

LES JOURNEES

SCIENTIFIQUES

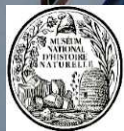
DE L'UMR BOREA

16-17 janvier
2017

UPMC
Paris

www.borea.mnhn.fr

UMR BOREA BIOLOGIE
DES ORGANISMES ET
ECOSYSTEMES
AQUATIQUES



LES JOURNEES

SCIENTIFIQUES

UMR BOREA

16 et 17 JANVIER 2017

PARIS

PROGRAMME

Lundi 16 janvier
matinée

Amphithéâtre Durand, Bâtiment Esclangon, UPMC

09:30-10:00

Accueil des participants – badges

10:00-10:15

Installation des présentations de la session 1

10:15-10:30

Présentation générale des journées

par Sylvie Dufour (directrice de l'UMR) et Pascal Sourdain (directeur-adjoint).

10:30-10:45

Hommage à Hervé Rybarczyk

par Tarik Meziane

SESSION 1

10:45-12:30

HIGHLIGHT(S) 2016 DES EQUIPES

10 min d'exposé (un ou deux topics max. au choix des équipes) + 5 min de discussion
Présentateurs/trices au choix des équipes

10:45-11:00

Equipe 1 « Évolution des biominéralisations et adaptation aux contraintes environnementales » (Responsables : Pascal Jean Lopez / Jean-Marc Lebel / Claude Bouchon)
Christelle Caplat et Katherine Costil : « Effets de la contamination et des contraintes environnementales sur la bioaccumulation métallique et les réponses biologiques de la moule saumâtre, *Mytilopsis leucophaeata* »

11:00-11:15

Equipe 2 « Reproduction et développement des organismes aquatiques : évolution, adaptation et régulations » (Responsables : Laure Bonnaud-Ponticelli / Pascal Favrel)
Jérémy Pasquier : « Desorphanisation » de systèmes neuropeptidergiques chez *Crassostrea gigas* »

11:15-11:30

Pause

11:30 -11:45

Equipe 3 « Adaptations aux milieux extrêmes » (Responsable : Bruce Shillito)
Bruce Shillito : « Recrutement d'un Ingénieur d'Etudes, Louis Amand et projets instrumentaux associés »

11:45-12:00

Equipe 4 « Dispersion larvaire et organisation en milieu austral et insulaire tropical » (Responsable : Philippe Keith)
Dominique Monti : « La difficile bioindication en situation de diadromie généralisée »
Céline Ellien : « Variabilité spatiale du recrutement des post-larves de *Sicyopterus lagocephalus* (Pallas, 1770) (Teleostei, Gobiidae, Sicydiinae) sur l'île de la Réunion »

- 12:00-12:15** **Equipe 5 « Diversité et interactions dans les écosystèmes côtiers »** (Responsables : Eric Feunteun / Pascal Claquin)
Juliette Fauchot : « Déterminisme des efflorescences toxiques de diatomées en Baie de Seine : influence des ratios en sels nutritifs sur la diversité spécifique et la production de toxine »
- 12:15-12:30** **Equipe 6 « Source et transfert de la matière organique en milieu aquatique »** (Responsable : Tarik Méziane)
Marc Pouilly : « Marqueurs biogéochimiques de l'origine et des migrations de poissons en Amazonie »
- 12:30-12:45** **Equipe 7a « Biodiversité et Macroécologie »** (Responsable : Bernard Hugueny)/
7b « Biodiversité et Aquaculture » (Responsable : Fabrice Duponchelle)
Rodolphe E. Gozlan : « Approches multiples en écologie de la conservation »
Fabrice Duponchelle : « Transamazonian natal homing in giant catfish »

12:45- 14:00 **Déjeuner (restaurant du CROUS, UPMC)**

**Lundi 16 janvier
après-midi**

Amphithéâtre Durand, Bâtiment Esclangon, UPMC

14:00-14:15 **Installation des présentations de la session 2 et session 3**

SESSION 2 **Présentation de l'OBLT, Observatoire Binational du Lac Titicaca**

14:15-14:30 Xavier Lazzaro, coordinateur de l'OBLT
10 min de présentation + 5 min de discussion

SESSION 3 **PREPARATION PROCHAIN CONTRAT QUINQUENNAL (2019-2023)**

14:30-18:00

14:30-15:00 **PRESENTATION DE LA FUTURE DIRECTION DE L'UMR**

Présentation du binôme de Direction : Laure Bonnaud-Ponticelli / Pascal Sourdain
Planning Tutelles et HCERES

15:00-15:20 **PRESENTATION DES FUTURES INTEGRATIONS A L'UMR**

Intégration dans l'équipe « Sources et devenir de la matière organique (MO) dans les écosystèmes aquatiques » (Responsable : Tarik Méziane)

5 min de présentation + 5 min de discussion chacun.e

- Gwenaël Avril, DR CNRS
- Claire Lazareth, CR IRD

15:20-15:30 **Pause – suite installation des présentations de la session 3**

PRESENTATION DES FUTURES EQUIPES DE L'UMR (10 min exposé par équipe (par les futurs responsables) + 5 minutes discussion

- 15:30-15:45 Equipe « **Développement et REproduction des Métazoaires : Régulations, adaptations, évolution** » (DOREMI) (Responsables : Sébastien Baratte / Anne-Sophie Martinez)
- 15:45-16:00 Equipe « **Adaptations aux milieux extrêmes** » (AMEX) (Responsable : Bruce Shillito)
- 16:00-16:15 Equipe « **Interactions génomes, histoire de vie, environnements et bases biologiques de la Conservation, de l'Aquaculture et de la Pêche** » (ICAP) (Responsable : Fabrice Duponchelle)
- 16:15-16:30 Equipe « **Biodiversité, plasticité, adaptation et conservation des espèces aux communautés** » (BIOPAC) (Responsables : Philippe Keith/ Eric Feunteun / Fabienne Audebert)
- 16:30-16:45 Equipe « **Résilience des Ecosystèmes Côtiers AnthroPisés** » (RECAP) (Responsables : Pascal Claquin / Pascal-Jean Lopez)
- 16:45-17:00 Equipe « **Sources et devenir de la matière organique (MO) dans les écosystèmes aquatiques** » (SOMAUQUA) (Responsable : Tarik Meziane)

Discussion générale

- 18:00 **Dépose des bagages aux hôtels**
Départ pour la Barge du CROUS

Lundi 16 janvier
soirée

Soirée à quai sur la Barge du CROUS

Quai François Mauriac, Paris 13^e

Accueil à partir de 18h30
(inscription et badge obligatoires)

Buffet d'înoaire
Fin de la soirée à 22h30



09:00-09:20

Accueil – installation des présentations de la session 4

SESSION 4
09:20-12:45

**PROJETS INTER-EQUIPES/INTER-SITES DANS LE CADRE DES PROGRAMMES
TRANSVERSAUX DE L'UMR : BILANS, DEMANDES DE RENOUVELLEMENT,
NOUVEAUX PROJETS**

5 min d'exposé + 5 min de discussion

9:20-10:10

Axe transversal Changements globaux

Modérateurs : responsables d'axe : Nathalie Niquil et Pascal Jean Lopez

9:20-9:30

Présentation générale de l'axe : Nathalie Niquil

9:30-9:40

« Identification du cycle de reproduction de l'huître de palétuvier, *Crassostrea rhizophorae* et transfert de tests écotoxicologiques de *C. gigas* à *C. rhizophorae* ». (co- resp. Soazig Lemoine, Eq1 Pointe à Pitre et Katherine Costil, Eq1 Caen) : 2015, renouvelé 2016. Bilan final

9:40-9:50

« Étude de la photo-physiologie d'Anthozoaires récifaux (coraux et gorgones) dans leur environnement – Capacités d'adaptation au changement climatique global » (co- resp. Claude Bouchon Eq1, Pointe à Pitre, Pascal Jean Lopez, Eq1 Paris et Pascal Claquin, Eq5 Caen) : 2015 renouvelé 2016. Bilan final

9:50 -10:00

« Evaluation des effets biologiques de l'acide domoïque produit par les microalgues du genre *Pseudo-nitzschia* sur les mollusques » (co- resp. : Antoine Serpentine, Eq1 Caen et Juliette Fauchot, Eq5 Caen) : 2016. Bilan à 1 an – pas de demande de renouvellement

10:00-10:10

« Approche spatiale et fonctionnelle des composés organiques impliqués dans la synthèse coquillière de la seiche (*Sepia officinalis*) » (co- resp. Laure Bonnaud-Ponticelli, Eq2 Paris, Pascal Jean Lopez, Eq1 Paris) : 2016. Bilan à 1 an – pas de demande de renouvellement.

10:10-10:40

Axe transversal Diadromie et Dispersion/Migration et Dispersion

Modérateurs : responsables d'axe : Philippe Keith et Eric Feunteun/ Clara Lord et Fabrice Duponchelle

5 min d'exposé + 5 min de discussion

10:10-10:20

Présentation générale de l'axe : par les responsables

10:20-10:30

« Anguille américaine des Caraïbes » (co- resp. : Eric Feunteun, Eq5 Dinard et Dominique Monti, Eq4 Pointe-à-Pitre) : 2015, renouvelé 2016. Bilan final – *résumé en attente*.

10:30-10:40

« Estimation de la durée de vie larvaire et structure génétique des populations de *Stiphodon rutilaureus* (Gobioidei : Sicydiinae) » (co- resp. : Clara Lord, Eq4 Paris et Eric Feunteun, Eq5 Dinard) : 2015, renouvelé 2016. Bilan final

10:40-11:00

Pause –suite des installations des présentations

- 11:00-11:50** **Axe transversal Communication chimique/Communication et Perception**
Modérateurs : responsables d'axe : Joël Henry et Céline Zatylny-Gaudin/Joël Henry et Nicolas Rabet
5 min d'exposé + 5 min de discussion
- 11:00-11:10 Présentation générale de l'axe : par les responsables
- 11:10-11:20 « Etude de la communication chimique entre le crabe (*C. maenas*) et la sacculine (*S. carcini*) par une approche peptidomique/protéomique comparée de l'hémolymphe de crabes sacculinés versus non sacculinés » (co-resp. Nicolas Rabet, Eq4 Paris et Joël Henry, Eq2 Caen) : 2015 renouvelé 2016. Bilan final
- 11:20-11:30 + LMI EDIA « Utilisation de la vitellogénine localisée dans le mucus pour faciliter le sexage des reproducteurs, pour permettre la détermination du stade de maturité des femelles et faciliter la formation de couples » (co-resp. Joël Henry, Eq2 Caen et Jésus Nuñez, Eq7 Bolivie) : 2016. Bilan à 1 an et demande de renouvellement
- 11:30-11:40 Nouveaux projets 2017
 + LMI EDIA « Détection et caractérisation des phéromones à l'origine de la sélection sexuelle chez le poisson amazonien *Apistogramma agassizii* » (co-resp. Céline Zatylny-Gaudin, Eq7 Caen et Fabrice Duponchelle, Eq7 Pérou)
- 11:40-11:50 + Axe Micro-organismes « Etude des épines venimeuses chez *Pterois volitans* » (co-resp. Céline Zatylny-Gaudin, Eq7 Caen, Claude Bouchon et Yolande Bouchon, Eq1 Pointe-à-Pitre)
- 11:40-12:00** **Axe transversal Micro-organismes (nouvel axe)**
Modérateurs : responsables d'axe : Cédric Hubas et Sébastien Duperron
5 min d'exposé + 5 min de discussion
- 11:40-11:50 Présentation générale de l'axe : par les responsables
- 11:50-12:00 Nouveau projet 2017
 « Diversité microbienne associée aux poissons téléostéens de l'Océan austral : approche biogéographique et lien avec le régime alimentaire » (co-resp. Sébastien Duperron, Eq3 Paris et Philippe Koubbi, Eq4 Paris)
- 12:00-12:10** **Atelier méthodologique Cultures cellulaires**
Modérateurs : responsables d'atelier : Stéphanie Bordenave, Clothilde Heude et Christophe Lelong
5 min d'exposé + 5 min de discussion
- 12:00-12:10 « Caractérisation moléculaire de cellules souches en culture et *in situ*, et tri cellulaire chez deux modèles aquatiques non-conventionnels, la seiche et la petite roussette » (co-resp. Aude Gautier, Eq2 Caen, Sébastien Baratte, Eq2 Paris et Aude Andouche, Eq2 Paris) : 2015 renouvelé 2016. Bilan final
- 12:10-12:30** **Atelier méthodologique Génomique fonctionnelle**
Modérateurs : responsables d'atelier : Guillaume Rivière et Pascal Jean Lopez
5 min d'exposé + 5 min de discussion
- 12:10-12:20 « Bilan scientifique du projet CHICOS (Caryotype Hultre Crassostrea) : Etablissement de caryotypes chez les huîtres *C. gigas* et *C. rhizophorae* – développement des techniques de marquages » (co-resp. Christophe Lelong, Eq2 Caen et Soazig Lemoine, Eq1 Pointe-à-Pitre) : 2015 renouvelé 2016. Bilan final
- 12:20-12:30 Nouveau projet 2017
 « MARMEET, Méthylation de l'ARN chez les Mollusques et développement » (co-resp. Guillaume Rivière, Eq2 Caen et Sébastien Baratte, Eq2 Paris)
- 12:20-14:00** **Déjeuner (restaurant du CROUS, UPMC)**

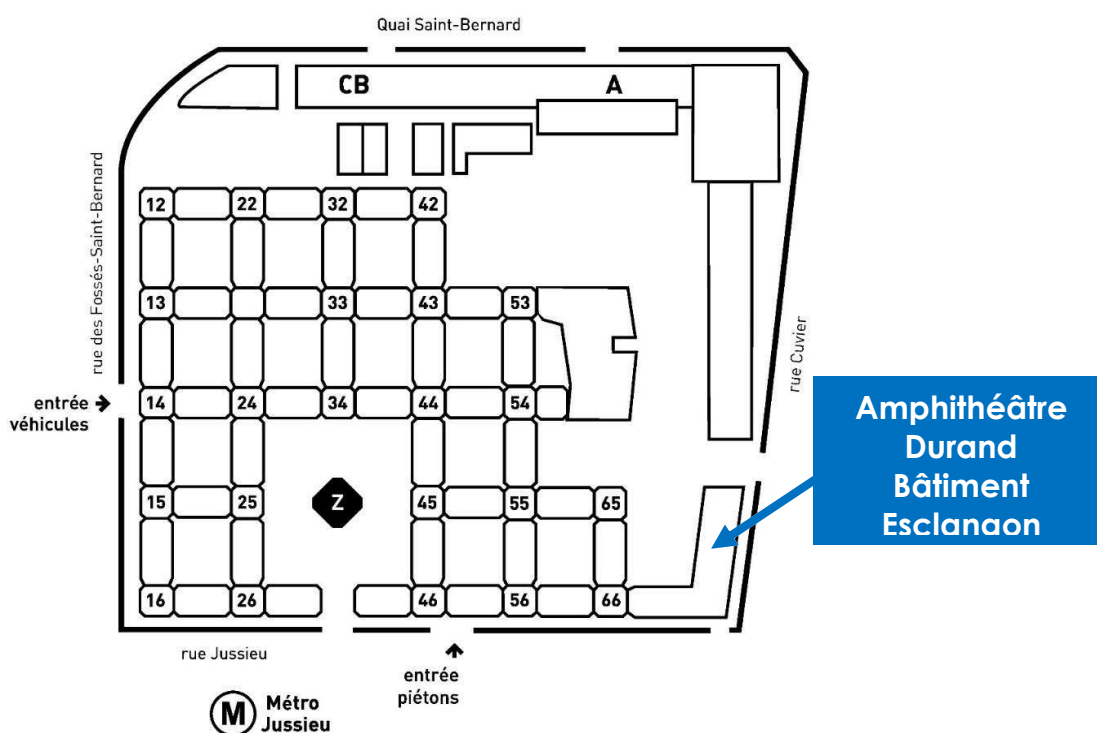
SESSION 5
14:00-17:00

ASSEMBLEE GENERALE

- Discussion sur les Axes transversaux et Ateliers méthodologiques 2017
- Discussion sur la future structuration de l'UMR
- Réflexions sur les Axes transversaux pour le prochain quinquennal
- Discussion sur les groupes de travail en vue du prochain quinquennal : Hygiène et sécurité y compris Prévention des conflits et risques psycho-sociaux; Organisation et soutien à la gestion ; Equipements dans l'UMR et leur mutualisation ; autres ...
- Règlement intérieur ; Livret d'accueil,
- Remplacement de certain.e.s représentant.e.s au Conseil de BOREA (contrat actuel) :
 - Représentant.e élu.e. Ingénieurs, Techniciens (remplacement pour 2017-2018 de : Françoise Gonnet, TCE, départ à la retraite en janvier 2017)
 - Doctorants (2 représentant.e.s) remplacement pour 2017
 - Post-doctorants (2 représentant.e.s) remplacement pour 2017
 - (*Rappel : Enseignants-Chercheurs et chercheurs (non responsables équipes) élus par les équipes pour 2017-2018 (remplacement équipe 1, équipe 2, équipe 4) : à communiquer par les équipes*)
- Questions diverses

17:00

Clôture – remise des badges



Session 1 : Highlights des équipes

Effets de la contamination et des contraintes environnementales sur la bioaccumulation métallique et les réponses biologiques de la moule saumâtre, *Mytilopsis leucophaeata*

Equipe n° 1

Présentatrices : **Christelle CAPLAT** et **Katherine COSTIL**

E-mail : christelle.caplat@unicaen.fr - katherine.costil@unicaen.fr

Mytilopsis leucophaeata est une moule introduite en Europe et faisant partie des *Dreissenidae*. Elle se caractérise par son euryécie et notamment sa capacité à coloniser des eaux dont la salinité est comprise entre 0,1 et 31 PSU. Dans le secteur de la Baie des Veys (Normandie), deux populations naturelles ont été suivies pendant 13 mois : une dans le site dulcicole de La Douve et l'autre sur les structures du port mésohalin de Carentan.

Mytilopsis leucophaeata montre un fort potentiel d'accumulation vis-à-vis de certains métaux classés parmi les 10 ETMs les plus toxiques pour les écosystèmes aquatiques. La comparaison entre le site dulcicole et le site portuaire apparaît bien marquée. On peut observer, dans les tissus des moules du port de Carentan, une accumulation croissante du cadmium (considéré comme l'élément le plus toxique), du cuivre, du nickel et du zinc, après 4 mois de suivi, sur la période hiver-printemps (pendant le repos sexuel et la mise en place de la gamétogénèse). Les maximums de concentration atteignent 2 à 10 fois la médiane nationale donnée par le réseau de surveillance ROOCH d'Ifremer (entre 2003 et 2007). Parallèlement, les concentrations en cadmium, cuivre et zinc mesurées dans les tissus des moules de la Douve restent stables pendant les 13 mois de suivi, indiquant un milieu peu ou pas contaminé par ces métaux.

Du point de vue biologique, les moules des deux populations présentent d'importantes différences de taille, poids et indice de condition, avec des valeurs toujours supérieures pour les individus récoltés dans La Douve. De plus, dans le port, le cycle gamétogénétique semble perturbé. En revanche, les biomarqueurs biochimiques étudiés montrent peu de différences significatives inter-sites (hormis pour l'activité des catalases supérieure à La Douve). Enfin, de fortes mortalités sont enregistrées pour les individus engagés dans les deux sites.

Ces travaux ouvrent un large champ d'investigations dans le domaine de l'écologie et de l'écotoxicologie de cette espèce encore très peu étudiée. En effet, il serait intéressant de caractériser 1) le lien entre les deux populations distantes d'environ 5 km ; 2) le type d'interaction entre *M. leucophaeata* et l'annélide tubicole *Ficopomatus enigmaticus* (dont les récifs sont colonisés par les moules dans le port) et 3) les capacités d'acclimatation de l'espèce aux contraintes environnementales dont la contamination métallique.

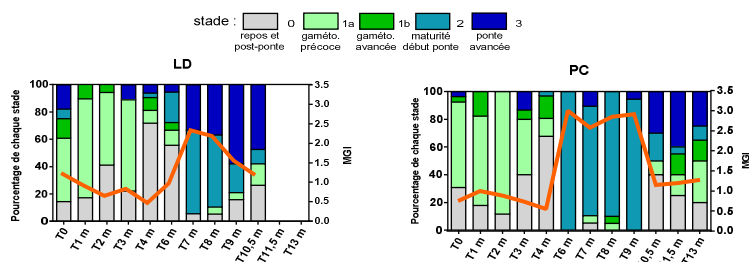
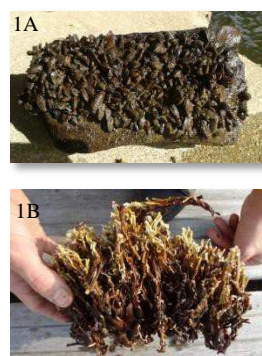


Fig. 1. Illustrations des populations naturelles de *M. leucophaeata* dans le site de la Douve (1A) et à la base des récifs à *F. enigmaticus* dans le port de Carentan (1B).

Fig. 2. Cycle de gamétogénèse et indice gonadique moyen (MGI) des moules récoltées dans la Douve (LD) et dans le port de Carentan (PC).

Session 1 : Highlights des équipes

« Désorphanisation » de systèmes neuropeptidergiques chez *Crassostrea gigas* »

Equipe n° 2

Présentateur : **Jérémy PASQUIER**

E-mail : jeremy.pasquier@unicaen.fr

La récente mise à disposition de plusieurs bases de données « omiques » pour l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, a permis de recenser de nombreux neuropeptides ainsi que plusieurs centaines de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Cependant l'huître creuse reste encore un modèle moléculaire émergent parmi les protostomiens, et jusqu'à maintenant peu de systèmes neuropeptidergiques ont été caractérisés d'un point de vue phylogénétique et fonctionnel chez cette espèce. Le but est de dévoiler les liens de parenté liant les neuropeptides et les GPCR identifiés chez l'huître avec ceux déjà décrits chez des modèles conventionnels. Pour cela une approche de reconstruction phylogénétique est mise en place. Cette étude phylogénétique sert, ensuite, de socle pour une étude fonctionnelle visant à caractériser les interactions moléculaires entre neuropeptides et GPCR de l'huître. Cette étude fonctionnelle est basée sur une approche d'endocrinologie inverse en système hétérologue.

Le couplage de la phylogénie et de l'endocrinologie inverse nous a d'ores et déjà permis d'identifier (désorphaniser) plusieurs couples ligands/récepteurs chez notre modèle.

Session 1 : Highlights des équipes

Recrutement d'un Ingénieur d'Etudes, Louis Amand, et projets instrumentaux associés

Equipe n° 3

Présentateur : **Bruce SHILLITO**

E-mail : Bruce.Shillito@upmc.fr

L'équipe AMEX étudie la Biologie des écosystèmes hydrothermaux profonds, et un des volets importants de sa recherche s'appuie sur l'expérimentation sur des animaux vivants, au moyen d'instruments qui reproduisent les conditions de pression et de température régnant en profondeur. Louis Amand, Ingénieur d'Etudes en mécanique, a rejoint l'équipe AMEX en novembre 2016. En plus de sa contribution à la mise en oeuvre des instruments existants (IPOCAMP, PERISCOP, BALIST), Louis sera aussi au coeur de plusieurs projets instrumentaux hyperbares en cours ou à venir au laboratoire.

Session 1 : Highlights des équipes

La difficile bioindication en situation de diadromie généralisée

Equipe n° 4

Présentateur : **Dominique MONTI**

E-mail : phone.dominique@gmail.com

Parmi les fortes originalités des écosystèmes insulaires, aux hydrosystèmes courts, figure en bonne place la grande proportion d'organismes diadromes, effectuant des déplacements réguliers le long du continuum eau douce/mer. Ces déplacements massifs et fugaces brouillent la lecture du lien entre structure des communautés et qualité des milieux : beaucoup d'outils quantitatifs classiques de l'écologie et du diagnostic de qualité y sont inopérants. La Guadeloupe est, avec la Martinique, un archétype de ces systèmes simplifiés par la turbulence de leurs eaux jointe à la totalité de ses espèces d'eau douce (moins une), crustacés, poissons qui, tous, sont migrateurs.

Frappée par une crise sanitaire par organochlorés majeure, les Antilles cherchent les compartiments ou éléments adéquats qui permettraient une bioindication fiable de niveaux de pollution. Parmi les pistes prospectées, le biofilm épilithique et sa structure ont donné lieu à un travail transversal entre équipes BOREA et extérieures à l'UMR (physique, bactériologie, chimie...) pour dégager des pistes de ce qui pourrait constituer de futurs bioindicateurs de pollution aux Antilles et dans les écosystèmes insulaires, tropicaux et non-tropicaux, aux mêmes caractéristiques.



Session 1 : Highlights des équipes

Variabilité spatiale du recrutement des post-larves de *Sicyopterus lagocephalus* (Pallas, 1770) (Teleostei, Gobiidae, Sicydiinae) sur l'île de la Réunion

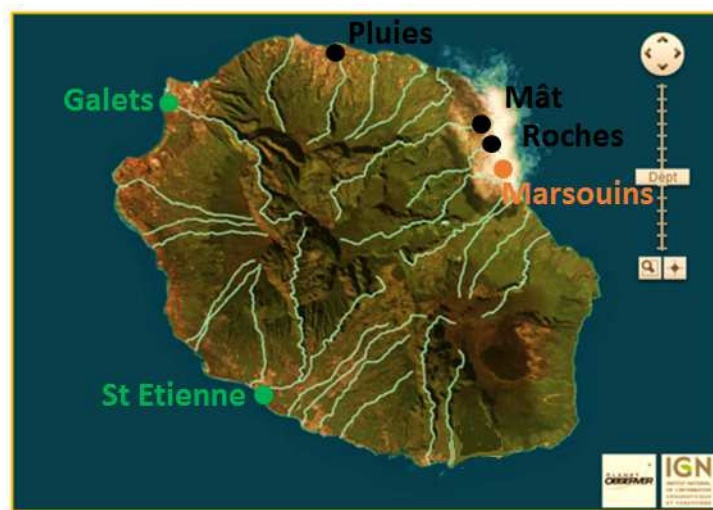
Equipe n° 4

Présentatrice : Céline ELLIEN

E-mail : celine.ellien@upmc.fr

Ce projet concerne l'étude de l'écologie et du socio-écosystème (pêcherie) d'une espèce de Gobiidae amphidrome que l'on trouve sur l'île de La Réunion (*Sicyopterus lagocephalus*), en particulier lors des transitions entre les milieux océanique et d'eau douce. L'objectif principal consiste à caractériser le recrutement des post-larves et sa variation, en identifiant les rivières dans lesquelles il est le plus abondant au cours de la saison de recrutement. On a déterminé également les structures en âge et en taille des post-larves, pour les différentes rivières, en cherchant à extraire des tendances en fonction de la localisation des rivières sur l'île.

Sur l'île de la Réunion, les post-larves de cette espèce sont pêchées et constituent une ressource alimentaire très importante pour les populations locales, mais une ressource très fragile en raison de la complexité du cycle de vie et du fort impact anthropique s'exerçant à travers cette pêche traditionnelle. Pour acquérir une connaissance scientifique de l'évolution de cette ressource, il est impératif que l'étude écologique soit associée à une étude ethnologique des conditions sociales, économiques et culturelles dans lesquelles l'activité de pêche était, est et sera pratiquée. Les objectifs ethnologiques de cette étude visent à comprendre pourquoi et comment cette activité de pêche a été mise en place, s'est développée et occupe socialement, culturellement et économiquement aujourd'hui, une place importante.



Session 1 : Highlights des équipes

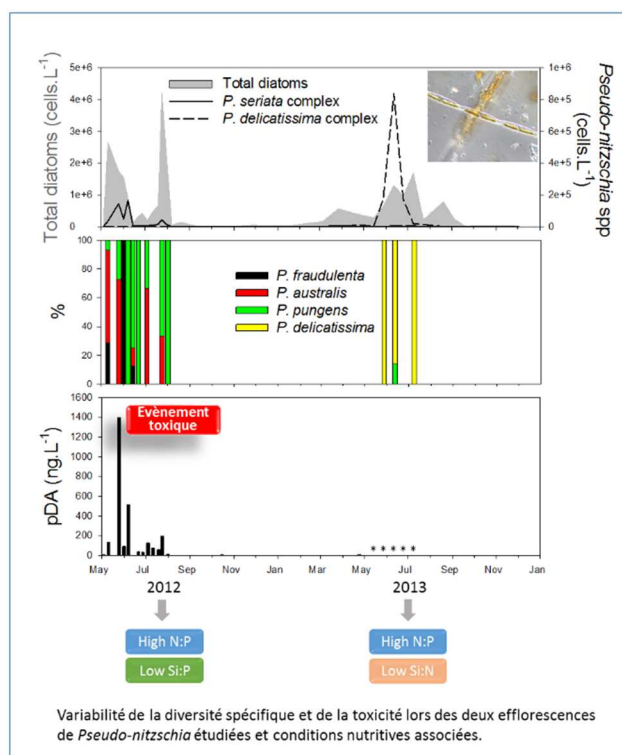
Déterminisme des efflorescences toxiques de diatomées en Baie de Seine : influence des ratios en sels nutritifs sur la diversité spécifique et la production de toxine

Equipe n° 5

Présentateur : **Juliette FAUCHOT**

E-mail : juliette.fauchot@unicaen.fr

Au sein des écosystèmes côtiers, la synthèse de toxines par certaines espèces phytoplanctoniques et leur accumulation dans différents compartiments des réseaux trophiques marins engendrent des risques sanitaires importants, en particulier liés à la consommation de coquillages. Ces événements toxiques ont ainsi un impact socio-économique important sur les filières conchylicoles et la pêche. Or les facteurs responsables du développement des espèces toxiques et de la synthèse de toxines par ces espèces sont encore mal connus. En Baie de Seine, les efflorescences toxiques des diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* ont entraîné des fermetures de secteurs de pêche à la coquille Saint-Jacques durant plusieurs mois en 2004, 2011 et 2012. Il existe en effet une importante variabilité interannuelle de ces phénomènes : même si les espèces du genre *Pseudo-nitzschia* forment des efflorescences tous les ans, celles-ci n'engendrent des événements toxiques et des fermetures de secteurs de pêche que certaines années. Les résultats de deux années d'étude en Baie de Seine ont montré que la variabilité interannuelle des événements toxiques est liée à des différences de diversité spécifique des *Pseudo-nitzschia* selon les années, et en particulier à la présence ou non de *P. australis* qui est la principale espèce responsable de la production de toxine. Les résultats obtenus montrent aussi l'importance de l'influence des sels nutritifs sur ces efflorescences : d'importantes concentrations en azote favorisaient les fortes abondances de *Pseudo-nitzschia* spp., mais les rapports entre les sels nutritifs influenceraient aussi la sélection des espèces de *Pseudo-nitzschia* et leur toxicité cellulaire.



Session 1 : Highlights des équipes

Marqueurs biogéochimiques de l'origine et des migrations de poissons en Amazonie

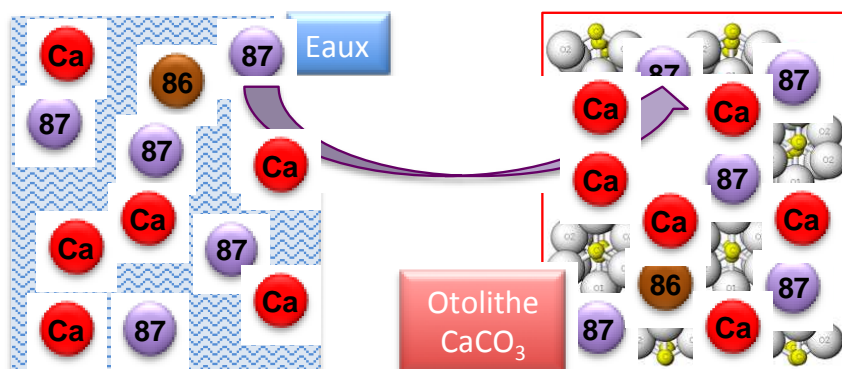
Equipe n° 6

Présentateur : **Marc POUILLY**

E-mail : pouilly@ird.fr

L'écologie et la biodiversité du bassin amazonien sont de plus en plus fragilisées par les activités anthropiques. Les poissons constituent un groupe particulièrement menacé par la pêche, les pollutions anthropiques, mais également par la dégradation et la fragmentation des habitats liées notamment à la mise en place de barrages. Pour optimiser leur croissance, assurer leur reproduction ou simplement trouver de quoi s'alimenter, un grand nombre d'espèces de poissons migrent au sein de ce bassin. Ces migrations sont essentielles à leur survie. Connaître les déplacements de ces espèces; piliers de l'alimentation des populations locales pour certaines, en voie de disparition pour d'autres; est indispensable pour évaluer les impacts des activités anthropiques et offrir des perspectives de protection des espèces. Les trajets de migrations et la provenance des stocks de poissons sont toutefois mal connus car difficilement observables au sein du système hydrographique amazonien aussi grand que complexe.

Dans le cadre du LMI Edia nous abordons cette thématique en utilisant comme marqueurs biogéochimiques, les variations de signature isotopiques des eaux et leur enregistrement dans les structures calcifiées des organismes. Les résultats obtenus montrent le potentiel de la méthode pour tracer les migrations des populations naturelles et comme outil de détection de l'origine des pêches commerciales. En 2016 nous avons obtenu un projet PEPS puis EC2CO afin d'améliorer la connaissance du fonds géochimique des eaux amazoniennes, essentielle au développement de la puissance de cet outil, grâce à l'étude microchimique des coquilles de Bivalves.



Substitution chimique du Calcium par le Strontium dans les otolithes des poissons

Le rapport $^{87}\text{Sr} / ^{86}\text{Sr}$ de l'eau est conservé dans les otolithes

Session 1 : Highlights des équipes

Approches multiples en écologie de la conservation

Equipe n° 7a

Présentateur : **Rudolphe E. Gozlan**

E-mail : rudy.gozlan@ird.fr

Synthèse des travaux de recherche en 2017. 1 – La combinaison d’outils sur le comportement des animaux en milieu naturel afin de mieux comprendre l’utilisation de l’espace et la mise en place des aires de distribution. Une telle approche peut servir de base pour la mise en place de réserves naturelles, la gestion des stocks de pêche mais aussi à une meilleure modélisation des niches écologiques ; 2 - Une modélisation des niches écologiques de poissons envahissants en prenant en compte la structuration génétique des populations dans l’aire de distribution native. De telle approche permettent une meilleure prise en compte des risques d’introduction, d’invasion et donc d’impact écologiques liés aux espèces dites exotiques. 3 - L’utilisation de modèles ‘individu centré’ qui reposent sur des règles simples de comportement et de bio-énergétique. Ici on a adapté un modèle initialement développé pour les oiseaux à des pêcheries de truites et de saumons Atlantique. Une fois établi et validé, de tels modèles permettent de tester une multitude d’hypothèses comme l’impact de la sécheresse sur la croissance et la distribution des poissons. 4 - Enfin, en utilisant une approche globale des écosystèmes terrestre et aquatique en milieu tropical, nous avons mis en évidence l’impact du changement d’utilisation des sols et plus particulièrement de la déforestation sur les réseaux trophiques aquatiques, sur la diversité d’hôtes et donc sur les risques liés à l’émergence de maladie infectieuses.

Les thématiques abordées cette année sont structurées autour de questions fondamentales et appliquées en faisant varier les modèles, les échelles d’études et les outils allant de la macro-écologie à la génomique des populations. Cela nous a permis jusqu’à maintenant de mieux cerner les implications liées aux changements de biodiversité et donc répondre au mieux à sa conservation.



Session 1 : Highlights des équipes

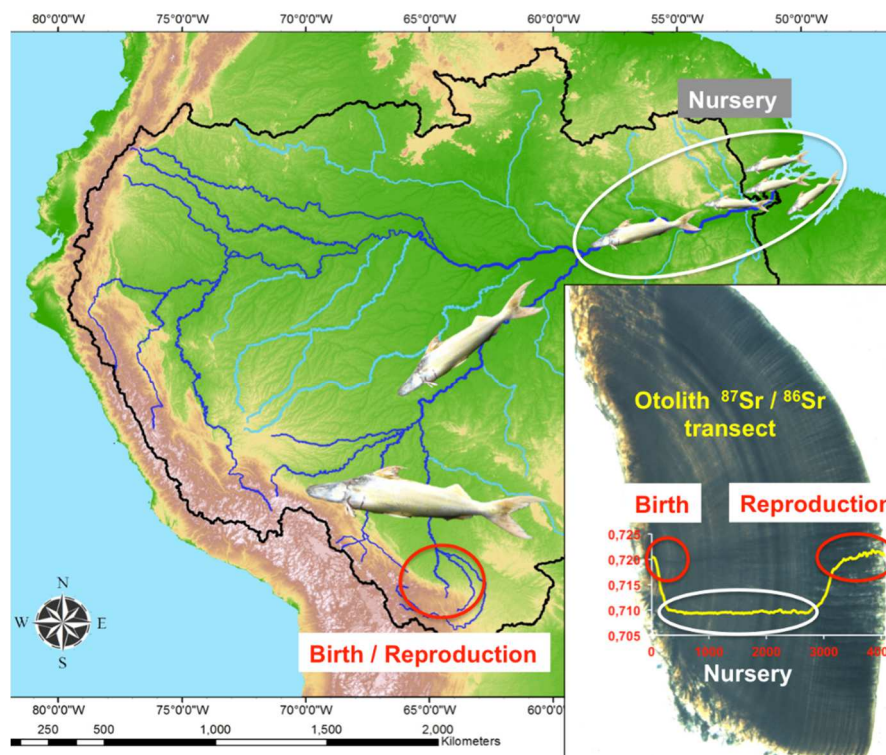
Transamazonian natal homing in giant catfish

Equipe n° 7b

Présentateur : **Fabrice Duponchelle**

E-mail : fabrice.duponchelle@ird.fr

La connaissance précise des migrations des poissons est un prérequis pour une gestion durable des pêches et pour évaluer les problèmes de connectivité engendrés par le développement de projets hydroélectriques, particulièrement dans les grands fleuves internationaux. Dans l'Amazone, les grands poissons chats du genre *Brachyplatystoma* sont les prédateurs ultimes des principaux cours d'eau et revêtent une importance considérable pour les pêcheries. Sur la base des fréquences de taille et de la distribution des gonades mûres dans les débarquements, ces espèces sont supposées effectuer de très longues migrations entre les zones de reproduction dans le piedmont andin et les nurseries dans l'estuaire de l'Amazone. Grâce à la microchimie ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) des otolithes de *B. rousseauxii*, nous avons pu démontrer que cette espèce effectue une migration transamazonienne de plus de 8000 km (la plus longue migration connue en eaux douces) entre ses zones de reproduction et ses nurseries et que les individus reviennent se reproduire dans la zone géographique où ils étaient nés (homing natal). Ce cycle de vie, exceptionnel en eaux douces, est mis en péril par les nombreux barrages hydroélectriques en construction ou en projet dans le bassin de l'Amazone. Les conséquences pourraient être désastreuses, non seulement pour les populations de cette espèce, mais aussi pour les chaînes alimentaires amazoniennes à travers les cascades trophiques.



Session 1 (suite) : Présentation de l'OBLT

L'Observatoire Binational du Lac Titicaca (OBLT) – Organisation et principales réalisations

Présentateur : LAZZARO Xavier

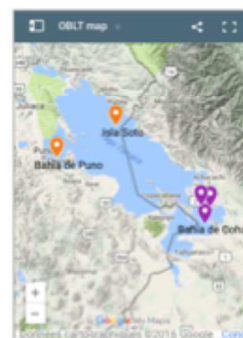
E-mail : xavier.lazzaro@ird.fr

Equipe n° 6

Bien que tropical, le Lac Titicaca, le plus haut (3800 m) des grands lacs, est enserré sur l'Altiplano au cœur des Andes. Berceau des civilisations précolombiennes, seule ressource en eau pour trois millions de riverains, il est maintenant victime de contamination minière, industrielle et domestique, et du dérèglement climatique. Il est indispensable de mieux comprendre son fonctionnement biogéochimique et écologique si particulier, suivre son évolution et proposer des solutions adéquates aux gouvernements de la Bolivie et du Pérou. Pour cela, en collaboration avec les Ministères Boliviens de l'Environnement et de l'Eau (MMAyA) et de la Pêche et l'Aquaculture (IPD PACU), en coordination avec l'Autorité Binationale du Lac Titicaca (ALT), les chercheurs de l'IRD et de l'UMR BOREA avec leurs homologues de l'Université Majeur de San Andrés (UMSA) à La Paz et de l'Institut Péruvien de la Mer (IMARPE) à Puno mettent en œuvre l'Observatoire Binational du Lac Titicaca (OBLT) labellisé par l'IRD en 2015. Pour les autorités des deux pays, l'OBLT a pour objectif pratique de produire des données scientifiques de qualité, actualisées et validées pour la prise de décisions concernant la gestion des ressources. Pour les scientifiques, il offre une plateforme d'infrastructures et de moyens avec des lignes de bases pour les recherches et l'accès unique à des réponses à l'échelle de l'écosystème entier.



Merci



Pour en savoir plus: borea.mnhn.fr/fr/OBLT

Session 4 : Projets inter-équipes / inter-sites

Identification du cycle de reproduction de l'huître de palétuvier, *Crassostrea rhizophorae* et transfert de tests écotoxicologiques de *C. gigas* à *C. rhizophorae*

Axe transversal/ Atelier méthodologique de BOREA

- *Changements globaux (coord : N. Niquil / P. J. Lopez)*

Projet inter-équipes et inter-sites

Co-responsable 1 : Soazig Lemoine, Eq1 Pointe-à-Pitre Guadeloupe (UA), soazig.lemoine@univ-ag.fr

Co-responsable 2 : Katherine Costil, Eq1 Université de Caen Normandie (UCN), katherine.costil@unicaen.fr

Autres participants : Anne Sophie Martinez, Eq2, UCN, Béatrice Adeline, Eq1 et Eq2, UCN et Antoine Serpentine, Eq1, UCN.

Mots Clés : Huîtres, reproduction, histologie, écotoxicologie, immunotoxicité.

Situation du projet

- *Bilan final à 2 ans (2015-2016)*

Objectifs du projet :

Le projet sur l'huître des palétuviers avait pour principal objectif de déterminer le cycle reproducteur de *C. rhizophorae* aux Antilles dans la mesure où aucune étude de ce cycle n'avait encore été effectuée et que par rapport à *C. gigas*, *C. rhizophorae* connaît des conditions climatiques très différentes, avec notamment peu de variations saisonnières.

Le projet visait également à transférer à *C. rhizophorae* des tests écotoxicologiques déjà opérationnels chez l'huître *C. gigas*, communément utilisée comme espèce sentinelle en biosurveillance environnementale.

La collaboration inter-équipes (équipes 1 et 2) et inter-sites (Pointe à Pitre et Caen) a consisté, en Guadeloupe, à :

- des échantillonnages et biométries réalisés par S. Lemoine (à 17 reprises sur la période de juin 2014 à juin 2016 pour le site de référence) et
- une contribution ponctuelle à ce travail de terrain (K. Costil en juin 2014 sur fonds propres et en juin 2016 ; A.S. Martinez en juin 2015 ; A. Serpentine en juin 2016 sur fonds de l'équipe 1) et des essais écotoxicologiques en laboratoire réalisés au moment de ces missions.

A Caen, le travail technique d'histologie a été effectué par B. Adeline alors que la lecture des lames, les mesures effectuées sur ces lames ainsi que le traitement des données ont été réalisés par K. Costil et A.S. Martinez.

Bilan du projet (bilan final à 2 ans)

Le cycle reproducteur de *C. rhizophorae* à la Guadeloupe a été déterminé à partir d'un total de 767 lames histologiques exploitables (qualité de lame suffisante, individus ne présentant pas de pathologies). Ces lames correspondent principalement au site témoin « Manche à Eau » (MAE) qui a été choisi pour décrire le cycle reproducteur de *C. rhizophorae* (508 lames) mais aussi aux sites moyennement (Baie du Lamentin : BLD ; 171 lames) ou très (Goyave : GOY ; 88 lames)

contaminés par la chlordécone.

Le résultat le plus marquant est que le cycle reproducteur de *C. rhizophorae* dans la Manche à Eau est continu avec seulement ~1% des individus en stade de repos sexuel (R) ou gamétogenèse (G), la très grande majorité des huîtres présentant une gonade développée à son maximum

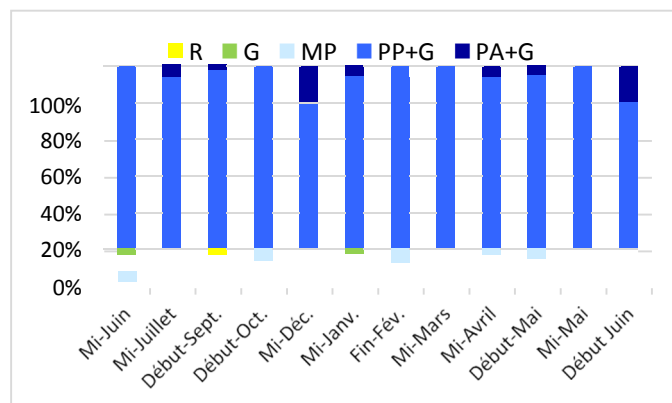
(en taille) (stades MP et PP) (Fig. 1). De plus, lorsque les huîtres pondent (ponte partielle, PP ou avancée PA), elles ont déjà entamé un nouveau cycle gamétogénétique (+G). En se basant sur les indices de condition (qui traduisent le remplissage de la coquille par la chair), il apparaît qu'en 2015 les pontes les plus massives ont eu lieu en mai et juin mais ce résultat n'a pas été retrouvé en mai 2016. Pour les mâles (ces individus étant actuellement les seuls exploités), la quantification de la « gamétogenèse n » (spermatozoïdes) *versus* « n+1 » (spermatogonies et spermatocytes) aboutit à des ratios variant de 1,82 (juin 2014) à 9,05 (décembre 2014) et suggère là encore une période de ponte plus importante au printemps. Ainsi, cette période de l'année serait plus favorable à la réalisation de tests d'embryotoxicité qui nécessitent l'induction de la ponte.

Même si le pas de temps du suivi sur le site de BDL est plus grand et irrégulier, les résultats acquis suggèrent également un cycle continu sur toute l'année. En comparaison à *C. gigas* en métropole, le cycle de reproduction de *C. rhizophorae* domine totalement le cycle de vie de l'espèce à la Guadeloupe. Enfin, quel que soit le site, le sex-ratio est significativement déséquilibré en faveur des femelles (de 56 à 61% des individus) (tests χ^2 corrigés de Yates ; $p < 0,05$) et les huîtres hermaphrodites représentent de 1,17 à 4,55% de la population étudiée. La réalisation d'échantillonnages dans les trois sites à la même période de trois années successives (23/06/2014, 22/06/2015 et 21/06/2016) a permis des comparaisons interannuelles et intersites. Dans les trois stations d'étude, aucune différence interannuelle n'a été notée (tests χ^2 ; $p > 0,05$) et pour une année donnée, les pourcentages des stades de gamétogenèse ne variaient pas significativement entre sites (tests χ^2 ; $p > 0,05$). Ces résultats ponctuels suggèrent que les niveaux de contamination par la chlordécone n'entraveraient pas le déroulement de la gamétogenèse des huîtres dans les sites étudiés. Les travaux réalisés sur le cycle reproducteur de *C. rhizophorae* vont donner lieu à l'écriture en 2017 d'un article qui pourrait être soumis dans le Journal *Invertebrate Reproduction and Development*.

Par ailleurs, en ce qui concerne le transfert de bioessais écotoxicologiques de *Crassostrea gigas* à *C. rhizophorae*, il a été choisi en 2016 de nous focaliser sur non pas l'embryotoxicité comme initialement prévu (suite aux essais de juin 2014) mais sur l'immunotoxicité en participant aux travaux d'Antoine Serpentine qui était en mission à Pointe à Pitre au même moment. Ainsi, nous avons contribué à la mise en œuvre du test de rétention du rouge neutre (approche spectrophotométrique) et à la détermination de paramètres immunitaires tels que la phagocytose (approche en cytométrie en flux) chez *C. rhizophorae*. Les premiers résultats suggèrent une variabilité inter-sites avec une immunodépression et une augmentation du stress oxydant dans le site le plus contaminé par la chlordécone (BDL *versus* MAE et site de Gabarre). Il semble donc que le transfert des tests d'immunotoxicité soit possible mais des expérimentations complémentaires demeurent nécessaires pour conclure définitivement.

Fig. 1. Cycle de gamétogenèse de *C. rhizophorae* échantillonné dans le site de Manche à Eau (Guadeloupe) sur la période de juin 2014 à juin 2016 (reconstitution).

R : repos sexuel ; G : gamétogenèse ; MP : maturité sexuelle partielle ; PP+G : ponte partielle (cycle n) + gamétogenèse (cycle n+1) ; PA+G : ponte avancée (cycle n) + gamétogenèse (cycle n+1).



Session 4 : Projets inter-équipes / inter-sites

Étude de la photo-physiologie d'Anthozoaires récifaux (coraux et gorgones) dans leur environnement – Capacités d'adaptation au changement climatique global

Axe transversal/ Atelier méthodologique de BOREA

- *Changements globaux (coord : N. Niquil / P. J. Lopez)*

Projet interéquipe et intersites

Co-responsable 1 : Bouchon, Claude, Biominéralisation (équipe 1), Guadeloupe,
Claude.Bouchon@univ-ag.fr

Co-responsable 2 : Claquin, Pascal, Diversité et interactions dans les écosystèmes côtiers
(équipe 5), Caen, Pascal.claquin@unicaen.fr

Autres participants : Équipe 1 : Lopez Jean-Pascal, Trouillefou Malika, Bouchon-Navaro
Yolande, Aurélien Japaud

Mots Clés : Coraux - Gorgones – Zooxanthelles - Photosynthèse - Changement global

Situation du projet

- *Bilan final à 2 ans (2015-2016)*

Bilan du Projet :

De nombreux Anthozoaires récifaux sont des animaux vivants en symbiose avec des algues Dinoflagellés : les zooxanthelles. Leur rôle principal est d'apporter à leur hôte une contribution énergétique sous la forme de métabolites carbonés photosynthétisés. Ces symbiotes, constitués de clades ayant des caractères génétiques différents, sont capables de conférer à leur hôte des capacités particulières d'adaptation à leur environnement. Par exemple, certains d'entre eux vont accélérer la croissance de l'hôte, d'autres vont les rendre plus tolérants vis-à-vis des changements de température...

Depuis 2 ans, un programme d'étude de la photosynthèse chez les coraux a été initié entre l'équipe 1 (C. Bouchon, P. Lopez, M. Trouillefou) et l'équipe 5 (P. Claquin). Deux missions de terrain, réalisées en Guadeloupe, ont permis de mettre en évidence des mécanismes originaux de chlororespiration chez le corail *Porites astreoides* que nous n'avons retrouvés que partiellement présents chez deux autres espèces du genre *Porites* (*P.divaricata* et *P.furcata*). En revanche les autres espèces testées *Acropora palmata*, *Motastrea cavernosa*, *Diploria strigosa*, n'ont montré aucun signe de chlororespiration avec les deux protocoles testés. La mission de 2016 a permis de compléter les mesures pour obtenir le nombre de réplicats nécessaires pour la rédaction d'une publication. Ces résultats ont été mis en parallèle avec les données de diversité des clades de Zooxanthelles associés aux coraux acquises dans le cadre d'un autre programme. En considérant le degré de diversité pris en compte, nous n'avons pas trouvé de lien évidemment entre la nature du clade et les réponses physiologiques observées. Ce résultat ouvre un champ très intéressant d'investigation sur le rôle de l'hôte dans ces régulations. De plus nous avons réalisé des mesures sur des *Porites astreoides* à différentes profondeurs pour estimer l'impact du gradient de lumière sur cette régulation. Les premiers résultats ont mis en évidence le même type de régulation qu'en surface contrairement à ce que la littérature sur la diversité des zooxanthelles laissait présager. La rédaction d'une publication est actuellement en cours.

Session 4 : Projets inter-équipes / inter-sites

Evaluation des effets biologiques de l'acide domoïque produit par les microalgues du genre *Pseudo-nitzschia* sur les mollusques

Axe transversal/ Atelier méthodologique de BOREA

- *Changements globaux (coord : N. Niquil/ P. J. Lopez)*

Projet Inter-équipe

Co-responsable 1 : Antoine Serpentini, Eq1, Caen, antoine.serpentini@unicaen.fr

Co-responsable 2 : Juliette Fauchot, Eq5, Caen, juliette.fauchot@unicaen.fr

Autres participants : Katherine Costil, Eq1, Caen, katherine.costil@unicaen.fr ; Jean-Marc Lebel, Eq1, Caen, jean-marc.lebel@unicaen.fr et Pascal Claquin, Eq5, Caen, pascal.claquin@unicaen.fr

Mots Clés : *acide domoïque, Pseudo-nitzschia, hémocytes, immunotoxicité, développement embryon-larvaire, métamorphose*

Situation du projet

- *Bilan à 1 an (2016)*
 - o *Demande de renouvellement : NON*

Objectifs du projet :

Au sein des écosystèmes côtiers, les diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* produisent une neurotoxine, l'acide domoïque (AD), qui est présente en concentrations variables dans le phytoplancton et les mollusques filtreurs suite aux efflorescences.

Les effets de l'AD sont assez bien caractérisés chez les mammifères et les oiseaux. Cependant, chez les Mollusques marins, très peu d'études relatent des effets de l'AD qui, néanmoins, pourrait moduler certains de leurs fonctions physiologiques. Ce projet avait donc pour objectif d'évaluer les effets biologiques de l'AD produit par les diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* sur deux espèces de Mollusques.

Les effets recherchés ont concerné l'analyse des paramètres immunitaires d'un Gastéropode, l'ormeau *Haliotis tuberculata* et du développement embryon-larvaire et de la métamorphose d'un Bivalve, l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Les paramètres immunitaires (viabilité des cellules, activité phagocytaire, production de ROS et stabilité des membranes lysosomales) ont été étudiés à partir de cultures primaires d'hémocytes *via* une approche *in vitro*. Concernant le développement embryon-larvaire des huîtres creuses, les tests ont été réalisés afin de déterminer le pourcentage d'anomalies du développement et de calculer la proportion des différents types d'anomalies observables. En complément, nous avons testé l'impact de l'AD sur un stade larvaire plus âgé, le stade pédivéligère (tests de métamorphose).

Ce projet s'est inscrit dans une collaboration inter-équipe de l'UMR entre l'équipe 1 et l'équipe 5 qui s'est concrétisé par un stage de Master 2 de janvier à juillet 2016. Ce projet se situe à l'interface des préoccupations scientifiques des deux équipes. Cette collaboration inter-équipes est basée, d'une part, sur les connaissances de l'écophysiologie et de l'écologie de *Pseudo-nitzschia* apportées par J. Fauchot et P. Claquin (équipe 5) et, d'autre part, sur les compétences de K. Costil, A. Serpentini et J.-M. Lebel (équipe 1) dans l'analyse des réponses des Mollusques marins aux stress environnementaux.

Bilan du projet (bilan à 1 an)

Afin de réaliser ce projet, nous avons choisi de tester 3 sources d'acide domoïque (AD) : l'AD de synthèse, l'AD directement sécrété par les cultures de *Pseudo-nitzschia* en réalisant des co-cultures et de l'AD particulaire contenu dans des extraits cellulaires de cultures (de façon à obtenir des concentrations en AD naturel plus importante que celle obtenue lors des co-cultures).

Les résultats obtenus montrent que l'AD synthétique n'a aucun effet sur la viabilité des hémocytes ou le développement embryo-larvaire après une exposition à des concentrations allant de 0,002 à 20 μM . Cependant, une modulation des paramètres immunitaires a été mesurée. Ainsi, une augmentation significative ($p < 0,05$) de 60% et 31% a été mesurée par rapport au contrôle pour la production de ROS et la stabilité des membranes lysosomales respectivement, lorsque les cellules sont exposées à 0,02 μM d'AD. Ce résultat préliminaire suggère ainsi un potentiel effet de l'AD dans le milieu sur le système immunitaire des Mollusques puisque des concentrations allant jusqu'à 0,03 μM sont retrouvées *in situ*.

Concernant l'AD particulaire issu d'extraits cellulaires, celui de *P. australis*, diatomée connue pour sécréter de fortes concentrations en AD, n'a pas d'effet sur la viabilité des hémocytes en culture pour des concentrations en AD allant de 0,0001 à 10 μM . En ce qui concerne les tests embryo-larvaires, une diminution très importante (98%) des taux de larves normales a été observée à partir d'une concentration de 0,02 μM d'AD. Cependant, un résultat similaire a été obtenu avec un extrait cellulaire de *T. weissflogii* qui ne contenait pourtant pas d'AD. Ce résultat suggère que l'arrêt du développement larvaire observé au cours de cette étude ne serait pas dû à la présence d'AD mais probablement à d'autres molécules faisant partie du contenu intracellulaire des diatomées. Curieusement, ce résultat n'est pas retrouvé lors des expérimentations menées avec les extraits de *P. multistriata* qui est une diatomée sécrétant de faibles quantités d'AD. Une étude du contenu cellulaire de ces différentes diatomées serait alors intéressante afin de mieux cerner les molécules potentiellement embryotoxiques et d'expliquer ces différences. Par ailleurs, les tests de métamorphose réalisés en présence des extraits issus de *P. australis* ou *T. weissflogii* n'ont montré aucune différence significative par rapport au contrôle.

Enfin, dans une troisième série d'expériences, nous avons réalisé des co-cultures de diatomées et de Mollusques (sous forme d'hémocytes, de larves véligères ou de larves compétentes pour la métamorphose). Lors des co-cultures avec *P. australis*, la viabilité des hémocytes diminue (60%) significativement ($p < 0,05$) par rapport au contrôle à partir d'un ratio 2 *P. australis*/1 hémocyte. Un pattern identique mais dans un degré moindre (36%), a été mesuré lors de co-cultures entre les hémocytes et *T. weissflogii*. Ces résultats préliminaires suggèrent que la diminution de viabilité mesurée est probablement due à la présence des diatomées (e.g. consommation des éléments nutritifs dans le milieu) plutôt qu'à l'AD. Par ailleurs, les co-cultures en présence de *P. australis*, *P. multistriata* ou *T. weissflogii* n'ont eu aucun effet significatif sur le développement embryo-larvaire des huîtres. Par contre, la présence de *P. australis* (44 000 cellules/ml) diminue (60%) significativement ($p < 0,05$) la métamorphose des larves pédivéligères. De plus, les dosages d'AD réalisés dans le milieu de culture montrent que la présence des larves a provoqué une très forte augmentation de la production d'AD chez *P. australis*. Ces résultats suggèrent une interaction entre les larves pédivéligère et/ou métamorphosées qui se nourrissent par filtration et les diatomées. Des expérimentations supplémentaires sont nécessaires pour analyser et comprendre les relations qui existent entre ces deux modèles.

Session 4 : Projets inter-équipes / inter-sites

Approche spatiale et fonctionnelle des composés organiques impliqués dans la synthèse coquillière de la seiche (*Sepia officinalis*)

Axe transversal/ Atelier méthodologique de BOREA

- *Changements globaux (coord : N. Niquil/ P. J. Lopez)*

Projet Inter-équipe

Co-responsable 1 : Laure Bonnaud-Ponticelli, Eq2, Paris, bonnaud@mnhn.fr

Co-responsable 2 : Pascal Jean Lopez, Eq1, Paris, pjlopez@mnhn.fr

Autres participants : Charles Le Pabic, Eq1 et Eq2, Paris, clepabic@mnhn.fr et Gilles Luquet, Eq1, gilles.luquet@mnhn.fr

Mots Clés : *Transcriptome – Protéome – Sac coquillier – Bouclier dorsal – Phragmocône*

Situation du projet

- *Bilan à 1 an (2016)*

- o *Demande de renouvellement : NON, les manipes et analyses n'étant pas achevées.*

Objectifs du projet :

Rappel du projet et des objectifs

Au sein des Mollusques, les Sepiidae représentent un modèle unique d'organismes biominéralisateurs par les spécificités de leur coquille interne cloisonnée et calcifiée : l'os de seiche est une synapomorphie des sepiidés. Comme pour tous les organismes calcifiants, l'acidification des océans peut impacter le processus de minéralisation. Des résultats récents ont cependant montré chez l'adulte et le juvénile à pH acide une hypercalcification de certaines parties de la coquille suggérant une régulation inattendue des carbonates. Sur la base de ces résultats étonnants, il nous est apparu indispensable de mieux comprendre comment la minéralisation s'effectuait et quels étaient les composants de la coquille, éléments essentiels de la minéralisation. Deux approches étaient envisagées : une approche protéomique qui avait partiellement débuté et une approche transcriptomique. Pour compléter ces analyses qualitatives et quantitatives, nous souhaitons évaluer leur localisation dans le sac coquillier afin de détecter une éventuelle production différentielle entre le sac coquillier supérieur et le sac coquillier inférieur, à l'origine de structures différentes au niveau de l'os (bouclier dorsal et partie chambrée respectivement). Nous devons compléter par des analyses 2D l'identification et la caractérisation des protéines de chacune des parties puis localiser par immunomarquage des protéines cibles intervenant dans la constitution et dans la fonction de la matrice.

Les résultats devaient permettre 1) d'améliorer notre compréhension « fonctionnelle » du rôle de la matrice protéique dans la synthèse coquillière de la seiche tant au cours des stades précoces de développement que chez l'adulte 2) d'élaborer des hypothèses sur l'origine des différents éléments de la coquille, bouclier dorsal et partie chambrée respectivement.

Ce projet implique des compétences sur les mécanismes de biominéralisation, la protéomique et la transcriptomique d'une part, et les mécanismes moléculaires mis en œuvre lors du développement de la seiche d'autre part portées respectivement par l'équipe 1 et 2.

Bilan du projet (bilan à 1 an)

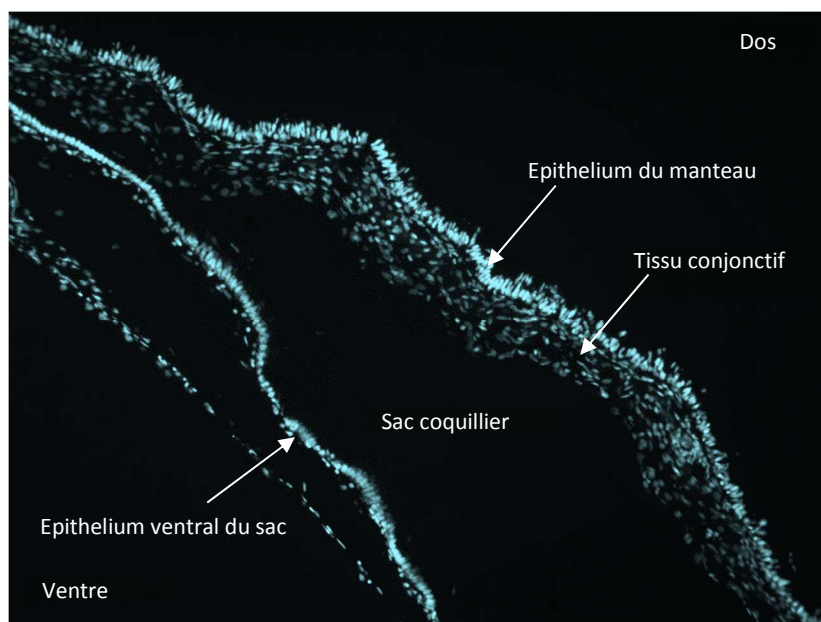
Les protéines impliquées dans la synthèse de cette coquille à la structure complexe n'avaient jamais fait l'objet d'étude. En 2014 et 2015 des travaux de protéomique ont été menés permettant d'identifier certains composés. Les analyses 2D nous ont permis de compléter les données et de définir plus précisément les protéines impliquées. L'ensemble des résultats a ainsi fait l'objet d'une publication (Le Pabic et al., 2017). En comparant/complétant avec les données transcriptomiques nous avons identifié des protéines dont certaines sont spécifiques des parties analysées (bouclier dorsal/partie chambrée) ; d'autres sont communes aux deux parties. Les données transcriptomiques confirment la présence des transcrits des protéines identifiées par les analyses protéomiques dans les sacs coquilliers dorsaux et ventraux (producteurs).

La transferrine, la chitinase et la tyrosinase ont été sélectionnées. La première, décrite pour la première fois dans un tissu minéralisé de mollusque apparaît exprimée dans les parties dorsale et ventrale du sac coquillier alors que les deux autres sont exprimées dans le sac coquillier ventral uniquement. Les données d'immunomarquages sont en cours d'obtention afin de préciser leur localisation dans les différentes parties du sac.

Le travail en génomique comparative avec les autres groupes de métazoaires, sur la transferrine dans un premier temps, est en cours et pourrait révéler un mode de calcification particulier par son rôle putatif dans le transfert d'ions carbonates.

Budget : Bilan des dépenses

- Ac anti-transferrin : 303,18
- Ac anti-chitinase : 303,18
- Ac anti- tyrosinase : 314,34
- soit 1152,25 euros



Marquage au DAPI d'une coupe d'embryon au stade 30. Région dorsale du sac coquillier

Session 4 : Projets inter-équipes / inter-sites

Anguille américaine des Caraïbes

Axe transversal/ Atelier méthodologique de BOREA

- *Diadromie et Dispersion/Migration et Dispersion (coord : Philippe Keith et Eric Feunteun/ Clara Lord et Fabrice Duponchelle)*

Co-responsable 1 : Eric Feunteun, EQ5 Dinard, eric.feunteun@mnhn.fr

Co-responsable 2 : Dominique Monti, EQ4 Pointe-à Pitre, dominique.monti@univ-ag.fr;

Situation du projet

- *Bilan final à 2 ans (2015-2016)*

Résumé manquant

Session 4 : Projets inter-équipes / inter-sites

Estimation de la durée de vie larvaire et structure génétique des populations de *Stiphodon rutilaureus* (Gobioidei : Sicydiinae)

Axe transversal de BOREA

- *Diadromie et Dispersion/Migration et Dispersion (coord : Philippe Keith et Eric Feunteun/ Clara Lord et Fabrice Duponchelle)*

Projet inter-équipe et inter-sites

Co-responsable 1 : Clara Lord, Eq4, Paris, claralord@mnhn.fr

Co-responsable 2 : Eric Feunteun, Eq5, Dinard, feunteun@mnhn.fr

Autres participants : Sophie Berland, Eq1, Paris, berland@mnhn.fr , Philippe Keith, Eq4, Paris, keith@mnhn.fr et Mélyne Hautecoeur, Eq4, Paris, hmelyne@mnhn.fr

Mots Clés : Amphidromie, phylogéographie, spéciation, mitogénome, otolithes

Situation du projet : *Bilan à 2 ans (2015-2016)*

Objectifs du projet

Les rivières insulaires tropicales sont peuplées par des téléostéens amphidromes dont le cycle de vie implique deux migrations entre l'eau douce et l'eau de mer. Les adultes se reproduisent et pondent en rivière et les larves sont transportées vers la mer. Après un temps variable passé en milieu marin, les post-larves recrutent à l'embouchure des rivières et remontent le cours d'eau. Les gobies Sicydiinae (9 genres, 100 espèces) sont apparus récemment, lors du dernier million d'années (Keith *et al.*, 2011), et les processus de spéciation font l'objet d'un regain d'intérêt pour leurs implications en systématique, en phylogéographie et dans le domaine de la conservation durable de la biodiversité. La phase de vie larvaire marine de ces espèces leur permet de disperser en milieu ouvert dans l'océan et de potentiellement coloniser des écosystèmes favorables qui sont souvent isolés les uns des autres mais connectés par la matrice océanique (Keith, 2003). Pourtant la variabilité des barrières géographiques à la dispersion implique que les processus par lesquels leur diversité est apparue et se maintient reste difficile à comprendre.

Le genre *Stiphodon* comporterait 33 espèces réparties dans l'océan Pacifique (Keith *et al.*, 2015). Un fort taux d'endémisme de ce genre et une richesse spécifique caractérise ce genre qui compte le plus grand nombre d'espèces chez les Sicydiinae. Pourtant la structure génétique n'est encore aujourd'hui fondée que sur un nombre limitant de gènes : un seul pour une espèce endémique de Micronésie, *S. caeruleus* (Chabarria *et al.*, 2014), de même pour *S. percnopterygionus* (Lord *et al.*, 2015), distribué dans le nord-ouest du Pacifique.

La durée de la phase larvaire, pouvant être un indice du potentiel de dispersion, n'a été estimée que pour cette dernière espèce (Yamasaki *et al.*, 2007) au sein de ce genre.

Enfin, l'intérêt anthropique rend certaines populations vulnérables lors des phases de vie en rivière et fait peser sur le groupe une menace de fragilisation.

L'objectif de ce projet initié en 2015 est d'étudier certains traits de vie, notamment la dispersion et la connectivité de *Stiphodon rutilaureus*, une espèce largement répartie dans l'ouest et le sud du Pacifique, par des approches combinées de sclérochronologie et de séquençage du mitogénome.

Bilan du projet (bilan à 2 ans)

1- Sclérochronologie : analyse microstructurale des otolithes

Sophie Berland, Eric Feunteun, Mélyne Hautecœur et Clara Lord (Inter-équipes)

Un total de 43 spécimens provenant de l'aire de distribution des *S. rutilaureus* ont été traités (8 de Papouasie, 25 du Vanuatu, 9 de Nouvelle-Calédonie et 1 des Îles Salomon). Les spécimens sont préparés et analysés à la plateforme d'otolithométrie de l'UMR BOREA. La lecture des stries journalières par 3 lecteurs indépendants indique une durée de vie larvaire moyenne (PLD-pelagic larval duration) de 62 ± 5 jours, sauf pour le spécimen des îles Salomon, qui présente une PLD de 46 jours. Ces résultats sont comparés à ceux trouvés pour d'autres représentants des Sicydiinae, et des différences importantes sont mises à jour.

La partie otolithométrie de ce projet a fait l'objet d'un stage de L3 d'une étudiante de l'UMPC, Noémie Valenza-Troubat. Le stage a été effectué en 2015 et l'étudiante a commencé la rédaction d'un article visant à proposer une review sur les différentes durées de vie larvaires trouvées chez les Sicydiinae, en y intégrant ses résultats sur *Stiphodon rutilaureus*.

2 – Séquençage du mitogénome

Clara Lord, Philippe Keith, Eric Feunteun (Inter-Équipes)

Les données quantitatives sur la durée de vie larvaire viendront compléter l'analyse phylogéographique réalisée à l'aide des mitogénomes. Les données génétiques sont obtenues grâce aux nouvelles technologies de séquençage (plateforme SSM). Les mitogénomes (16505 paires de bases) de 42 spécimens (issus des campagnes réalisées en Nouvelle-Calédonie et au Vanuatu) sont maintenant séquencés et assemblés. Ce sont les premiers mitogénomes obtenus pour *S. rutilaureus*. 33 spécimens récoltés aux îles Salomon en octobre 2015 sont en cours de traitement, et 49 spécimens récoltés en novembre 2016 aussi aux îles Salomon seront traités en début d'année 2017. Ces échantillons supplémentaires sont indispensables à la finalisation de l'échantillonnage, permettant de présenter des résultats statistiques robustes.

L'analyse phylogénétique des premiers mitogénomes obtenus sur la région Nouvelle-Calédonie/Vanuatu montre que cette espèce présente deux clades distincts. Ces deux clades représentent-ils deux populations différentes qui se sont mises en place sans barrière géographiques apparentes ? Sommes-nous les témoins d'un processus de spéciation avec la divergence en cours de deux espèces ? La variation génétique allant jusqu'à la différenciation de lignées entre populations d'espèces diadromes semble avoir d'autres moteurs conditionnels que la présence de barrières géographiques. L'espèce connue sous le nom de *Stiphodon rutilaureus* pourrait se révéler être un complexe d'espèces et constituer par là un modèle d'intérêt tant pour une contribution à la redéfinition des contours devenus flous, de la notion d'espèce que pour l'étude des conditions de divergence et de spéciation chez les organismes amphidromes.

La partie moléculaire de ce projet a fait l'objet de deux stages (L3 Université de Créteil - 2015 ; M1 SEP UMPC/MNHN- 2016), effectués par un même stagiaire, Homère Alves Monteiro Kisalu.

Bilan et perspectives du projet

Sur les deux années, ce projet a permis l'encadrement de deux stagiaires au cours de 3 stages. Les résultats obtenus viennent alimenter les débats sur les processus par lesquels la diversité des espèces diadromes est apparue et se maintient et ils apportent des éléments sur les facteurs qui régissent la distribution des espèces dans les îles tropicales Indo-Pacifiques. La variation des traits de vie et la connaissance des flux de gènes entre populations d'espèces diadromes sont des éléments importants en vue de la gestion de ces organismes, surtout dans le contexte du changement global.

Afin de terminer ce projet, Noémie Valenza-Troubat a commencé son stage de M2 (Dir : C. Lord). Le but de son stage est de compléter les données en finalisant le traitement des spécimens provenant des îles Salomon, aussi bien en otolithométrie qu'en moléculaire (≈ 100 spécimens). Pendant ce stage, nous analyserons quelques otolithes, issus de chacune des deux populations, à la nanosims, pour obtenir des éléments sur la phase marine, phase sur laquelle nous ne possédons aucune information. E. Feunteun a en effet effectué des tests en 2016 sur des otolithes d'anguilles

et de gobies Eleotridae et les résultats sont probants.

D'ici la fin du stage de M2 (juin 2017), nous soumettrons la review sur les PLD d'espèces amphidromes et un article sur la structure des populations de *S. rutilaureus* sera en préparation.

Session 4 : Projets inter-équipes / inter-sites

Etude de la communication chimique entre le crabe (*C. maenas*) et la sacculine (*S. carcini*) par une approche peptidomique/protéomique comparée de l'hémolymphe de crabes sacculinés versus non sacculinés

Axe transversal de BOREA

- *Communication chimique/ Communication chimique et Perception (coord : J. Henry et N. Rabet)*

Projet inter-équipes et inter-sites

Co-responsable 1 : RABET, Nicolas, Equipe 4, Site MNHN, Paris, rabet@mnhn.fr

Co-responsable 2 : HENRY, Joël, Equipe 7b, Site Université de Caen, joel.henry@unicaen.fr

Autres participants éventuels :

AUDEBERT, Fabienne, Equipe 4, Site MNHN, Paris, fabienne.audebert@upmc.fr

BERNAY Benoît, Plateforme PROTEOGEN, Caen, benoit.bernay@unicaen.fr

Mots Clés : *crabe, sacculine, interaction hôte/parasite, castration chimique, peptidomique, protéomique.*

Situation du projet

- *Bilan final à 2 ans (2015-2016)*

Projet : La sacculine (*Sacculina carcini*) est un parasite du crabe vert (*Carcinus maenas*) qui est connu pour communiquer avec son hôte afin de modifier sa physiologie au profit du parasite installé. Giard (1886) a montré que la sacculine féminise son hôte mais sans identifier les mécanismes mis en jeu. Rubiliani (1985) a par ailleurs observé que la mue de l'hôte est aussi complètement inhibée via des molécules chimiques circulantes. Il a été aussi montré que la molécule circulante détruit en grande partie la glande de mue et donc bloque sa fonction hormonale. L'ensemble de ces modifications physiologiques sont des phénomènes biologiques remarquables encore très mal connus.

Nous avons proposé d'étudier les mécanismes de communications hôte/parasite en ciblant en particulier l'hémolymphe du crabe, vecteur probable de cette communication chimique. Notre stratégie repose sur la comparaison des peptidomes/protéomes circulants du crabe sacculiné versus non sacculiné. Le différentiel devrait nous permettre d'accéder aux molécules de communication exprimées et libérées dans l'hémolymphe du crabe par l'hôte et le parasite.

Par le séquençage en RNAseq de l'externa de 5 individus de l'espèce *Sacculina carcini*, nous avons obtenu un transcriptome global assemblé et filtré par la plateforme ABiMs de la station biologique de Roscoff (Erwan Corre).

Ce transcriptome qui est en cours d'annotation nous permettra par une approche *in silico* d'une part d'identifier des régulateurs hormonaux propres au parasite et de les confronter structurellement à ceux exprimés par l'hôte, et d'autre part de détecter toute protéine ou peptide du parasite circulant dans l'hémolymphe de l'hôte.



Figure 1 : prélèvement de l'hémolymphe

Résultats/Discussion

La première année, l'équipe de Paris a collecté des animaux sacculinés et non sacculinés et l'extraction de l'hémolymphe a été réalisée conjointement avec l'équipe de Caen (fig.1).

L'équipe de Caen a analysé les échantillons des crabes sains mâles et femelles, non parasités, avec une approche peptidomique (nanoLC, MS/MS).

Les échantillons d'hémolymphe posent de nombreux problèmes au niveau chromatographique et nécessitent d'importants ajustements techniques. Toutefois, certaines analyses réalisées en nLC-MALDI-TOF/TOF ont permis d'obtenir des spectres MS et MS/MS d'excellente qualité (figure 1).

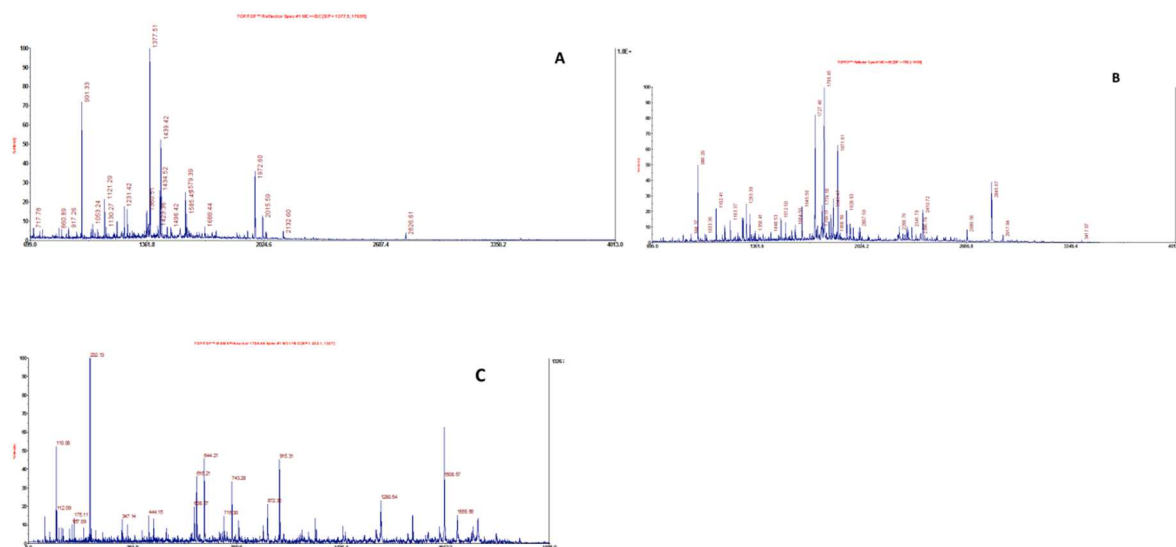


Figure 2 : (A) spectre MS de l'hémolymphe mâle après réduction/alkylation, (B) spectre MS de l'hémolymphe femelle après réduction/alkylation, (C) spectre MS/MS de l'hémolymphe femelle après réduction/alkylation.

La banque virtuelle qui a été générée n'a pas permis d'obtenir d'identifications pour le moment. La réussite de cette tentative était soumise à un certain nombre de conditions : la parfaite conservation du pattern de cystéines, l'obtention de peptides tryptiques correspondant à ce domaine particulier et bien entendu la présence de VIH/MIH/GIH dans l'hémolymphe des femelles étudiées.

La deuxième année, les analyses peptidomiques réalisées chez le crabe sacculiné se sont révélées plus compliquées que celles des crabes sains avec de colmatages en série des colonnes de nanoLC. Les échantillons vont donc probablement subir une préparation préalable en HPLC avant l'étape de nanoLC-MS/MS.

Comme une série de transcriptomes a été séquencés chez le crabe vert *C. maenas*, nous avons réalisé en 2016 le transcriptome de partie externe de sacculines. Deux espèces de sacculines parasitant deux crabes (*Sacculina carcini* est associée à *Carcinus maenas* et *S. gerbei* à *Cancer pagurus*) ont été collectées par l'équipe de Paris, lors d'une grande marée le 9 mars 2016 à Saint Malo (notre site de référence pour les deux espèces de sacculines) et amené à Caen le lendemain où l'extraction d'ARNm a été réalisée. Nous avons par contre abandonné

l'idée de construire un transcriptome de larves de *S. carcini* en raison d'un défaut de ponte fin 2015, début 2016.

Les ARN totaux ont été envoyés à la plateforme Génome Québec pour la construction de banques d'ADNc et le séquençage. Les données de séquençage ont été assemblées par la plateforme ABiMs de la station biologique de Roscoff. Le transcriptome global représente 295913 transcrits. La version annotée sera disponible dans les prochains jours.

L'équipe de Paris a procédé à de nouveaux assemblages et a réalisé des analyses en utilisant la stratégie « gène candidat » en recherchant des gènes transcrits par blasts.

Nous avons identifié par blast peptidique les gènes du développement connus par l'équipe de J. Deustch. S'il n'est pas surprenant d'identifier des gènes du développement précoce comme *caudal* car il y a des embryons en cours de développement dans les sacculines étudiées, nous avons été plus surpris par l'expression de gènes homéotiques qui n'avaient été identifiés que plus tardivement dans le développement larvaire. De la même manière nous avons recherché par blasts protéiques des gènes du développement plus communs comme *vasa*, *Argonaute/Piwi* etc. Nous avons identifié ces gènes chez les deux espèces.

Selon cette méthode, nous avons aussi identifié le gène *IR25a* qui est connu comme étant un récepteur olfactif très conservé chez les Bilatériens. Cette découverte suggère que la sacculine adulte possède des capacités olfactives mais aussi que nous pourrions étudier l'expression de ce gène pour connaître les centres de l'olfaction particulièrement chez les larves cypris. En effet la nécessité du repérage de l'hôte implique une capacité olfactive particulièrement développée à ce stade qui est une communication entre le parasite et son hôte mais par le biais de l'environnement extérieur cette fois ci.

L'équipe de Caen a réalisé une première approche *in silico* avec le logiciel PepTraq. Plusieurs familles de neuropeptides ont été identifiées et parmi celles-ci 3 VIH/CHH/GIH. Parmi les neuropeptides identifiés, on retrouve aussi 2 transcrits très proches structurellement de CCAP probablement issus d'un mécanisme de polymorphisme. Par ailleurs, le neuropeptide mature est absolument identique à celui retrouvé chez l'hôte. Nous sommes donc à la recherche d'autres homologues structuraux du même type qui permettraient d'expliquer certains dysfonctionnements chez l'hôte induits par le parasite. La disponibilité prochaine du transcriptome annoté constituera un atout majeur pour la mise en œuvre de cette approche.

Au cours de l'année 2017 nous continuerons les analyses *in silico* et peptidomiques afin d'identifier l'existence d'une communication croisée entre l'hôte et le parasite adulte, et si celle-ci est avérée, la nature des peptides détectés constituera un indice important pour comprendre les conséquences physiologiques de ce mécanisme. Des tests fonctionnels pourront alors être envisagés pour vérifier les hypothèses émises.

Session 4 : Projets inter-équipes / inter-sites

Utilisation de la vitellogénine localisée dans le mucus pour faciliter le sexage des reproducteurs, pour permettre la détermination du stade de maturité des femelles et faciliter la formation de couples

Axe transversal de BOREA

- *Communication chimique/ Communication chimique et Perception (coord : J. Henry et N. Rabet)*
- *LMI EDIA (coord. : JF Renno)*

Projet Inter-équipe et/ou Inter-sites

Inter-sites à partir du 1^{er} janvier 2017, Caen-Montpellier

Co-responsable 1: Joël Henry, Eq7, Caen, joel.henry@unicaen.fr

Co-responsable 2 : Jésus Nunez, Eq7, Montpellier/Bolivie/Pérou/Côte d'Ivoire, jesus.nunez@ird.fr

Mots Clés : *Vitellogénine, mucus, géniteurs, transcriptomique, protéomique*

Situation du projet

- *Bilan à 1 an (2016)*
 - o *Demande de renouvellement : OUI*

Projet : Communication chimique et contrôle du comportement reproducteur chez *Arapaima gigas*

Les molécules de communication de type phéromone chez les poissons ont été mises en évidence chez plusieurs espèces et elles contribuent ou induisent la parade nuptiale ou plus généralement le comportement reproducteur au moment de l'émission des gamètes.

Chez *Arapaima gigas*, il n'existe aucune donnée sur l'existence de ces molécules, alors que le comportement reproducteur est très élaboré chez cette espèce avec plusieurs étapes, allant de la formation du couple qui va défendre un territoire, jusqu'à la construction d'un nid où seront déposés les œufs, au moment d'une sorte de parade nuptiale.

L'existence d'une communication chimique entre reproducteurs des 2 sexes semble donc établie par les données éthologiques même si aucune molécule n'a été identifiée à ce jour. Néanmoins, des travaux récents montrent chez certaines espèces de poissons la présence de vitellogénines (Vtgs) localisées dans le mucus des femelles en gamétogénèse (Wang et al, 2015). Par ailleurs, les travaux réalisés par notre équipe en 2016 chez *Heterotis niloticus* ont permis d'identifier le transcrite d'une vitellogénine, laquelle a été détectée en protéomique dans le foie, l'ovaire et le mucus de femelles en vitellogenèse. Un anticorps polyclonal est en cours de production et sera disponible début février 2017 pour atteindre les objectifs annoncés dans le projet précédent.

L'objectif de ce projet est de lever des verrous techniques bien identifiés afin de mettre en place un parcours zootechnique robuste permettant de développer l'aquaculture de cette espèce en Bolivie, ces verrous étant d'une part le sexage des géniteurs pour lesquels aucun caractère secondaire discriminant ne permet de distinguer les mâles des femelles et d'autre part un ou des signaux chimiques induisant la formation des couples. La présence de Vtg dans le mucus des

femelles comme observée chez *H. niloticus* lors du précédent projet financé par l'UMR, pourrait constituer un de ces signaux chimiques recherchés pour effectuer un sexage à l'aide d'un test immunologique rapide de terrain non stressant, pour déterminer le stade de maturité des femelles si la quantité de Vtg au niveau du mucus est estradiol dépendante et enfin pour induire la formation des couples si les mâles sont capables de détecter la Vtg de façon quantitative.

Pour répondre à ces questions, la première étape consiste à caractériser la ou les Vtg(s) par une approche transcriptomique réalisée au niveau du foie et de l'ovaire de femelles en gamétogénèse et/ou matures. Un transcriptome annoté sera assemblé en collaboration avec la plateforme ABiMs de la station biologique de Roscoff.

Afin de vérifier la présence de Vtg(s) au niveau du mucus, le protéome du mucus sera caractérisé chez les 2 sexes à maturité sur la plateforme Proteogen par une approche en nLC-MALDI-TOF/TOF (SF ICORE 4206, Université de Caen).

Cette démarche s'inscrit dans la poursuite d'une approche comparée ciblant 2 espèces sœurs amazoniennes : l'*Heterotis niloticus*, l'*Arapaima gigas* qui présentent les mêmes problématiques dans la mise en place des cycles d'élevage.

Ce travail sera réalisé en partie dans le cadre de la thèse de monsieur Daniel Koua N'ZI, qui, après un séjour de 2 mois au printemps 2016 en France à Caen, a séjourné 3 mois en Bolivie d'avril à juin 2016 (financement ESA-C2D "Ecole Supérieure d'Agronomie - Contrat de Désendettement et de Développement".)

Planning du projet :

- Echantillonnage de foie, d'ovaire et de mucus programmé en août 2017 pour *Arapaima gigas* (mission en Bolivie de Jésus Nunez et Joël Henry, financée par le projet ESA-C2D)
- Séquençage NGS en septembre 2017
- Assemblage et annotation en novembre 2017
- Protéomique qualitative en décembre 2017 janvier 2018

Budget : # 3000 Euros + Financement LMI EDIA et projet C2D

- NGS (Génome Québec) = 2500€
- Spectrométrie de masse = 500€

Demande : 1 500 Euros



Arapaima gigas

Références bibliographiques

- Bazáes, A., Olivares, J. & Schmachtenberg, O. (2013). Properties, Projections, and Tuning of Teleost Olfactory Receptor Neurons. *J. Chem. Ecol.*, 39, 451-464.
- Stacey, N. (2003). Hormones, pheromones and reproductive behavior. *Fish Physiol Biochem*, 28, 229-235.
- Stacey, N. and Sorensen, P. W. 2005. Reproductive pheromones. *Behav. Physiol. Fish* 24:359–412.
- Wang J, Shan R, Zhang X, Tian H, Wang W, Ru S (2015). Development of a lipovitellin-based sandwich ELISA for quantification of vitellogenin in surface mucus and plasma of goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol Environ Saf.* 120:80-7.

Session 4 : Projets inter-équipes / inter-sites

Détection et caractérisation des phéromones à l'origine de la sélection sexuelle chez le poisson amazonien *Apistogramma agassizii*

Axe transversal/ Atelier méthodologique de BOREA

- *Communication chimique/ Communication chimique et Perception (coord : J. Henry/N. Rabet)*
- *LMI EDIA (coord. : JF Renno)*

Projet Inter-sites

Co-responsable 1 : Céline Zatylny-Gaudin, Eq7, Caen, celine.gaudin@unicaen.fr

Co-responsable 2 : Fabrice Duponchelle, Eq7, Pérou, fabrice.duponchelle@ird.fr

Autres participants éventuels :

Jean-François Renno, Eq7, Bolivie, Jean-Francois.Renno@ird.fr

Guillain Estivals, Eq7, Pérou, ichtyos3134@hotmail.fr

Mots Clés : *Spéciation, sélection différentielle, phéromones sexuelles, spectrométrie de masse, cichlidés amazoniens*

Situation du projet

- *Nouveau projet 2017*

Objectifs du projet :

Nos premiers résultats, obtenus dans le cadre du LMI-EDIA, montrent l'existence d'une sélection sexuelle marquée chez *Apistogramma agassizii*, poisson appartenant au groupe des cichlidés nains amazoniens. La sélection sexuelle pourrait jouer un rôle majeur dans les processus de diversification de ce groupe, qui présente de nombreuses similitudes avec leurs cousins des grands lacs africains, les Haplochromines, connus comme les cas les plus spectaculaires de radiation explosive chez les vertébrés (Kocher 2004, Wagner et al. 2012).

Selon le patron de coloration des mâles et leur origine géographique les femelles *A. agassizii* expriment un degré de sélection variable du partenaire avec lequel elle s'accouple. En effet, en condition d'origine sympatrique (même ruisseau), les femelles vont opérer une sélection disruptive, certaines se reproduisant préférentiellement avec un type de patron de coloration de mâle et d'autres avec un autre type (nageoires bleues versus nageoires rouges, par ex.) et ce de façon répétitive, tandis qu'en condition d'origine allopatriques (ruisseaux différents), alors qu'un seul type de mâle leur est proposé (une seule couleur), les femelles se reproduisent préférentiellement avec les mâles issus de leur propre ruisseau plutôt qu'avec des mâles issus de ruisseaux distants de quelques centaines de mètres ou quelques km. En revanche, quand la distance séparant les ruisseaux devient plus élevée (plusieurs dizaines de km), alors les accouplements se font sans différenciation géographique par la femelle entre mâle issu du même ruisseau qu'elle ou du ruisseau éloigné. La compréhension des mécanismes impliqués dans la reconnaissance différentielle du partenaire sexuel, qu'ils soient d'ordre visuel (couleurs-opsines), olfactif (communication chimique), auditif ou comportemental, est essentielle pour appréhender l'importance du phénomène de sélection sexuelle observée et son rôle potentiel dans les mécanismes de spéciation au sein de ce groupe très diversifié (> 100 espèces décrites et de

nombreuses autres en attente).

Dans le cadre de cette action incitative, nous nous attacherons à déterminer en conditions expérimentales les principaux agents de communication chimique (phéromones) chez *A. agassizii* et à tester le lien entre une éventuelle variation de ces phéromones et son rôle dans le choix sexuel par la femelle de mâle différenciés par leur couleur.

Pour cela, nous utiliserons, en conditions expérimentales sur la station du IIAP à Iquitos, Pérou, différentes populations d'*A. agassizii* présentant une sélection sexuelle marquée. Pour chaque population, un trio de 1 mâle bleu, 1 mâle rouge et 1 femelle (plus 1 contrôle) sera placé, dans des aquariums transparents, hermétiquement séparés mais permettant aux poissons de se voir, selon la configuration illustrée ci-dessous. L'opération sera répétée avec 5 trios par population et pour 3 populations différentes. Après quelques jours, deux types de prélèvements seront réalisés : 1) du mucus de chacun des poissons sera récupéré et préservé individuellement au congélateur, 2) parallèlement, 200 ml d'eau de chacun des aquariums seront prélevés et passés individuellement sur des colonnes C18 (après induction des colonnes avec 5 ml de méthanol HPLC, rinçage avec 5 ml d'ac. acétique 1%). Les colonnes seront ensuite séchées et préservées individuellement au frais.

Ces prélèvements seront ensuite acheminés à Caen pour effectuer des analyses en spectrométrie de masse. Les phéromones sexuelles identifiées chez les poissons sont généralement de petites molécules (stéroïdes, prostaglandines ou dérivés d'acides biliaires) (Buchinger et al., 2015; Johnson et al., 2015; Keller-Costa et al., 2014). Des analyses seront réalisées en LC-MS/MS afin de réaliser des études comparatives entre les différents échantillons et d'identifier si possible le ou les composé(s) chimiques libéré(s) par les mâles.

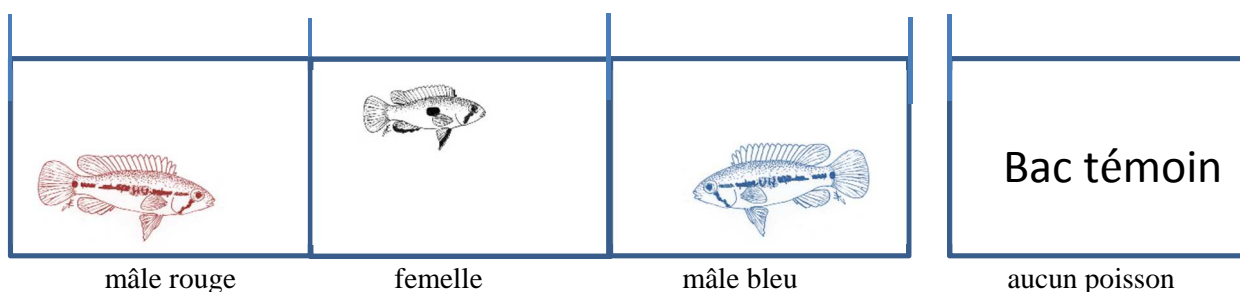
Ce sujet développé au sein de l'équipe 7 en inter-sites portant sur la communication chimique chez *A. agassizii* et la caractérisation de phéromones est en adéquation avec l'axe transversal *Communication chimique et Perception* et le programme transversal LMI EDIA développés au sein de l'UMR BOREA.

Planning du projet (renouvellement ou nouveau projet)

- 1^e semestre 2017 : phase expérimentale
- 2^e semestre 2017 : analyses chimiques et interprétation des résultats

Budget : 1500 €

- Consommables pour réaliser les expériences in vivo, les prélèvements et la préparation des échantillons : 500€
- Analyses en spectrométrie de masse LC-ESI-MS/MS sur des plateformes extérieures : 1000€



Session 4 : Projets inter-équipes / inter-sites

Etude des épines venimeuses chez *Pterois volitans*

Axe transversal/ Atelier méthodologique de BOREA

- *Communication chimique et Perception* (coord : J. Henry/N. Rabet)
- *Micro-organismes* (coord. : C. Hubas et S. Duperron)

Projet Inter-équipes

Co-responsable 1 : Céline Zatylny-Gaudin,, Equipe 7, Caen, celine.gaudin@unicaen.fr

Co-responsable 2 : Claude Bouchon et Yolande Bouchon-Navaro Equipe 1, Guadeloupe, yolande.bouchon@orange.fr, claudette.bouchon@univ-ag.fr

Autres participants : Baptiste Houyvet, doctorant, Louis Benoist, Master 2R et Benoit Bernay, IGR Plateforme proteogen

Mots Clés : *Venins, Peptides antimicrobiens, Minéralisation, Défense, Téléostéens*

Situation du projet

- *Nouveau projet (2017)*

Objectifs du projet :

A partir d'une première collaboration entre l'équipe de Caen et celle de la Guadeloupe, nous avons pu réaliser deux transcriptomes chez *Pterois volitans* : un transcriptome d'épines venimeuses et un transcriptome de nageoires pelviennes.

Les premiers résultats obtenus à partir de l'analyse de ces transcriptomes et des analyses protéomiques sur le venin du poisson lion montrent que le venin de ce poisson est complexe. Il comporte comme constituants majoritaires 4 toxines (dont deux ont été nouvellement identifiées) et une protéine inconnue la « venom protein » présentant des motifs communs avec des allergènes d'abeilles. En plus de ces résultats sur le venin, de nombreux peptides antibactériens ont été identifiés (thèse de Baptiste Houyvet).

Ce projet a pour objectif d'étudier d'avantage ces molécules identifiées chez le poisson lion et de comprendre comment l'épine venimeuse utilise ces molécules pour se défendre des prédateurs et des microorganismes.

Si les premières études menées ont permis d'obtenir un certain nombre de résultats, certains d'entre eux restent partiels par manque de matériel frais et par la perte de qualité des échantillons lors des transports.

Lors de ce projet, nous souhaiterions

- 1) Réaliser de nouveaux prélèvements sur le poisson lion sur le site de la Guadeloupe.
- 2) Réaliser des extractions *in situ* afin de disposer d'une quantité importante de toxines pour réaliser des tests fonctionnels (tests hémolytiques sur du sang de poissons et de mammifères, et des tests de toxicité)
- 3) Etudier les épines dorsales afin d'établir les particularités de ces épines situées au niveau des nageoires en menant une étude histologique (protocole de fixation en cours de mise au point) couplée à une étude protéomique permettant d'identifier les protéines responsables de la calcification et de la dureté des épines.
- 4) Comprendre le rôle des peptides antimicrobiens au niveau de ces épines, ces derniers pouvant agir en synergie avec les toxines ou protéger l'épine après envenimation.

Pour ce dernier point, nous souhaiterions tester les peptides antibactériens sur les tests

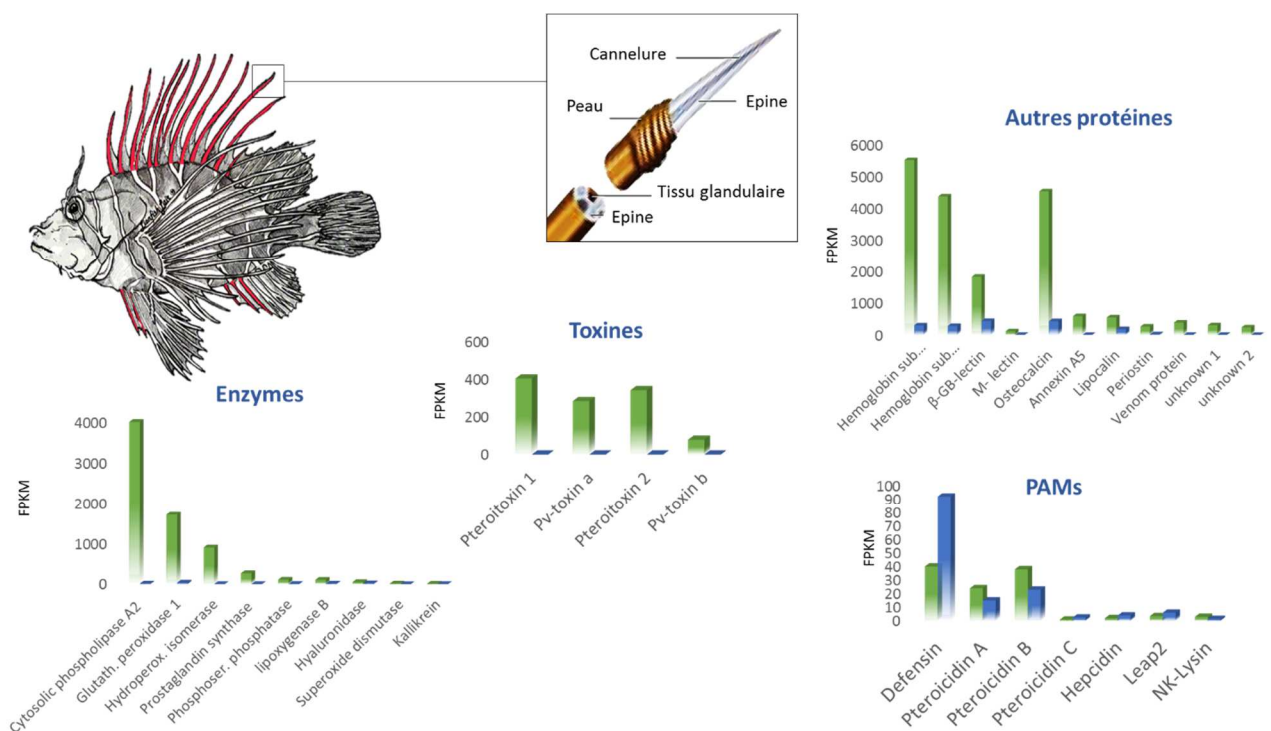
fonctionnels mis au point pour les toxines et suivre les peptides antibactériens avant et après envenimation en réalisant sur des échantillons frais une approche quantitative en peptidomique basée sur l'iItraq.(Miao J et al, 2015)

Planning du projet (nouveau projet)

- 1^e trimestre 2017 : Prélèvements et extractions des tissus sur place en Guadeloupe
- 2^e trimestre 2017 : Traitement des échantillons biologiques, Analyses en spectrométrie de masse et tests fonctionnels
- 3^e trimestre 2017 : Analyse des résultats
- 4^e trimestre 2017 : Publication des résultats._

Budget : 1500 €

- Consommables pour réaliser le traitement et l'analyse des échantillons : 700€
- Transport mission Guadeloupe : 800€



Session 4 : Projets inter-équipes / inter-sites

DAPTO : Diversité microbienne Associée aux Poissons Téléostéens de l'Océan austral : approche biogéographique et lien avec le régime alimentaire

Projet Inter-équipes

Co-responsable 1 : Duperron Sébastien, équipe 3, sebastien.duperron@upmc.fr

Co-responsable 2 : Koubbi Philippe, équipe 4, philippe.koubbi@upmc.fr

Autre participante : Nelly Léger, équipe 3

Mots Clés : *Microbiote, symbiose, téléostéens, biogéographie*

Situation du projet

- *Nouveau projet (2017)*

Contexte : Tous les animaux abritent de nombreux micro-organismes dans leur tube digestif et sur la peau, et le rôle de ces micro-organismes dans la physiologie des hôtes a longtemps été sous-estimé. Chez les téléostéens, les travaux récents menés sur des espèces modèles comme le *Danio rerio*, ou d'intérêt commercial (poissons d'élevage par exemple) ont montré l'existence de communautés microbiennes associées à la peau et au tube digestif (Hovda *et al.* 2007; Kim, Brunt and Austin 2007; Roeselers *et al.* 2011). L'importance de la première dans la santé des spécimens a été montrée, de même que celle de la seconde dans le régime alimentaire, par exemple à travers la contribution de composés comme la vitamine B.

La diversité, l'importance et le rôle de ces communautés sont beaucoup moins bien documentés dans les populations naturelles de téléostéens, et leur biogéographie n'a pas encore été analysée (Llewellyn *et al.* 2016). Le microbiote participe cependant très probablement à la *fitness* des téléostéens et influence leur distribution. Par ailleurs, du point de vue des micro-organismes, nos connaissances sur le rôle des métazoaires en tant que réservoirs de diversité microbienne sont encore très fragmentaires.

Dans le cadre des recherches menées depuis plusieurs années dans l'océan Austral (programmes IPEV de P. Koubbi), plusieurs espèces de poissons mésopélagiques ont été échantillonnées en différents points de leur aire de répartition et les spécimens fixés afin d'étudier leur écologie, leur régime alimentaire et ses variations et de modéliser leur niche écologique (Koubbi *et al.*, 2011a et b ; Duhamel *et al.*, 2014). Une campagne à la mer en janvier-février 2017, ObsAustral, à bord du Marion Dufresne permettra d'échantillonner le long d'un gradient allant du subantarctique à 56°S des espèces de poissons mésopélagiques. N. Léger (équipe 3) embarquera pour échantillonner des tissus de téléostéens en vue de réaliser les analyses moléculaires de ce projet pilote.

Objectifs : Nous souhaitons à travers ce projet inter-équipes mettre en place une expérience pilote d'étude de la diversité microbienne (en particulier bactérienne, les bactéries constituant la plus grande partie du microbiote) associée à plusieurs espèces de poissons mésopélagiques, principalement des Myctophidés à large répartition, afin d'étudier la composition de ces communautés et l'influence des facteurs environnementaux (géographie, saisonnalité) et hôtes-dépendants (régime alimentaire, statut reproducteur, étape du cycle de vie).

Démarche : Ce travail reposera sur le séquençage à haut débit (Illumina) d'une zone hypervariable d'un gène marqueur bactérien classique (le gène codant pour l'ARNr 16S) sur des

échantillons de tube digestif et de peau provenant d'individus prélevés en différents points et correspondant à différentes étapes du cycle de vie. Ces séquences seront comparées aux bases de données afin d'identifier les lignées bactériennes présentes, et les communautés associées aux différents individus seront comparées à l'aide d'outils issus de l'écologie microbienne tels que les analyses multivariées et les tests factoriels à l'aide du logiciel R et de packages associés (vegan). Ces méthodes sont couramment employées au sein de l'équipe 3 (Laming *et al.* 2015). Les échantillons seront acquis par les membres des deux équipes lors de la mission de 2017 programmée sur le Marion Dufresne.

Contribution attendue : Les résultats de cette étude préliminaire permettront de qualifier les communautés bactériennes associées à ces hôtes téléostéens, d'identifier leur rôle dans la physiologie des hôtes, ainsi que les facteurs à l'origine de leur variabilité. Ces données viendront compléter celles issues des campagnes précédentes et pourront être incorporées aux modèles de niche écologique développés. Si ces résultats s'avèrent prometteurs, des demandes seront déposées lors d'appels d'offre en vue de continuer le travail à travers un master 2 puis une thèse.

Références citées

- Duhamel, G., Hulley, P.-A., Causse, R., **Koubbi**, P., Vacchi, M., Pruvost, P., Vigetta, S., Irisson, J.-O., Mormède, S., Belchier, M., Dettai, A., Williams, H., Gutt, D. J., Jones, C. D., Kock, K.-H., Lopez Abellan, L. J., Van de Putte A., 2014. Biogeographic patterns of fish. In: De Broyer, C., **Koubbi**, P., Griffiths, H.J., Raymond, B., Udekem d'Acoz C. d', et al. (eds.). Biogeographic Atlas of the Southern Ocean. Scientific Committee on Antarctic Research, Cambridge, pp. 328-362.
- Hovda MB, Lunestad BT, Fontanillas R *et al.* Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 2007;**272**:581–8.
- Kim D-H, Brunt J, Austin B. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Appl Microbiol* 2007;**102**:1654–64.
- Koubbi**, P., Hulley, P.A., Pruvost, P., Henri, P., Labat, J.P., Wadley, V., Hirano, D., Moteki, M., 2011a. Size distribution of meso- and bathypelagic fish in the Dumont d'Urville Sea (East Antarctica) during the CEAMARC surveys. *Polar Science*, 5(2): 195-210.
- Koubbi**, P., Moteki, M., Duhamel, G., Goarant, A., Hulley, P.A., O'Driscoll, R., Ishimaru, T., Pruvost, P., Tavernier, E., Hosie, G., 2011b. Ecoregionalisation of myctophid fish in the Indian sector of the Southern Ocean: results from generalized dissimilarity models. *Deep-sea Research II*, 58: 170-180.
- Laming SR, Szafranski KM, Rodrigues CF, Gaudron SM, Cunha MR, Hilario A, Le Bris N, **Duperron S**. Fickle or Faithful: The Roles of Host and Environmental Context in Determining Symbiont Composition in Two Bathymodioline Mussels. *Plos One* 2015;**10**:e0144307.
- Llewellyn MS, McGinnity P, Dionne M *et al.* The biogeography of the atlantic salmon (*Salmo salar*) gut microbiome. *Isme J* 2016;**10**:1280–4.
- Roeselers G, Mittge EK, Stephens WZ *et al.* Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME J* 2011;**5**:1595–608.

Planning du projet

Janvier-février 2017 : échantillonnage au cours de la campagne ObsAustral (équipes 3 et 4)

Mars- juin 2017 : extractions d'ADN, PCR, séquençage à haut débit des microbiotes associés (Tag sequencing, équipe 3)

Juillet-décembre 2017 : analyse des données moléculaires, et analyse statistique des paramètres influençant la diversité et la composition des communautés microbiennes (équipes 3 et 4)

Jan-juin 2018 : intégration des données, rédaction d'une publication. Eventuellement, stage de Master 2 pour approfondir le travail

Budget :

Participation aux frais de séquençage (Illumina Tag sequencing) : **1500** euros
le reste sera couvert par la dotation IUF de S. Duperron (séquençage, pour un total d'environ 7000 euros) ; une demande Dialog (coûts associés à la campagne équipe 3) ; une demande IPEV (coûts associés à la campagne équipe 4).



Session 4 : Projets inter-équipes / inter-sites

Caractérisation moléculaire de cellules souches en culture et *in situ*, et tri cellulaire chez deux modèles aquatiques non-conventionnels, la seiche et la petite roussette

Axe transversal/ Atelier méthodologique de BOREA

Cultures cellulaires (coord : S. Bordenave/C. Heude/C. Lelong)

Projet Inter-sites

Co-responsable 1 : Aude Gautier, Eq2, Caen, aude.gautier@unicaen.fr

Co-responsables 2 : Sébastien Baratte, Eq2, Paris, baratte@mnhn.fr et Aude Andouche Eq2, Paris, andouche@mnhn.fr

Mots Clés : *immunocytochimie, cytométrie en flux, Sepia officinalis, Scyliorhinus canicula*

Situation du projet :

- *Bilan final à 2 ans (2015-2016)*

Objectifs du projet :

Des cultures cellulaires de cellules souches ont été initiées chez deux modèles aquatiques non-conventionnels, la seiche et la petite roussette, au sein de l'équipe 2 sur les sites de Paris et Caen respectivement (étude de la neurogenèse chez la seiche, étude de la lignée germinale mâle chez la roussette). Ces cultures primaires contiennent divers types cellulaires qu'il est nécessaire de caractériser plus finement. Pour cela, deux défis techniques devaient être relevés : la mise au point de l'**immunomarquage** tout en préservant l'organisation tridimensionnelle des cultures et l'initiation des analyses en **cytométrie en flux**.

Dans ce contexte, le projet visait 3 objectifs scientifiques :

Objectif 1 : identifier, chez la roussette et la seiche, des marqueurs moléculaires des cellules souches par immunohistochimie et d'hybridation *in situ*

Objectif 2 : analyser le contenu cellulaire des cultures primaires par immunocytochimie (après mise au point du protocole)

Objectif 3 : analyser le contenu cellulaire des cultures primaires par cytométrie en flux pour envisager le tri cellulaire.

L'idée de ce projet inter-sites était 1) de faciliter les échanges de savoir-faire techniques entre les deux sites de l'équipe (immunomarquage, hybridation *in situ*), 2) de mutualiser l'achat d'anticorps coûteux pour la recherche de cellules souches (et avec de forts risques de résultats négatifs dans le cas de la seiche), 3) de se former à la cytométrie en flux (plateforme SFR ICORE).

Bilan du projet :

> *Actions menées et résultats*

Objectif 1. Un panel d'anticorps ciblant les cellules souches embryonnaires humaines a été acheté et partagé sur les 2 années du projet (facteurs de transcription : Sox2, Nanog, Oct4, ID4 ; antigènes de surface : TRA-1, SSEA-4). Chez la roussette, des marquages positifs ont été obtenus avec

Sox2, SSEA-4, ID4 et Pou2 (Oct4) dans les spermatogonies de la niche germinale mais aussi dans celles des cystes. Ce marquage plus large que celui attendu suggère que le potentiel souche de ces cellules ne serait pas limité aux spermatogonies de la niche. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres marqueurs tels que Nanos et validés par hybridation *in situ*. Chez la seiche, le système nerveux en développement n'a présenté aucun immunomarquage positif (résultats 2015). Par contre, deux structures se sont révélées positives à ID4, Sox2, Oct4 et Vasa : l'organe de l'éclosion et deux structures glandulaires de l'entonnoir (résultats 2016). Il s'avère que ces structures présentent un taux de répllication (marquage EdU) particulièrement élevé.

Objectif 2. Un protocole d'immunomarquage préservant la structure 3D des cultures de spermatogonies de roussette a été mis au point. Les marqueurs de pluripotence étudiés ont été détectés dans les colonies cellulaires, ce qui conforte l'hypothèse qu'elles contiennent des cellules souches.

Objectif 3. La recherche de marqueurs de pluripotence dans les cultures ayant donné des résultats positifs chez la roussette (Objectifs 1&2), une analyse de leur contenu en cytométrie en flux a été initiée. Le protocole reste à optimiser pour une meilleure détection des cellules souches dont la proportion reste faible même après enrichissement et culture (essais en 2015 et en 2016).

> *Valorisation et Perspectives*

Au-delà des bénéfices escomptés concernant la mise en commun d'achat de matériel, l'échange de savoir-faire (déplacement à Paris pour comparer et améliorer l'HIS, partage d'un protocole de détection de l'activité AP) et le renforcement des liens inter-sites au sein de l'équipe, les éléments scientifiques suivants seront valorisés :

- Rédaction en cours d'un article sur les marquages positifs obtenus chez la seiche pour des facteurs de pluripotence dans les glandes de l'entonnoir et de l'éclosion
- Valorisation des résultats chez la roussette dans le cadre de la thèse de Laura Gribouval (direction Pascal Sourdain, co-encadrement Aude Gautier) : présentation orale au 19th European Testis Workshop (06/2016), contribution future à deux articles scientifiques (l'un validant le caractère souche des spermatogonies en culture, le second sur Nanos chez la petite roussette).
- Rédaction d'un projet commun sur l'ontogenèse gonadique chez les espèces seiche-huître et roussette (Emergence 2016, Sorbonne Universités, en attente de décision à cette date).

Session 4 : Projets inter-équipes / inter-sites

Bilan scientifique du projet CHICOS (Caryotype Huître Crassostrea) : Etablissement de caryotypes chez les huîtres *C. gigas* et *C. rhizophorae* – développement des techniques de marquages

Axe transversal/ Atelier méthodologique de BOREA

- *Génomique fonctionnelle (coord : G. Riviere et P.J. Lopez)*

Projet Inter-sites/Inter-équipes

Co-responsable 1 : Christophe Lelong, Eq2, Caen, christophe.lelong@unicaen.fr

Co-responsables 2 : Soazig Lemoine, Eq1 Pointe à Pitre, soazig.lemoine@univ-ag.fr et Etienne Bézault, Eq1, Pointe à Pitre, ebezault@univ-ag.fr

Autres participants : Kristelle Kellner et Anne-Sophie Martinez, Eq1

Mots Clés : Huîtres, Caryotype, Cartographique chromosomique de gènes

Situation du projet :

- *Bilan final à 2 ans (2015-2016)*

I- Introduction

L'obtention de données cytogénétiques chez *Crassostrea gigas* et *C. rhizophorae* est un outil important pour la compréhension des mécanismes reproducteurs chez l'huître creuse ou sur l'huître des palétuviers et leurs capacités d'adaptation aux facteurs externes, particulièrement en termes de variation et régulation de la ploïdie. Ces données cytogénétiques s'avèrent de plus en plus pertinentes et complémentaires des données moléculaires acquises chez les huîtres pour différentes problématiques de l'UMR.

Au cours du projet CHIC mené en 2015, le protocole d'obtention de caryotypes chez *C. gigas* a été mis en place en optimisant les paramètres de choix des tissus, de choc hypotonique, de fixation et d'étalement des préparations. L'optimisation du protocole d'établissement de figures de caryotypes ayant été plus long qu'initialement prévu, la seconde partie du projet, à savoir le développement des approches de FISH, n'a pas pu être envisagé pleinement. Par la suite, le transfert de ce protocole vers *C. rhizophorae* a été entrepris. L'interaction entre les deux équipes repose sur un accès plus aisé à l'équipement nécessaire à Caen (système d'acquisition d'image). Pour l'espèce *C. rhizophorae*, les échantillonnages et les caryotypes ont été réalisés à l'UA, puis l'acquisition à Caen.

Dans le projet CHICOS, les **objectifs** sont :

i) L'amélioration des protocoles d'obtention de figures métaphasiques. Les résultats préliminaires ont montré que la méthodologie semble maîtrisée, mais certains points sont à optimiser. Notamment, le choc hypotonique reste à améliorer pour accentuer l'éclatement des enveloppes

pour une meilleure dispersion des chromosomes. En effet, les figures métaphasiques obtenues montrent que des chromosomes ne sont pas complètement évacués du noyau ou chevauchants, faussant le dénombrement.

ii) Le transfert du protocole de caryotypes vers d'autres types cellulaires. Si le protocole a été optimisé prioritairement sur les branchies de *C. gigas*, certaines problématiques chez *C. gigas* et *C. rhizophorae* nécessitent d'employer ces approches cytogénétiques à d'autres cellules, notamment sur les embryons, au niveau des cellules gonadiques ou des tissus soumis à régulation par les contaminants.

iii) Le développement de la technique FISH. S'il n'a pas été possible d'initier des marquages en FISH au cours du précédent projet, le protocole expérimental a été d'ores et déjà défini pour être mené au cours du premier semestre 2016. Pour valider le protocole, il sera réalisé à l'aide de sondes dirigées contre les gènes codant les ARN ribosomiques nucléolaires (45S) et nucléoplasmiques (5S) et l'histone H3 (Barranger et al, 2015, Aquatic toxicology). Ces premiers essais permettront de valider le protocole, notamment pour une double localisation chromosomique. Les données sur *C. rhizophorae* étant peu nombreuses, les sondes développées pour *C. gigas* seront employées chez *C. rhizophorae*, au regard de leur proximité phylogénétique.

iv) Le transfert du protocole de FISH pour des gènes d'intérêt chez les deux espèces. La méthodologie FISH permettra d'obtenir des cartographies plus fines chez l'huître et la synténie de clusters de gènes impliqués dans la reproduction et le déterminisme sexuel.

II- Résultats

1- Optimisation des conditions pour l'obtention de caryotypes

Préalablement à la localisation chromosomique à l'aide de sondes, l'optimisation d'obtention de caryotypes exploitables a été menée en ajustant les conditions des chocs hypotoniques. Généralement réalisés à 150mM ou 0,9% (w/v) de sodium citrate chez les vertébrés ou d'autres organismes, les premiers essais qui avaient été menés précédemment montraient un étalement faible des chromosomes et une dispersion réduite de ces derniers. L'optimisation a donc été réalisée sur les branchies en diminuant la solution hypotonique pour le choc avec deux chocs successifs. Aux conditions de deux chocs successifs de 0,45% ou 0,9% de sodium citrate, la dispersion des chromosomes est faible (figure 1). Par contre, la diminution de l'osmolarité, avec un premier choc à 0,9% de sodium citrate suivi d'un second à 0,45% de sodium citrate, la dispersion est plus importante (moins de chevauchement de chromosomes) et un meilleur étalement des chromosomes (plus détendus). Les chocs hypotoniques en chlorure de potassium couplé ou non à un choc en sodium citrate ne montrent pas des résultats plus convaincants. Réalisée initialement sur de la branchie d'huître, l'optimisation des caryotypes n'a pas montré de résultat probant sur l'aire gonadique. Cette optimisation a été menée sur l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Pour l'huître des palétuviers, *Crassostrea rhizophorae*, les tentatives de caryotype n'ont pas été fructueuses, notamment un problème dans l'éclatement des noyaux. Pour cette espèce, il sera nécessaire de modifier les conditions du choc osmotique. Par la suite, les expérimentations ont été uniquement réalisées sur l'huître creuse.

2- Développement des techniques de marquage

Pour la localisation chromosomique des gènes d'intérêt, la technique de FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) a été développée sur les caryotypes précédemment obtenus. Ce développement a été réalisé à la fois sur les gènes codant les ARN ribosomiques nucléolaire 45S et nucléoplasmique 5S et l'histone H3 (communément employés pour la validation de la méthode) et sur des gènes impliqués dans la régulation de la reproduction chez l'huître (*Smarcad1* et *Laminin A*), ainsi que sur les régions télomériques.

Les conditions d'obtention des gènes *45s*, *5s* et *h3* ont été déterminées pour obtenir les fragments de la taille attendue et l'incorporation de nucléotides marqués a été faite soit par incorporation directe (*45s*, *5s* et *h3*), soit par nick translation (télomères). Pour les gènes *smarcad1* et *lamininA*, aucune amplification a été obtenue, certainement lié la taille des fragments souhaités (d'environ 10kpb).

A l'issue des marquages, des tentatives d'hybridation FISH ont été menées sur des caryotypes obtenues dans les conditions optimisées précédemment. Aucun marquage a été obtenu avec les sondes codant *45s* (figure 2A et B), *h3* (figure 2C et B) et les régions télomériques (non montré).

III- Conclusion

Au bilan de ce projet, les conditions optimales pour l'obtention des caryotypes ont été définies chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Elles permettent de disposer de caryotypes exploitables pour la cartographie chromosomique. En ce qui concerne l'huître des palétuviers *Crassostrea rhizophorae*, ces conditions n'ont pas été pertinentes et à l'avenir, cela nécessitera de les optimiser au mieux.

Si l'obtention des sondes codant les ARN ribosomiques, l'histone H3 et les régions télomériques a été permise, il reste à définir d'autres stratégies pour soit l'amplification de longues sondes pour les gènes intérêt, soit de l'hybridation FISH, non pas avec une sonde longue, mais une succession de sondes courtes.

Au cours de l'hybridation FISH, il n'a pas été permis d'obtenir des marquages. Sur cette approche, nous devons soit optimiser l'incorporation des nucléotides marqués, soit les conditions d'hybridation et de révélation.

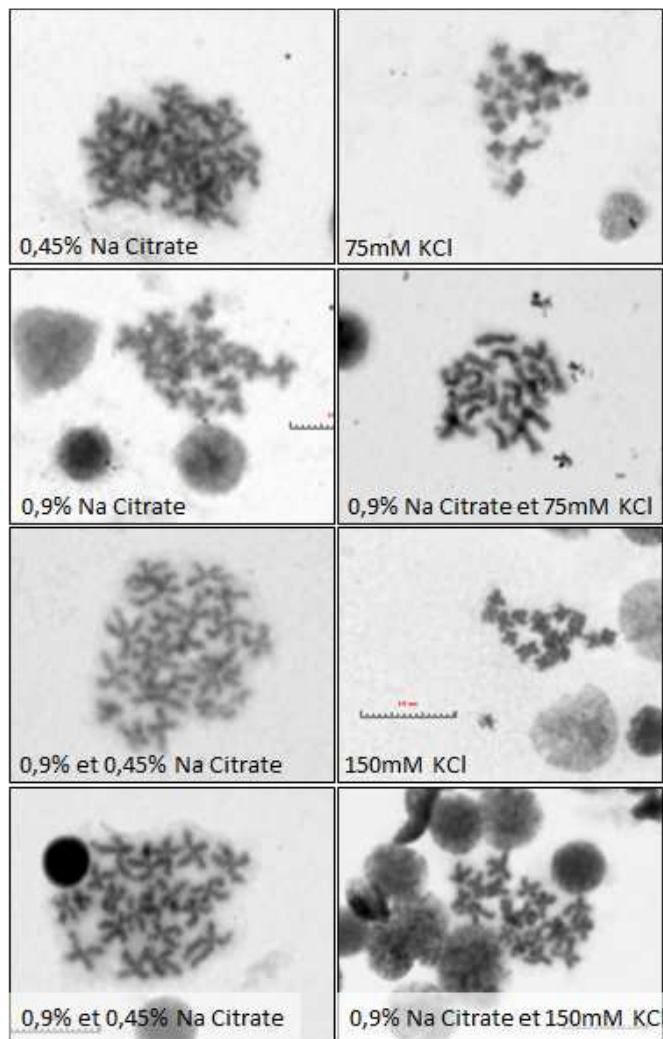


Figure 1: Optimisation des conditions de chocs hypotoniques pour l'obtention de caryotypes sur les branchies chez l'huître *Crassostrea gigas* par deux chocs successifs au Sodium Citrate (Na Citrate) 0,9% ou 0,45% ou au chlorure de potassium (KCl) 75mM ou 150mM (Coloration au Giemsa et grossissement total x1000)

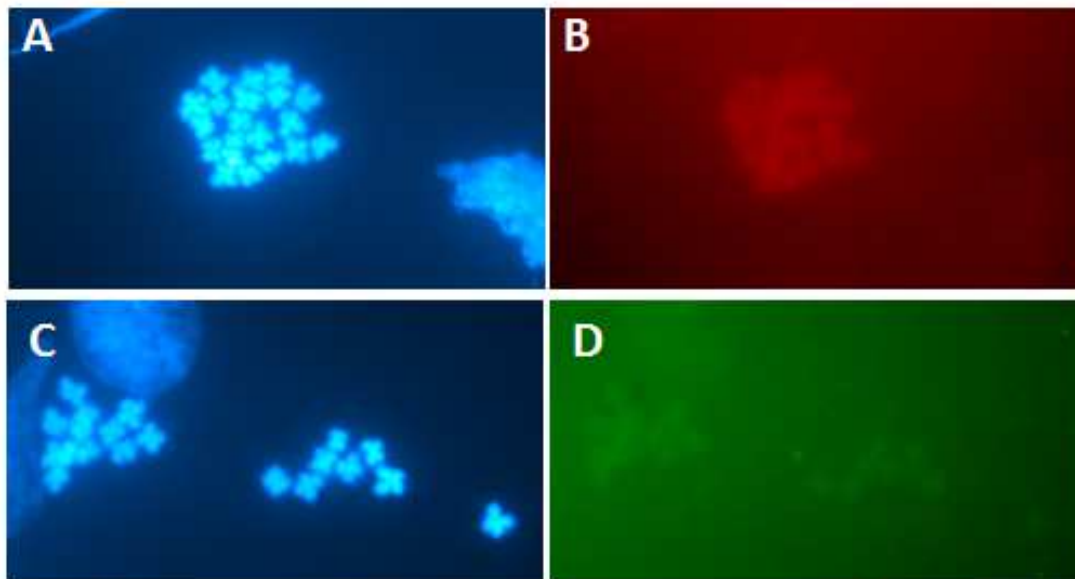


Figure 2: Hybridation fluorescente *in situ* des sondes ARNr 45S (A et B) et ARN codant l'histone H3 (C et D) chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. L'ADN est relevé en DAPI (A et C), la sonde ARNr 45S en Rhodamine (B) et l'ARNm de H3 en Fluorescéine (D) (Grossissement total x 1000).

Session 4 : Projets inter-équipes / inter-sites

MARMEET / Méthylation de l'ARN chez les Mollusques et développement

Axe transversal/ Atelier méthodologique de BOREA

- Génomique fonctionnelle (coord : G. Rivière/P. J. Lopez)

Projet Inter-sites Paris/Caen

Co-responsable 1 : Guillaume Rivière, Eq2 Caen, guillaume.riviere@unicaen.fr

Co-responsable 2 : Sébastien Baratte, Eq2 Paris, sebastien.baratte@mnhn.fr

Autres participants : Louise Chevet (étudiante M1) Caen, Aude Andouche, Eq2 Paris

Mots Clés : ARN, méthylation, mollusques, développement, evo/devo

Situation du projet :

- Nouveau projet (2017)

Objectifs du projet :

Les modifications épigénétiques jouent un rôle crucial dans le développement chez de nombreuses espèces réparties largement dans la phylogénèse, notamment via l'intégration physiologique de paramètres environnementaux *lato sensu* au niveau de l'expression des gènes. Cependant, des différences dans leurs modalités et leur régulation attestent de nombreuses spécialisations évolutives. Ainsi, de nombreuses études ont démontré que la méthylation de l'ADN exerce une fonction fondamentale dans la régulation prétranscriptionnelle et transcriptionnelle au cours du développement. Cette situation est retrouvée chez les Deutérostomiens comme chez les Protostomiens, bien que les niveaux de méthylation soient extrêmement variables entre les groupes et entre différents stades et/ou organes au sein d'un même groupe.

Par ailleurs, la méthylation est couramment présente dans l'ARN messager (méthylation des adénines de l'ARN, m⁶A-ARN) (3 à 5 m⁶A par ARNm chez les mammifères) ⁽¹ et revue dans ²). Cette marque longtemps négligée apparaît pourtant importante pour la régulation de l'expression des gènes, puisqu'elle influence entre autres l'épissage ³, le processing des miRNA ⁴, l'export et la stabilité des ARNm ⁵ ainsi que la traduction ⁶. Ces fonctions sont cruciales notamment pour la différenciation des cellules souches ^{7,8} mais également pour la réponse au stress ⁹. L'accumulation dans l'oocyte d'ARNm maternels impliqués dans le développement précoce pose la question de la présence, de la dynamique et du rôle de la méthylation des adénosines de l'ARN au cours de l'évolution des métazoaires. Cependant, l'existence d'une telle modification reste à ce jour méconnue en dehors de la levure, de quelques modèles ecdysozoaires (drosophile, nématode) et des mammifères.

L'objectif de ce projet est d'explorer la présence et d'envisager la fonction de la méthylation de l'ARN, inconnues à ce jour chez les Lophotrochozoaires. Deux mollusques d'intérêt économique dont les phases développementales sont différentes et complémentaires au niveau fondamental et chez qui de nombreuses données génomiques et transcriptomiques sont disponibles seront étudiés dans une approche comparative : un bivalve, l'huître creuse *C. gigas*, et un céphalopode, la seiche *S. officinalis*. La caractérisation de la présence de m⁶A-ARN et de sa dynamique *in vitro* (**extraction d'ARNm, RNA Fluorescent Dot Blot**) et potentiellement *in situ*

(immunocytochimie) seront envisagés dans divers contextes physiologiques (oocytes-développement - tissus adultes) chez l'huître et la seiche. L'identification (*études in silico*) et la caractérisation du profil d'expression (**RT-qPCR**) des orthologues des enzymes de la régulation de la méthylation de l'ARN seront également réalisées. Ce projet innovant (la présence d'ARN méthylé n'a à ce jour jamais été démontrées chez les Mollusques à notre connaissance) s'inscrit en complémentarité entre les sites de l'UMR au niveau des modèles (Caen-huître/Paris-seiche). Ces travaux constituent les premières étapes vers un travail plus approfondi de caractérisation des gènes dont les ARNm sont méthylés, par approches ciblées (MeRIP-qPCR) et globales (MeRIP-seq). A terme, ces travaux permettront de mieux comprendre le rôle de la méthylation de l'ARN au cours de l'évolution.

Retombées principales attendues du projet à un an :

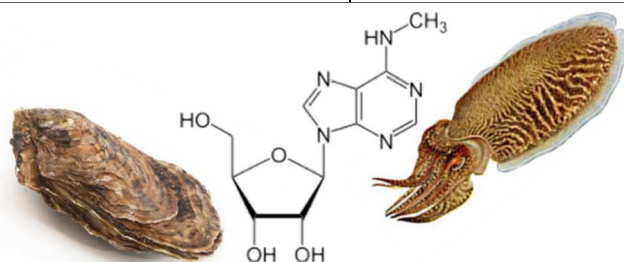
- Caractérisation de la présence de m6A-ARNm chez deux mollusques
- Caractérisation de la dynamique éventuelle de m6A-ARNm chez l'huître et la seiche dans divers contextes
- Caractérisation du profil d'expression des orthologues putatifs de la machinerie de méthylation de l'ARN chez deux mollusques

Planning du projet (nouveau projet)

Jan-Mar 2017	Avr-Juin 2017	Juil-Sept 2017	Oct-Dec 2017
Etudes <i>in-silico</i>			
	RT-qPCR		
	F-Dot-Blots		
			Restitution

Budget :

	Coût approximatif (euros)
Kits extraction ARN polyA	250
RT-qPCR	250
Anticorps anti-m6A	450
Matériel biologique (géniteurs huître)	450
DotBlot (inclus utilisation scanner proXpress)	100
TOTAL	1 500



Références

1. Desrosiers, R., Friderici, K. & Rottman, F. Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**, 3971–5 (1974).
2. Gilbert, W. V, Bell, T. A. & Schaening, C. Messenger RNA modifications: Form, distribution, and function. *Science* **352**, 1408–12 (2016).
3. Dominissini, D. *et al.* Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes

- revealed by m6A-seq. *Nature* **485**, 201–206 (2012).
4. Alarcón, C. R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N. & Tavazoie, S. F. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature* **519**, 482–5 (2015).
 5. Wang, X. *et al.* N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature* **505**, 117–20 (2014).
 6. Wang, X. *et al.* N⁶-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell* **161**, 1388–1399 (2015).
 7. Batista, P. J. *et al.* M⁶A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **15**, 707–719 (2014).
 8. Mansour, A. A. *et al.* m6A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science* (80-.). **347**, 1002–1006 (2015).
 9. Zhou, J. *et al.* Dynamic m(6)A mRNA methylation directs translational control of heat shock response. *Nature* **526**, 591–594 (2015).