

changements climatiques. Parmi les objectifs spécifiques du projet global, il s'agira de i) définir la carte de référence de diversités microbienne et moléculaire de l'holobionte corallien autour du triangle du corail (zone de l'océan Pacifique, en rouge sur la carte, qui concentre la plus grande biodiversité marine au monde), ii) définir les patrons de diversités microbienne et moléculaire, et suivre l'évolution le long des gradients est-ouest et sud-nord, à grande échelle et à l'échelle locale dans des environnements contrastés, iii) comparer les transcriptomes et métabolomes afin d'évaluer leur contribution aux phénomènes d'adaptation locale aux changements climatiques, iv) rechercher de nouveaux marqueurs de bonne santé des coraux.

La première année, l'échantillonnage a été effectué le long du gradient est-ouest sur 21 îles (3 sites/île, 10 colonies/site); pour chaque espèce 630 échantillons seront prélevés pour les analyses ADN/ARN (métabarcoding, métagénomique et métatranscriptomique), 630 pour les analyses de biomarqueurs et télomères, et 630 pour l'analyse du métabolome.

Projet de thèse

Modèle d'étude : *Millepora platyphylla*

Millepora platyphylla est un cnidaire de la classe des hydrozoaires. Bien que ne faisant pas partie des coraux scléactiniaires (coraux durs), les *Millepora* sont considérés à la fois comme des membres et comme des ennemis naturels des communautés de coraux durs; ils participent activement à la construction des récifs et entrent en compétition avec les coraux en préemptant l'espace disponible, formant des colonies de grandes surfaces, massives, de couleur brun clair. C'est une espèce à large répartition présente à faible profondeur (0-20 m) dans les eaux tropicales de l'Indo-Pacifique, de la Mer Rouge aux îles Pitcairn et du Japon à l'Australieⁱⁱ. Comme les scléactiniaires, ils vivent en association symbiotique avec des zooxanthelles. Appelés aussi coraux de feu, ils sont urticants et leur simple contact provoque de vives brûlures: ils possèdent des nématocystes, des organites vénéneux capables, suite à un stimulus mécanique ou chimique, de se planter dans leur proie avec des crochets. Après pénétration le venin contenu dans le nématocyste est injecté dans la proie. Ce venin est constitué d'un mélange de protéines cytotoxiques, hémolytiques ou possédant une activité de type PLA2. Plusieurs toxines (protéiques ou non-protéiques^{iii,iv}) ont été mises en évidence (milleporin-1, ...) à partir de *Millepora*^v, mais une seule, la MCTx-1 (18 kDa), a été caractérisée. D'une manière générale les informations sur le métabolome des *Millepora* sont très parcellaires.

Objectifs

En raison du rôle écologique important de *Millepora* dans les récifs coralliens et de la méconnaissance de cet organisme présent sur tout l'océan Pacifique, nous proposons d'explorer sa variabilité et son adaptabilité face aux changements globaux. Ce projet propose d'unir observations de terrain, expériences en laboratoire et techniques de pointe en écologie chimique et métabolomique pour observer i) sa diversité et sa plasticité métabolique, ainsi que la contribution de l'interaction microbienne, de la variabilité génétique ou des conditions environnementales à la diversité métabolique, ii) la nature des avantages adaptatifs de cette espèce dans le récif corallien face à la prédation et à la compétition. Ces deux objectifs seront réalisés grâce aux nombreux échantillons collectés dans les différents laboratoires naturels que sont la station biologique de Moorea et les legs de l'expédition Tara-Pacifique.

Objectif 1 : Evaluation de la diversité chimique de *Millepora platyphylla* dans l'océan Pacifique et corrélations variabilité métabolique/variabilité génétique, /diversité microbienne associée, /conditions environnementales.

A notre connaissance aucune étude du métabolome n'a été menée sur cette espèce, ni même sur le genre. Le métabolome s'inscrit dans un contexte post-génomique, il est par définition caractéristique d'un état physiologique car il représente l'ultime réponse d'un organisme à un stress. Toute variation du métabolome de *Millepora platyphylla* traduira une variation de son état physiologique. **Quel est l'effet des variations**

naturelles sur la diversité et la plasticité du métabolome ? Quelle est la distance métabolique entre différentes conditions environnementales ?

Il s'agira dans un premier temps de définir l'expression métabolique de base (empreintes métaboliques "moyennes") de l'holobionte de *Millepora platyphylla*, et d'établir son profil métabolique (caractérisation des principaux métabolites). Afin de mettre en évidence l'implication du métabolome dans la réponse des *Millepora* aux interactions biotiques et abiotiques, nous avons choisi de travailler par une **approche métabolomique**. La mise au point et la validation du développement méthodologique lié à l'approche métabolomique choisie fera partie aussi de ce premier objectif.

Dans un deuxième temps, l'analyse par métabolomique des échantillons prélevés lors de l'expédition Tara-Pacific permettra de répondre à ces questions, de voir dans quelle mesure "l'holométabolome" de *Millepora* varie avec le gradient géographique, notamment dans des sites possédant une biodiversité réduite ou en bordure d'aires de développement, dans des sites soumis à des niveaux d'acidité différents ou des gradients de température, et si cette variabilité est liée à la variabilité génétique de l'hôte ou de l'holobionte, à la diversité microbienne associée et/ou à des perturbations environnementales.

Objectif 2 : Déterminer la nature des avantages adaptatifs des *Millepora* dans le récif corallien.

Les *Millepora* sont relativement protégés des prédateurs et épibiontes, même si quelques mollusques corallivores sont retrouvés sur les colonies. Ce sont des espèces opportunistes, à forts taux de croissance, qui possèdent des stratégies agressives de colonisation de substrats ; ils sont capables de croître sur des coraux durs^{vi}. **Ces avantages adaptatifs sont-ils liés à la seule présence des nématocystes et de leurs toxines, actifs par contact, ou également à l'excrétion de métabolites secondaires à activités cytotoxiques, antiappétantes ou antifouling ?**

Il a été observé en Polynésie française que les colonies de *Millepora platyphylla* constituaient des oasis de survie pour des espèces de coraux scléactiniaires (*Acropora*, *Pocillopora*) sensibles aux perturbations environnementales et peuvent donc favoriser la persistance de leurs populations lors d'invasion d'*Acanthaster*^{vii}. La cohabitation de proximité entre espèces concurrentes est viable et résiste à des stress intenses si les avantages de l'interaction entre les 2 espèces sont plus importants que les effets antagonistes directs (compétition pour l'espace)^{viii}. **Cette association Scléactiniaire/*Millepora* est-elle médiée par des métabolites secondaires ?**

En résumé, ce projet possède à la fois un axe analytique complet et un axe d'écologie intégrée. Il permettra au candidat de mettre en oeuvre les dernières approches de métabolomique appliquée à l'écologie chimique, et de les utiliser dans un contexte d'analyses de matrices complexes, l'holobionte corallien, et de biologie des systèmes multi-omiques dans des modèles environnementaux soumis à des stress biotiques et abiotiques.

Approche méthodologique

A-Matériel biologique :

In situ à Moorea : Des prélèvements de terrain seront effectués à différents endroits d'une colonie (centre, bords sans compétiteur et bords en phase de recouvrement de corail) afin de comparer le contenu métabolique de l'holobionte soumis à des pressions biotiques différentes. Les métabolomes de colonies avec et sans prédateurs (Mollusques du genre *Drupella*) seront également échantillonnés ainsi que de colonies présentant des signes de blanchissement ou maladies.

En aquarium à Moorea : L'interaction *Millepora*/compétiteur/prédateurs sera également testée en aquarium. Des boutures de *Millepora platyphylla* et de coraux (*Acropora*, *Pocillopora*) seront maintenues en aquarium en bacs séparés ou mixtes et soumis à des prédateurs potentiels (corallivores). Des prélèvements seront

réalisés à différents temps de l'expérience pour suivre l'évolution du métabolome. L'approche métabolomique devrait permettre de mettre en évidence les composés responsables des interactions, positives ou négatives, *Millepora*/prédateur, *Millepora*/coraux/prédateurs et *Millepora*/compétiteur.

Echantillons de l'expédition Tara-Pacifique : l'accès à de nombreux échantillons répartis sur tout l'océan Pacifique permettra de rechercher les variations de métabolome dans le cadre de plusieurs scénarios prédits liés au changement global :

- i) perte de biodiversité : sites avec une biodiversité réduite (en utilisant le gradient Est-Ouest de biodiversité Pacifique, ex : Moorea vs Papouasie Nouvelle Guinée (PNG)),
- ii) évolution pendant les déplacements d'aire de distribution ('range shift'), en utilisant les sites en bordure d'aire (Polynésie Française, Japon, Australie),
- iii) évolution due à l'acidification des océans : sites avec des niveaux d'acidité différents (en utilisant les événements volcaniques du Japon, de PNG et de Palau),
- iv) évolution en conditions chaudes : sites avec des températures contrastées (le long du courant de Kuroshio : Taiwan – Ryukyu – Okinawa – Tokara – Okinoshima),
- v) évolution en cas de maladie : comparaison des métabolomes de colonies blanchies et non blanchies, ou entre parties de colonies malades et non malades (Futuna et Malpelo).

B-Approche analytique :

Chimie des substances naturelles :

La caractérisation du métabolome sera réalisée avec les méthodes classiques en chimie des substances naturelles : extraction, fractionnement, purification et élucidation structurale par spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et spectrométrie de masse, à partir de prélèvements effectués à Moorea.

Métabolomique environnementale :

La méthodologie employée sera inspirée de celle d'un précédent protocole mis au point au laboratoire (2014)^{ix} et utilisé avec succès sur des coraux scléactiniaires :

- extraction des métabolites par une extraction biphasique afin de prendre en compte la portion du métabolome la plus large possible (métabolites polaires, moyennement polaires et lipophiles),
- acquisition des empreintes métaboliques par des techniques analytiques complémentaires (RMN, LC-MS/MS, GC-MS),
- pré-traitement des données (correction de ligne de base, alignement de pics, normalisation, ..) à l'aide d'outils logiciels adaptés (XCMS, CAMERA, développés sous R ou sous Workflow4metabolomics, ...),
- analyses statistiques multivariées (ACP, PLS-DA, ...).

Si les données de métabolomique, issues de la comparaison des *Millepora* entre les différentes conditions, mettent en évidence des métabolites particuliers (sur- ou sous-exprimés), ceux-ci seront identifiés par RMN 1D/2D et par spectrométrie de masse haute résolution.

Ecologie chimique :

Des extraits hydroalcooliques et organiques seront préparés et testés pour leurs activités antifouling (souches marines formant des biofilms, larves de coraux, ...) et répulsives envers des prédateurs potentiels. Le potentiel de colonisation de substrats vivants (coraux scléactiniaires) sera évalué en aquarium en testant les extraits hydroalcooliques et organiques préparés sur des colonies de coraux maintenus en aquarium afin d'observer d'éventuelles nécroses. Un fractionnement bio-guidé des fractions "actives" permettra d'isoler les métabolites impliqués dans la colonisation de l'espace et la compétition entre espèces.

Les outils de chimie analytique permettant cette étude sont directement accessibles à l'UPVD, le CRIOBE hébergeant le plateau technique d'analyses chimiques de la plateforme Bio2Mar. Le travail expérimental d'écologie chimique sera effectué à la station biologique de Moorea pourvue de tout le matériel d'aquariologie nécessaire.

Profil du candidat / compétences

Le (la) candidat(e) devra être titulaire d'un master 2 ou d'un diplôme équivalent (diplôme d'ingénieur chimiste) et démontrer des compétences en chimie analytique et chimie des substances naturelles. Il (elle) devra maîtriser les outils classiques de purification et d'analyse structurale (RMN, spectrométrie de masse). Une expérience dans le traitement des données métabolomiques (XCMS, W4M, ...) sera également considérée comme un atout pour le candidat. Le candidat doit avoir des prédispositions excellentes pour travailler en équipe.

Collaborations

- Emilie BOISSIN : CRIOBE (Biologie marine, biogéographie, génétique des populations).
- Olivier THOMAS : Marine Biodiscovery, School of Chemistry, University Road, National University of Ireland Galway. (Chimie des substances naturelles, écologie chimique, métabolomique environnementale).

ⁱ <http://oceans.taraexpeditions.org/m/environnement/ocean-biodiversite/animal-mineral-vegetal-les-coraux-a-la-croisee-des-chemins/>

ⁱⁱ Lewis JB. Biology and Ecology of the hydrocoral *Millepora* on Coral reefs. *Advances in marine biology*, 2006, 50:1-55.

ⁱⁱⁱ Garcia-Arredondo A, Murillo-Esquivel L, Rojas A, Sanchez-Rodriguez J. Characteristics of hemolytic activity induced by the aqueous extract of the Mexican fire coral *Millepora complanata*. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*, 2014, 20:49

^{iv} Garcia-Arredondo A, Rojas-Molina A, Bah M, Ibarra-Alvarado C, Gallegos-Corona MC, Garcia-Servin M. Systemic toxic effects induced by the aqueous extract of the fire coral *Millepora complanata* and partial purification of thermostable neurotoxins with lethal effects in mice. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2015, 169, 55-64.

^v Iguchi A, Iwanaga S, Nagai H, Isolation and characterization of a novel protein toxin from fire coral. *Biochemical and biophysical research communications*, 2008, 365, 107-112.

^{vi} Dubé CE, Boissin E, Planes S. Overgrowth of living scleractinian corals by the hydrocoral *Millepora platyphylla* in Moorea, French Polynesia. *Mar Biodiv*, 2015, DOI 10.1007/s12526-015-0392-y

^{vii} Kayal M and Kayan E. Colonies of the fire coral *Millepora platyphylla* constitute scleractinian survival oases during *Acanthaster* outbreaks in French Polynesia. *Marine Biodiversity*, 2016, DOI 10.1007/s12526-016-0465-6.

^{viii} Kayal M, Lenihan HS, Pau C, Penin L, Adjeroud M. Associational refuges among corals mediate impacts of a crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* outbreak. *Coral Reefs*, 2011, 30:827-837.

^{ix} Mohamadi F. Thèse de l'Université de Perpignan, 2014, 201p.