

**Sujet de thèse:** Echanges trophiques dans l'holobionte Démospone photosymbiotique.

**Directeur de thèse:**

Isabelle Domart-Coulon (MC MNHN)

isabelle.domart-coulon@mnhn.fr

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

Marie-Lise Bourguet-Kondracki (UMR 7245 MCAM, DR CNRS)

Alain Paris (UMR7245 MCAM, Pr MNHN)

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

Cédric Hubas (UMR7208 BOREA, MC MNHN)

**Equipe:**

Equipe Molécules de Défense et de Communication dans les Ecosystèmes Microbiens (MDCEM)

**Publications récentes des directeurs de thèse avec leurs anciens doctorants:**

A Lecointe, I Domart-Coulon, A Paris, A Meibom. Cell proliferation and migration during early development of a symbiotic scleractinian coral. 2016. Proc Roy Soc B: Biol Sci 283: 20160206

C Kopp, I Domart-Coulon, D Barthélémy, A Meibom. 2016. Nutritional input from symbionts in reef-building corals is minimal during planula larval life stage. Science Advances 25.03.2016 Vol. 2, no. 3, e1500681

C Kopp, I Domart-Coulon, ... M Hignette, A Meibom. 2015. Subcellular investigation of photosynthesis-driven carbon and nitrogen assimilation and utilization in the symbiotic reef coral *Pocillopora damicornis*. mBio Vol. 6 no. 1 e02299-14.

C Bauvais, S Zirah, L Piette, F Chaspoul, I Domart-Coulon, ..., ML Bourguet-Kondracki. 2015. Sponging up metals: Bacteria associated with the marine sponge *Spongia officinalis*. Mar Environ Res 104: 20-30

**Descriptif du sujet de thèse et méthodes envisagées:**

Les endosymbioses bactériennes à partenaires multiples sont caractéristiques de nombreuses Démospones, notamment parmi les Haplosclérides marines. Si les analyses taxonomiques de la diversité des microbiomes associés sont en plein essor, le fonctionnement de ces holobiontes reste un domaine sous-exploré, en particulier en ce qui concerne le rôle potentiel de leurs cyanobactéries symbiotiques dans l'assimilation photosynthétique du carbone et son transfert à l'hôte animal. Il a été récemment établi que les éponges ont un rôle important dans le recyclage de la matière organique dissoute des écosystèmes récifaux oligotrophiques, mais leur rôle dans la fixation directe du carbone inorganique reste à éclaircir. Les interactions trophiques dans l'holobionte sont difficiles à établir par les méthodes traditionnelles de fractionnement et d'analyse chimique qui sont limitées par la biomasse disponible et les contaminations possibles entre types cellulaires.

De nouvelles approches analytiques à haute résolution seront utilisées pour étudier dans la symbiose intacte les flux trophiques et métaboliques entre partenaires. Des expériences de pulse-chasse en aquarium avec marqueurs isotopiques ( $^{13}\text{C}$ -bicarbonate et  $^{15}\text{N}$ -nitrate ou  $^{15}\text{N}$ -ammonium) seront menées sur l'éponge *Haliclona* sp. (élevée à l'Aquarium tropical de la Porte Dorée, Paris, et Oceanopolis Brest). Les paramètres de lumière seront caractérisés (intensité et qualité spectrale) et l'activité photosynthétique (rendement quantique et taux de transport d'électron dans le photosystème II des symbiontes) pourra être mesurée in situ par des méthodes non invasives de télédétection (fluorimétrie PAM, imagerie de fluorescence PAM et/ou réflectance spectrale). L'enrichissement des tissus en isotopes  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  sera analysé pour le C et N total et les acides gras, par spectrométrie de masse (MS) isotopique (GC-IRMS) (analyses dites « en bulk »). L'observation parallèle des tissus en microscopie électronique à transmission puis en spectrométrie de masse d'ions secondaires (NanoSIMS) permettra de cartographier l'enrichissement isotopique des compartiments subcellulaires.

Il sera ainsi possible de visualiser et de quantifier in situ les échanges entre partenaires symbiotiques. Complétées par l'établissement des profils correspondants de pigments et des empreintes produites par MS et résonance magnétique nucléaire (RMN) à haute résolution, l'approche métabolomique permettra de coupler par analyse statistique multivariée les biomarqueurs putatifs spécifiques de chaque type d'empreintes pour préciser la structure chimique des biomarqueurs et les réinscrire dans les voies métaboliques connues ou originales (méthode de traçage de voies par approche isotopique).

Ces méthodes de chimie analytique pourront ainsi être utilisées pour identifier les principaux métabolites discriminants impliqués dans ces échanges phototrophiques.

Nos résultats préliminaires sur l'éponge *Haliclona* sp. cryptique d'aquarium tropical ont permis de former une équipe multidisciplinaire et complémentaire d'encadrants experts dans ces différents domaines et de mettre au point les protocoles nécessaires à la mise en œuvre de ces différentes approches. Ces résultats montrent la diversité des morphotypes cyanobactériens et bactériens dans les bactériocytes de l'éponge ainsi que la diversité de ses pigments, dont la composition est sensible à un gradient de lumière. Le  $^{13}\text{C}$ -bicarbonate est assimilé par les cyanobactéries (dès 6h de pulse à la lumière), ouvrant la voie à l'étude de la translocation et l'utilisation de ces photosynthétats par les autres bactéries et l'hôte, pour la production de métabolites primaires, et, possiblement, de petites molécules de communication et de défense chimique.

**Stratégie de publication:**

Publication n°1 : Caractérisation intégrative (taxonomique, cytologique, microbiologique, pigmentaire et métabolique) des différents morphes de couleur d'une *Haliclona* sp. cryptique d'aquarium tropical.

Publication n°2 : Investigations à l'échelle de l'organisme *Haliclona* sp. et de ses compartiments subcellulaires de l'assimilation de  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  inorganique et des flux de métabolites dans la symbiose photosynthétique.

Publication n°3 : Réponse de la photosymbiose aux variations d'intensité et de qualité lumineuse influençant l'efficacité de la photosynthèse et le métabolisme de l'hôte.

**Réorientation possible du sujet si échecs:**

L'accès à des spécimens élevés en aquarium permet d'expérimenter en conditions contrôlées. Ce matériel *Haliclona* sp. assimile le  $^{13}\text{C}$ -bicarbonate qui marque ses cyanobactéries dès 6h d'incubation à la lumière. Cependant les sources et concentrations de  $^{15}\text{N}$  inorganique nécessaires pour marquer les cyanobactéries sont à tester avec des doses-réponses comparant  $^{15}\text{N}$  nitrate et  $^{15}\text{N}$  ammonium (analyses isotopiques « en bulk »). La durée du pulse, et de la chasse en eau de mer non marquée, seront ajustés de la même manière, afin d'optimiser la série temporelle de prélèvements à réaliser pour la microscopie et la chimie.

Si les biomasses sont trop faibles pour l'isolement des métabolites discriminants, les bases de données existantes pour les analytes des principales voies métaboliques permettront de proposer des hypothèses de classification.

**Faisabilité sur 3 ans (échancier):**

Année 1 : Caractérisation de l'holobionte 1) barre-code moléculaire de l'hôte 2) profil pigmentaire et métabolique (RMN et LC-MS) de réplicats supplémentaires 3) caractérisation des cyanobactéries (morphotypes et metabarcodes r16S bactérien). 4) extension des analyses statistiques multivariées des jeux de données (publication n°1)

Années 2 et 3: Marquages isotopiques des cyanobactéries de *Haliclona* sp, quantification et visualisation (en bulk et à la NanoSIMS) du devenir des photosynthétats dans l'holobionte. Détermination par GC-IRMS des acides gras et par LC-MS (HR) des analytes marqués isotopiquement, tentatives d'isolement et de caractérisation structurale (publication n°2)

Année 3 : Variations expérimentales de lumière et analyse de la photosynthèse (pigments, imagerie PAM) et des empreintes métaboliques de l'holobionte (publi n°3)

**Profil du candidat recherché:**

Biologiste - Microscopiste, avec formation en chimie analytique (méthodes d'extraction et purification de pigments, d'acides gras, et de petites molécules à spectre de polarité large). Goût pour les statistiques. Aptitude aux expérimentations en aquarium.