

# Proposition de stage

## Parcours Master 2 « Microbiologie, Environnement, Santé »

### 1. Laboratoire / Entreprise d'accueil :

Intitulé : MNHN UMR7245-CNRS, Eq. CCE  
Adresse : Dpt RDDM, MCAM, 12, Rue Buffon, case CP39, 75005 Paris  
Responsable du Laboratoire: Pr. BERNARD C  
Responsable de l'encadrement : Dr **COMTE** Katia  
Téléphone : 01 40 79 31 76  
Fax :  
E-mail : kcomte@mnhn.fr  
Co-encadrant éventuel : Dr **COMBES A** (ESPCI-Paris)

### Perspectives de poursuite de thèse :

oui (si financement)  
 non

avec une bourse spécifique  
 oui  
 non

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

**Synthèse et caractérisation de supports à base d'anticorps pour l'extraction sélective de cyanotoxines, les microcystines (MCs), sous formes libres et liées d'échantillons biologiques complexes.**

#### **Projet scientifique:**

##### 1. *Présentation et description du sujet*

Depuis de nombreuses années, des phénomènes de prolifération de cyanobactéries (procaryotes photosynthétiques) s'observent de manière récurrente à la surface de tous les écosystèmes aquatiques, et ce quel que soit le continent considéré. En plus d'engendrer un profond dysfonctionnement des hydrosystèmes, la plupart des espèces proliférantes possède également un potentiel toxique avéré pour les organismes aquatiques directement exposés à ces molécules. Or, si les effets néfastes liés à la contamination directe sont largement établis aujourd'hui (la liaison des MCs au niveau des protéines cibles induit la toxicité), l'impact indirect au cours des consommations successives d'organismes (*i.e.* proies-prédateurs) et le passage des MCs *via* la chaîne alimentaire, reste très mal connu et plutôt hypothétique.

Cette incertitude, qui alimente les débats actuels, vient principalement du manque d'études spécifiques sur la détection des MCs après ingestion par les organismes et sur leur devenir au sein des cellules. Ceci est lié à la difficulté d'analyse et à l'incapacité des méthodes classiquement utilisées (*i.e.* western blots ou ELISA) à détecter et/ou à distinguer les 2 formes principales existantes au sein des organismes exposés: MC-liées aux protéines et/ou MC-libres dans les cellules [1]. Il est par conséquent très difficile d'évaluer la toxicité réelle des MCs liées ainsi que la proportion relative entre MCs-libres et MCs-liées, et leur possible incidence négative sur le métabolisme primaire et la survie cellulaire.

Ce projet vise donc à synthétiser et à caractériser deux supports à base d'anticorps dirigés sur deux sites spécifiques d'une MC choisie comme modèle, la microcystine-LR (MC-LR [2]. Le

premier anticorps (Ad4G2) se fixe au niveau du fragment Adda (spécifique de la famille des MCs), cependant ce site n'est disponible pour l'interaction antigène-anticorps que si la MC est sous forme libre puisque c'est également le site de fixation covalent de la MC aux protéines. Ainsi cet immunoabsorbant ne permettra l'extraction que des MC-libres. La spécificité d'un deuxième support à base d'anticorps dirigé sur le double site arginine-leucine (MC10.7) de la molécule MC-LR sera évaluée, notamment sa capacité à piéger les deux formes de MCs libres et/ou liées en milieu pur puis dans différents milieux biologiques complexes.

En fonction de la spécificité du second support, une combinaison des 2 supports pourrait également être envisagée afin de fixer sur le premier support, les MC-libres contenues dans l'échantillon d'intérêt, puis par passage sur le second support, les MC-LR liées. Ce projet consiste donc à optimiser des procédures d'immunoextraction, ainsi qu'à valider des témoins chimiques pour calculer le pourcentage de liaison des MCs aux protéines (développement d'un modèle de MC liées avec du glutathion ou les protéines phosphatases pures).

## 2. Techniques/méthodes utilisées

Préparation d'échantillons biologiques - Greffage d'anticorps - Extraction sur immunoabsorbant - Chromatographie en phase liquide (LC/MS)

## 3. Résultats attendus

L'utilisation de 2 anticorps dirigés contre 2 sites distincts de la molécule microcystine-LR et fixés sur deux supports solides en parallèle, sera testée sur des échantillons biologiques +/- complexes, en vue de distinguer la forme liée de la forme libre des MCs une fois ingérées par les organismes aquatiques.

## 4. Références

1- Combes A., Dellinger M., Cadel-six S., Amand S., Comte K. (2013) Ciliate *Nassula sp.* grazing on a microcystin-producing cyanobacterium (*Planktothrix agardhii*): impact on cell growth and in the microcystin fractions. *Aquatic Toxicology*, 126, 435 – 441

2- Thèse de Mr Flinois C sous la direction de MC Hennion, soutenu en 2006 université Paris 6  
« Miniaturisation du couplage en ligne de l'extraction sur phase solide à la microchromatographie en phase liquide associée à la détection par spectrométrie de masse : applications à l'analyse de traces de métabolites polaires de pesticides et de toxines algales »