Proposition d’un sujet de thèse : Etude des interactions bactéries / coelomocytes chez le concombre breton, *Holothuria forskali*.

Acronyme « CoeloPro », **Coelo**mocytes et **Pro**biotiques bactériens

Encadrement F. Gaillard (IR-CNRS) & P. Le Chevalier (MCF-UBO)

**-Contexte scientifique du projet :**

La consécration de la théorie de l’hologénome s’explique pour partie par les progrès fulgurants réalisés dans le domaine du séquençage haut débit de l’ADN (Baird and Hajibabaei, 2012) et de méta barcoding qui ont permis la confirmation des relations étroites existant entre microbiote et hôte, appelé l’holobionte (Simon et al., 2019). Le rôle de ce microbiote reste obscur, les données bibliographiques suggèrent une fonction de bouclier microbien et une implication dans la défense de l’hôte. La bibliographie fait également état de différences de composition entre le microbiote de l’hôte et les communautés bactériennes de l’environnement (Antunes et al., 2010) suggérant une sélection par l’hôte du microbiote.

Les premières études ont été menées chez les Cnidaires, animaux diploblastiques (Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2018) , et cette théorie n’a été que rarement explorée chez les animaux marins triploblastiques, cas des échinodermes.

Au cours de nos travaux de recherche consacrés à l’étude du microbiote chez les échinodermes et notamment l’holothurie noire, *Hothuria forskali,* nous avons non seulement mis en évidence l’existence d’un microbiote cultivable conséquent dans le liquide coelomique (≈105 UFC.mL-1) mais également montré que le microbiote cœlomique de cet organisme présente une proportion importante (11%) de bactéries à potentiel antibactérien (thèse UBO-LUBEM de C. Offret, Oct 2013-sept 2016, « Exploration du Microbiote des Invertébrés Marins », (Offret et al., 2019).

Plus récemment, Le LBCM a participé au projet HoloFarm (Financement FEAMP -mesure 47 – 2018/2021) regroupant 4 laboratoires académiques, une entreprise privée et un centre technologique et ayant pour objet la mise au point des protocoles d’élevage de l’holothurie, et notamment de l’espèce locale, l’holothurie noire, *Holothuria forskali.* Dans ce cadre, le LBCM a parallèlement dirigé des travaux de thèse selon deux axes, le premier concernant l’inventaire du microbiote bactérien dans différents compartiments du concombre de mer, *H. forskali*, et le second traitant de l’établissement d’une collection d’isolats bactériens possédant des activités anti-microbiennes (thèse UBO-LBCM de H. Laguerre, déc 2018-déc 2021, «  Microbiote des Echinodermes : Spécificité et plasticité des microbiotes chez *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea) » (Laguerre et al., 2020). Ainsi, trois souches bactériennes ont suscité un intérêt tout particulier non seulement en raison de leurs propriétés antimicrobiennes mais également par leurs affiliations taxonomiques, genre *Bacillus* et *Pseudoalteromonas*. En effet, le LBCM mène des travaux de recherche sur des bactéries de même genre mais d’espèces différentes dans le cadre des projets Pacman et Sea to Sea.

Nous proposons à travers le projet « CoeloPro » d’accéder à des données essentielles concernant

* Le dialogue entre coelomocytes et bactéries, la dynamique du microbiote et du système immunitaire de l’holobionte
* L’exploration des trois souches bactériennes en tant que possibles probiotiques et l’évaluation du potentiel bioprotecteur de ces organismes dans des structures aquacoles.

**Plan de travail de la thèse**

Le projet de thèse est structuré en trois parties

**I Caractérisation génomique et métabolique des trois souches, des candidats probiotiques**

* la caractérisation génomique des trois souches étudiées

*Séquençage, annotation et exploration du génome* (génomes déjà partiellement séquencés en collaboration avec l’Institut Pasteur (O Chesneau & D Clermont)).

* la caractérisation structurale des métabolites bioactifs anti-microbiens (antibactériens voire algicides)

*Purification bio-guidée et caractérisation des composés bioactifs*

* la caractérisation fonctionnelle des composés bioactifs

*Spectre d’activité et mécanismes d’action algicide et antibactérien des composés bioactifs purs*

**II Exposition des coelomocytes à des bactéries, *in vitro***

* Différents tests biochimiques et enzymatiques ainsi que des analyses en microscopie seront mis en œuvre afin de déterminer la réponse au stress des cellules immunitaires (coelomocytes) de l’holothurie noire, *H. forskali* en contact avec des bactéries auto/allochtones.
  + Descriptions et caractérisations des différentes populations de coelomocytes seront réalisées par des colorations cytologiques, de la microscopie électronique à balayage/ transmission ainsi que de la cytométrie en flux.
  + Des analyses de détermination de métabolites secondaires seront conduites avec le laboratoire irlandais, « Marine Biodiscovery Laboratory », du Pr Olivier Thomas, NUI Galway.
  + Au laboratoire de Biologie des Organismes Marins et Biomimétisme de l’université belge à Mons, Pr Igor Eeckhaut, des essais de tri des types de cellules immunitaires (coelomocytes) seront réalisés par cytométrie en flux. Des cultures cellulaires seront ensuite expérimentées sous différentes conditions. Des analyses en microscopies à balayage et en transmission seront réalisées afin d’évaluer morphologie et contenus cellulaires en présence et absence de bactéries.
  + Au laboratoire BOMB, des analyses de transcriptomique viendront compléter les données précédentes

**III Détermination du statut immunitaire de l’holothurie lors de challenges bactériens avec les candidats probiotiques / applications biotechnologiques des 3 souches en aquaculture**

* ***In Vivo,*** des expérimentation*s* de challenges bactériens seront entreprises avec les 3 souches étudiées
  + L’un des objectifs de cette 3ème partie du projet de thèse vise à mettre au point une « formule coelomocytaire » afin d’évaluer le statut immunitaire des holothuries
  + L’innocuité ou la pathogénicité de souches bactériennes d’intérêt seront évaluées

Ce sujet de thèse implique trois laboratoires : BOMB-Belgique, IP-France et MBL-Irlande – pour leurs appuis technique et financier. Cette synergie des différents laboratoires permettra de mener à terme le projet « CoeloPro».

**Contacts : Laboratoire/institut…**

Le projet « CeoloPro» s’inscrit dans la continuité des précédents travaux de recherche réalisés au laboratoire ayant comme modèle biologique l’holothurie, *H. forskali*.

Le projet s’appuie sur un réseau de collaborations avérées apportant les compétences nécessaires :

- En bactériologie-bio-informatique, collaboration Institut Pasteur

- En zootechnie : collaboration MNHN de Concarneau, stabulation des holothuries en mésocosmes

- En analyse transcriptomique : BOMB, Belgique

- En analyse métabolomique, MBL, Irlande

***Bibliographie***

Antunes, F., Hinzmann, M., Lopes-Lima, M., Machado, J., Martins da Costa, P., 2010. Association between environmental microbiota and indigenous bacteria found in hemolymph, extrapallial fluid and mucus of Anodonta cygnea (Linnaeus, 1758). Microb Ecol 60, 304–309. https://doi.org/10.1007/s00248-010-9649-y

Baird, D., Hajibabaei, M., 2012. Biomonitoring 2.0: a new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing. Molecular Ecology 21, 209–2044.

Laguerre, H., Jégou, C., Raymond, G., Xavier, B., Améziane, N., Fleury, Y., Chevalier, P., 2020. The Black Sea Cucumber Holothuria forskali: a new species for Aquaculture in Europe.

Offret, C., Jégou, C., Mounier, J., Fleury, Y., Le Chevalier, P., 2019. New insights into the haemo- and coelo-microbiota with antimicrobial activities from Echinodermata and Mollusca. J Appl Microbiol 126, 1023–1031. https://doi.org/10.1111/jam.14184

Rosenberg, E., Zilber-Rosenberg, I., 2018. The hologenome concept of evolution after 10 years. Microbiome 6, 78. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0457-9

Simon, J.-C., Marchesi, J.R., Mougel, C., Selosse, M.-A., 2019. Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. Microbiome 7, 5. https://doi.org/10.1186/s40168-019-0619-4