

**Unité de Recherche Communication Bactérienne et Stratégies Anti-infectieuses (CBSA)**

**Effets de neuropeptides sur la virulence de bactéries à Gram-négatif du microbiote cutané. Recherche des mécanismes d'action et d'inhibiteurs de virulence.**

**Effects of neuropeptides on the virulence of cutaneous microbiota Gram-negative bacteria. Research into mechanisms of action and virulence inhibitors.**

**Unité de recherche / Research Unit**

**CBSA**

**Université de ROUEN**

**Sujet de thèse / Thesis subject**

Le LMSM a développé le concept d'Endocrinologie Microbienne Cutanée en montrant les liens entre des neuropeptides de la peau (Substance P - SP, Calcitonin Gene Related Peptide - CGRP) et la virulence des bactéries à Gram positif. La peau héberge des bactéries commensales (*Pseudomonas fluorescens*) et pathogènes (*Pseudomonas aeruginosa*) à Gram négatif mais l'effet des neuropeptides cutanés sur ces bactéries reste inconnu. On recherchera l'effet de la SP et du CGRP sur la virulence des deux *Pseudomonas* sur la lignée de kératinocytes HaCaT et sur les cellules DPCs et ORS à l'origine des follicules pileux. La cytotoxicité, l'expression de marqueurs de l'inflammation (IL1 $\alpha$ , IL8, TNF $\alpha$ ..) ainsi que la formation de biofilms seront suivies seules et/ou en association avec des bactéries cutanées à Gram+. Les protéines EfTu et DnaK, senseurs de la SP et du CGRP chez les Gram+, sont aussi exprimées chez les *Pseudomonas*. Leur rôle dans la réponse à la SP et au CGRP chez les Gram- sera étudiée par immunoprécipitation, thermophorèse à microéchelle et docking moléculaire. Comme vu chez les Gram+, l'implication de canaux mécanosensibles MscL sera recherchée par knock-down du gène et utilisation d'antagonistes (GdCl3 et GsMTx4). Le mécanisme de couplage entre l'association de la SP à EfTu et le CGRP à DnaK et la réponse bactérienne reste inconnu. Dans le cas de la SP, le rôle de l'hexamère formé par EfTu dans la membrane sera étudié par mesure de flux de marqueurs, de conductance électrique, voire pontage réversible et SPR. La liaison DnaK-CGRP sera étudié de même et par modélisation moléculaire. Une partie exploratoire du projet vise à rechercher l'effet sur les bactéries d'autres neuropeptides cutanés dont la galanine, le neuropeptide Y et le peptide intestinal vasoactif. Enfin, une analyse du microbiote cutané par séquençage massif (MiSeq) en France et au Togo, complétera ce travail dans un contexte clinique et recherchera l'effet d'extraits végétaux locaux (Montage d'un réseau).

En Anglais :

LMSM has developed the concept of Microbial Cutaneous Endocrinology by showing the links between skin neuropeptides (Substance P - SP, Calcitonin Gene Related Peptide - CGRP) and Gram-positive bacterial virulence. The skin harbors Gram-negative commensal (*Pseudomonas fluorescens*) and pathogenic (*Pseudomonas aeruginosa*) bacteria, but the effect of cutaneous neuropeptides on these bacteria remains unknown. The effects of SP and CGRP on the virulence of the two *Pseudomonads* will be investigated on the HaCaT keratinocyte line and on DPCs and ORS cells at the origin of the hair follicles. Cytotoxicity, expression of inflammatory markers (IL1 $\alpha$ , IL8, TNF $\alpha$ , etc.) as well as the formation of biofilms will be monitored alone and/or in association with Gram+ skin bacteria. The EfTu and DnaK proteins, SP and CGRP sensors in Gram+, are also expressed in *Pseudomonas*. Their role in the response to SP and CGRP in Gram- will be studied by immunoprecipitation, microscale thermophoresis and molecular docking. As seen in Gram+, the involvement of mechanosensitive MscL channels will be sought by knock-down of the gene and use of antagonists (GdCl3 and GsMTx4). The final coupling mechanism between the association of SP to EfTu and CGRP to DnaK and the bacterial response remains unknown. In the case of SP, the role of the hexamer formed by EfTu in the membrane will be studied by measuring the flux of markers, electrical conductance, reversible bridging and SPR. The DnaK-CGRP binding will be studied in the same way and molecular modeling. An exploratory part of the project aims to research the effect on bacteria of other cutaneous neuropeptides, including galanin, neuropeptide Y and vasoactive

intestinal peptide. Finally, an analysis of the skin microbiota by high-throughput sequencing (illumina MiSeq) in France and Togo will complete this work in a clinical context and will seek the effect of local plant extracts (Setting up a collaborative network).

### **Expérience et formation souhaitées / searched skills**

#### Qualifications et expérience

- Master 2 reconnu par l'École Doctorale ED 497 NBISE (ED Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement) ou équivalence validée par l'ED
- Expérience significative dans un laboratoire de recherche
- Compétences transversales en Microbiologie, Biologie Cellulaire et Biochimie.

#### Compétences opérationnelles

- Maîtrise du geste stérile et de la culture bactérienne
- Maîtrise des techniques de culture cellulaire eucaryotes
- Maîtrise des techniques d'étude des biofilms, chromatographie et western blot
- Maîtrise du français et de l'anglais (lu, écrit, oral)

#### Connaissances générales

- Physiologie bactérienne
- Physiologie humaine (peau en particulier)
- Biochimie (interactions protéines-ligand)
- Statistiques

#### Qualités

- Facilités rédactionnelles et oratoires
- Autonomie et rapidité de réaction
- Sens de l'organisation
- Pro-activité
- Capacité d'intégration
- Investissement professionnel
- Rigueur et éthique professionnelle

#### En Anglais :

#### Qualifications and experience:

- Master 2 recognized by the Doctoral School ED 497 NBISE (Norman ED of Integrative Biology, Health, Environment) or equivalence validated by the ED
- Significant experience in a research laboratory
- Transversal skills in Microbiology, Cellular Biology and Biochemistry.

#### Operational skills

- Mastery of sterile gesture and bacterial culture
- Mastery of eukaryotic cell culture techniques
- Mastery of techniques for studying biofilms, chromatography and western blot
- Fluency in French and English (reading, writing, speaking)

#### General knowledge

- Bacterial physiology
- Human physiology (skin in particular)
- Biochemistry (protein-ligand interactions)
- Statistics

#### Qualities

- Writing and speaking skills
- Autonomy and speed of reaction
- Sense of organization
- Proactivity
- Ability to integrate
- Professional investment

- Rigor and professional ethics

<b>Contacts</b>		
Marc G.J. FEUILLOLEY	<a href="mailto:marc.feuilloy@univ-rouen.fr">marc.feuilloy@univ-rouen.fr</a>	02 32 29 15 42 / 06 09 67 63 37
Amine BOUKERB	<a href="mailto:amine.boukerb@univ-rouen.fr">amine.boukerb@univ-rouen.fr</a>	02 32 29 16 71