

Proposition de stage

Parcours Master 2 « Microbiologie, Environnement, Santé »

1. Laboratoire / Entreprise d'accueil :

Intitulé : Laboratoire d'Océanographie Microbienne
Adresse : Observatoire de Banyuls sur Mer, Avenue Pierre fabre, 66650 Banyuls sur Mer
Responsable du Laboratoire / Entreprise : Fabien Joux
Responsable de l'encadrement : François-Yves Bouget
Téléphone : 04.68.88.73.50
Fax : 04.68.88.73.95
E-mail : francois-yves.bouget@obs-banyuls.fr
Co-encadrant éventuel : Jean-Baptiste Guyon

Perspectives de poursuite de thèse :

oui
 non

avec une bourse spécifique
 oui
 non

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

Evaluation de la productivité (croissance, photosynthèse, biomasse) de lignées génétiquement modifiées de lycopène cyclase d' *Ostreococcus tauri*

Description :

Les microalgues sont parmi les organismes vivants les plus productifs dans la conversion de l'énergie lumineuse en matière organique grâce à la photosynthèse. De plus, elles contiennent de nombreuses molécules d'intérêt pour les biotechnologies tels les acides gras polyinsaturés à longue chaînes de type omega 3 ou encore les caroténoïdes. Les marchés pour la biomasse de microalgues sont nombreux dans des domaines allant de la cosmétique, au complément alimentaire et la pharmacologie. La culture à grande échelle de microalgues est limitée notamment par le rendement de la photosynthèse. En effet, une partie importante de l'énergie lumineuse peut être dissipée sous forme de chaleur par le mécanisme dit de « Non Photochemical Quenching » (NPQ). Le NPQ fait intervenir des β caroténoïdes de type xanthophylles. En réponse à un excès de photons, la violaxanthine est convertie en antheraxantine et zéaxanthine qui dissipent l'énergie lumineuse sous forme de chaleur.

A ce jour plus de 700 caroténoïdes ont été identifiés chez de nombreux organismes marins dont les microalgues. Majoritairement localisés dans les membranes des thylakoïdes des chloroplastes de microalgues, les caroténoïdes jouent un rôle clé de pigments accessoires pour l'absorption de la lumière ou dans la photoprotection. Les propriétés antioxydantes et de photoprotection des caroténoïdes les rendent

particulièrement intéressants pour les biotechnologies. La biosynthèse des caroténoïdes fait intervenir plusieurs enzymes telles que des désaturases, des cyclases ou encore des isomérases. La lycopène cyclase, LCYB (lycopène β -cyclase) cyclise le lycopène en β -carotène, tandis que les actions conjointes de la LCYB et la LCYE (lycopène ε -cyclase) aboutissent à la synthèse d' α -carotène. Chez les Mamiellophyceae, les domaines B et E sont réunis dans une seule protéine en amont d'un domaine membranaire de type LHC (Light harvesting complex) (Blatt et al 2015). Les LHCs sont des complexes protéiques (≈ 25 KDa) liés aux antennes collectrices de la membrane des thylakoïdes permettant de fixer différents pigments, notamment les chlorophylles et les caroténoïdes.

Les approches physiologiques ont montré qu'il est possible d'améliorer quantitativement et qualitativement la production de caroténoïdes (alpha et beta) en condition de stress, le pigment majoritaire étant l'alpha caroténoïde prasinoxanthine (Guyon et al., 2018). Nous avons généré par génie génétique des lignées modifiées de la lycopène cyclase chez la picoalgue verte *Ostreococcus tauri* (Mamiellophyceae) en utilisant la recombinaison homologue (Lozano et al., 2014). Trois types de lignées ont été obtenues : (1) Un mutant Knock out (KO) sans le domaine LHC, une lignée où un promoteur fort a été introduit en amont du domaine E (KI Knock in) et une lignée où le domaine E-LHC est surexprimé dans un contexte sauvage (RI pour random integration). L'analyse de la teneur en caroténoïdes a montré que les lignées KO et KI accumulent jusqu'à 90% d' α -caroténoïdes et que la lignée RI accumule 4 fois plus de caroténoïdes totaux que la lignée sauvage en lumière forte. Les premières expériences indiquent que les paramètres photosynthétiques, dont le NPQ, sont affectés dans certaines de ces lignées.

L'objectif du stage est d'étudier l'impact de la lumière sur la croissance, la biomasse et l'activité photosynthétique des lignées modifiées de lycopène cyclase. Il s'agira notamment d'établir le lien entre la teneur en caroténoïdes (qualitative et quantitative, la croissance et la biomasse cellulaire dans différentes conditions de lumière. Les techniques utilisées seront la cytométrie en flux, le PHYTO-PAM, l'analyse élémentaire du carbone et de l'azote et la biochimie (HPLC).

Les résultats permettront d'évaluer le potentiel des différentes lignées pour des applications biotechnologiques (taux de croissance, productivité en caroténoïdes spécifiques).

Nous recherchons un candidat autonome, ayant des capacités d'analyse, de synthèse et de rédaction.

3. Conditions du stage :

Gratification statutaire. Possibilité d'hébergement au laboratoire à tarif étudiant.

Références:

1. Blatt, A., Bauch, M. E., Pörschke, Y. & Lohr, M. A lycopene β -cyclase/lycopene ε -cyclase/light-harvesting complex-fusion protein from the green alga *Ostreococcus lucimarinus* can be modified to produce α -carotene and β -carotene at different ratios. *Plant J.* 82, 582–95 (2015).
2. Guyon JB, Vergé V, Schatt P, Lozano JC, Liennard M, Bouget FY (2018). Comparative analysis of culture conditions for the optimization of carotenoid production in several strains of the picoeukaryote *Ostreococcus*. *Mar. Drugs* 16(3), 76; doi:10.3390/md16030076
3. Lozano, J-C., Schatt, P., Botbol, H., Vergé, V., Lesuisse, E., Blain, S., Carré, I.A. & Bouget, F-Y. Efficient gene targeting and removal of foreign DNA by homologous recombination in the picoeukaryote *Ostreococcus*. *The Plant Journal.* 78, 1073-1083 (2014).