OcéaSafe Project : Developing yeast-based biosensors for Marine Toxins

Hélène Martin-Yken

Chargée de Recherche INRA (MICA)

LISBP Toulouse





- ***Introduction :***
  - ***Personnal Scientific Background***
  - ***Ciguatera Food Poisoning***

- ***Scientific Project :***
  - ***Scientific Questions***
  - ***1rst application : Ciguatoxines***
  - ***Biosensors strains developped***
  - ***Project follow-up***

- *INRA H2025 Strategical Orientations*
- *Collaborators : UMR 241 EIO*

Context: personal scientific background

Chargée de Recherche INRA (MICA)

Research 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

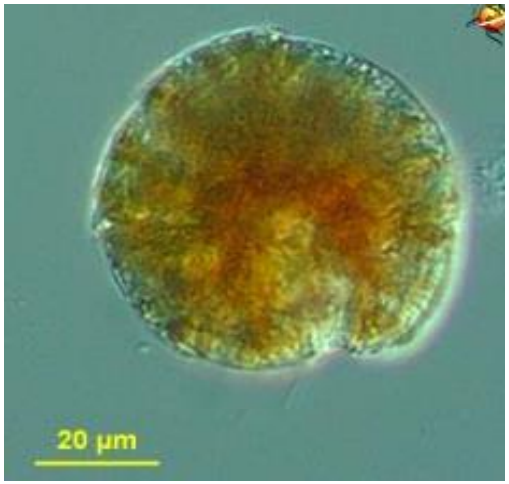
In LISBP (Laboratoire d'Ingénierie des Système Biologiques et des Procédés), Team : Physiology and Functional Genomic of Eukaryotes.

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.

- Fi 50).
- Fi pe
  th cific.
- F th
  1
- T
  d uban
  n

THE CAUSAL AGENT : CIGUATOXINES (CTXS)



Gambierdiscus toxicus, (B Anderson, MBL.)

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

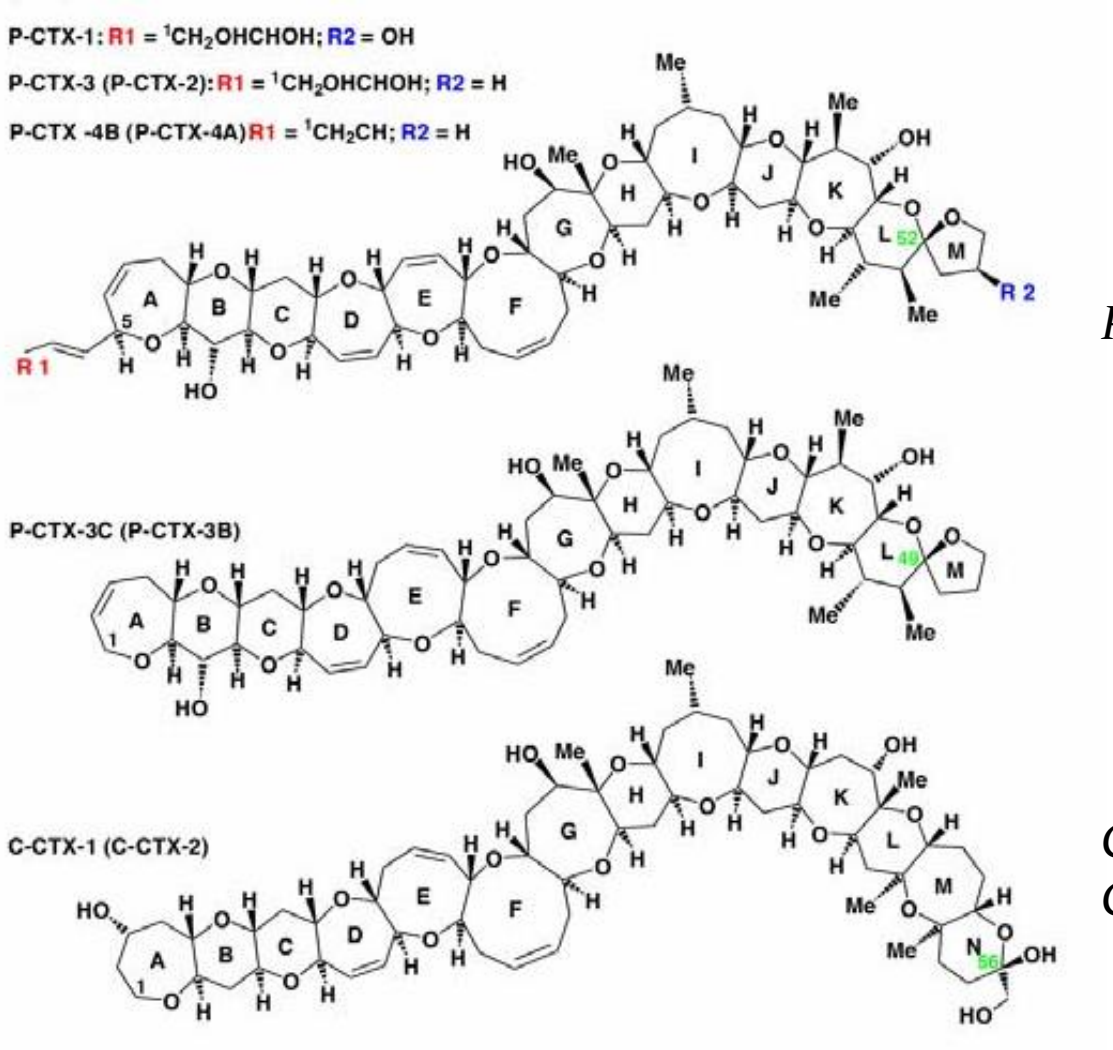
- Produced by the dinoflagellate micro-algae *Gambierdiscus toxicus,* upon corral reefs damage

- Polycyclic polyethers, liposoluble, MW~1100 Da

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

No simple detection test available !!!

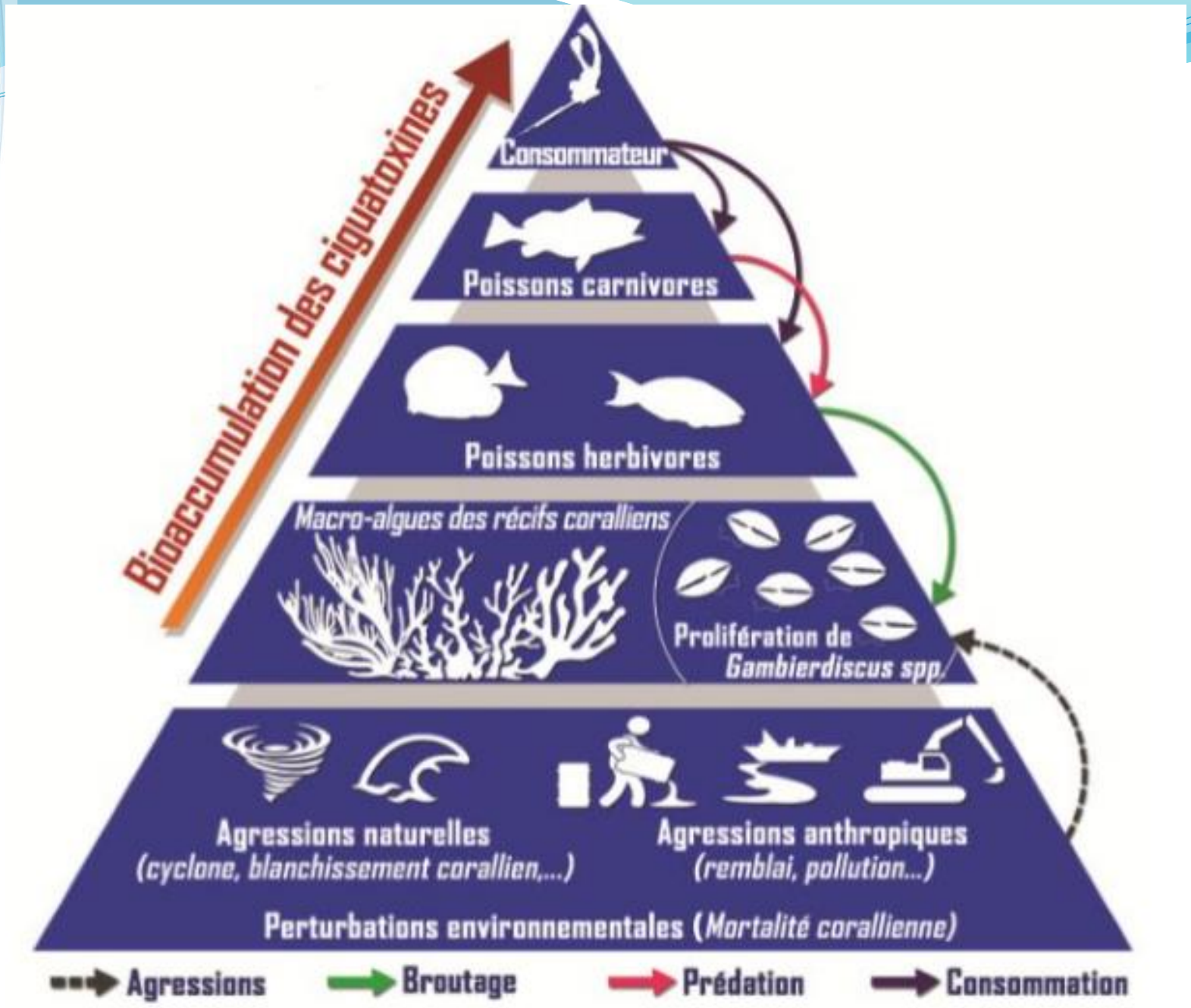
Ciguatoxines Molecular Structures



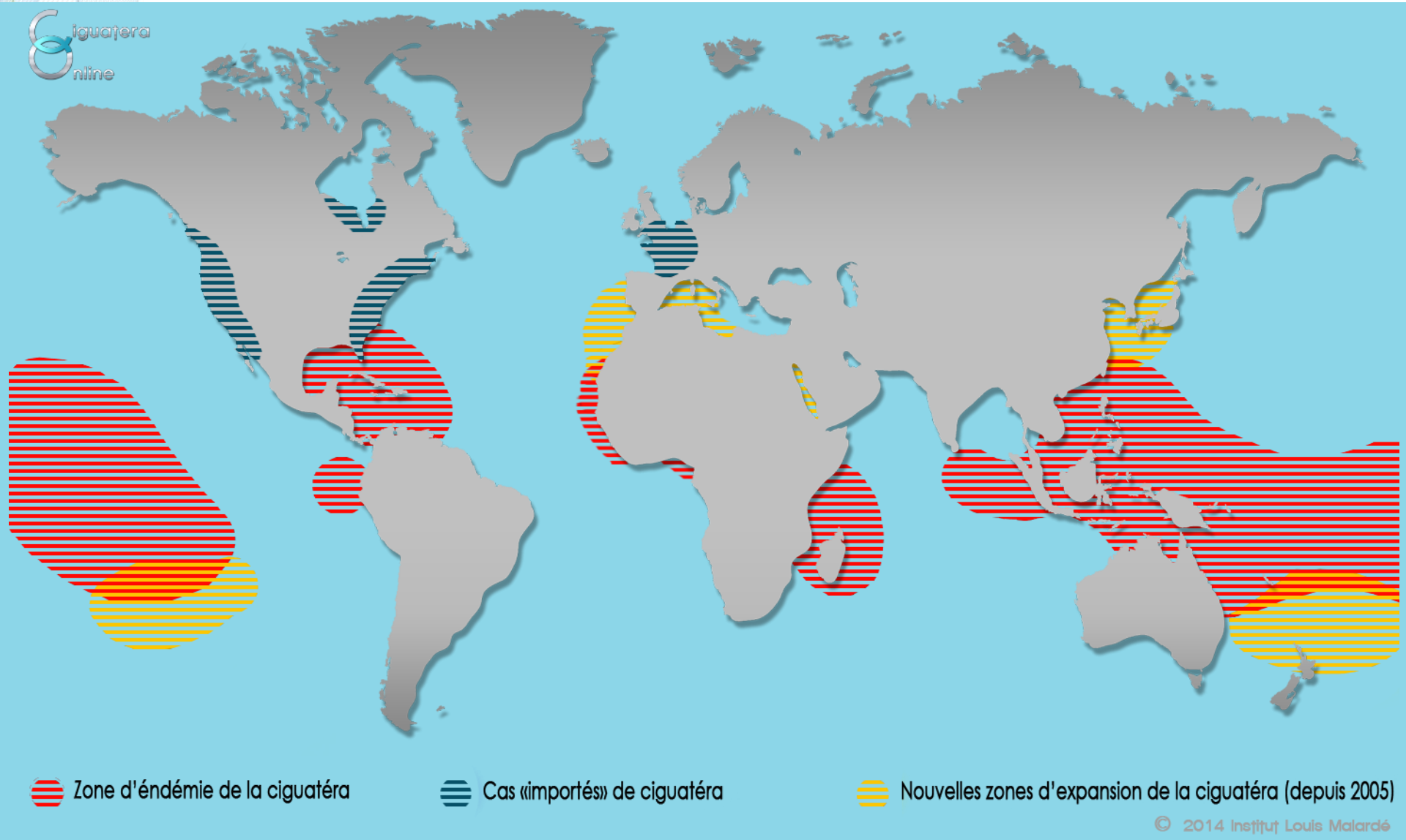
Pacific Ciguatoxines

Caribbean Ciguatoxines

(Nicholson and Lewis, Marin Drugs, 2006).

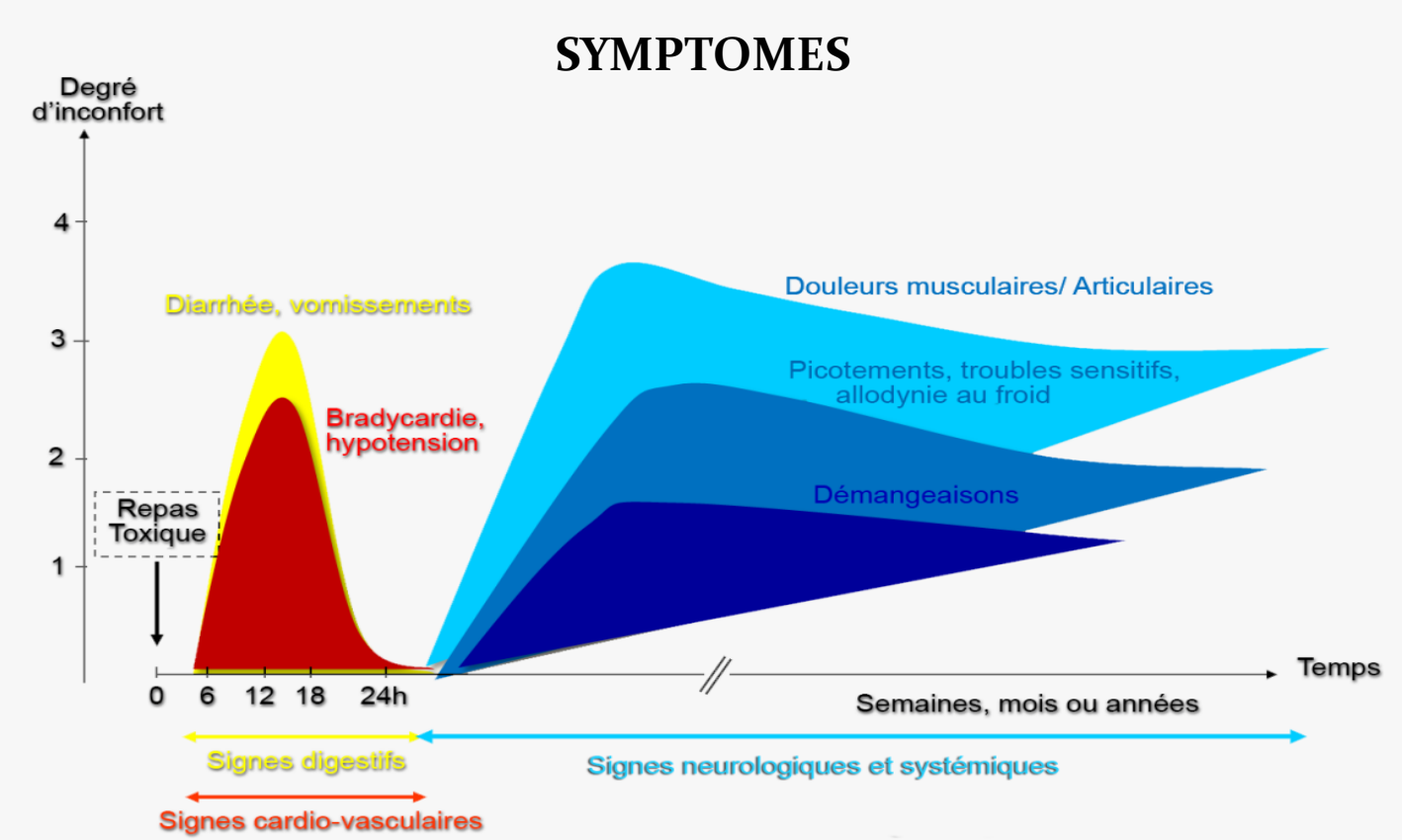

Bioaccumulation des ciguatoxines
Consommateur
Poissons carnivores
Poissons herbivores
Macro-algues des récifs coralliens
Prolifération de Gambierdiscus spp.
Agressions naturelles
(cyclone, blanchissement corallien,...)
Agressions anthropiques
(remblai, pollution...)
Perturbations environnementales (Mortalité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

World Repartition of Ciguatera



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).

CTXs Targets :
Voltage Gated Sodium Channels

- VGSC play key roles **in electric signal propagation** in excitable tissues (nerves, heart, muscles).

- Mechanism : activation of VGScs provokes a transiant depolarization, responsible of the ascendant phase of the action potential.

- **CTXs stay fixed and prevent repolarization of VGSCs.**

La famille des canaux VGSCs **de mammifères**

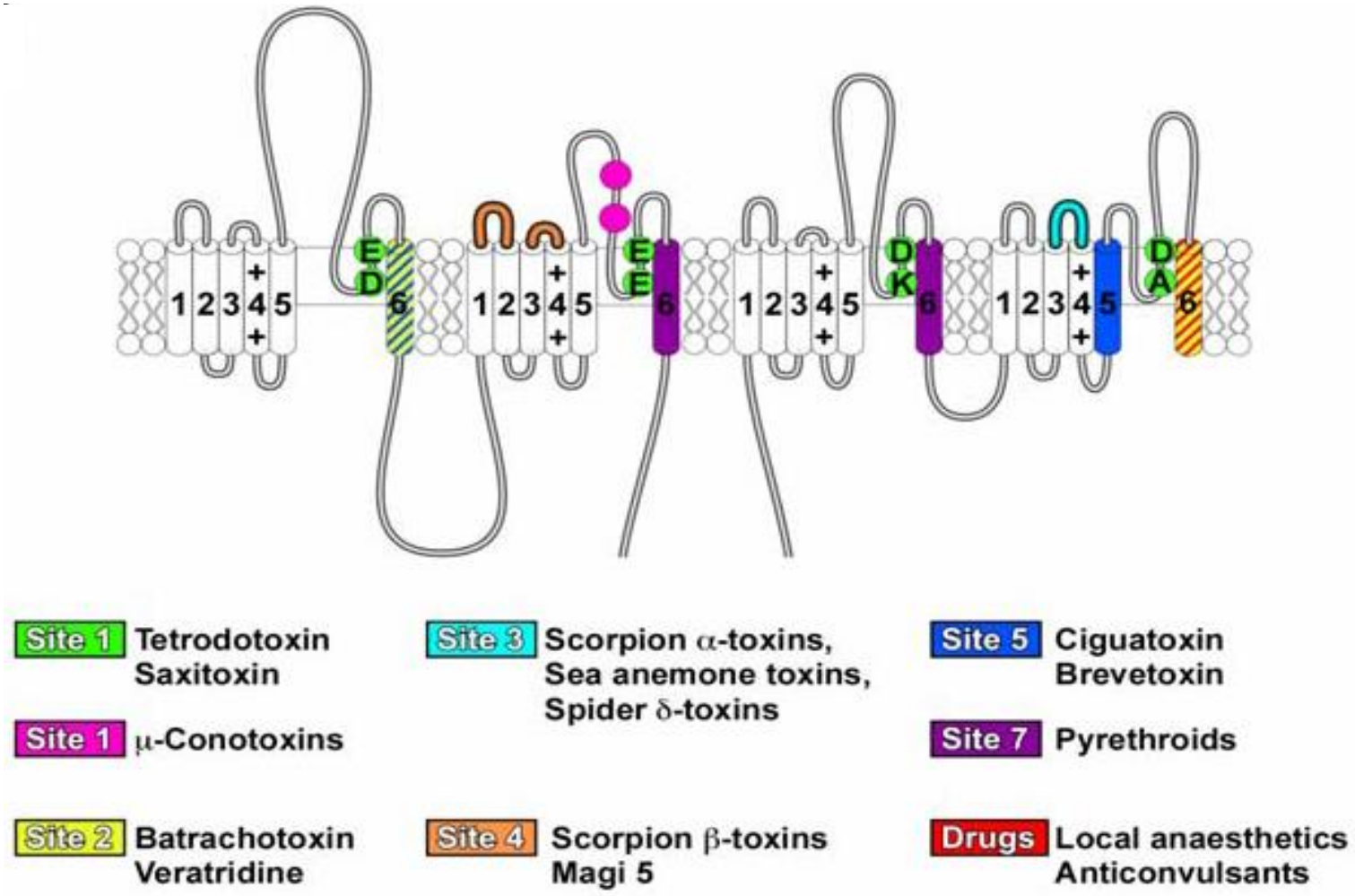
Nomenclature	Distribution	Disease correlations
$Na_v1.1$	Brain, spinal cord	Epilepsy
$Na_v1.2$	Brain, spinal cord, peripheral nerve	Epilepsy
$Na_v1.3$[a]	Brain, spinal cord	Pain
$Na_v1.4$	Skeletal muscle	Movement disorders
$Na_v1.5$	Cardiac muscle, skeletal muscle	Cardiovascular syndromes
$Na_v1.6$	Brain, 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

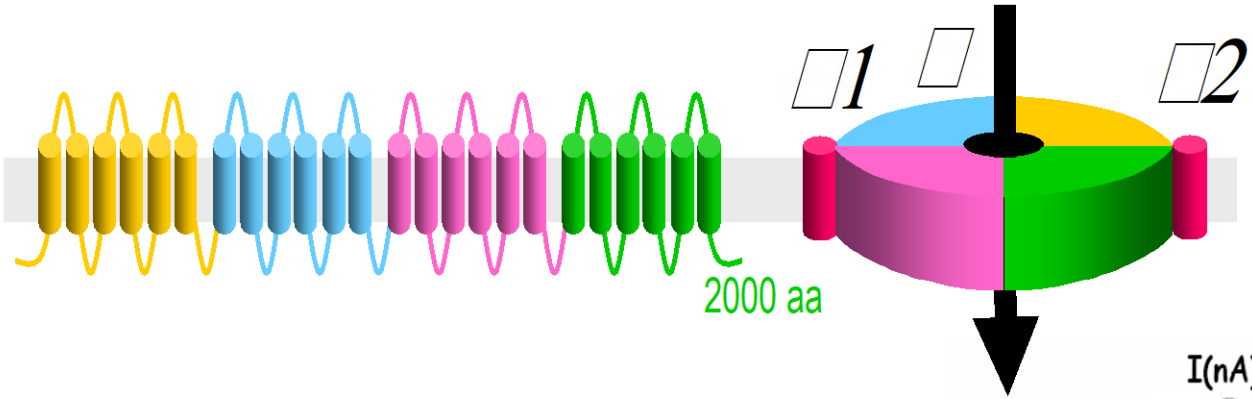
CTXs Targets : Voltage Gated Sodium Channels



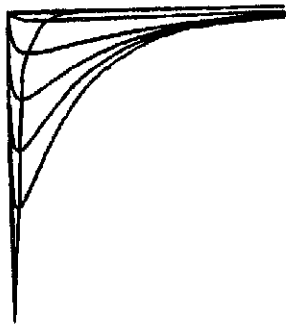
(Nicholson and Lewis, Marin Drugs, 2006).

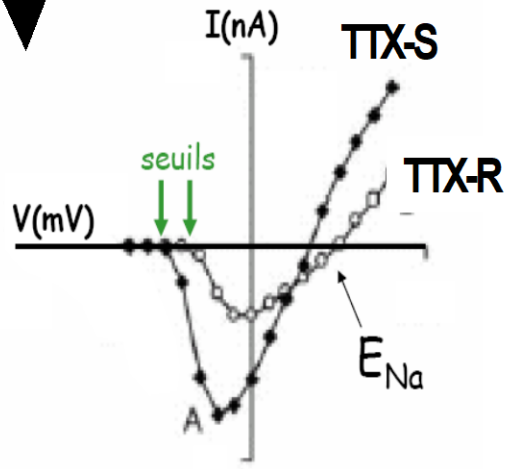
CTXs Targets : Voltage Gated Sodium Channels

rôles dépolarisation de la membrane du neurone et propagation du PA



bloqueurs tétrodotoxine
anesthésiques locaux
anti-convulsivants
anti-arythmiques





CTXs Detection : problematic

- Current assays : heavy, difficult, long, expensive, and/or unethical (*Mouse bioassay, RBA, CBA, HPLC…)*

→ *URGENT NEED FOR A SIMPLE DETECTION TOOL !!!*

- Can we design a biosensor for Ciguatoxins ?

- Yeast based bio sensors : interesting for several reasons

Developping 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 :

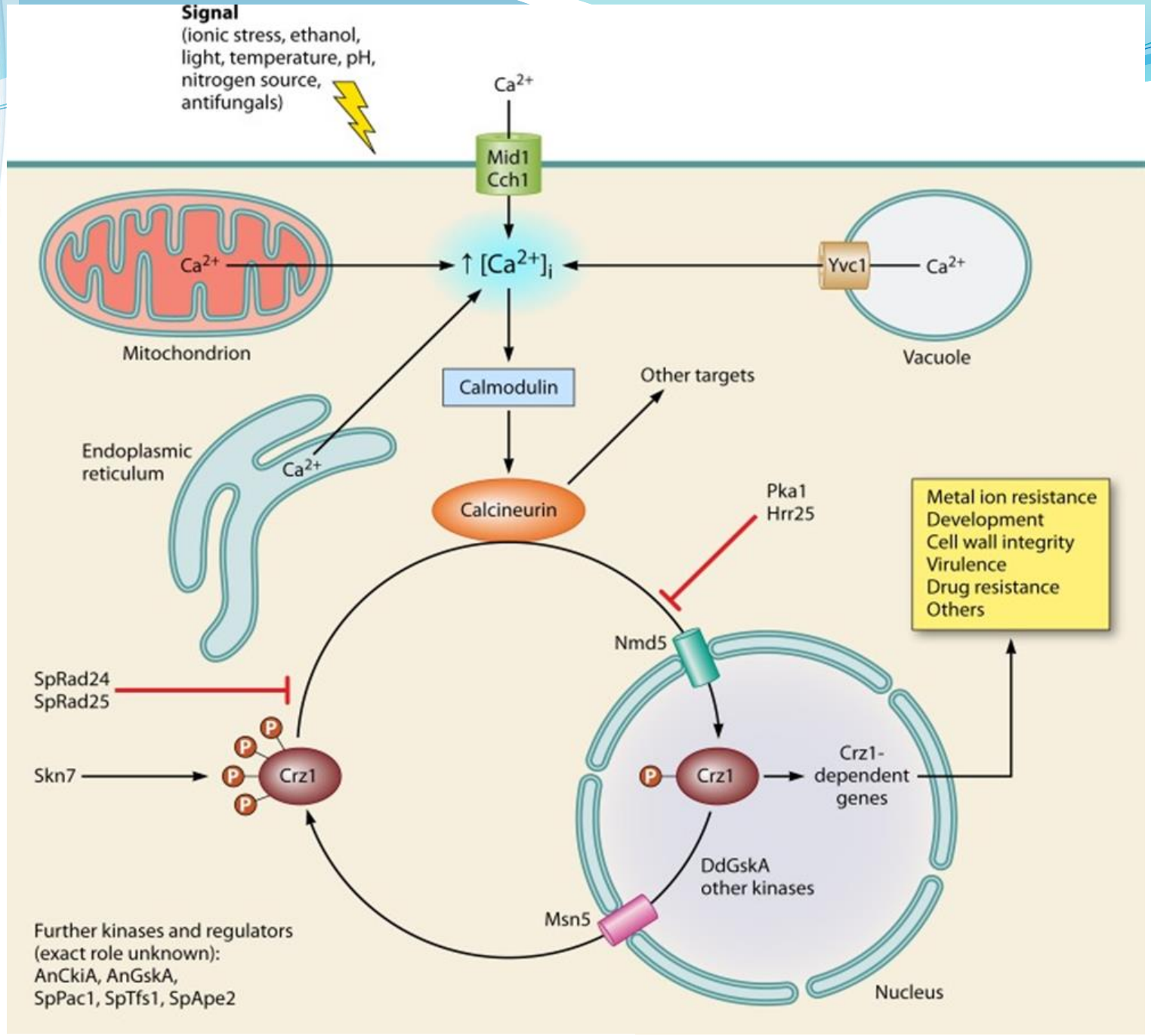
No direct cytotoxic effect of Ciguatoxins on yeast cells.

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

→ *Need for modelization*

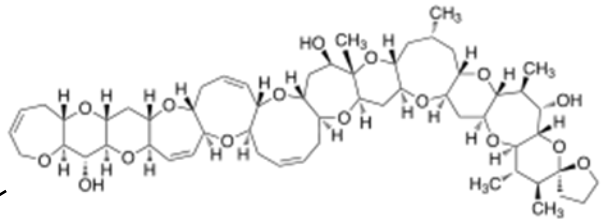
- The closest homolog of mammalian VGSCs in yeast is Cch1, the calcium channel, which activates the Calcineurine pathway.

→ *Is this pathway activated by CTXs ?*


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

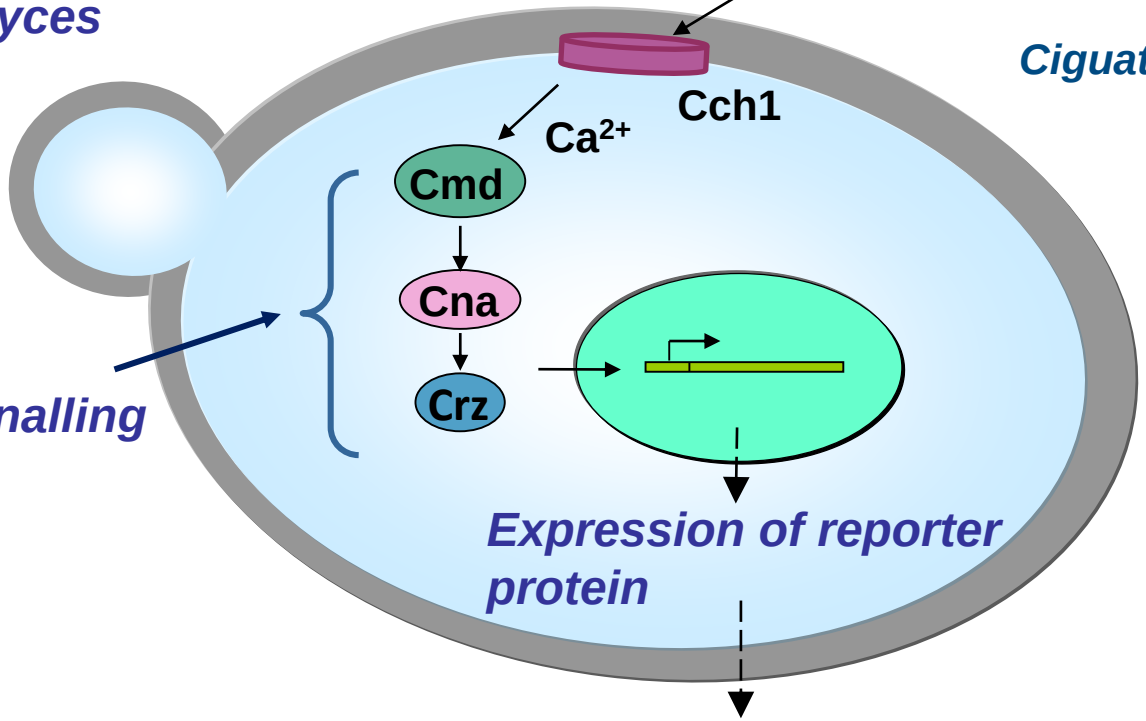
(Thewes, 2014)

Biosensor strains design



Ciguatoxins

Model Yeast Saccharomyces cerevisiae

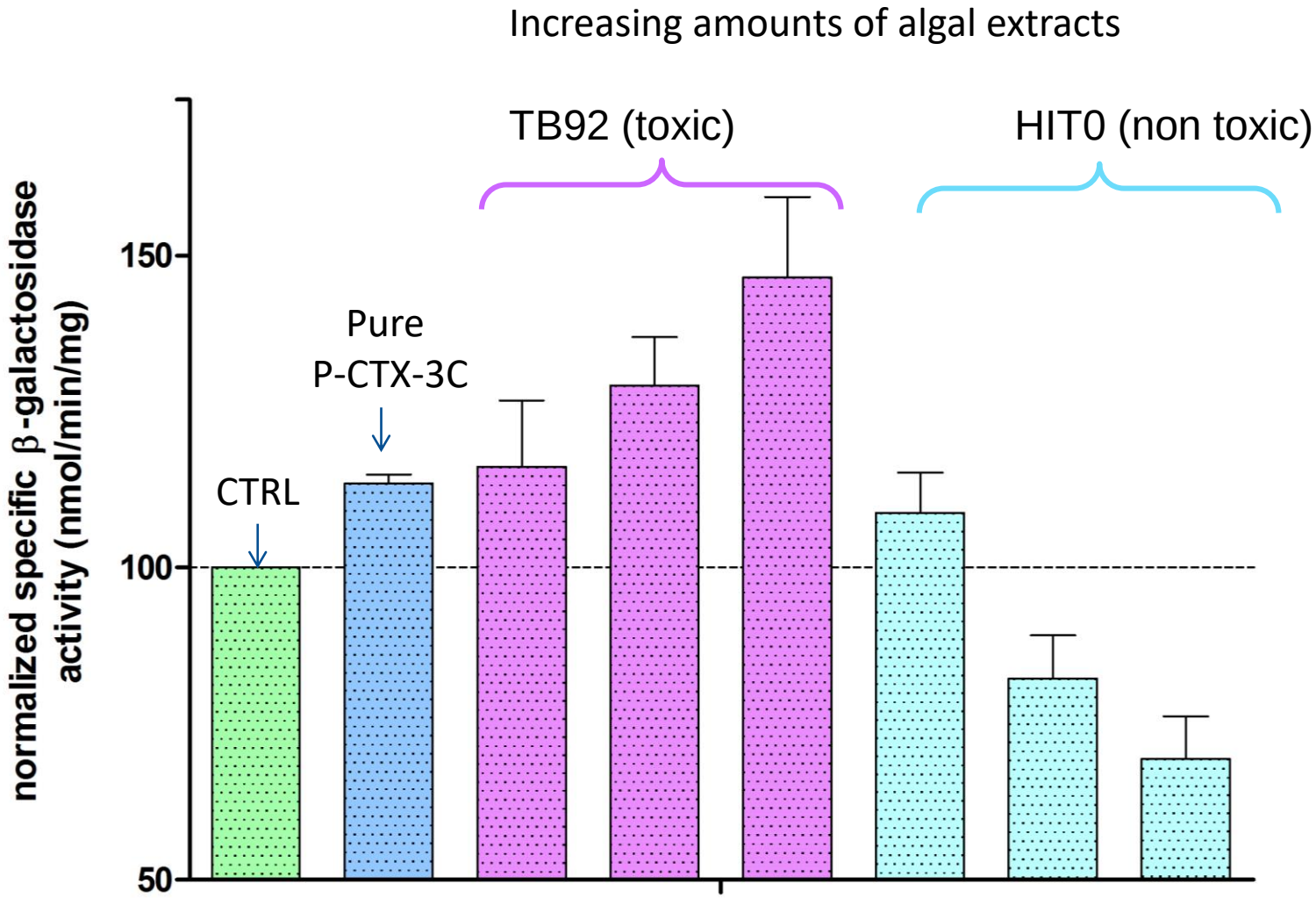


Cellular signalling pathway

Expression of reporter protein

Signal (fluorescence or colorimetry)

Response to Algal extracts



Perspectives :

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 Cch1-VGSC

Response Optimisation

Developp a generic approach, apply to other toxins and drugs binding VGSCs.

Future applications : build a bio-sensor : huge interest for Pharmacology and Environmental domains

Thanks for your attention !

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

CIGUATERA

Poissons dangereux à la consommation

- ★ Pêches et ventes interdites en tous lieux et en tous temps.
- ★ Pêches et ventes interdites au nord du 16,5° parallèle (cf. carte).
- ★ Pêches et ventes interdites, quel que soit le lieu de pêche, si le poids dépasse 1 kg.

Poissons interdits à la pêche et à la vente

(Arrêté préfectoral n°2002-1249)



Vector fish of ciguatera toxins



Ctenochaetus striatus



Neso unicornis



Cheilinu



Neso brevirostris



Caranx sexfasciatus



Lutjanu



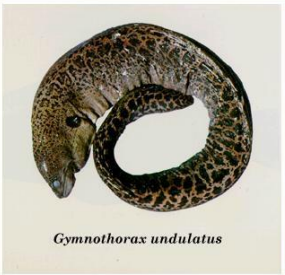
Lutjanus rivulatus



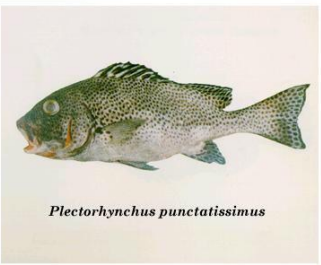
Glabrilutjanus nematophorus



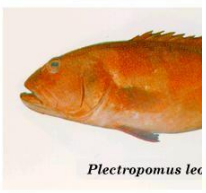
Scar



Gymnothorax undulatus



Plectorhynchus punctatissimus



Plectropomus le

POISSONS VÉNÉNEUX

OFIMER

RÉGION GUADELOUPE

La pêche et la vente de ces poissons sont interdites en tout temps et tous lieux.

ARCHIPEL DE LA GUADELOUPE

TÉTRODONS ET DIODONS
Puffer, Spotfin Burrfish, Spotfin Porcupinefish.
Chilomycterus et *Diodon*



BARRACUDA BÉCUNE
Great Barracuda
Sphyraena barracuda





CARANGUE JAUNE
Yellow Jack
Caranx bartholomaei



GRANDE SÉRIOLE
Greater Amberjack
Seriola dumerili



SÉRIOLE LIMON - BABIANE
Almaco Jack
Seriola rivoliana

La même interdiction s'applique aux poissons pêchés au nord du parallèle 16° 50' de latitude Nord, appartenant aux espèces suivantes :



CARANGUE NOIRE
Black Jack
Caranx lugubris



CARANGUE FRANCHE
CARANGUE BLEUE
Bar Jack
Caranx ruber



CARANGUE GROS-YEUX MAYOL
Horse Eye Jack
Caranx latus



MURÈNE CONGRE VERT
Green Moray
Gymnothorax funebris



VIEILLE À CARREAUX
Yellow fish Grouper
Mycteroperca venenosa



VIEILLE MORUE
Tiger Grouper
Mycteroperca tigris



VIEILLE VARECH
Mutton Hamlet
Alphestes afer



VIEILLE BLANCHE
Red Grouper
Epinephelus morio



La même interdiction s'applique aux poissons ci-dessous, quel que soit le lieu de pêche, si leur poids dépasse 1 kg.

PAGRE DENTS DE CHIEN
Dog Snapper
Lutjanus jocu
Concerné par les deux interdictions



VIVANEAU OREILLES NOIRES
Blacklin Snapper
Lutjanus buccanella



PAGRE JAUNE
Shoolmaster Snapper
Lutjanus apodus

Extrait de l'Arrêté Préfectoral n°2002/1349 du 19/08/2002 : Annexes n°2 et 3.

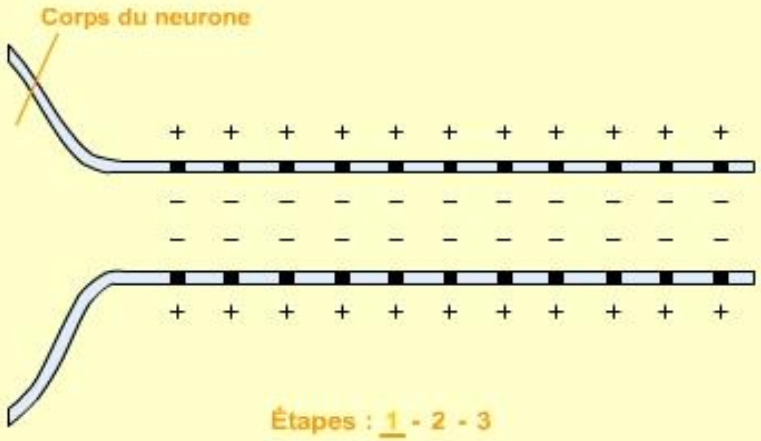
Dessins : ©Th. Petit le Brun 2006 avec le concours de l'association Green Sub et de l'APSBT.

- *Introduction (Context) :*
  - *Human Ressources*
  - *Ciguatera Food Poisoning*

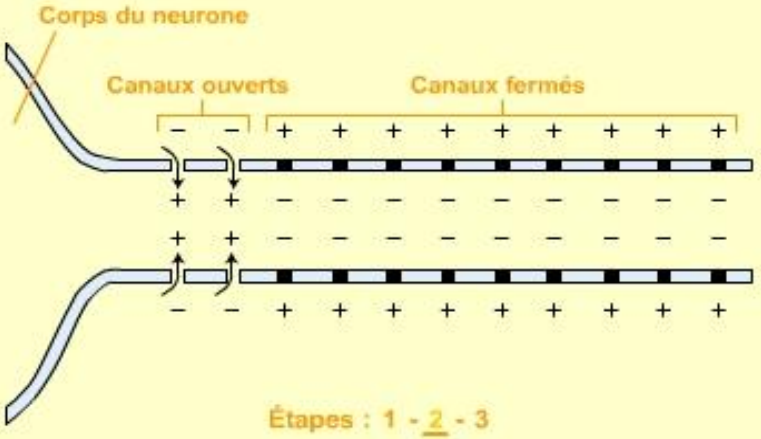
- *Scientific Project :*
  - *Scientific Questions*
  - *1rst application : Ciguatoxines*
  - *Biosensors strains développed*
  - *Project follow-up*

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

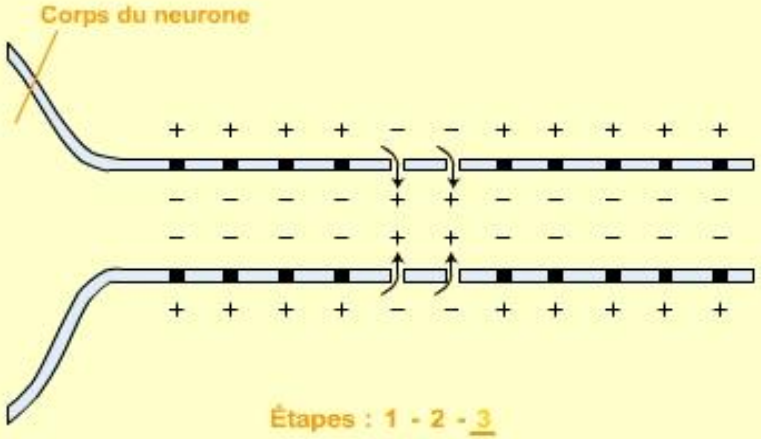
1. À l'état de repos, les canaux de la membrane du neurone créent une répartition inégale des charges : davantage de charges négatives à l'intérieur et plus de charges positives à l'extérieur.



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.

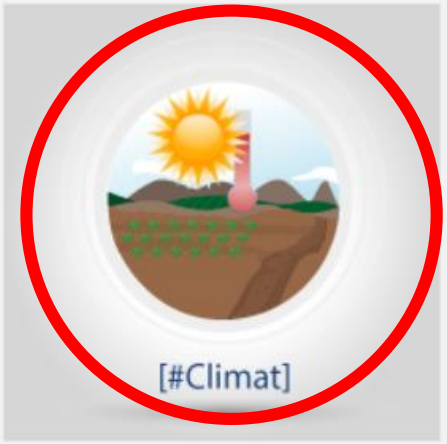




5 priorités thématiques et 3 orientations de politique générale

















L'UMR 241 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
TEANIINIURAITEMOANA 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

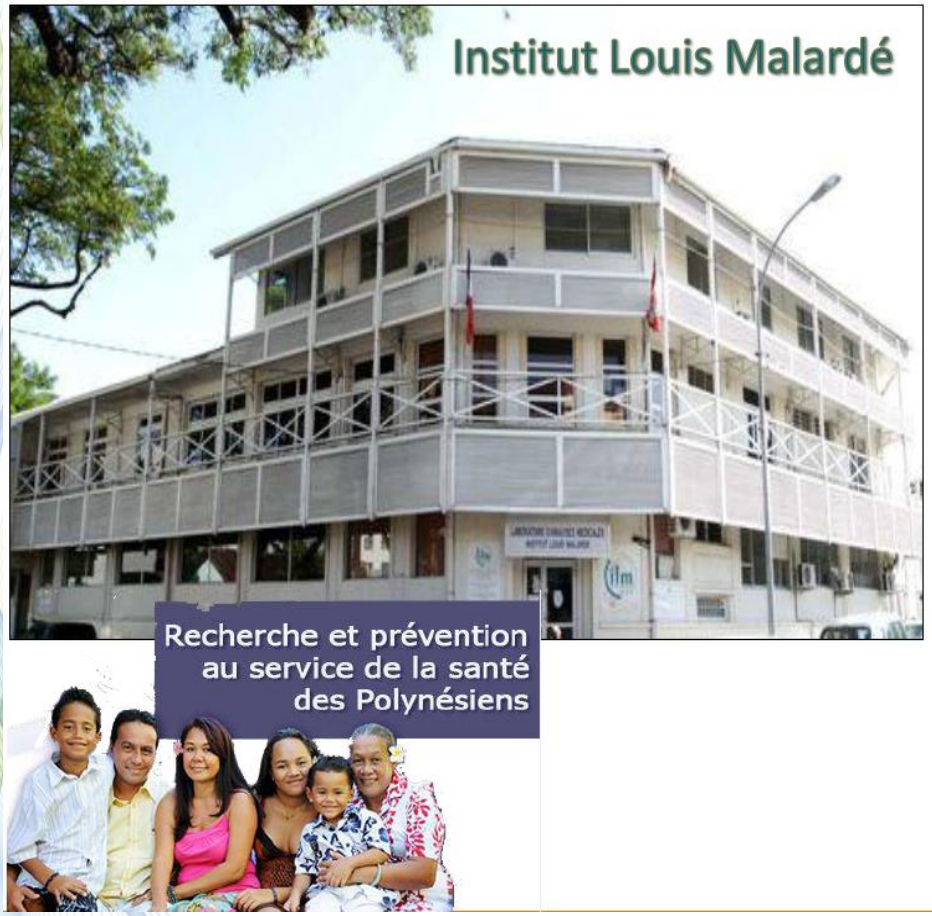
Direction Service Commun Thématiques de recherche

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)

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

- 2017: 2 Communications,

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