

Proposition d'un projet de thèse dans l'équipe AIME en vue du concours d'attribution des contrats doctoraux (détails disponibles au lien : <http://ed.vie-sante.unistra.fr/concours-dattribution-des-contrats-doctoraux/concours-dattribution-des-contrats-doctoraux/>)

Nom du Directeur de thèse : BRINGEL Françoise (DR CNRS)

Nom du co-encadrant : NADALIG Thierry (MCF UNISTRA)

Responsable d'équipe : VUILLEUMIER Stéphane (Pr. UNISTRA)

Titre : **Dégradation du chlorométhane au sein du microbiome de la phyllosphère**

Résumé :

Le chlorométhane (CH₃Cl, CM) est le composé organique chloré le plus abondant dans l'atmosphère. Il est responsable de la destruction de 16% de la couche d'ozone catalysée par des radicaux halogénés (4). Il est majoritairement d'origine naturelle et émis par les plantes. Des bactéries capables d'utiliser le CM comme seule source de carbone et d'énergie pour leur croissance ont été isolées à partir de feuilles de plantes (6). Ainsi, les bactéries CM-dégradantes au sein des microbiomes associées à la phyllosphère (i. e. la partie aérienne des plantes) pourraient contribuer à contrôler les émissions de CM vers l'atmosphère (1).

L'objectif principal du projet de thèse est d'identifier la diversité des voies métaboliques et des bactéries impliquées dans la dégradation du CM au niveau de la phyllosphère. A ce jour, la seule voie caractérisée en détail est la voie aérobie *cmu* (pour « CM Utilisation ») qui permet à des bactéries méthylophiles capables de croître sur des composés en C₁ de pousser avec le CM (5,9,10). La déchloration du CM nécessite l'expression du gène *cmuA* (10). C'est un gène signature pour la détection de communautés bactériennes CM-déchlorantes dans l'environnement (6). Récemment, l'équipe d'accueil a toutefois démontré l'existence d'une voie de dégradation du CM alternative à la voie *cmu* à l'aide d'outil de chimie isotopique et de génomique comparative (7).

Le projet de thèse propose de caractériser la diversité bactérienne (les taxons, les voies de dégradation, les gènes) de la dégradation du CM du microbiome de la phyllosphère de différentes plantes. On cherchera à corréliser les ratios du fractionnement isotopique du carbone ou de l'hydrogène lors de la dégradation du CM à l'occurrence de communautés bactériennes déchlorantes de différentes phyllosphère. La diversité taxonomique sera évaluée à partir de produits PCR ciblant les gènes 16 S RNA, dont les séquences seront comparées à des banques de données de référence (2). En parallèle, l'abondance et la diversité du gène *cmuA* seront évaluées par qPCR (3) et par séquençage de produits PCR ciblant le gène *cmuA*. L'ensemble de ces données permettra d'établir un premier inventaire du potentiel de biodégradation du CM associé à diverses sources biogéniques.

A la suite de ce travail (prévu pour la première année de thèse), le répertoire génétique des communautés microbiennes actives dans l'assimilation de CM sera établi par une approche dite de « stable isotope probing » (8) pour un microbiome de phyllosphère choisi. Pour ce faire, on utilisera du CM marqué au C¹³. Lorsque ce carbone sera assimilé par des microorganismes, l'ADN métagénomique correspondant sera enrichi en C¹³, et pourra être séparé de l'ADN léger par ultracentrifugation, amplifié par « multi-displacement amplification » (8) puis séquencé par une méthode à haut-débit de type HiSeq Illumina. Pour faciliter l'identification des gènes associés aux communautés bactériennes actives dans la dégradation du CM, 3 conditions de marquage au C¹³ seront testées avec soit du CM ou du méthanol (un autre composé en C₁ produit par les plantes), soit une combinaison de CM marqué et de méthanol non marqué. Ces approches culture-

indépendantes auront pour objectif de permettre la découverte de voies métaboliques du CM différentes de la voie *cmu*. Ces travaux fourniront une meilleure connaissance des communautés bactériennes de la phyllosphère contribuant ainsi à la compréhension des processus contrôlant les flux de CM de la phyllosphère vers l'atmosphère.

- (1) Bringel & Couée 2015 Front Microbiol 6:486
- (2) Copeland et al 2015 Mol Plant Microbe Interact 28:274
- (3) Fahran Ul Haque et al 2013 App. Environ Microbiol 79:6561
- (4) Keppeler et al 2005 Atmos Chem Phys 5:2403
- (5) Marx et al 2012 J Bacteriol 194:4746
- (6) Nadalig et al 2011 FEMS Microbiol Eco 77:438-448
- (7) Nadalig et al 2014 Front Microbiol 5:523
- (8) Neufeld et al 2008 Environ Microbiol 10:1526
- (9) Roselli et al 2013 Plos One 8:e56598
- (10) Vannelli et al 1999 PNAS USA 96:4615

Pour postuler :

Merci d'adresser votre candidature par mail (lettre de motivation, CV, notes de Master 1 et Master 2 et rangs de classement) avant le 15 mai 2016 à l'un des contacts ci-dessous.

Contacts :

francoise.bringel@unistra.fr (Téléphone : 03 68 85 18 15)

nadalig@unistra.fr (Téléphone : 03 68 85 19 73)

vuilleumier@unistra.fr (Téléphone : 03 68 85 20 22)

PhD project proposed by the AIME team for a candidate willing to compete for University fellowship Holders of a degree different from the Master's degree of a French University must submit an exemption request to the Doctoral School before May 18th, 2015. Details available at: <http://ed.vie-sante.unistra.fr/en/research-awards/competition-for-university-fellowships/>

Supervisor: BRINGEL Françoise

Co-supervisor: NADALIG Thierry

Group leader: VUILLEUMIER Stéphane

Title: **Chloromethane degradation within the microbiome of the phyllosphere**

Abstract:

Chloromethane (CH₃Cl, CM) is the most abundant chlorinated organic compound in the atmosphere and is responsible for 16% of the halogen-catalysed destruction of the ozone layer (4). CM is mainly emitted from natural terrestrial sources such as plants, and bacteria growing with CM as the sole carbon and energy source have been isolated from plant leaves (6). CM-utilizing microbes in the phyllosphere (i.e. the above-ground parts of plants) are likely to play a role in controlling CM plant emissions to the atmosphere (1).

The proposed PhD project will detect and characterize bacterial degradation pathways of CM in the phyllosphere. The only chloromethane utilization pathway described in detail so far is the *cmu* (CM Utilization) pathway that enables aerobic methylotrophic bacteria growing with C1 compounds to utilize CM as the unique source of carbon and energy (5,9,10). CM dehalogenation requires expression of the *cmuA* gene (10), and this gene has been used as a biomarker for CM degradation in environmental samples (6). Recently, our team discovered another previously uncharacterized CM-degrading pathway independent of *cmuA*, using isotopic chemistry coupled with comparative genomics (7).

The PhD project will characterize the bacterial diversity (taxons, metabolic pathways, genes) in the degradation of CM in different phyllosphere-associated microbiomes. Comparison of CM isotopic signatures of phyllosphere CM-degrading communities with carbon (C) and hydrogen (H) with those of pure strains (7) will be performed to evaluate the relevance of the *cmu* pathway in the phyllosphere environment under ambient concentrations of CM. Taxonomic characterization and profiling of bacterial communities will be performed by high throughput sequencing of a 16S rRNA gene amplicon (2). Obtained sequences will be phylogenetically assigned by comparison to sequence databases. Alpha diversity of *cmu*-pathway CM-degrading microorganisms will be defined by qPCR of the *cmuA* gene (3) and high throughput metagenome shotgun sequencing. This will establish a first inventory of *cmu*-pathway associated CM degradation potential associated with biogenic sources of CM.

After analysis of the results obtained in the first year, phyllosphere-associated microbes able to assimilate CM will be assessed for one selected plant using DNA stable isotope probing (8). [¹³C]-labelled metagenomic DNA of active bacterial subpopulations in planta will be isolated by ultracentrifugation, amplified by multi-displacement amplification (8) and sequenced by HiSeq Illumina to reveal frequently [¹³C]-labelled genes and provide the basis for taxonomic analysis and detection of CM-associated biochemical pathways. Three sets of [¹³C]-labelling conditions will be investigated in parallel, i.e. [¹³C]-CH₃Cl or [¹³C]-CH₃OH (methanol, a commonly encountered C1 compound in the phyllosphere) alone, and [¹³C]-CH₃Cl together with [¹³C]-CH₃OH, to allow comparative analysis of CM-degrading abilities of methylotrophic communities. A goal of the performed ¹³C-labelled metagenome analysis will be the discovery of yet unknown microbial CM-degradation genes and pathways beyond the known *cmu* pathway. The PhD project is thus expected

to contribute to a better understanding of the processes that control the flux of CM from the phyllosphere to the atmosphere.

- (1) Bringel & Couée 2015 Front Microbiol 6:486
- (2) Copeland et al 2015 Mol Plant Microbe Interact 28:274
- (3) Fahran Ul Haque et al 2013 App. Environ Microbiol 79:6561
- (4) Keppeler et al 2005 Atmos Chem Phys 5:2403
- (5) Marx et al 2012 J Bacteriol 194:4746
- (6) Nadalig et al 2011 FEMS Microbiol Eco 77:438-448
- (7) Nadalig et al 2014 Front Microbiol 5:523
- (8) Neufeld et al 2008 Environ Microbiol 10:1526
- (9) Roselli et al 2013 Plos One 8:e56598
- (10) Vannelli et al 1999 PNAS USA 96:4615

Contacts:

francoise.bringel@unistra.fr (Phone : 03 68 85 18 15)

nadalig@unistra.fr (Phone : 03 68 85 19 73)

vuilleumier@unistra.fr (Phone : 03 68 85 20 22)