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-02954420v1

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

LISBP
Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés

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 développed

  Project follow-up

- *INRA H2025 Strategical Orientations*
- *Temporary affectation : UMR 241 EIO*

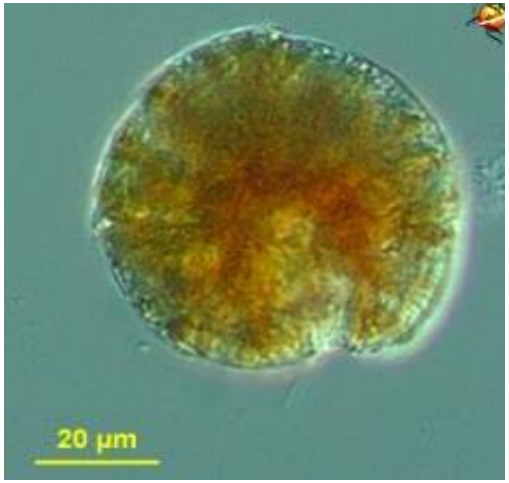
The mystery of Ciguatera

Cet 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 ceux 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.
- 4
- ban

THE CAUSAL AGENT : CIGUATOXINES (CTXS) :



Gambierdiscus toxicus, (B Anderson, MBL.)

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

No simple detection test available !!!

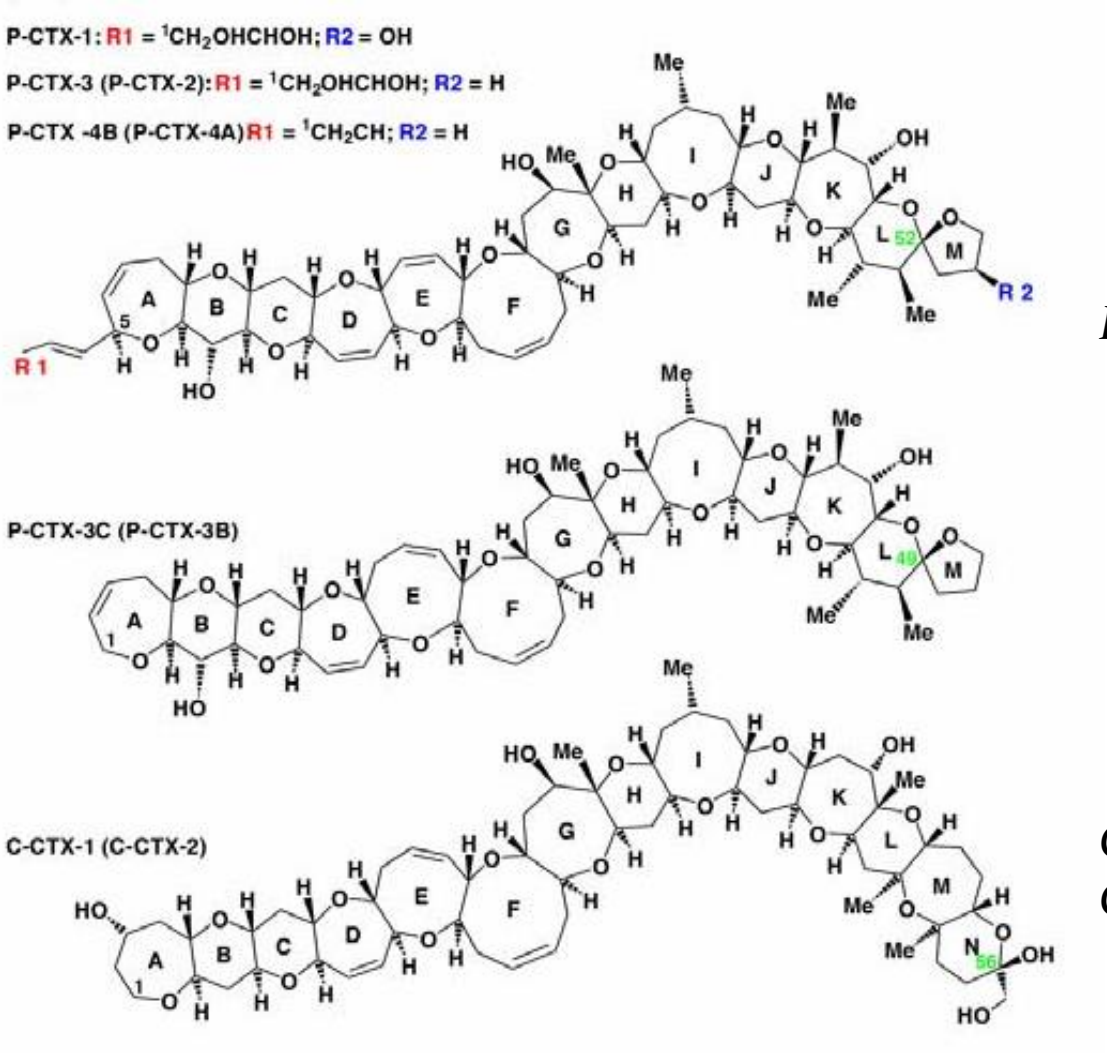
- Produced by the dinoflagellate micro-algae *Gambierdiscus toxicus,* upon corral reefs damage

- Polycyclic polyethers, liposoluble, MW~1100 Da

- 3 famillies :

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

Ciguatoxines Molecular Structures

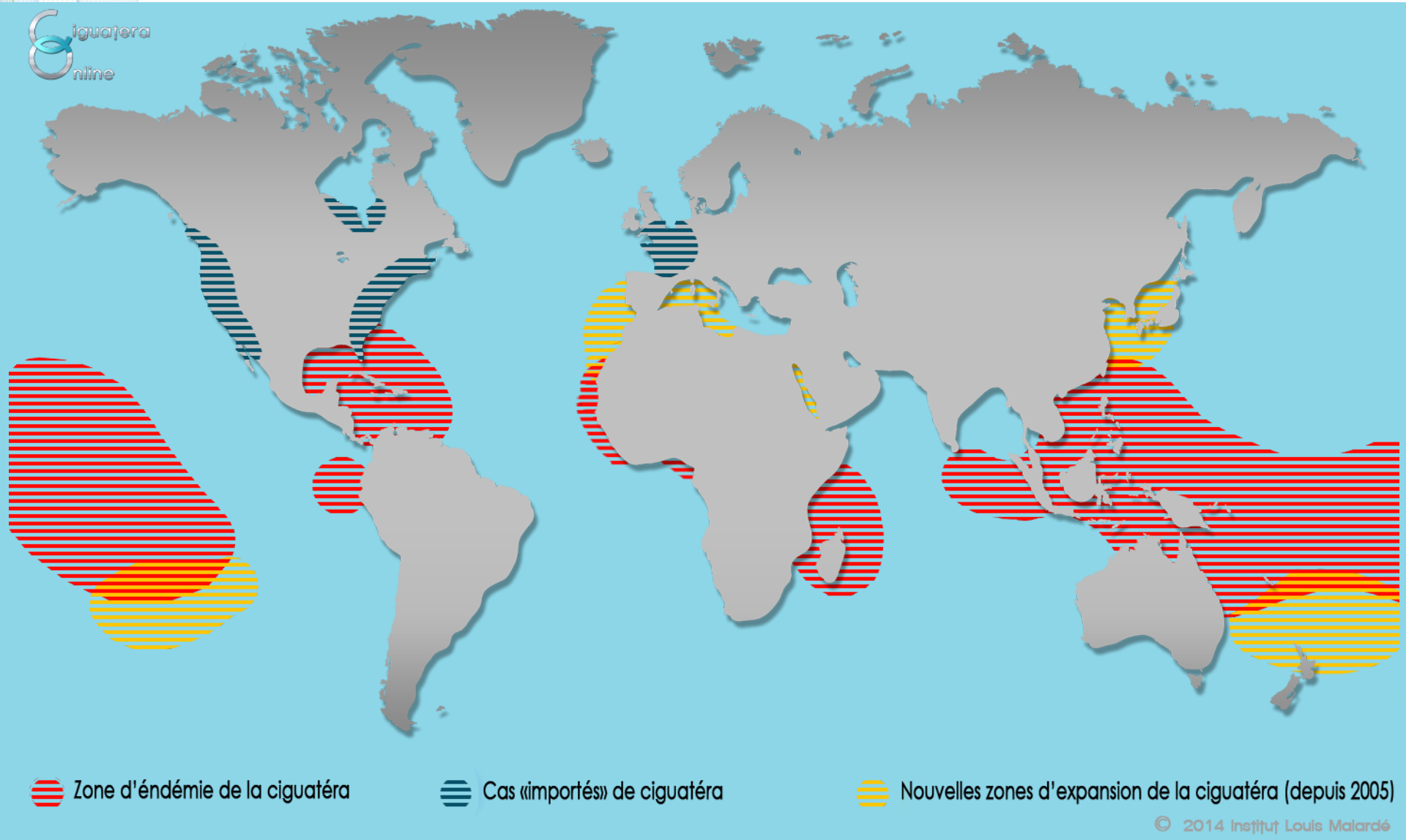


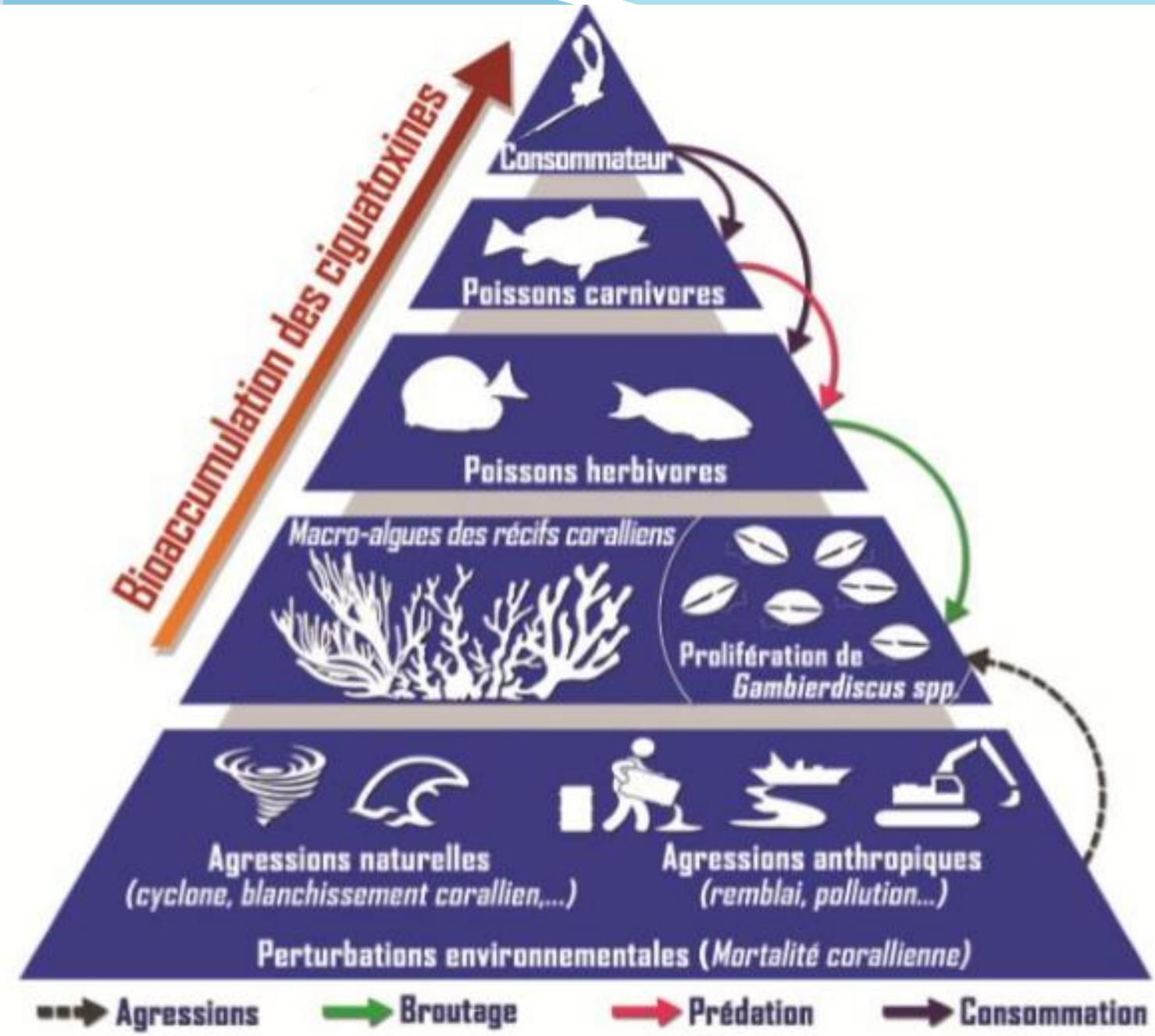
Pacific Ciguatoxines

Caribbean Ciguatoxines

(Nicholson and Lewis, Marin Drugs, 2006).

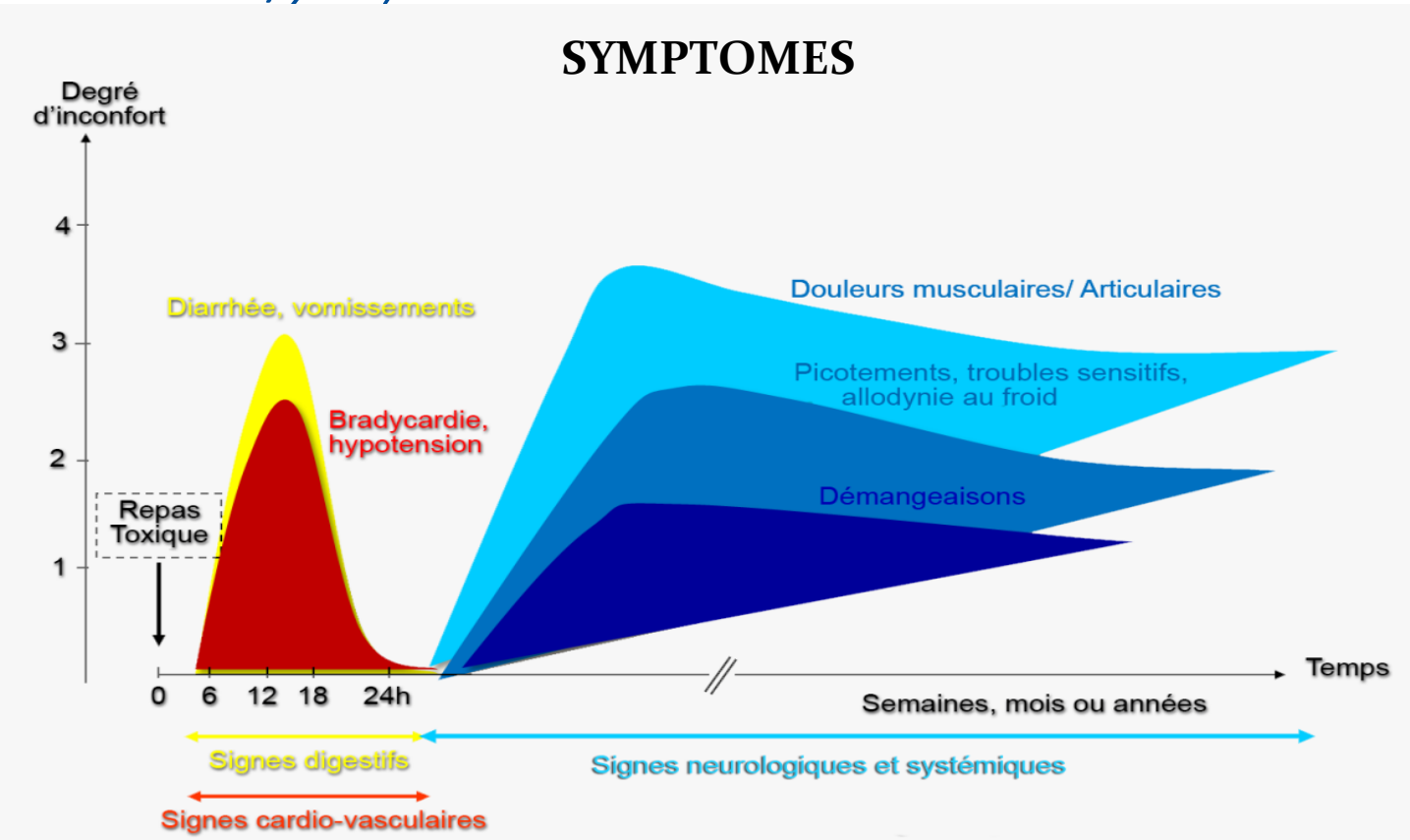
World Repartition of Ciguatera




Bioaccumulation des ciguatoxines
Consommateur
Poissons carnivores
Poissons herbivores
Macro-algues des récifs coralliens
Prolifération de
Gambierdiscus spp.
Agressions naturelles
(cyclone, blanchissement corallien,...)
Agressions anthropiques
(remblai, pollution...)
Perturbations environnementales (Mortalité corallienne)
Agressions
Broutage
Prédation
Consommation

Ciguatera Food Poisoning

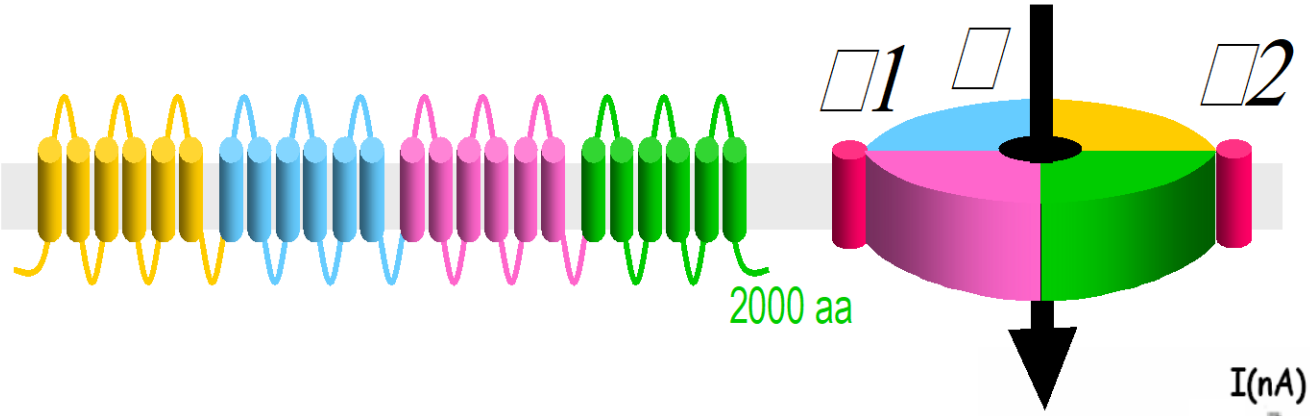
- Considered as the **number one** Food poisoning of marine origine in the world *(~200 000 cases /year).*



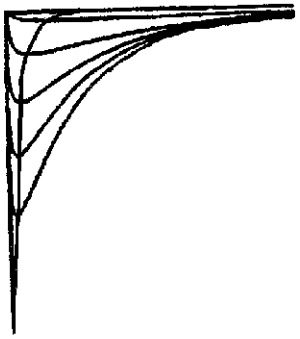
- Body **sensitization** effect : increase of symptoms severity upon next exposure, cross effects (ex : alcohol).

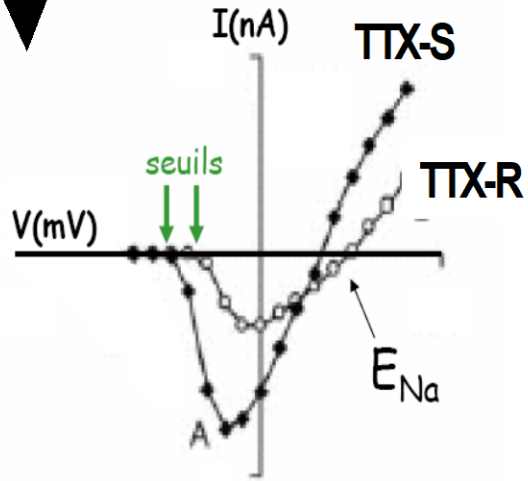
The Targets : Voltage Gated Sodium Channels

rôles dépolarisation de la membrane du neurone et propagation du PA

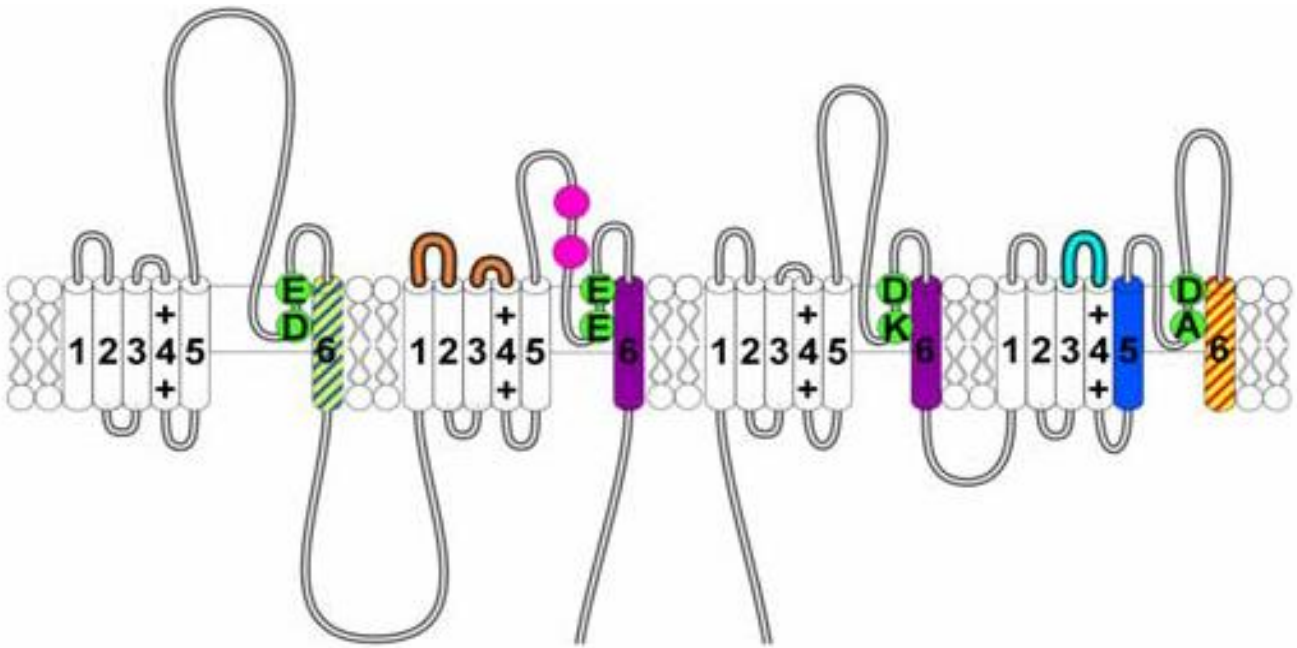


bloqueurs tétrodotoxine
anesthésiques locaux
anti-convulsivants
anti-arythmiques





The Targets : Voltage Gated Sodium Channels



Site 1 Tetrodotoxin
Saxitoxin

Site 1 μ-Conotoxins

Site 2 Batrachotoxin
Veratridine

Site 3 Scorpion α-toxins,
Sea anemone toxins,
Spider δ-toxins

Site 4 Scorpion β-toxins
Magi 5

Site 5 Ciguatoxin
Brevetoxin

Site 7 Pyrethroids

Drugs Local anaesthetics
Anticonvulsants

(Nicholson and Lewis, Marin Drugs, 2006).

- *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 environnemental issues and bioterrorism related threats.***

- ***Relevant regarding curent 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 :

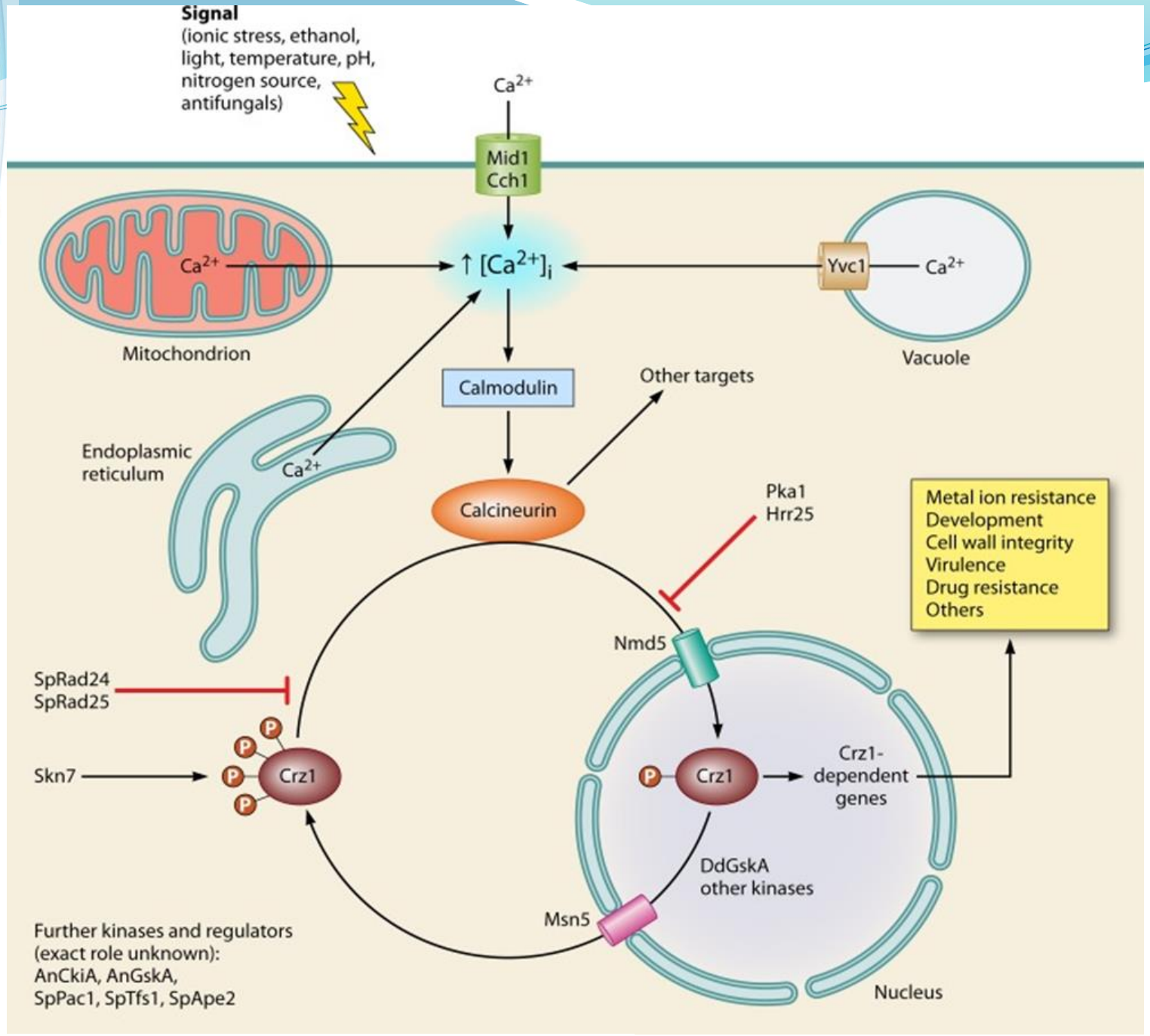
No direct cytotoxic effect of Ciguatoxines on yeast cells.

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

→ *Need for modelization*

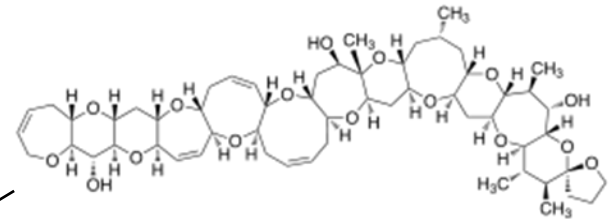
- The closest homolog of mammalian VGSCs in yeast is Cch1, the calcium channel, which activates the Calcineurine pathway.

→ *Is this pathway activated by CTXs ?*


Signal
(ionic stress, ethanol, light, temperature, pH, nitrogen source, antifungals)
Ca2+
Mid1
Cch1
Ca2+
↑ [Ca2+]i
Yvc1
Ca2+
Mitochondrion
Vacuole
Calmodulin
Other targets
Endoplasmic reticulum
Ca2+
Calcineurin
Pka1
Hrr25
Metal ion resistance
Development
Cell wall integrity
Virulence
Drug resistance
Others
Nmd5
SpRad24
SpRad25
Skn7
Crz1
Crz1
Crz1-dependent genes
DdGskA
other kinases
Msn5
Further kinases and regulators (exact role unknown):
AnCkiA, AnGskA,
SpPac1, SpTfs1, SpApe2
Nucleus

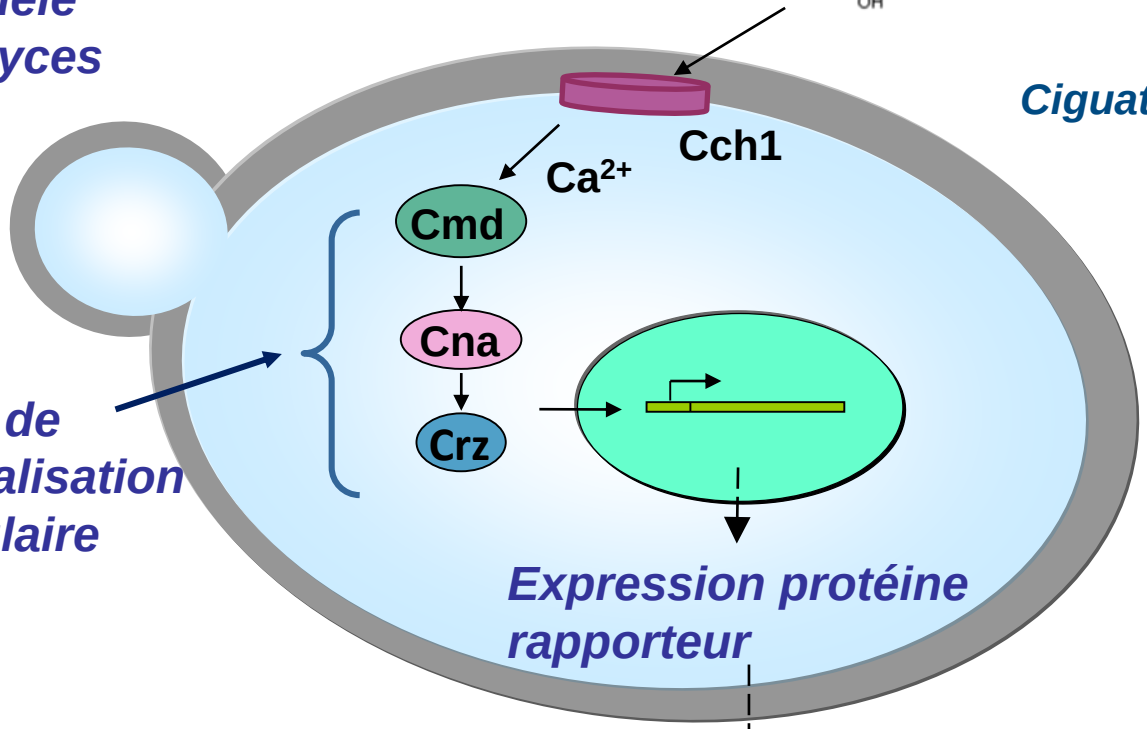
(Thewes, 2014)

Biosensor strains design



Ciguatoxines

Levure modèle Saccharomyces cerevisiae

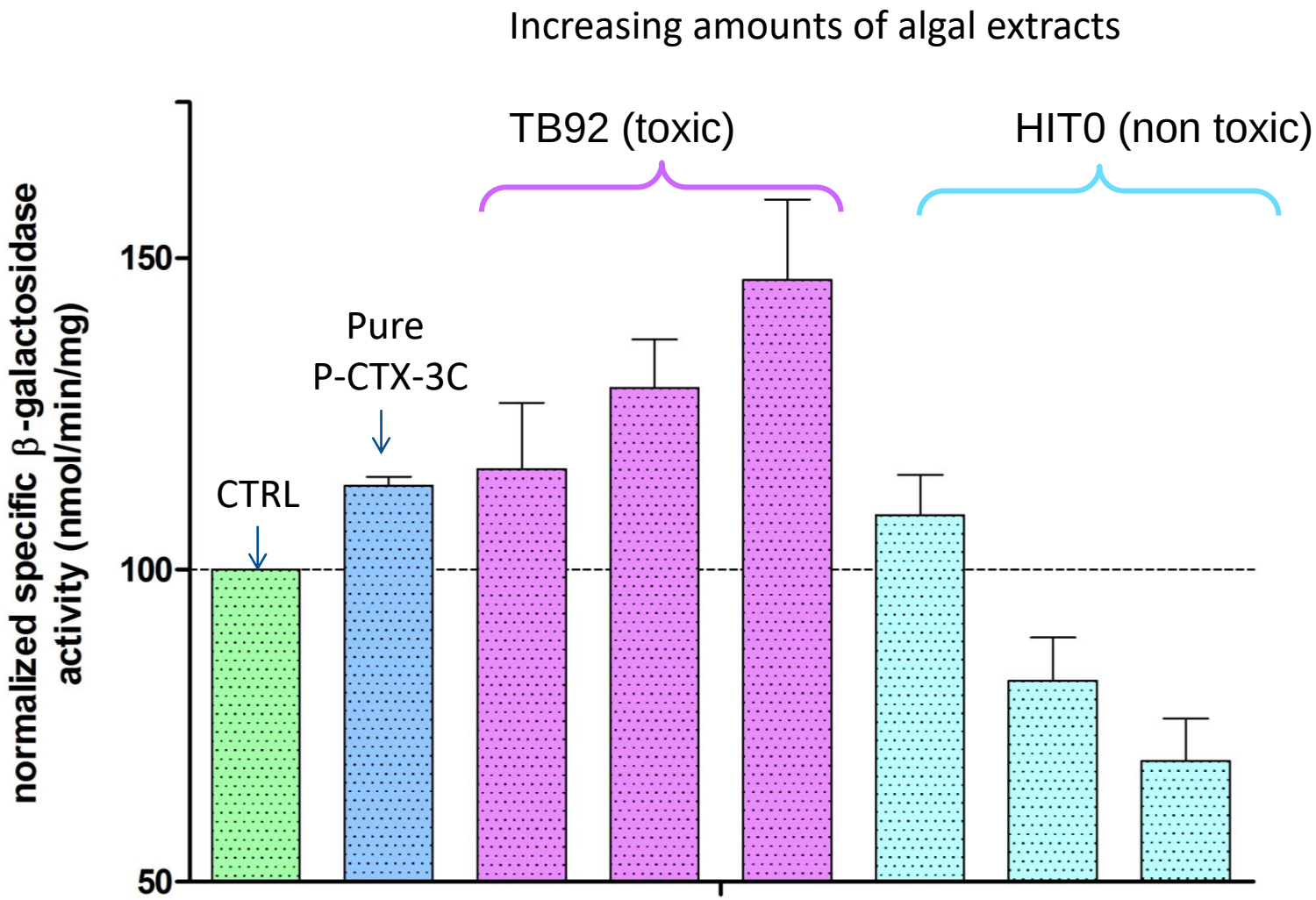


Voie de signalisation cellulaire

Expression protéine rapporteur

Signal colorimétrique ou fluorescent

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 / blokers of VGSC and Cch1

- Hyper-active point mutants of Cch1 and Crz1

- Chimera Construction Cch1-VGSC

Response Optimisation :

- Others promotors ?

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

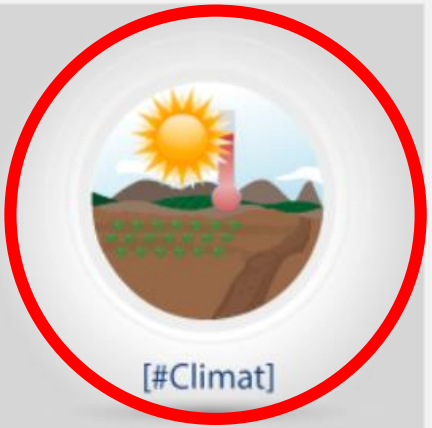
  1rst application : Ciguatoxines

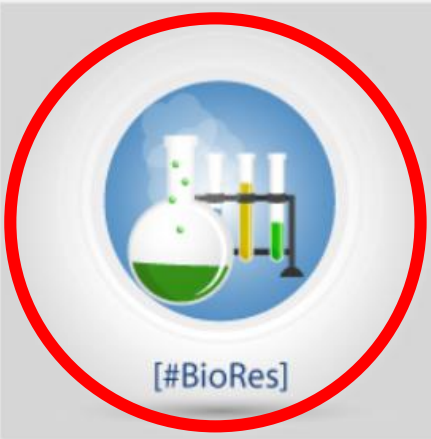
  Biosensors strains développed

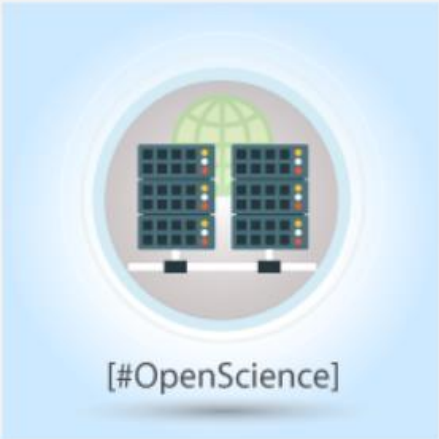
  Project follow-up

- ***INRA H2025 Strategical Orientations***
- ***Temporary affectation : UMR 241 EIO***

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 développed

  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

Unité Mixte de Recherche 241 Ecosystèmes Insulaires Océaniens

Directeur
Marc TAQUET
marc.taquet@ird.fr – 87 77 62 12

Directeur Adjoint
Benoît BELIAEFF
benoit.beliaeff@ifremer.fr – 40 54 60 10

THEME 1 – Resp. Gilles LE MOULLAC
VALORISATION DURABLE DES RESSOURCES NATURELLES

THEME 2 – Resp. Mireille CHINAIN
ENJEUX SANITAIRES ET ZOOSANITAIRES

THEME 3 – Resp. Jean-Claude GAERTNER
VULNERABILITE DES ECOSYSTEMES INSULAIRES

Assistantes-Gestionnaires
Aline DENDEN
secretariat-umr241@upf.pf
40 80 39 67
Françoise HALE
francoise.hale@ird.fr
40 47 42 02

Chercheurs et Enseignants chercheurs

BRAHMI Chloé – MCU - UPF
DEMOY-SCHNEIDER Marina – MCU - UPF
GOGUENHEIM Jean – C2A - IFREMER
HO Raimana – MCU – HDR - UPF
KY Chin Long – C1 – HDR - IFREMER
LE LUYER Jérémy – C1 – HDR - IFREMER
LE MOULLAC Gilles – C2B – HDR - IFREMER
RAHARIVELOMANANA Phila – PRU – HDR -UPF
REISSER Céline – C1 - IFREMER
SCHMITT Nelly – MCU - UPF
SOULET Stéphanie – MCU - UPF
TEAI Taivini – MCU –HDR - UPF

CHINAIN Mireille – CR – HDR - ILM
DARIUS H. Taiana – CR - ILM
GATTI Clémence – CR - ILM
ROUE Mélanie – CR - IRD
SAULNIER Denis – C2A – HDR - IFREMER
SUHAS Edouard – CR - ILM

ASCHENBROICH Adelaïde – ½ ATER - UPF
BELIAEFF Benoit – C3 – HDR - IFREMER
GAERTNER Jean-Claude – DR – HDR - IRD
GAERTNER-MAZOUNI Nabila – PRU – HDR - UPF
LAFABRIE Céline – MCU - UPF
MARTINEZ Elodie – CR - IRD
MORSCHEL Jean – MCU - UPF
RODIER Martine – CR - IRD
TAQUET Marc – DR – HDR - IRD
TCHEKEMIAN Anthony – MCU - UPF
ZUBIA Mayalen – MCU - UPF

Ingénieurs et Techniciens

AUFFRET Pauline – VSC - IFREMER
BASSET Caline – Tech – IFREMER
BISCH Lauriane – Tech - IFREMER
BOUCHER Carol – Tech - UPF
BROUSTAL Floriane – VSC - IFREMER
CHUPEAU Cassandre – VSC - IFREMER
CRUSOT Margaux – VSC - IFREMER
LEHARTEL Tamatoa – Tech - UPF
MAIHOTA Mayaline – Tech - IFREMER
MEGE Mickaël – VSC - IFREMER
QUILLIEN Virgile – Tech - IFREMER
SHAM-KOUA Manaarii – Tech - IFREMER
SOYEZ Claude – Tech - IFREMER
TETAURA Nono – Tech - IFREMER
TETUMU Roger – Tech - IFREMER
VANAA Vincent – Tech - IFREMER

BELLIARD Corinne – Tech - IFREMER
CRUCHET Philippe – Tech - ILM
HENRY Kévin – Tech - ILM
REVEL Taina – Tech – ILM
TCHONG Tiriana – CVD - ILM
UNG André – Tech - ILM
VIALLON Jérôme – IE - ILM

BONNO Emile – Tech - IRD
FONTANA Clément – IR - IRD
LO-YAT Alain – IR - IFREMER
MAIHOTA Nicolas – Tech - IRD

Post Doctorants et Doctorants

BENAYAD Sarah – Doc - UPF
GARDON Tony – Doc- IFREMER
HUGHES Kristelle – Doc- UPF
LATCHERE Oihana – Doc - UPF
STENGER Pierre Louis – Doc - UPF
TEANINIURAITEMOANA Vaihiti- Post-Doc - IFREMER
VITRAC Marotea - Doc - UPF

LONGO Sébastien - Doc- UPF

AUBERT Anaïs - Post-Doc - IRD
BUHOT Michel - Doc – UPF
HULOT Vivien - Doc - UPF
LEGRAS Gaëlle - Doc- UPF
LEPETIT Camille - Doc- UPF
RAAPOTO Hirohiti - Doc - IRD
SANGARE Nathanaël – Doc - IFREMER
SAUZEDE Raphaelle - Post-Doc - IRD
THEOPHILUS Tohei - Doc – UPF

UMR 241 Ecosystèmes Insulaires Océaniens

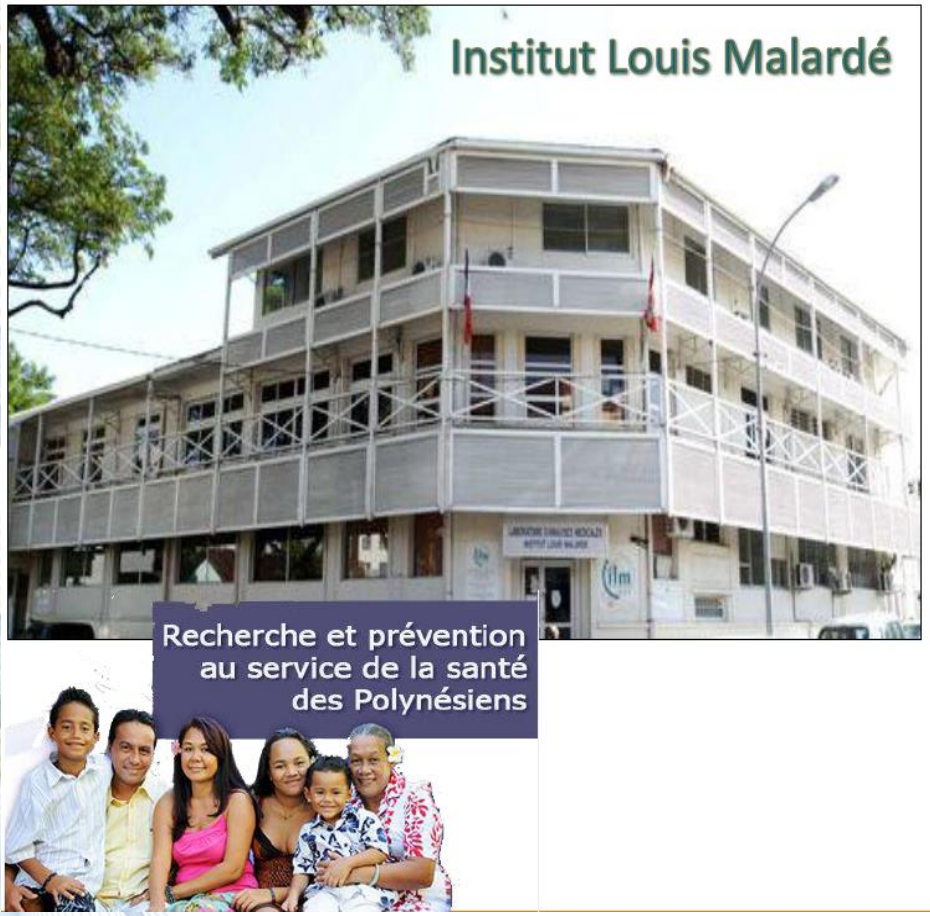
Direction | Service Commun | Thématiques de recherche

Le thème indiqué pour chaque personnel correspond à son thème principal

Màj 24/10/2017

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

History of ciguatera research in French Polynesia



- **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).

d'après Deval 2008

La famille des canaux VGSCs **de mammifères**

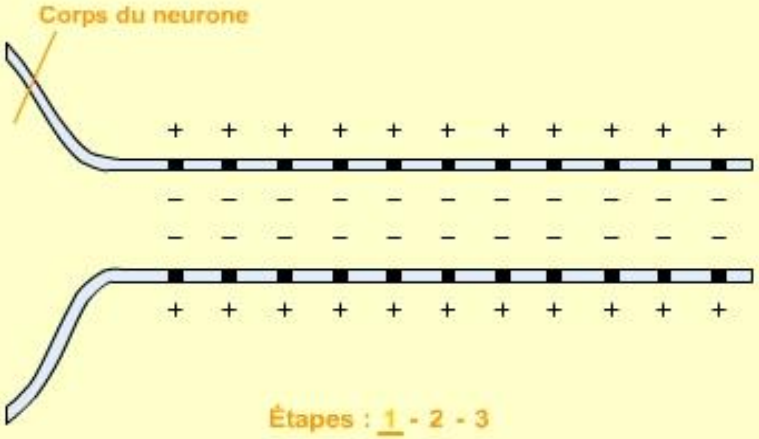
Nomenclature	Distribution	Disease correlations
$Na_v1.1$	Brain, spinal cord	Epilepsy
$Na_v1.2$	Brain, spinal cord, peripheral nerve	Epilepsy
$Na_v1.3$[a]	Brain, spinal cord	Pain
$Na_v1.4$	Skeletal muscle	Movement disorders
$Na_v1.5$	Cardiac muscle, skeletal muscle	Cardiovascular syndromes
$Na_v1.6$	Brain, spinal cord, DRG	Movement disorders, neurological disorders
$Na_v1.7$[a]	DRG, endocrine glands (adrenal & thyroid)	Neuroendocrine disorders, pain
$Na_v1.8$[a]	Peripheral nerves (small sensory neurons, DRG)	Pain
$Na_v1.9$[a]	Spinal cord (sensory axons), DRG	Pain

Canaux VGSC comme cibles therapeutiques

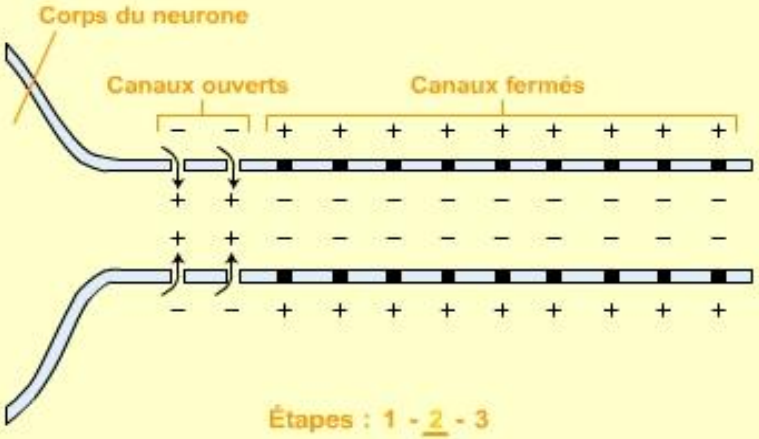
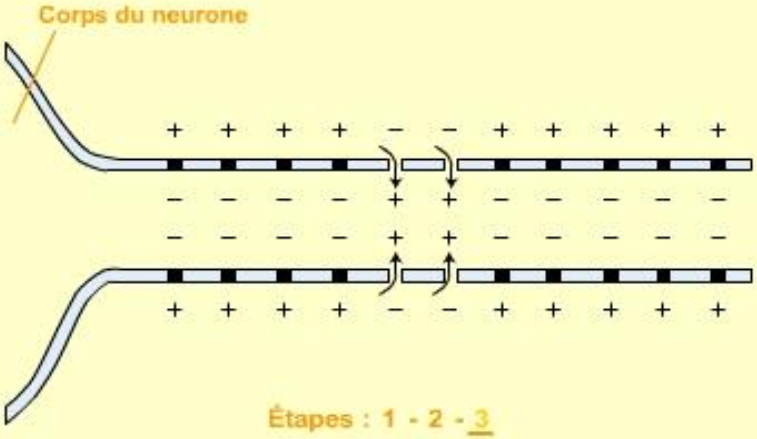
pharmacologie antinociceptive	Douleur chronique et neuropathique	**développements**
Anesthésiques locaux (lidocaïne)	i.t. injections (lamotrigine)	TTX^R , NaV1.7

From Delmas, Cell 2008

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.