

Sujet de thèse: Métabolisme des lipides membranaires et modulation homéo-visqueuse en fonction de la pression hydrostatique, chez les crevettes profondes et littorales.

Directeur de thèse:
SHILLITO

bruce.shillito@upmc.fr

Co-directeur(s) titulaire(s) HDR:

Co-directeur(s) non-titulaire(s) HDR:

LAMAZIERE

Equipe:

Adaptations aux Milieux EXtrêmes (AMEX, équipe 3). Equipe composée de 3 enseignants-chercheurs, 1 ingénieur en mécanique, 1 technicienne en biologie moléculaire.

Publications récentes des directeurs de thèse avec leurs anciens doctorants:

- Cottin D., Brown A., Oliphant A., Mestre N., Ravaux J., Shillito B., Thatje S. (2012) Sustained hydrostatic pressure tolerance of the shallow water shrimp *Palaemonetes varians* at different temperatures: Insights into the colonisation of the deep sea. *Comp. Bioch. Physiol.*, A, 162, 357-363doi:10.1016/j.cbpa.2012.04.005
- Cottin D., Shillito B., Chertemps T., Thatje S., Léger N., Ravaux J. (2010) Comparison of heat-shock responses between the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* and the related coastal shrimp *Palaemonetes varians*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 393, 9-16.
- Cottin D., Ravaux J., Léger N., Halary S., Toullec J.Y., Sarradin P.M., Gaill F., Shillito B. (2008) Thermal biology of the deep-sea vent annelid *Paralvinella grasslei*: in vivo studies. *J. Exp. Biol.*, 211, 2196-2204.

Descriptif du sujet de thèse et méthodes envisagées:

Les membranes biologiques sont des assemblages complexes de lipides, de protéines et de polysaccharides. Elles peuvent être définies d'un point de vue biophysique par un certain nombre de propriétés mécaniques et notamment la fluidité membranaire, un élément crucial pour le fonctionnement cellulaire. Le comportement dynamique des membranes dépend directement de variables environnementales telles que la température et la pression, mais également de leur composition moléculaire, en particulier la composition en lipides (1, 2). La théorie homéo-visqueuse propose que chaque organisme ajuste la composition moléculaire de ses membranes, en fonction des paramètres environnementaux, afin de maintenir une fluidité "universelle" garante de leur bon fonctionnement (3). Ainsi on observe chez les ectothermes des milieux froids une augmentation des proportions de chaînes insaturées dans les phospholipides, pour compenser la rigidification des membranes par le froid (4).

Si ce phénomène d'adaptation ou d'acclimatation homéo-visqueuse est relativement bien établi en fonction de la température (5), il n'en va pas de même pour la pression hydrostatique. En milieu marin, certains organismes effectuent des migrations bathymétriques très importantes au cours de leur cycle de vie (6), et des corrélations ont été suggérées entre composition des membranes et profondeur d'habitat (et donc pression : 7). Pour autant, la nature des ajustements effectués (composition lipidique), ainsi que leur dynamique temporelle (adaptation, acclimatation), enfin les mécanismes de cette régulation (enzymes impliquées) demeurent encore largement méconnus (8). Ceci s'explique en partie par le peu de données expérimentales obtenues, sur des organismes difficiles à maintenir vivants en laboratoire.

Le projet a pour but d'explorer la réponse moléculaire (lipides, protéines) impliquée dans l'acclimatation d'invertébrés marins, à la suite d'un changement de pression hydrostatique, et ce pour la première fois en milieu contrôlé. Il s'appuiera sur l'étude de la crevette hydrothermale *Mirocaris fortunata* (Dorsale médio-Atlantique), présente à des profondeurs variant de 800 m à plus de 3600 m. Fait remarquable, cet organisme s'acclimate bien en captivité, et est maintenu à l'aquarium public d'Océanopolis depuis plusieurs années déjà, soit à pression naturelle (1700 m de profondeur simulée), soit à pression atmosphérique, dans le cadre d'une collaboration avec notre laboratoire (9). Il s'agit là d'une occasion unique de disposer d'organismes profonds vivants, dans les conditions contrôlées d'un laboratoire. Un travail expérimental a récemment été initié sur ces crevettes, sous forme d'incubations prolongées (4 mois) à différentes pressions. Par la suite, des profils d'espèces moléculaires de lipides (lipidomes) ont été obtenus par des approches de spectrométrie de masse (plateforme du site UPMC/CHU Saint Antoine). Les lipidomes des 2 groupes expérimentaux de crevettes montrent des signatures caractéristiques et significativement différentes (modèles statistiques multivariés). Cette "réponse lipidique", associée à la capacité manifeste d'acclimatation de *Mirocaris* à des pressions variables, ouvre de nombreuses perspectives dans le cadre d'un sujet de thèse.

Les méthodes envisagées sont les suivantes :

- 1 - Expérimentation in vivo : caractérisation des capacités d'acclimatation de *Mirocaris fortunata* à différentes combinaisons de pression et température. Etudes de mortalité, comportement, cinétique d'acclimatation.
- 2 - Analyses lipidomiques : détermination des lipidomes en fonction des différentes conditions d'acclimatation, par les approches de spectrométrie de masse précédemment citées.
- 3 - Analyses transcriptomiques (différentielles, + q-PCR) dans le but d'établir des relations phénotype/génotype, en quantifiant l'expression des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse des lipides (élongases, désaturases, réductases) (plateforme de q-PCR, IBPS, campus UPMC).

A terme, une approche pharmacologique est envisagée, en inhibant spécifiquement des voies du métabolisme des lipides à l'aide de drogues (inhibiteurs enzymatiques), afin d'observer les réponses phénotypiques en fonction des conditions expérimentales. Enfin, le spectre d'investigation offert par l'approche transcriptomique permettra aussi d'explorer plus largement (hors réponse homéo-visqueuse) les mécanismes de régulation liés au phénomène d'acclimatation à la pression hydrostatique.

- 1 - Winter, Dzwolak (2005) *Phil Trans R Soc A* 363, 537
- 2 - Brooks (2014) *Int Union Crystall J*, 1, 470
- 3 - Hazel (1995) *Ann Rev Physiol*, 57, 19
- 4 - Logue et al (2000) *J Exp Biol* 203, 2105
- 5 - Guschina, Harwood (2006) *FEBS Letters* 580, 5477
- 6 - Clarke, Tyler (2008) *Curr Biol* 18, 282
- 7 - McDonald (1997) *Comp Biochem Physiol Vol* 116A, No. 4, 291
- 8 - Pond et al (2014) *PLoS ONE* 9(10): e111043. doi:10.1371/journal.pone.0111043
- 9 - Shillito et al (2015) *Deep-Sea Res Part II*, 121, 137

Stratégie de publication:

Les incubations déjà réalisées avec la crevette profonde *Mirocaris* ont apporté des résultats prometteurs, qui pourraient être publiés assez rapidement, et qui permettront en tout cas d'affiner une stratégie expérimentale pour démarrer la thèse. Nous envisageons que le(la) doctorant(e) s'attelle à la rédaction d'une première publication à la fin de la première année.

Globalement, deux étapes de publication sont envisagées : d'abord caractériser la capacités d'acclimatation des organismes étudiés (pressions, températures, comportements, cinétique des mortalités, ..), tout en analysant les lipidomes correspondant aux différentes conditions d'acclimatation. Ensuite, explorer les mécanismes de régulation du métabolisme des lipides, en mesurant les variations d'expression d'enzymes clés dans la synthèse des lipides membranaires.

Réorientation possible du sujet si échecs:

Malgré un contexte favorable (voir rubrique disponibilité du matériel), une difficulté majeure pouvant survenir dans ce projet tiendrait à une difficulté d'approvisionnement en crevettes hydrothermales (aléas météorologiques lors des missions, problèmes de transport, ..). C'est pour pallier cette éventuelle difficulté que nous proposons d'étudier en parallèle une autre espèce de crevette, côtière celle-là (*Palameonetes varians*, littoral européen). Grâce à nos précédents travaux en aquarium pressurisé, nous avons pu montrer que cet organisme survit au moins une semaine à 1000 m de profondeur simulée (10), ce qui suggère une grande capacité d'acclimatation à la profondeur.

10 - Cottin et al (2012) *Comp Biochem Physiol A*, 162, 357

Faisabilité sur 3 ans (échancier):

Première année : expérimentation *in vivo*, analyses lipidomiques. L'analyse des données disponibles permettra de réaliser des expérimentations *in vivo* à Océanopolis, et dans nos locaux, sous différents régimes de pression. Ce travail sera suivi de l'analyse détaillée des données lipidomiques obtenues.

Deuxième année : analyses transcriptomiques. Les lipidomes associés à des transcriptomes obtenus sur les mêmes lots d'animaux nous orienteront dans la recherche d'enzymes clés du métabolisme des lipides, possiblement impliquées dans la réponse homéo-visqueuse. Des séquences spécifiques seront alors recherchées, en vue de pouvoir quantifier le degré d'expression de ces enzymes en fonction des conditions expérimentales.

Troisième année : analyses des résultats et synthèse des travaux, en vue de la rédaction du manuscrit de thèse.

Profil du candidat recherché:

Bonnes connaissances en Biochimie et métabolisme des lipides. Bonne connaissance des approches statistiques multi-variées.