

Proposition de stage

Parcours Master 2 « Microbiologie, Environnement, Santé »

1. Laboratoire / Entreprise d'accueil :

Intitulé : **UMR 7245 MNHN/CNRS « Molécules de communication et adaptations des micro-organismes » - équipe « Cyanobactéries, cyanotoxines et environnement »**

Adresse : **12 rue Buffon 75005 Paris**

Responsable du Laboratoire / Entreprise : **Sylvie Rebuffat/Philippe Grellier (PRs MNHN)**

Responsable de l'encadrement : **Benjamin Marie (CR CNRS)**

Téléphone : **01 40 79 32 12**

E-mail : bmarie@mnhn.fr

Co-encadrant éventuel : Charlotte Duval (TCH), Séverine Le Manach et Qin Qiao (doctorantes)

Perspectives de poursuite de thèse :

oui
 non

avec une bourse spécifique

oui
 non

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

Etude des effets toxicologiques chez le poisson médaka d'extraits de cyanobactéries d'eau douce et recherche de molécules à potentielle activité de type perturbateur endocrinien

Résumé du sujet :

Les importantes proliférations de cyanobactéries qui sont actuellement observées de façon récurrente sur tout le globe, sont liées à l'anthropisation des milieux et aux changements environnementaux globaux (Pearl and Paul 2012). Outre leurs conséquences sur les écosystèmes aquatiques, ces développements peuvent également avoir un impact sanitaire en raison de la capacité des cyanobactéries à synthétiser une grande variété de métabolites secondaires, dont les cyanotoxines. Parmi elles, les microcystines, hépatotoxines les plus fréquemment rencontrées dans l'environnement, ont fait l'objet de nombreuses études (voir revue dans Chorus 2005). Cependant, des travaux récents, réalisés notamment dans le laboratoire d'accueil, ont pu mettre en évidence que les cyanobactéries produisent d'autres molécules, pour l'heure non-caractérisées, montrant également des effets délétères, potentiellement sur les systèmes endocrines de certains

vertébrés, notamment de poissons (Rodgers *et al.*, 2011 ; Stepankova *et al.*, 2011 ; Marie *et al.*, 2012).

Ce sujet proposé vise à étudier : i) la diversité moléculaire des métabolites secondaires produits par 5 souches de cyanobactéries (*Aphanizomenum*, *Planktothrix*, *Arthrospira*...), ii) Les effets au niveau toxicologique d'extraits métaboliques de ces souches chez un modèle vertébré, le poisson médaka, et, iii) déterminer si ces différents extraits métaboliques présentent des activités de type perturbateur endocrinien chez le poisson médaka. Le choix des souches étudiées sera menés de manière à comparer des cocktails de métabolites présentant, ou non certaines cyanotoxines connues, telles les microcystines ou les saxitoxines, et afin de tenter de déterminer si ces molécules en particulier seraient également susceptibles d'impacter les systèmes endocrines.

Contexte scientifique

Les cyanobactéries sont des micro-organismes photosynthétiques connus pour être capables de synthétiser par voie ribosomale ou non-ribosomale une grande diversité de métabolites secondaires, dont une partie est d'ores et déjà connue pour induire des effets toxiques pour les organismes qui y sont exposés. Parmi la liste des toxines naturelles connues pour être produites par des cyanobactéries, citons les microcystines, hépatotoxines notoires produites par synthèse non-ribosomale par une grande diversité de genre de cyanobactéries, et pour lesquelles des concentrations limites dans les eaux de boissons ont été préconisées par l'OMS, ou les saxitoxines, puissantes neurotoxines inhibant de manière irréversible l'activité des canaux sodium-dépendant des cellules nerveuses, provoquant des paralysies pouvant entraîner la mort.

On dénombre à ce jour près de 600 métabolites secondaires de cyanobactéries, dont une partie a d'ores et déjà pu être caractérisée comme molécules toxiques, et ayant pu être décrite par caractérisation fine de leur structure chimique suite à leur purification ou par simple détection de leurs formes ioniques par spectrométrie de masse. Cependant nos connaissances quant à la diversité chimique globale de l'ensemble des métabolites secondaires produits par ces cyanobactéries et leurs potentiels effets toxicologiques restent encore largement incomplètes.

D'une manière générale, si les effets toxicologiques (*sensu stricto*) des hépatotoxines, comme les microcystines, ont fait l'objet de nombreuses études et sont aujourd'hui assez bien documentés (Chorus 2005), l'incidence des cyanobactéries et de la diversité de leurs métabolites sur les organismes aquatiques, notamment *via* la diversité des molécules qu'elles produisent, reste peu connue. Notons notamment que selon certains travaux récents, des molécules nouvellement décrites chez les cyanobactéries, telles les acides rétinoïques (Wu *et al.*, 2012) ou les isoflavones (Kledjus *et al.*, 2010), molécules mimétiques des œstrogènes, paraîtraient susceptibles de perturber le système endocrinien de certains vertébrés notamment.

Questions abordées

Quelle est la diversité chimique de métabolites produits par certaines cyanobactéries ? Quelles nouvelles molécules restent encore à décrire ? quels sont leurs potentiels toxiques pour les organismes aquatiques ? Est ce que ces métabolites seraient susceptibles d'induire des effets de type perturbateur endocrinien, et si oui lesquels seraient potentiellement impliqués ?

Méthodologie

- **Cultures en masse de 5 souches de cyanobactéries** provenant de la collection vivante de

cyanobactérie du MNHN (PMC) parmi les 600 souches disponibles, et ayant été sélectionnées en fonction de leur origine géographique (IdF), de leur position taxonomique (2 *Plankthotrix*, 2 *Aphanizomenon* et 1 *Arthrospira*) et de la similarité général de leurs profils métaboliques et leur production, ou non-production de cyanotoxines de référence (microcysties et saxitoxines). Des pré-cultures en volumes réduits auront été réalisées au préalable.

- **Extractions des métabolites** produits par 5 souches pré-sélectionnées (lyophilisation, sonication, évaporation, ...)
- **Caractérisations de la composition en métabolite par spectrométrie de masse** couplée à une chaîne de séparation HPLC (LC-MS/MS en mode positif et négatif), et recherche notamment de molécules potentiellement impliquées dans des effets de type perturbations endocrines (phyco-estrogènes) à l'aide d'une interrogation des bases de données publiques (METLIN) à partir des spectres de fragmentations de ces molécules.
- **Tests d'embryo-toxicité chez le poisson médaka** (protocole OCDE 212) sur 9j, pour ces 5 extraits (5 concentrations, en triplicats, ...).
- **Calculs des variables de toxicité** des différents extraits (NOECs, LOECs, LC50s, ...).
- **Expérimentations avec les différents extraits aux LC10 et analyses des dommages anatomopathologiques (collaboration ENVA) et moléculaires** au niveau de marqueurs de perturbation endocrine par ELISA et/ou par PCR en temps réelle.

Bibliographie

Chorus I (2005) Federal Environmental Agency Publisher, Berlin, 117p.

Damkova V, et al. (2009) *Neuro Endocrinol Lett.* 30, 205-10.

Kledjus B, et al. (2010) *J. Chromatogr. A* 1217, 7956-7965.

Paerl HW, Paul VJ (2012) *Water Res* 46: 1349-1363.

Rodgers ED, et al. (2011) *Environ. Sci. Technol.* 45, 1962-1969.

Stepankova T, et al. (2011) *Aquat. Toxicol.* 105, 497-507.

Wu X, et al. (2012) *Proc. Nat. Am. Soc.* 109, 9477-982.