



ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA TERRE



Sujet de thèse Etude biominéralogique de la précipitation de phosphates de calcium par des souches bactériennes modèles et dans des objets naturels anciens et actuels

Directeur de thèse Benzerara Karim

Co-encadrant : François Guyot

Équipe d'accueil– Géobiosphère Actuelle et Primitive (Boucicaut)

Résumé

De nombreuses études ont proposé que les bactéries pouvaient jouer un rôle important dans la précipitation de phosphates de calcium à la surface de la Terre. Ce processus de biominéralisation pourrait être responsable de la formation des gisements sédimentaires de phosphorites qui constituent les plus grandes ressources actuellement exploitées de phosphate. De manière intéressante, ce processus de biominéralisation par les bactéries pourrait aussi être responsable : de la préservation exceptionnelle de tissus mous de métazoaires offrant des sites paléontologiques importants, de calcifications pathologiques ou encore de l'immobilisation d'un certain nombre de métaux polluants. Pourtant malgré l'importance de ce processus de biominéralisation, on connaît mal les mécanismes minéralogiques et biologiques impliqués et il reste de nombreuses questions de premier ordre non résolues : pourquoi certaines espèces favorisent la précipitation de phosphate de calcium et pas d'autres ? Quels sont les mécanismes biominéralogiques de la précipitation de phosphate de calcium induite par les bactéries ? Quelles sont les conséquences de cette biominéralisation sur la survie des cellules ? Le but de cette thèse sera de coupler les techniques de la microbiologie et de la minéralogie moderne afin de caractériser le plus finement possible les mécanismes de précipitation bactérienne de phosphates de calcium et de déterminer lesquels sont vraiment importants dans la nature, s'il y a des microorganismes spécifiques impliqués systématiquement dans ces processus ou s'il s'agit d'une propriété partagée largement par le vivant, et de progresser sur la compréhension des processus de fossilisation et l'évaluation des signatures fines du vivant (e.g., présence de certaines molécules organiques, isotopiques etc..) pouvant être recherchées dans des microfossiles préservés dans l'enregistrement géologique.

Descriptif de la thèse

Contexte et question posées

De nombreuses études ont proposé par le passé que les bactéries pouvaient jouer un rôle important dans la précipitation de phosphates de calcium à la surface de la Terre. Ce processus de biominéralisation pourrait être responsable de la formation des gisements

sédimentaires de phosphorites qui constituent les plus grandes ressources actuellement exploitées de phosphate. De manière intéressante, ce processus de biominéralisation par les bactéries pourrait aussi être responsable : de la préservation exceptionnelle de tissus mous de métazoaires offrant des sites paléontologiques importants (e.g., Doushantuo avec les plus anciens fossiles de métazoaires), de calcifications pathologiques ou encore de l'immobilisation d'un certain nombre de métaux polluants (e.g., plomb, uranium, chrome etc...). Pourtant malgré l'importance de ce processus de biominéralisation, on connaît mal les mécanismes minéralogiques et biologiques impliqués et il reste de nombreuses questions de premier ordre non résolues : pourquoi certaines espèces favorisent la précipitation de phosphate de calcium et pas d'autres ? Quels sont les mécanismes biominéralogiques de la précipitation de phosphate de calcium induite par les bactéries ? Quelles sont les conséquences de cette biominéralisation sur la survie des cellules ? Enfin, si nombreuses sont les études affirmant l'intervention de microorganismes dans la plupart des phénomènes cités ci-dessus, les traces effectives laissées par les microorganismes dans les phosphorites notamment ne sont pas toujours évidentes ou univoques, et il serait important d'apporter des contraintes supplémentaires à une simple observation de « sphères micrométriques » dans les phosphorites.

Approche proposée

Afin de progresser sur ces questions, ce travail de thèse visera à caractériser le processus de biominéralisation bactérienne des phosphates de calcium et les traces laissées dans les sédiments actuels et anciens en couplant trois approches complémentaires :

La première de ces approches est une modélisation expérimentale en laboratoire de la précipitation de phosphates de calcium à l'aide de différents microorganismes modèles. La souche *Ramlibacter tataouinensis* qui a été isolée à partir d'un environnement fortement minéralisateur (sable de Tataouine, Tunisie) et précipite en milieu riche additionné de calcium des phosphates de calcium au niveau de sa paroi sera utilisée. Il s'agira dans un premier temps de caractériser les produits minéraux formés et visualiser leur localisation en relation avec l'ultrastructure des bactéries, notamment pour les tout premiers stades de la précipitation en utilisant la cryo-microscopie électronique en transmission (MET). En parallèle, la viabilité des cellules et leur activité métabolique dans des cultures en cours de calcification seront suivies. Ceci passe par l'utilisation des techniques modernes de la minéralogie depuis la diffraction des rayons X, divers types de spectroscopie vibrationnelle (IR, Raman) ou d'absorption X (XANES), et de microscopie (MEB, MET). Le génome de cette bactérie ayant été séquencé, l'utilisation d'outils supplémentaires de la biologie moléculaire permet d'envisager l'étude de l'effet de gènes spécifiques sur ce processus de biominéralisation, par exemple par inactivation d'un gène susceptible d'être impliqué dans la calcification. Un deuxième organisme modèle sera utilisé : *Escherichia coli*, qui ne réalise pas la précipitation de phosphates de calcium dans les conditions naturelles mais dont la génétique est mieux maîtrisée. Parmi les mécanismes proposés dans la biominéralisation bactérienne de phosphates de calcium (principalement hydroxyapatite), il a été suggéré que l'activité de phosphatases (alcalines ou acides) qui dégradent le phosphate organique en phosphate inorganique était impliquée. Plusieurs souches d'*E. coli* sont disponibles : une sauvage et d'autres transformées de manière à surexprimer une phosphatase alcaline dans le périplasme ou dans le cytoplasme, ce qui servira à tester le rôle effectif de cette enzyme dans la précipitation d'hydroxyapatite par des cellules cultivées en présence de phosphate organique et de calcium. *E. coli* présente de plus l'avantage d'être une bactérie facilement cultivable en milieu minimum bien contraint chimiquement, ce qui permet un suivi des cinétiques de précipitation et la modélisation des équilibres chimiques existant en solution. Enfin, des systèmes biominéralisateurs simples comprenant seulement la phosphatase alcaline ou encore la phosphatase alcaline et des protéines décrites dans la littérature

comme favorisant la nucléation de l'hydroxyapatite pourront par la suite être étudiés, ce qui permettra de s'affranchir de la complexité inhérente aux cellules entières et de se concentrer sur les processus de nucléation et croissance des minéraux. Il sera alors envisageable de s'intéresser par la suite aux autres mécanismes qui ont été proposés dans la littérature, par exemple la dégradation de matière organique par des bactéries sulfato-réductrices ou l'uréolyse en poursuivant les modélisations expérimentales sur ce type de microorganismes.

Cette approche sera complétée par l'étude d'échantillons de phosphorites anciennes en recherchant les similitudes et différences avec les objets produits dans les expériences. Un site pertinent est celui du plus grand bassin phosphaté du Maroc, le bassin Crétacé-Eocène des Ouled Abdoun sur lequel travaillent notamment plusieurs paléontologues du MNHN. La démarche consistera à caractériser finement la minéralogie et à rechercher les hétérogénéités chimiques de la matière organique à l'échelle micrométrique en utilisant des techniques bien maîtrisées à l'IMPMC comme le FIB, le MET et la microscopie synchrotron (STXM) afin de mieux contraindre l'origine biologique de ces formations.

Enfin, la troisième approche consistera à travailler sur des sites où se fait la phosphatogenèse actuellement (e.g., phosphorites du Pérou, du Chili, de Californie ou du Mexique). Sur ces phosphorites actuelles, en plus des analyses réalisées sur les phosphorites anciennes, il sera intéressant d'étudier la diversité des microorganismes présents dans le but de mettre en évidence d'éventuels groupes de microorganismes connus pour stimuler la précipitation de phosphates de calcium. Ceci pourra par exemple être réalisé par une approche moléculaire (séquençage de l'ADNr 16S) en collaboration avec P. Lopez Garcia (Orsay). L'activité de phosphatases pourra de plus être testée sur ces échantillons et des extractions de protéines suivies de la recherche de phosphatases spécifiques pourront être tentées. L'IMPMC dispose pour cela d'un laboratoire entièrement équipé pour la biochimie des protéines. Certaines souches pourront être mises en culture et testées pour leur capacité à précipiter les phosphates de calcium.

Le couplage de ces trois approches permettra de caractériser le plus finement possible les mécanismes de précipitation bactérienne de phosphates de calcium et de déterminer lesquels sont vraiment importants dans la nature, s'il y a des microorganismes spécifiques impliqués systématiquement dans ces processus ou s'il s'agit d'une propriété partagée largement par le vivant, et de progresser sur la compréhension des processus de fossilisation et l'évaluation des signatures fines du vivant (e.g., présence de certaines molécules organiques, isotopiques etc..) pouvant être recherchées dans des microfossiles préservés dans l'enregistrement géologique.