

Effet du changement climatique sur le mucus des anguilles : conséquences sur la conservation d'une espèce en danger.

Directeur : Nathalie Tapissier (CRIOBE)
Co-encadrante : Elisabeth Faliex (CEFREM)

Contexte et problématique : La peau des poissons n'est pas kératinisée et est exclusivement composée de cellules vivantes. Par conséquent, celle-ci est directement et continuellement exposée à l'eau, et constitue donc une frontière importante de défense contre les attaques provenant de l'environnement direct des poissons. La peau des poissons est recouverte de mucus qui est sécrété par des cellules de l'épiderme et contient de nombreuses molécules de défense telles que immunoglobulines, cytokines, protéines du complément, lysozyme, protéases et peptides antimicrobiens (Salinas, 2015 ; Reverter et al. 2017), qui lui confèrent son importance. Ce mucus est une couche dynamique qui joue un rôle majeur dans des fonctions physiologiques telles que l'osmorégulation, la protection contre les infections mais aussi dans la communication inter et intra spécifique. Il paraît donc évident que des modifications de cette surface, liées à des changements de l'environnement (changements globaux, infections parasitaires, pollutions chimiques,...) peuvent avoir des conséquences majeures sur la survie des espèces (figure 1).

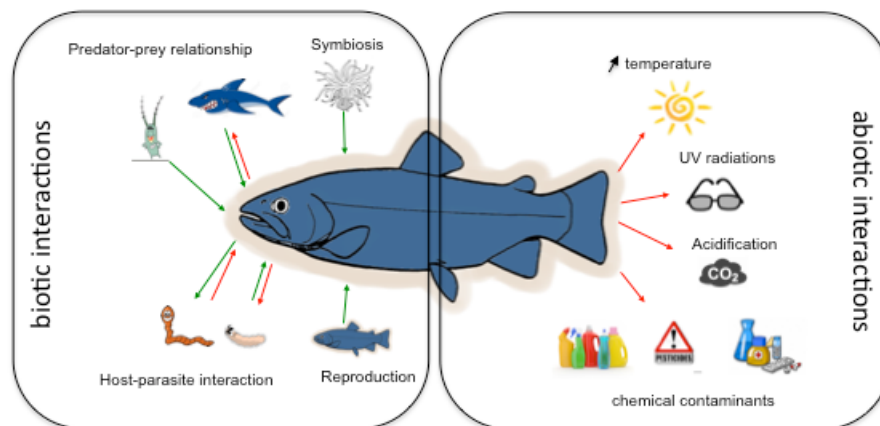


Figure 1 : rôle du mucus dans les relations poisson/environnement

Les anguilles sont des poissons amphidromes connus pour avoir un mucus abondant mais à ce jour, peu d'études ont été menées sur les capacités d'adaptation des anguilles via la composition de leur mucus. Des études relativement récentes montrent la présence de lectines (Tasumi, et al. 2004 et 2016) qui sont exprimées de manière différentielle chez les espèces tropicales et tempérées (Tsutsui et al, 2015 et 2016). Celles-ci sont généralement connues, entre autres, pour leurs effets liés à l'immunité innée et leur activité antimicrobienne. Aussi des modifications de l'environnement du

poisson pourraient avoir des conséquences sur leur expression et par conséquent sur les capacités qu'auront les individus à se protéger des agressions du milieu. Par ailleurs, des peptides antimicrobiens ont été mis en évidence chez l'anguille Japonaise (Liang et al, 2011, Zhang et al, 2013, Cho et al 2002) révélant un intérêt particulier pour le mucus d'anguille et son rôle dans la défense du poisson contre les agents pathogènes.

Objectifs : Le réchauffement climatique constitue un des facteurs prépondérants du changement global. Nous proposons au cours de cette thèse d'étudier l'interrelation entre ce facteur : la hausse de température, et les contaminants biotiques (parasites, et agents pathogènes), sur la composition du mucus de deux espèces d'anguilles : une espèce de climat tempéré (l'anguille européenne, *Anguilla anguilla*), en danger d'extinction (inscrite sur la liste rouge mondiale de l'UICN, 2014), et une espèce de climat tropical (l'anguille obscure, *Anguilla obscura*) présente en Polynésie, dont l'inscription sur la liste rouge mondiale de l'UICN dépend d'un apport de données aujourd'hui insuffisantes. Pour cela, nous souhaitons comparer l'impact du changement climatique sur le métabolome du mucus chez ces deux espèces ainsi que l'impact de l'élévation de température sur leur sensibilité à l'infestation parasitaire. Notre hypothèse de base est que l'espèce tropicale sera plus à même de s'adapter aux changements climatiques que l'espèce de milieu tempéré.

Méthodologie : L'étude se fera en deux parties, une partie en milieu naturel et une partie en conditions expérimentales où seront modifiés les paramètres température et contaminants biologiques.

Dans un premier temps, un travail d'exploration de terrain consistera i) à collecter des anguilles dans leur milieu naturel ii) à caractériser les communautés de parasites au niveau des branchies et de la vessie et iii) à prélever du mucus branchial, épithélial et intestinal pour enregistrer leurs empreintes chimiques respectives en UHPLC/HRMS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution). Cette partie sera réalisée sur chaque site et le candidat devra partager son temps entre Perpignan et Moorea.

Dans un deuxième temps, un dispositif expérimental sera réalisé à partir de civelles exemptes de parasites élevées au laboratoire. Elles seront ensuite introduites dans des aquariums thermostatés à différentes températures (jusqu'à +4°C par rapport à leur température environnementale naturelle, conformément aux prévisions du GIEC). Après un temps d'acclimatation, des prélèvements de mucus seront effectués pour évaluer l'effet de la température sur le métabolome.

Les anguilles élevées dans les différents aquariums seront ensuite infestées par deux types de parasites (voir protocole expérimental figure 2) :

- *Anguillicola crassus*, endoparasite naturel de l'anguille japonaise qui, par sa virulence pour l'espèce tempérée est pressenti comme l'un des facteurs de son extinction,
- *Pseudodactylogyrus anguillae* et *P. bini*, ectoparasites branchiaux naturels de l'anguille japonaise mais qui sont également reportés chez l'espèce européenne.

Le CRIOBE dispose pour cela de structures expérimentales aussi bien en milieu tempéré, dans une animalerie sur le site de l'Université de Perpignan, qu'en milieu tropical avec la station d'écologie expérimentale de Moorea en Polynésie française. Ces expériences seront d'abord menées sur l'anguille européenne puis sur l'anguille tropicale.

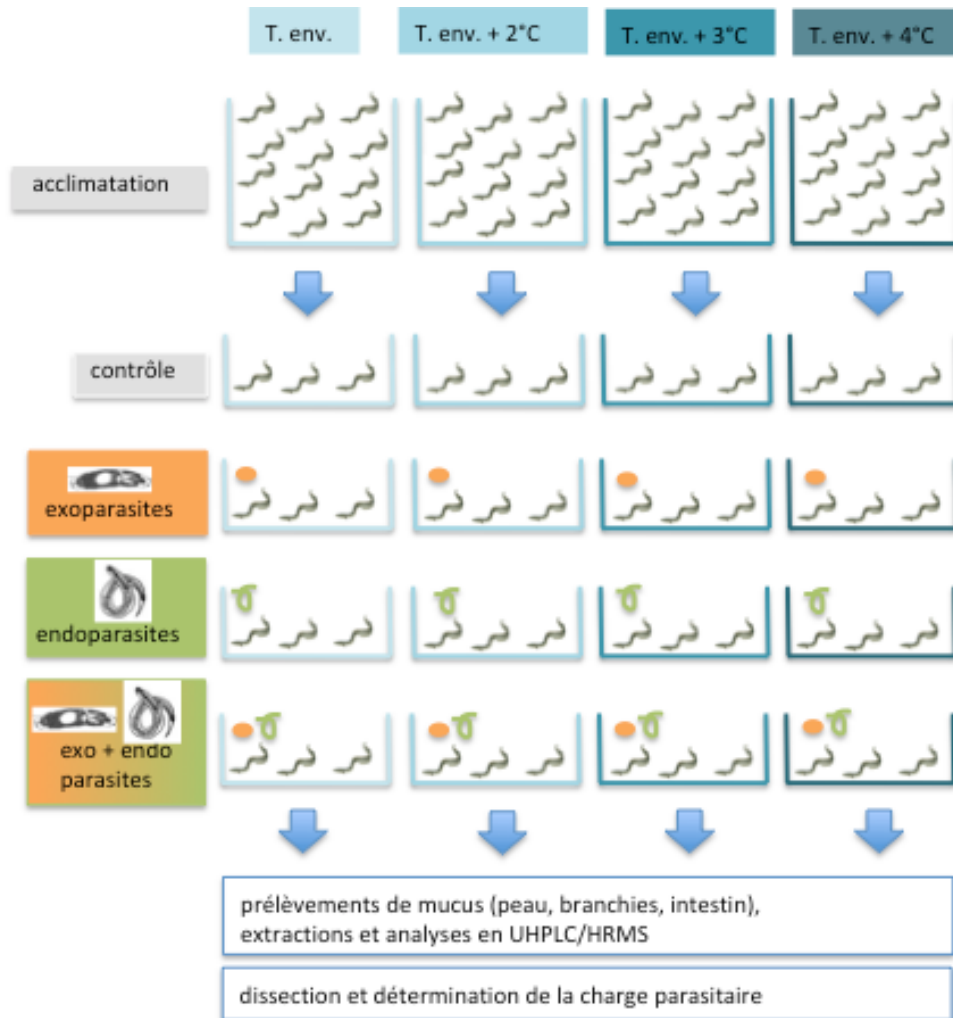


Figure 2 : schéma du protocole expérimental qui sera réalisé sur chaque espèce d'anguille.

L'état physiologique des individus soumis aux différentes conditions expérimentales sera évalué par deux techniques complémentaires :

- **le profilage métabolique du mucus de la peau, des branchies et de l'intestin.** Une approche non-ciblée permettra une vision globale des modifications métaboliques (principalement au niveau du métabolisme primaire) provoquées par ces facteurs biotiques et abiotiques. Parallèlement, une approche métabolique ciblée sur la production de molécules de défense (peptides antimicrobiens) par les poissons sera réalisée pour comprendre l'impact de l'élévation de température sur la réponse des deux espèces aux infections parasitaires (figure 3). Les prélèvements de mucus lyophilisés pour les analyses chimiques seront extraits et analysés sur la plateforme Bio2Mar du CRIOBE de Perpignan.

- **la détermination de l'état d'infestation des anguilles infestées expérimentalement.** Cet état d'infestation sera réalisé a posteriori après dissection à la loupe binoculaire des organes cibles des parasites, à savoir : la vessie gazeuse pour *A. Crassus*, la peau et les branchies pour *P. anguillae* et *P. bini*. Un dénombrement de chaque espèce de parasite sera entrepris. Ce travail permettra de valider le succès des infestations expérimentales et d'obtenir précisément le niveau d'infestation de chaque individu.

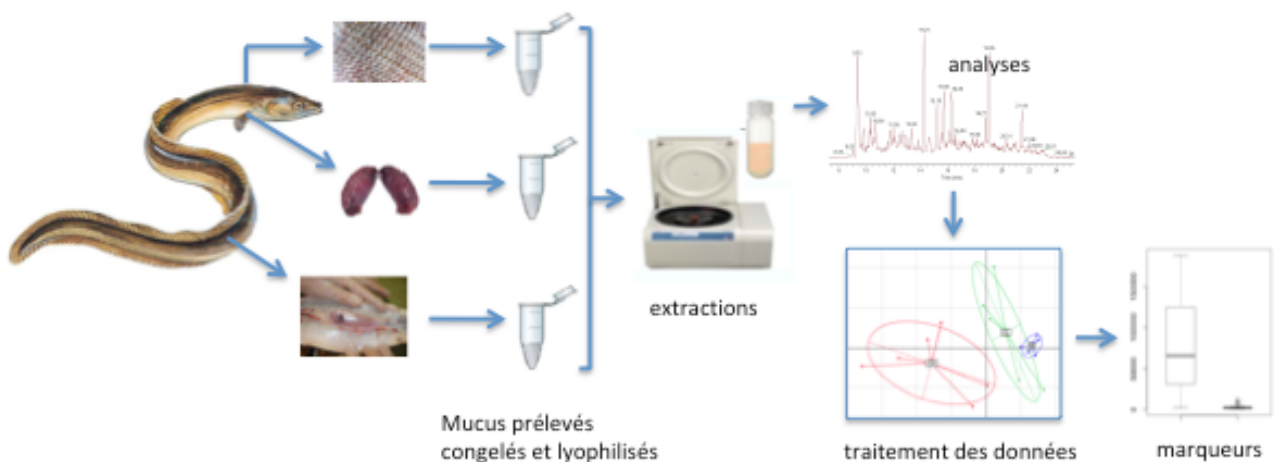


Figure 3 : schéma du « workflow » des analyses métaboliques.

La synthèse des résultats devrait i) permettre de savoir quelles sont les relations entre succès de l'infestation parasitaire et la température dans un contexte de changement climatique ii) conduire à la mise en évidence de métabolites marqueurs de l'impact de ces deux perturbations biotiques et abiotiques iii) d'évaluer l'interrelation entre ces deux facteurs iv) d'apporter des données inédites sur l'anguille tropicale nécessaires pour statuer sur son inscription sur la liste rouge mondiale de l'UICN. De plus, ces résultats devraient permettre d'établir les conséquences du changement global sur la survie des espèces et plus particulièrement dans le cas de l'anguille européenne, une espèce en danger. A une échelle plus large, notre étude permettra de comparer les conséquences du changement global sur deux espèces avec des histoires de vie différentes et d'appréhender ces conséquences sur leur distribution.

Profil et compétences recherchés :

Ce projet s'adresse à un(e) étudiant(e) ayant obtenu un diplôme de master transdisciplinaire à l'interface chimie/biologie. Il (elle) devra être capable de travailler en laboratoire mais aussi sur le terrain et être relativement mobile puisque des missions sont prévues en Polynésie française.

Expériences souhaitées :

- Aquariologie
- Anatomie et Parasitologie de poisson
- Analyses chimiques (LC/MS)
- Traitements statistiques (R)

Références bibliographiques :

- Cho JH, Park IY, Kim H.S, Lee W.T, Kim M.S, Kim S.C., Cathepsin D produces antimicrobial peptide parasin I from histone H2A in the skin mucosa of fish. *FASEB J.*, 16 (2002) 429-431.
- Ebran N, Julien S, Orange N, Saglio P, Lemaître C, Molle G. Pore-forming properties and antibacterial activity of proteins extracted from epidermal mucus of fish. *Comp. Biochem. Physiol. A.*, 122(1999), 181-189.
- Ebran N, Julien S, Orange N, Auperin B, Molle G; Isolation and characterization of novel glycoproteins from fish epidermal mucus: correlation between their pore-forming properties and their antibacterial activities. *Biochim. Biophys. Acta*, 1467 (2000), 271-280.
- Fang J., Shirakashi S., Ogawa K. Comparative Susceptibility of Japanese and European Eels to Infections with *Pseudodactylogyru*s spp. (Monogenea). *Fish Pathology*, 43 (2008) 144-151.
- Liang, Ying; Guan, Ruizhang; Huang, Wenshu; Isolation and Identification of a Novel Inducible Antibacterial Peptide from the Skin mucus of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Protein J.*, 6, (2011), 413-421.
- Tasumi, S., W.J. Yang, T. Usami, S. Tsutsui, T. Ohira, I. Kawazoe, M.N. Wilder, K. Aida, Y. Suzuki Characteristics and primary structure of a galectin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica* *Dev. Comp. Immunol.*, 28 (2004), 325-335.
- Tasumi, S., A. Yamaguchi, R. Matsunaga, K. Fukushi, S. Suzuki, O. Nakamura, K. Kikuchi, S. Tsutsui. Identification and characterization of pufferlectin from the grass pufferfish *Takifuguniphobles* and comparison of its expression with that of *Takifugurubripes* *Dev. Comp. Immunol.*, 59 (2016), 48-56.
- Tsutsui, S., Yoshinaga, T., Watanabe, S. Skin mucus C-type lectin genes from all 19 *Anguilla* species/subspecies. *Fish Sci* 81 (2015) 1043. doi:10.1007/s12562-015-0922-3.
- Tsutsui, Shigeyuki; Yoshinaga, Tatsuki; Komiya, Kaoru. Differential expression of skin mucus C-type lectin in two freshwater eel species, *Anguilla marmorata* and *Anguilla japonica*. *Developmental and Comparative Immunology*, 61(2016), 154-160.
- Reverter, M., Sasal, P., Banaigs, B., Lecchini, D., Lecellier, G., Tapissier-Bontemps, N. Fish mucus metabolomics reveals fish life history traits. *Coral Reefs*, (2017) 1-13. DOI 10.1007/s00338-017-1554-0.
- Salinas I. The Mucosal Immune System of Teleost. *Fish. Biol.*, 4(2015): 525-539.
- Zhang D.L., Guan R.Z., Huang W.S., Xiong J., Isolation and characterization of a novel antibacterial peptide derived from hemoglobin alpha in the liver of Japanese eel, *Anguilla japonica* *Fish & Shellfish Immunology*, 35 (2013) 625-631.