorale Environnements-Santé à Dijon
(<https://e2s.ubfc.fr/>)