

Proposition de stage

Parcours Master 2 « Microbiologie, Environnement, Santé »

1. Laboratoire / Entreprise d'accueil :

Intitulé : Laboratoire d'Océanographie Microbienne, UMR 7621 CNRS-UPMC
(<http://lomic.obs-banyuls.fr>)

Adresse : Observatoire Océanologique de Banyuls, 66650 Banyuls/mer

Responsable du Laboratoire / Entreprise : F. Joux

Responsable de l'encadrement : Fabien Joux

Téléphone : 04 68 88 73 42

Fax : 04 68 88 73 95

E-mail : joux@obs-banyuls.fr

Co-encadrant éventuel : François-Yves Bouget

Perspectives de poursuite de thèse :

oui
 non

avec une bourse spécifique

oui
 non

2. Titre, description du sujet, approches utilisées, références (2 pages maximum) :

Validation de l'approche biocapteur luminescent *Ostreococcus tauri* pour la détection de polluants dans l'environnement marin

Les milieux aquatiques sont soumis à l'apport d'un ensemble de polluants chimiques susceptibles d'affecter la faune et la flore aquatiques. La Directive Cadre sur l'Eau (DCE) a été modifiée par le Parlement européen et du Conseil le 12 août 2013 en introduisant douze nouvelles substances, qui viennent compléter la liste des 33 substances prioritaires pour lesquelles les Etats membres doivent respecter des normes de qualité environnementale (<http://www.eaufrance.fr/breve/directive-sur-l-eau-nouvelles>).

Les microorganismes, et notamment les microalgues, sont particulièrement sensibles aux pollutions chimiques avec des conséquences importantes sur le fonctionnement des milieux aquatiques et sur les autres maillons trophiques. Des tests en laboratoire peuvent être pratiqués sur des microorganismes afin d'évaluer la toxicité d'un échantillon naturel ou d'un produit chimique. Ces tests sont généralement basés sur des mesures d'inhibition de croissance sur une durée de 48h-72h. Des développements sont encore possibles autour de ces tests afin d'automatiser les analyses et d'augmenter leur sensibilité de détection.

L'utilisation de lignées génétiquement modifiées de microorganismes rapportrices de luminescence permettent l'analyse en temps réel de l'expression de gènes cibles en réponse à différents contextes expérimentaux et notamment la présence de composés toxiques. Les avantages offerts par l'approche biocapteur luminescent sont i) une mesure non invasive (sans prélèvement), ii) une mesure haut débit (pouvant être répétée plusieurs fois pendant la période d'essai), iii) la spécificité de la réponse mesurée en fonction du gène ciblé.

Alors que différents biocapteurs luminescents ont été développés sur des bactéries et des levures, nous avons récemment proposé pour la première fois l'utilisation d'une lignée luminescente d'une microalgue marine eucaryote, *Ostreococcus tauri*, pour réaliser des tests écotoxicologiques (Sanchez-Ferandin et al., 2013). La construction introduite porte le gène complet de la Cycline Dependant Kinase (CDKA) fusionné en phase de traduction à la luciférase de luciole (Moulager et al., 2010). CDKA est un régulateur central de la division cellulaire chez les eucaryotes dont l'expression reflète la division cellulaire. Une plateforme robotisée permettant la culture dans des conditions contrôlées de lumière de plusieurs microplaques est couplée à un luminomètre afin d'analyser en continu (fréquence de mesure 1 heure) jusqu'à 360 échantillons en parallèle. Ce dispositif associé à ce nouveau biocapteur permet d'envisager de tester la toxicité d'un grand nombre de molécules ou d'échantillons naturels sur le premier maillon trophique du milieu marin.

L'objectif de ce stage est de valider l'approche biocapteur luminescent *Ostreococcus tauri* comme test écotoxicologique appliqué au milieu marin en réalisant différents essais :

- tester la réponse du biocapteur vis-à-vis d'une liste étendue de substances prioritaires (~20) présentes dans la nouvelle DCE ;
- comparer cette réponse avec celle d'une communauté naturelle de phytoplancton exposée à ces mêmes substances ;
- tester la réponse du biocapteur vis-à-vis d'échantillons d'eau prélevés d'environnements marins présentant des degrés divers de pollution ;
- le stagiaire contribuera également à des expériences visant à identifier les principaux gènes induits ou réprimés par la présence de diuron, un herbicide très couramment rencontré dans les milieux aquatiques. Cette analyse permettra de définir des gènes candidats pour la construction de biocapteurs luminescents plus spécifiques (Lozano et al., 2014).

Ce stage constitue un projet de maturation industriel et sera soumis à une confidentialité. En fonction du budget disponible une poursuite du travail dans le cadre d'un CDD de 6 mois est envisageable.

Techniques utilisées : culture de microorganismes, luminescence, cytométrie en flux, dosage de chlorophylle, extraction ARN, analyse de séquences.

Qualités requises : Goût pour la recherche appliquée et le développement technologique, bon sens de l'organisation (grand nombre d'échantillons et de données à gérer), esprit synthétique et bonne qualité rédactionnelle (des comptes rendus réguliers seront demandés pour apprécier l'avancement du travail), autonomie dans le travail.

Références

- Lozano JC, Schatt P, Botebol H, Vergé V, Lesuisse E, Blain S, Carré I, Bouget FY (2014). Efficient gene targeting and foreign DNA removal by homologous recombination in the picoeukaryote *Ostreococcus*. *Plant Journal* 78 :1073-1083.
- Moulager M, Corellou F, Verge V, Escande M-L, Bouget FY. (2010). Integration of light signals by the retinoblastoma pathway in the control of S phase entry in the picophytoplanktonic cell *Ostreococcus*. *PLoS Genetics* 6, e1000957. doi: 10.1371/journal.pgen.1000957.
- Sanchez-Ferandin S., Leroy F., Bouget F-Y., Joux F. (2013) A new, sensitive marine microalgal recombinant biosensor using luminescence monitoring for toxicity testing of antifouling biocides. *Applied Environmental Microbiology* 79:631-638.