



**HAL**  
open science

## OcéaSafe Project : Developing yeast-based biosensors for Marine Toxins

Hélène Martin-Yken

► **To cite this version:**

Hélène Martin-Yken. OcéaSafe Project : Developing yeast-based biosensors for Marine Toxins. 2018.  
hal-02954420

**HAL Id: hal-02954420**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02954420>**

Submitted on 1 Oct 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# *OcéaSafe Project : Developing yeast-based biosensors for Marine Toxins*

*Hélène Martin-Yken*

*Chargée de Recherche INRA (MICA)*

*LISBP Toulouse*



# *Context: personal scientific background*

*Chargée de Recherche INRA (MICA)*

*2 themes : - Cell wall Integrity and stress response in yeasts and fungi, Role of KNR4 protein (since 2001)  
- Biosensors Development (2016-)*

*Competences : - Fungal cell walls,  
- Cellular signalisation pathways  
- Microbial adhesion*

*In LISBP (Laboratoire d'Ingénierie des Système Biologiques et des Procédés).*

*Team : Physiology and Functional Genomic of Eukaryotes.*

- ***Introduction :***
  - Human Ressources***
  - Ciguatera Food Poisoning***
- ***Scientific Project :***
  - Scientific Questions***
  - 1rst application : Ciguatoxines***
  - Biosensors strains developed***
  - Project follow-up***
- ***INRA H2025 Strategical Orientations***
- ***Temporary affectation : UMR 241 EIO***

# The mystery of Ciguatera

Et après-midi, un des naturels, ayant harponné un poisson, mon secrétaire l'acheta et me l'envoya après mon retour. Il était d'une nouvelle espèce, un peu comme un poisson-soleil, avec une grosse tête longue et hideuse. Ne nous doutant pas qu'il pouvait nous empoisonner, nous donnâmes l'ordre de l'apprêter pour le souper. Mais par bonheur il fallut si longtemps pour le dessiner et le décrire qu'il n'était plus temps de le faire cuire, de sorte qu'on n'apprêta que le foie et les rognons auxquels monsieur Forster et moi goûtâmes tout juste.

Vers trois heures du matin, nous nous trouvâmes atteints d'une extraordinaire faiblesse et d'un engourdissement de tous les membres. J'avais presque perdu le sentiment du toucher et je ne pouvais distinguer, entre ce que j'avais la force de soulever, les corps lourds des légers. Un quart d'eau et une plume avaient le même poids pour ma main. Nous prîmes tous les deux de l'émétique et après cela nous fîmes une suée qui nous apporta beaucoup de soulagement. Le matin, un des cochons qui avait mangé les entrailles fut trouvé mort.

50).

e  
ific.

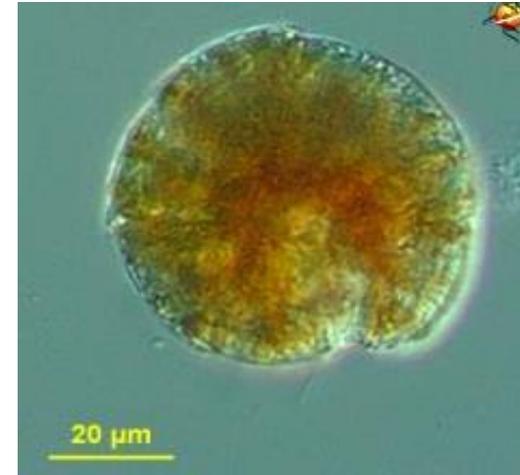
ban

## THE CAUSAL AGENT : CIGUATOXINES (CTXS) :

- **Among the most powerful marine biotoxines (1 microgramme can kill a man)**

**No simple detection test available !!!**

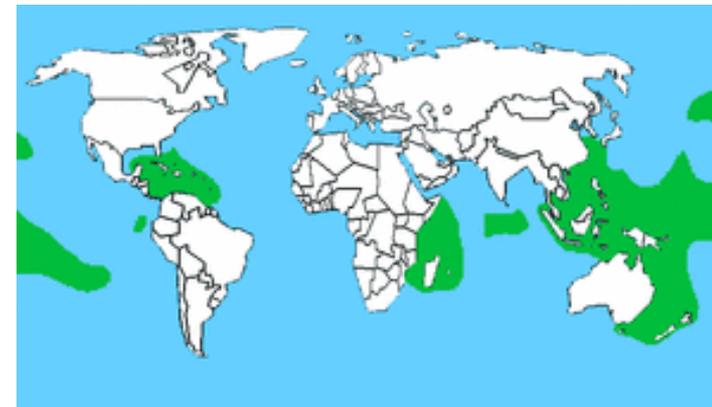
- Produced by the dinoflagellate micro-algae *Gambierdiscus toxicus*, upon corral reefs damage



*Gambierdiscus toxicus*, (B Anderson, MBL.)

- Polycyclic polyethers, liposoluble, MW~1100 Da

- 3 families :  
Pacific = P-CTXs, Caribbean = C-CTXs,  
Indian Ocean = I-CTXs.

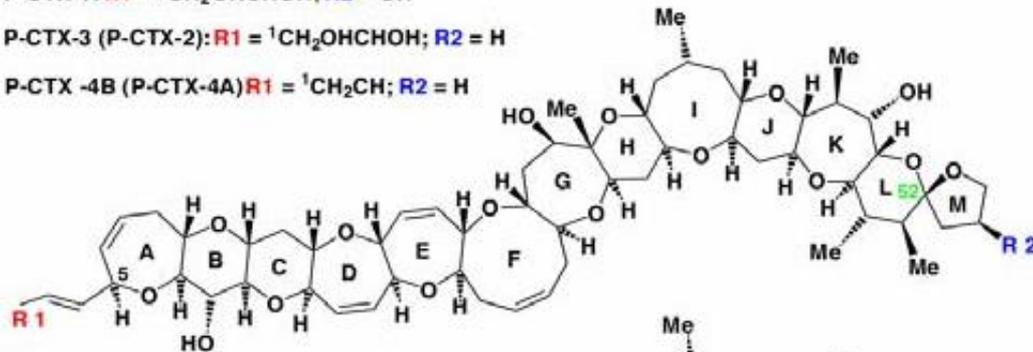


# Ciguatoxines Molecular Structures

P-CTX-1: **R1** =  $^1\text{CH}_2\text{OHCHOH}$ ; **R2** = OH

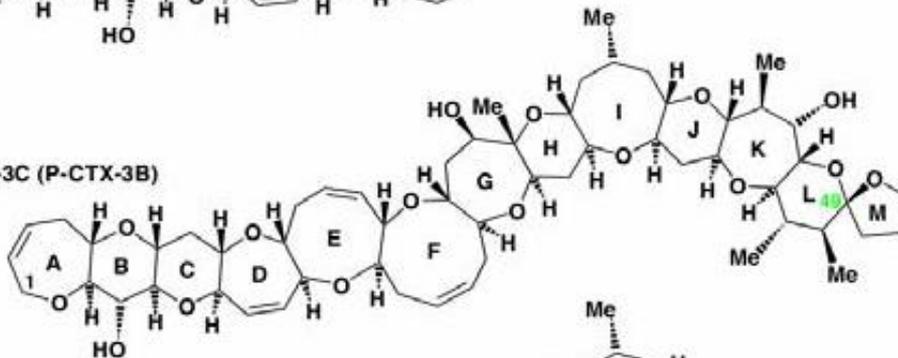
P-CTX-3 (P-CTX-2): **R1** =  $^1\text{CH}_2\text{OHCHOH}$ ; **R2** = H

P-CTX-4B (P-CTX-4A) **R1** =  $^1\text{CH}_2\text{CH}$ ; **R2** = H

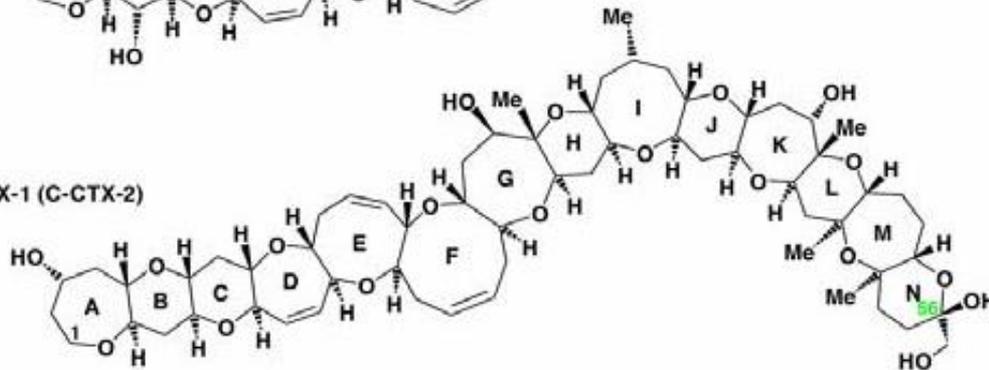


*Pacific Ciguatoxines*

P-CTX-3C (P-CTX-3B)

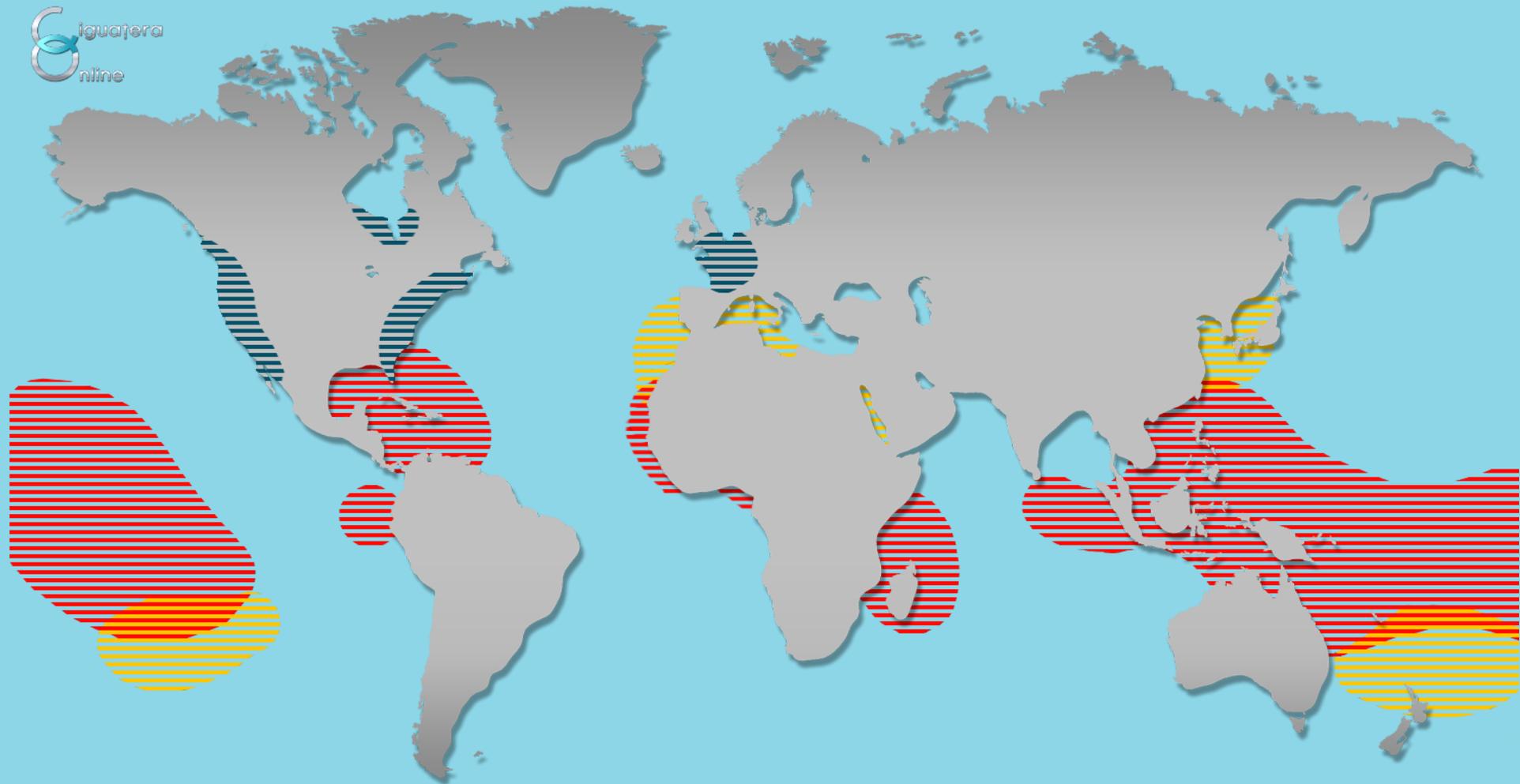


C-CTX-1 (C-CTX-2)



*Caribbean Ciguatoxines*

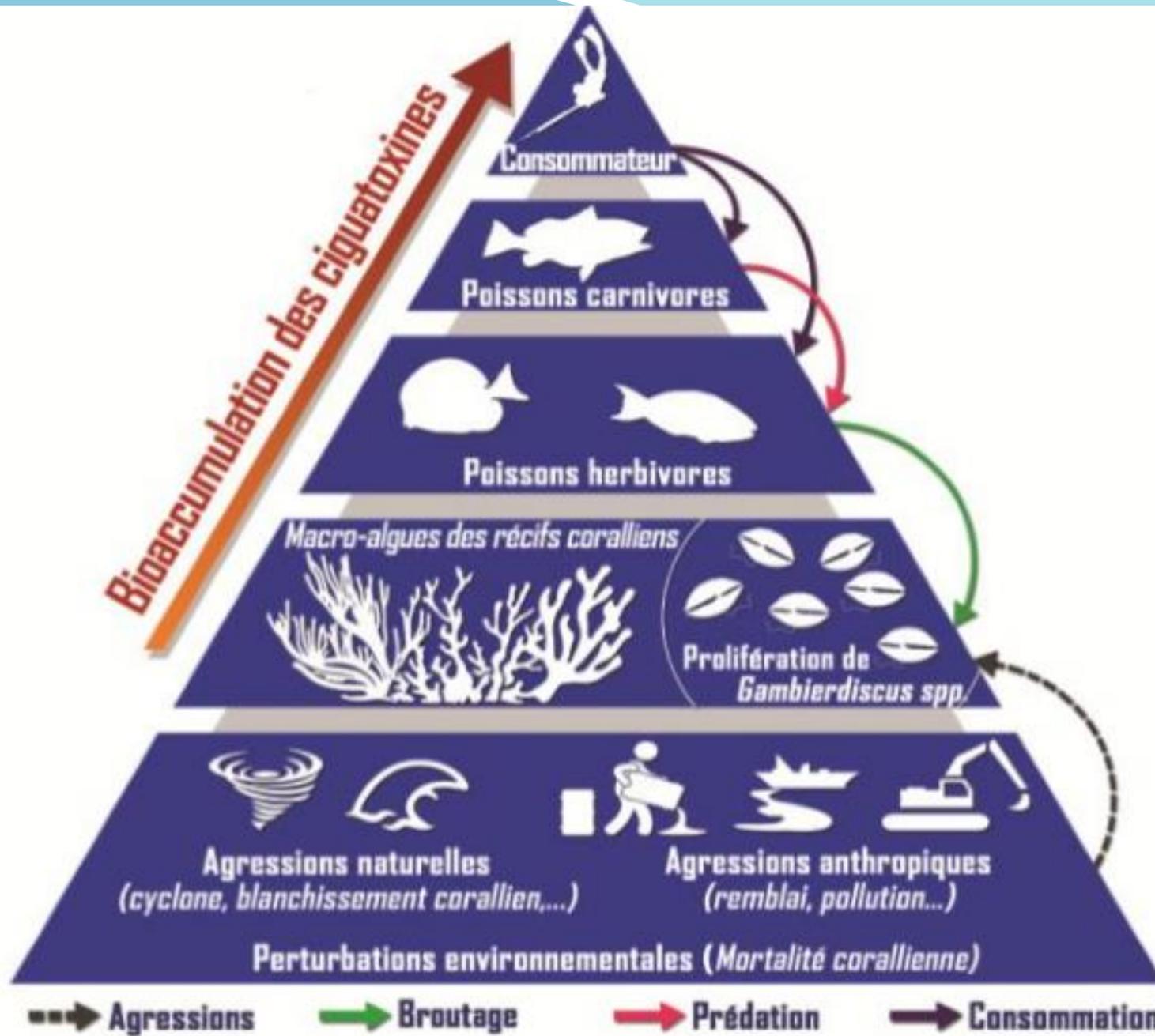
# World Repartition of Ciguatera



 Zone d'endémie de la ciguatera

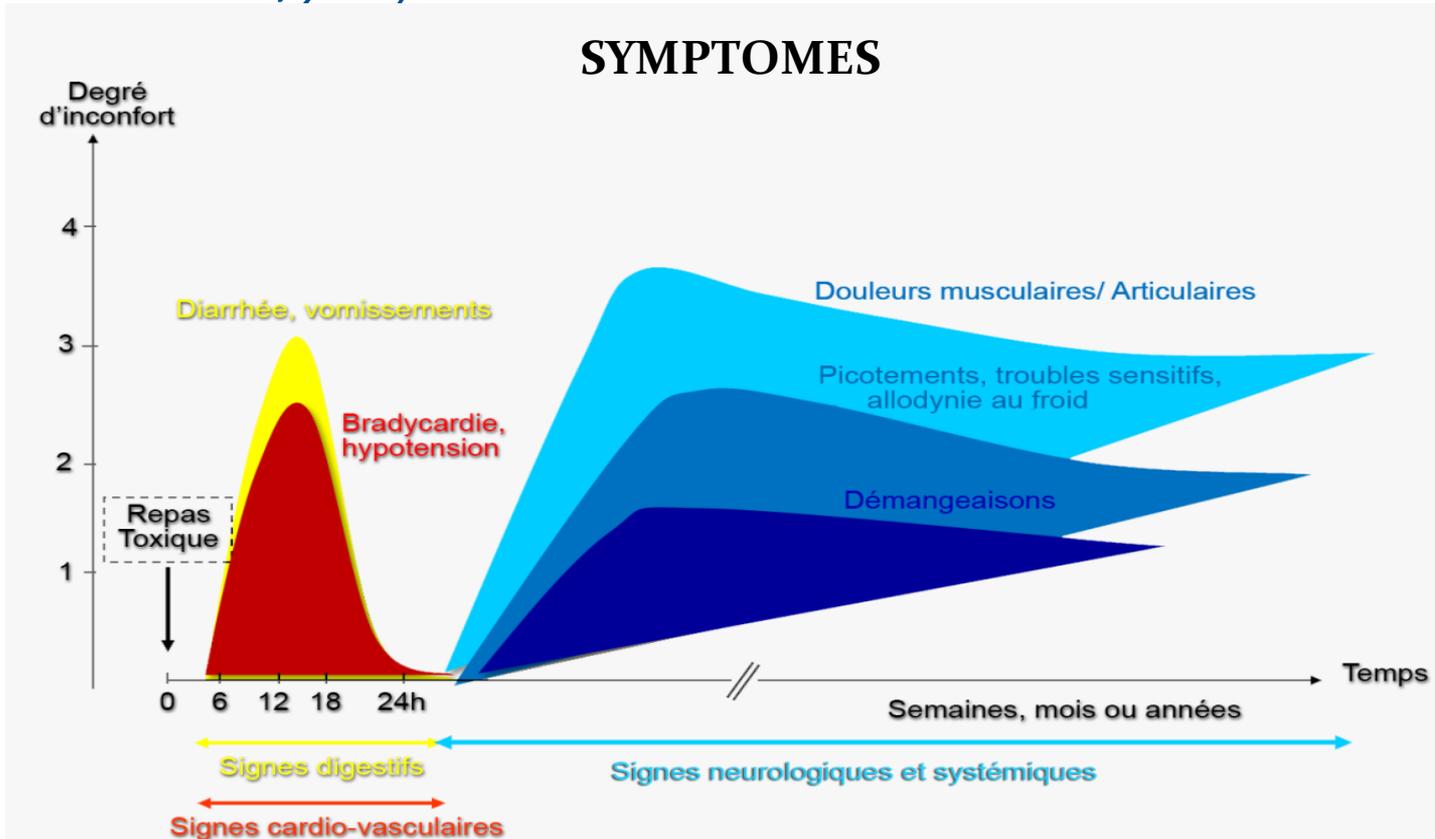
 Cas «importés» de ciguatera

 Nouvelles zones d'expansion de la ciguatera (depuis 2005)



# Ciguatera Food Poisoning

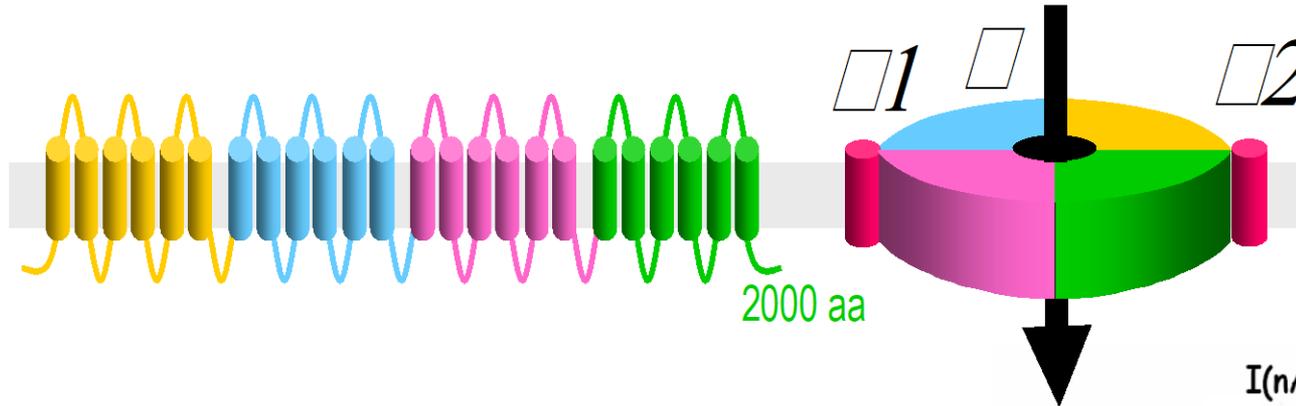
- Considered as the **number one** Food poisoning of marine origine in the world (~200 000 cases /year).



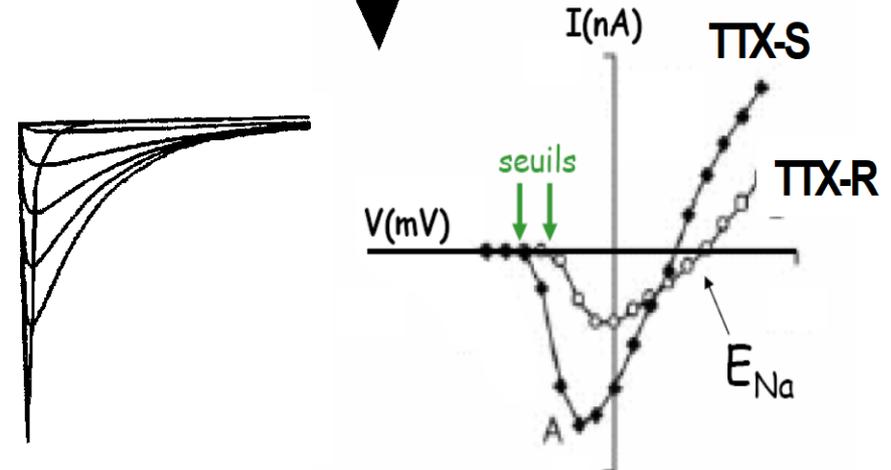
- Body **sensitization** effect : increase of symptoms severity upon next exposure, cross effects (ex : alcohol).

# The Targets : Voltage Gated Sodium Channels

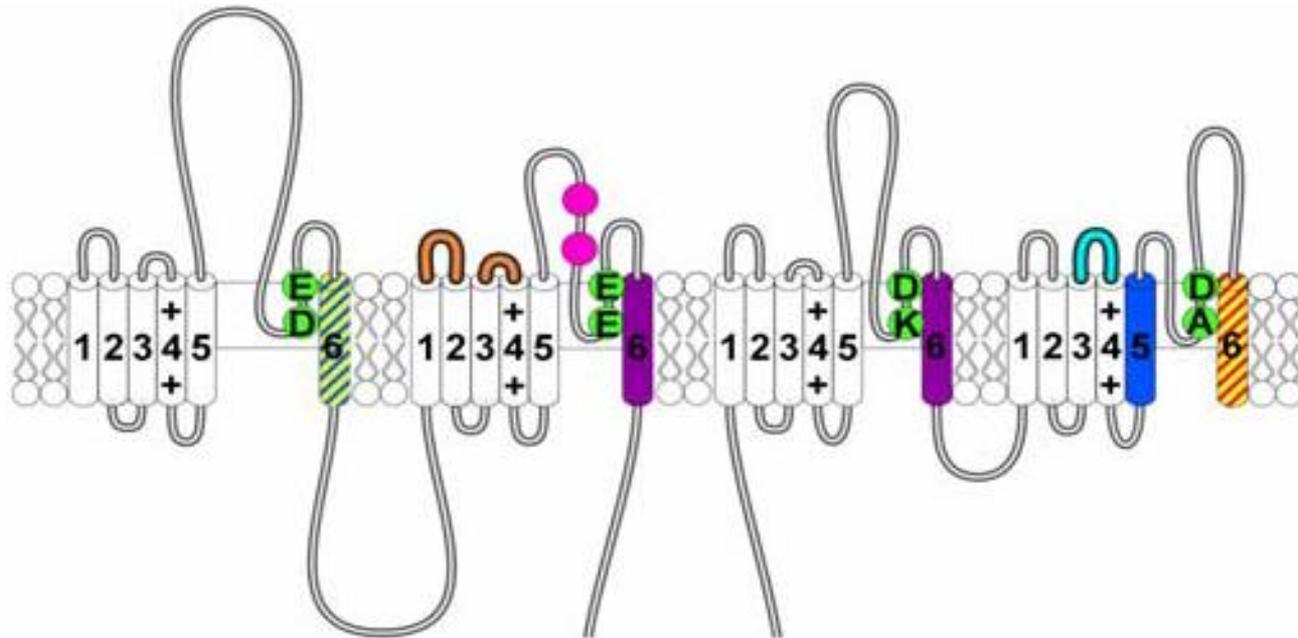
rôles    dépolarisation de la membrane du neurone et propagation du PA



bloqueurs    tétrodotoxine  
                 anesthésiques locaux  
                 anti-convulsivants  
                 anti-arythmiques



# The Targets : Voltage Gated Sodium Channels



**Site 1** Tetrodotoxin  
Saxitoxin

**Site 1**  $\mu$ -Conotoxins

**Site 2** Batrachotoxin  
Veratridine

**Site 3** Scorpion  $\alpha$ -toxins,  
Sea anemone toxins,  
Spider  $\delta$ -toxins

**Site 4** Scorpion  $\beta$ -toxins  
Magi 5

**Site 5** Ciguatoxin  
Brevetoxin

**Site 7** Pyrethroids

**Drugs** Local anaesthetics  
Anticonvulsants

- *Current assays : Mouse bioassay, RBA, CBA, HPLC.*
- ***URGENT NEED FOR A SIMPLE DETECTION TOOL !!!***
- *Based on these data, can we design a biosensor for Ciguatoxins ?*
- *Yeast based bio sensors : interesting for several reasons*

# *Live Cell Assays*

- *Wide range of application domains: pharmacy industry cosmetics, chemical hazard evaluation (REACH), alternatives to animal testing, diagnostic, management of environmental issues and bioterrorism related threats.*
- *Relevant regarding current regulations and industrial needs:*

***Market estimated over 4 billions dollars !***

# ***Developing yeast-based Biosensors***

## ***Scientific Questions :***

- ***Cell wall permeability/reactivity towards toxins?***  
***Investigation tools : cell wall mutants, tagged toxins.***
- ***Membrane target (receptor)? Binding?***  
***Investigation tools : Cloning,***  
***SMFS with Atomic Force Microscopy.***
- ***Cellular signalisation pathways?***  
***Investigation tools : reporters, Fluorescent proteins,***  
***western blotting, RT-PCR.***

## ***State of the Art at project start :***

***No direct cytotoxic effect of Ciguatoxines on yeast cells.***

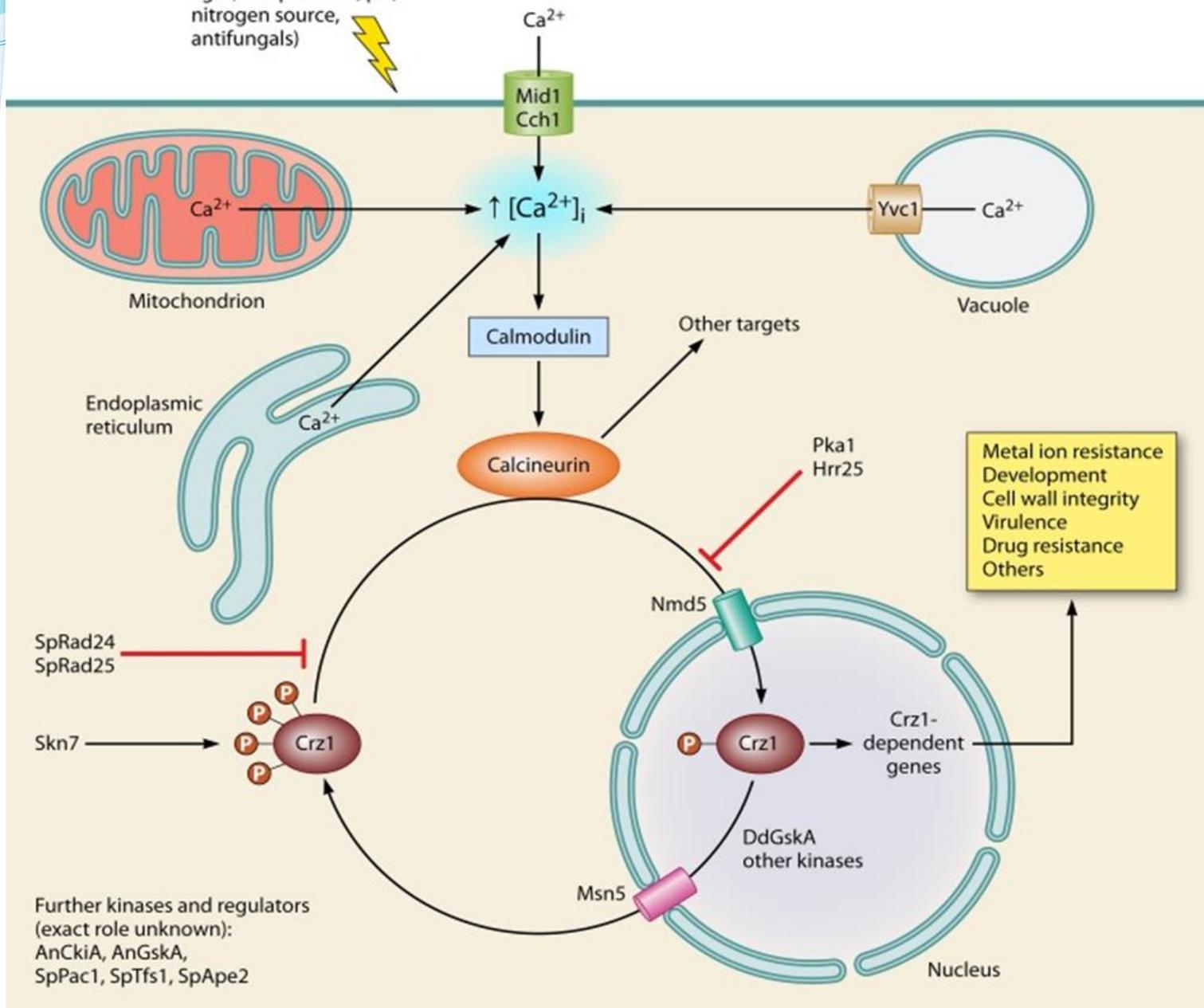
- Express a mammalian VGSC in *S. cerevisiae*, or its fixation domain fused to an endogenous yeast channel

→ ***Need for modelization***

- The closest homolog of mammalian VGSCs in yeast is Cch1, the calcium channel, which activates the Calcineurine pathway.

→ ***Is this pathway activated by CTXs ?***

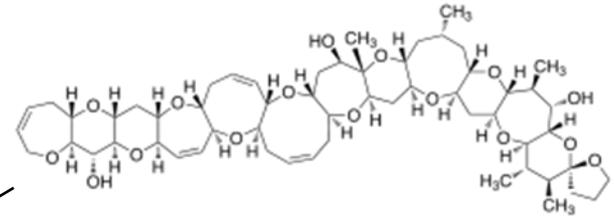
**Signal**  
 (ionic stress, ethanol,  
 light, temperature, pH,  
 nitrogen source,  
 antifungals)



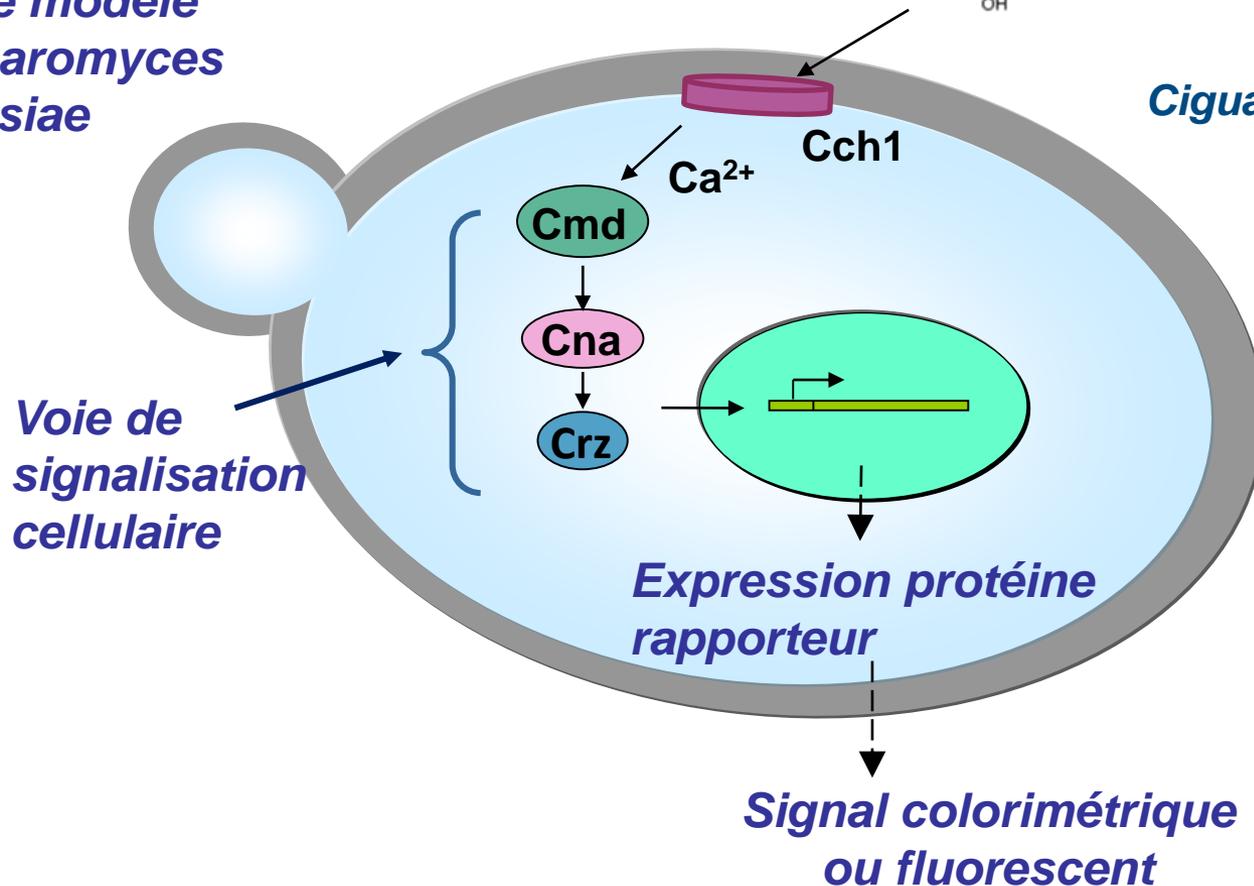
(Thewes, 2014)

# Biosensor strains design

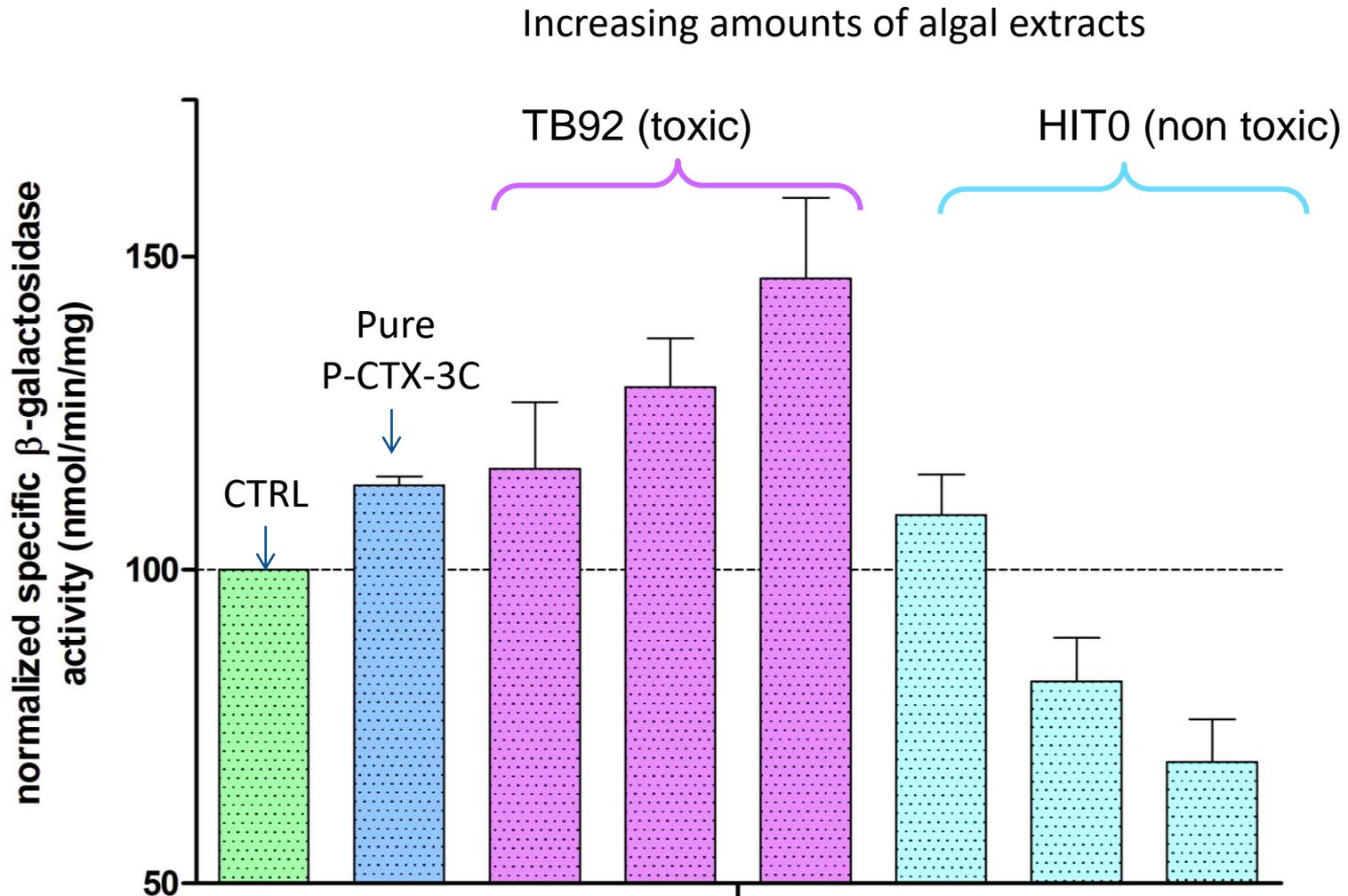
Levure modèle  
*Saccharomyces cerevisiae*



Ciguatoxines



# Response to Algal extracts



# **Scientific Project Follow up :**

## **Understanding yeast cellular response to CTXs**

- **Cell wall transfert**
- **Competition CTXs - Rosmarinic acid and tetrodotoxin.**
- **Inhibitory Effect of HIT0 extracts ?????**
- **Activators / repressors / blockers of VGSC and Cch1**
- **Hyper-active point mutants of Cch1 and Crz1**
- **Chimera Construction Cch1-VGSC**

## **Response Optimisation :**

- **Others promoters ?**

**Developp a generic approach, apply this research to other toxins and drugs binding VGSCs**

**Huge interest Pharmacology and Environmental domains !**

**Future applications : Build a bio-sensor**

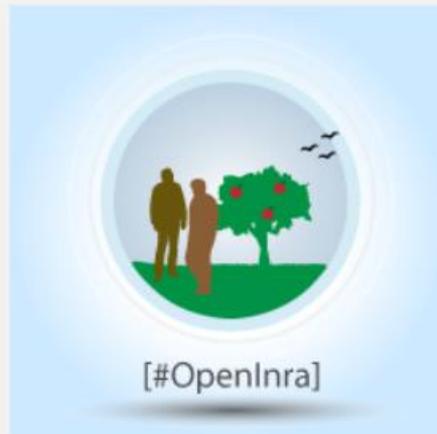
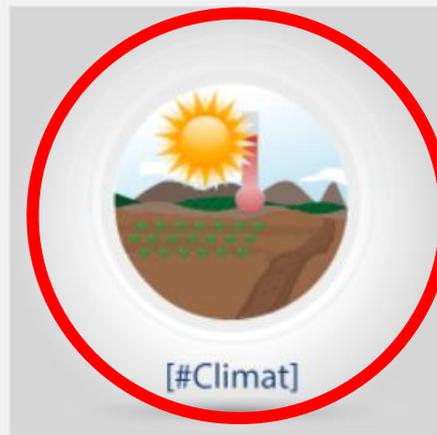
**Need to go and work in a CTXs specilized lab : UMR 241 EIO**

- ***Introduction (Context ) :***  
***Human Ressources***  
***Ciguatera Food Poisoning***
  
- ***Scientific Project :***  
***Scientific Questions***  
***1rst application : Ciguatoxines***  
***Biosensors strains developed***  
***Project follow-up***
  
- ***INRA H2025 Strategical Orientations***
- ***Temporary affectation : UMR 241 EIO***



## Orientations stratégiques de l'Inra à l'horizon 2025

### 5 priorités thématiques et 3 orientations de politique générale



- *Introduction (Context ) :  
Ciguatera Food Poisoning  
Human Ressources*
- *Scientific Project :  
Scientific Questions  
1rst application : Ciguatoxines  
Biosensors strains developed  
Project follow-up*
- *INRA H2025 Strategical Orientations*
- *Temporary affectation : UMR 241 EIO*

# Structure d'accueil : L'UMR EIO

- Fédère la recherche en Biologie en Polynésie française.
- 71 permanents + 30 à 60 étudiants.
- **Quatre tutelles** :
  - Université de Polynésie française
  - IRD
  - Ifremer
  - Institut Louis Malardé .
- **Structurée en trois thèmes** :

*THEME 1 : VALORISATION DURABLE DES RESSOURCES NATURELLES*

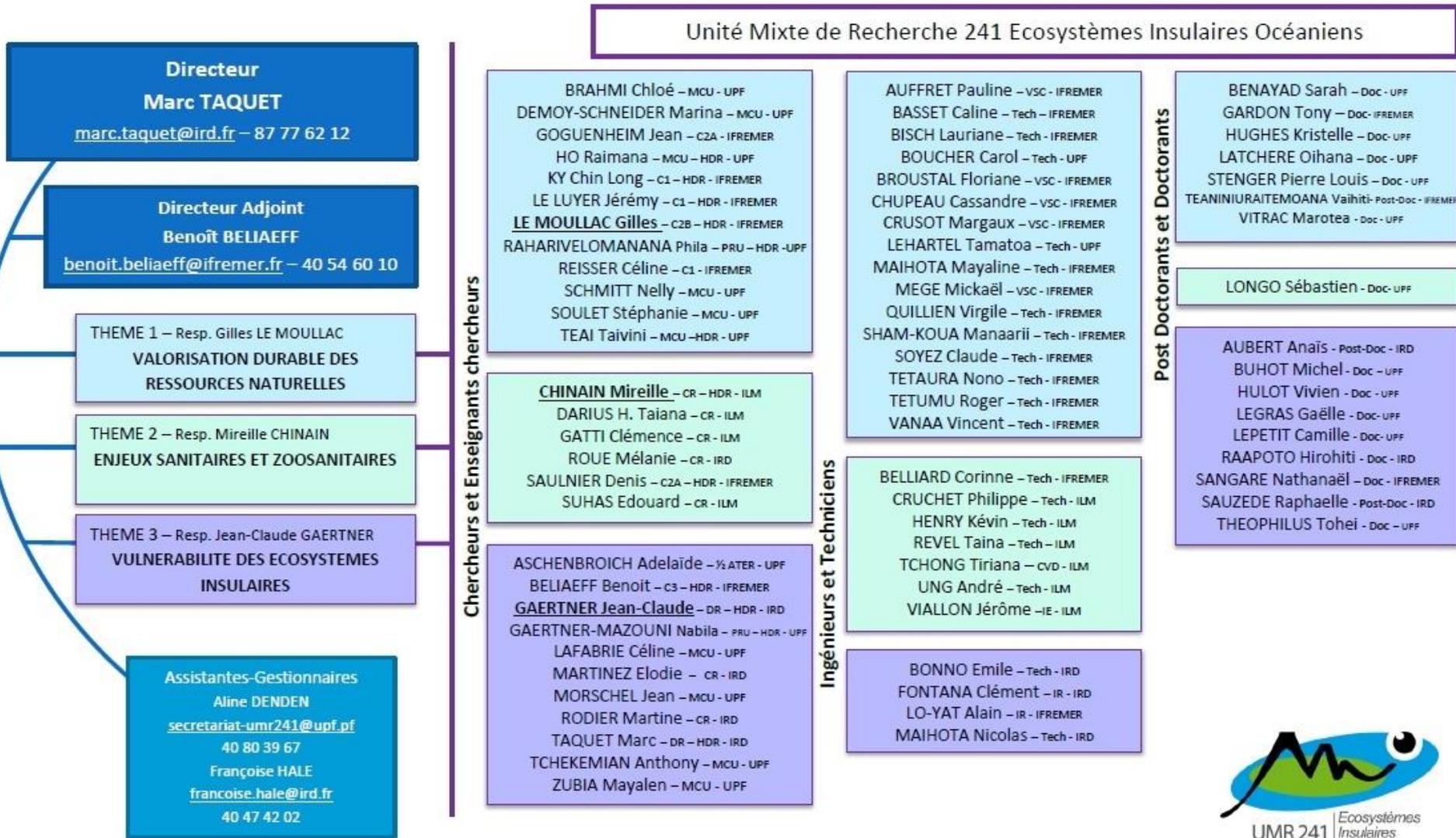
*THEME 2 : ENJEUX SANITAIRES ET ZOOSANITAIRES*

*THEME 3 - VULNERABILITE DES ECOSYSTEMES INSULAIRES*

- **et cinq Plateformes** :
  - Plateforme de Microscopie électronique
  - Plateforme de Substances naturelles
  - Plateforme Biotoxines Marines
  - Plateforme Biochimie-Biologie cellulaire
  - Plateforme Technique.

# Structure d'accueil : L'UMR EIO

## ORGANIGRAMME FONCTIONNEL



■ Direction   ■ Service Commun   ■ ■ ■ Thématiques de recherche

Le thème indiqué pour chaque personnel correspond à son thème principal



# Structure d'accueil : Le Laboratoire des Micro-Algues Toxiques

## History of ciguatera research in French Polynesia

Institut Louis Malardé



Recherche et prévention  
au service de la santé  
des Polynésiens



- **1963** : major poisoning outbreak in Bora-Bora following the consumption of giant-clams (3 fatalities)
- **1967** : Creation of the Medical Oceanography Unit at Institut Louis Malardé

### Milestone discoveries

- **1977** : Finding of the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*, as the causative agent of ciguatera (Bagnis and coll.)
- **1989** : Elucidation of the molecular structure of ciguatoxin (Legrand and coll.)  
in collaboration with Pr T. Yasumoto's group (Tohoku University)
- **1999** : Description of 3 novel species of *Gambierdiscus*, including *G. polynesiensis* (Chinain and coll.)  
in collaboration with Dr M. Faust (Smithsonian Institution)

*Thanks for your attention !*

*Interested in Microbial Adhesion ?  
Come to BioPhysAdh meeting, 10-11 septembre, Toulouse.  
website : <https://biophysadh.sciencesconf.org>*

# *Developing yeast-based Biosensors*

- 2017: 2 Communications,
- 2018 : 1 Publication (*Env. Res.*)
- 5 Projects submitted
  - 2016: 1 funded (PEPs CNRS)
  - 2017: 3 non funded, 1 submitted (decembre ANSES).



## Importance des VGSCs

- Rôle : génération et propagation du signal électrique dans les tissus excitables (cœur, muscle, nerfs).
- L'activation des VGSCs dans ces tissus provoque une dépolarisation qui est responsable de la phase ascendante du potentiel d'action (PA).

# La famille des canaux VGSCs **de mammifères**

Nomenclature	Distribution	Disease correlations
Na <sub>v</sub> 1.1	Brain, spinal cord	Epilepsy
Na <sub>v</sub> 1.2	Brain, spinal cord, peripheral nerve	Epilepsy
Na <sub>v</sub> 1.3 <sup>a</sup>	Brain, spinal cord	Pain
Na <sub>v</sub> 1.4	Skeletal muscle	Movement disorders
Na <sub>v</sub> 1.5	Cardiac muscle, skeletal muscle	Cardiovascular syndromes
Na <sub>v</sub> 1.6	Brain, spinal cord, DRG	Movement disorders, neurological disorders
Na <sub>v</sub> 1.7 <sup>a</sup>	DRG, endocrine glands (adrenal & thyroid)	Neuroendocrine disorders, pain
Na <sub>v</sub> 1.8 <sup>a</sup>	Peripheral nerves (small sensory neurons, DRG)	Pain
Na <sub>v</sub> 1.9 <sup>a</sup>	Spinal cord (sensory axons), DRG	Pain

## Canaux VGSC comme cibles thérapeutiques

pharmacologie  
antinociceptive

Anesthésiques locaux  
(lidocaïne)

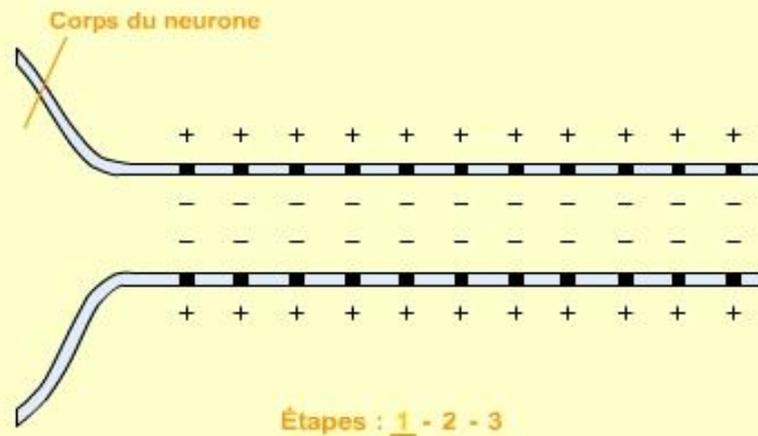
Douleur chronique et  
neuropathique

i.t. injections (lamotrigine)

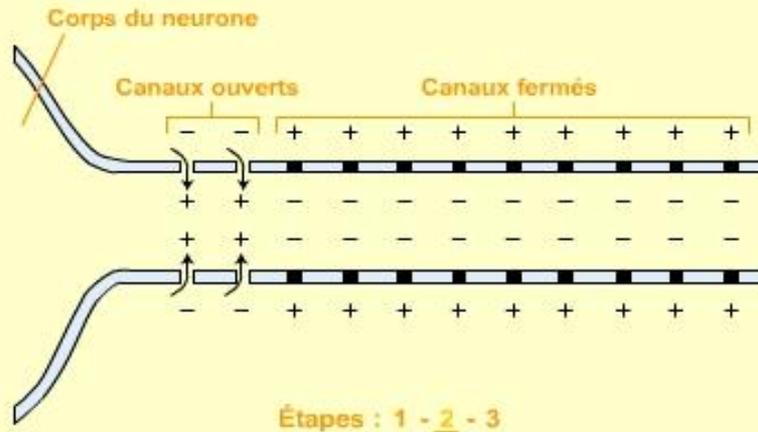
**développements**

TTX<sup>R</sup>, NaV1.7

1. À l'état de repos, les canaux de la membrane du neurone créent une répartition inégale des charges : davantage de charges négatives à l'intérieur et plus de charges positives à l'extérieur.



2. L'influx nerveux, en ouvrant et fermant certains canaux, va inverser le potentiel électrique de part et d'autre de la membrane : durant un bref instant, l'intérieur devient plus positif que l'extérieur.



3. Le potentiel de repos est rapidement rétabli par le travail d'autres canaux. Mais déjà, dans la région voisine, le phénomène se répète, propageant ainsi l'influx nerveux le long de l'axone du neurone.

