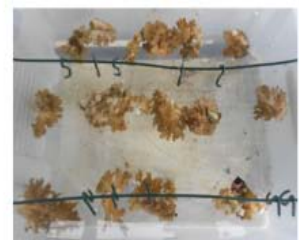




Caractérisation par métabolomique de l'effet des stress environnementaux chez le corail *Pocillopora damicornis* de Polynésie française.



Etude métabolomique de l'impact d'un stress chimique : le chlordécone, sur *Pocillopora damicornis*

Laboratoire d'accueil : CRIOBE, USR3278, CNRS-EPHE

Collaboration : LCBE, EA421

Financement : Bourse IRCP « Tahiti Perle »

Rapport de mission Aout 2012

Par Fahoullia MOHAMADI, doctorante au LCBE, sous la direction de Isabelle Bonnard, Cédric Bertrand et Bernard Banaigs

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse Isabelle Bonard, Cédric Bertrand et Bernard Banaigs pour leur aide et encadrements au quotidien.

Merci également à Véronique Berteaux-Lecellier pour avoir supervisé l'ensemble des travaux expérimentaux réalisés, merci de m'avoir encadrée et accompagnée tout au long de ces 4 semaines en Polynésie française. Ce fut également un plaisir de travailler sur ce projet avec Patricia Wecker et d'être initiée aux techniques de génomique, transcriptomique et cytologique.

Je remercie le CRIOBE et tout son personnel pour l'accueil, et la mise à disposition des supports logistiques nécessaires au bon déroulement de mes travaux.

Et enfin un grand merci à l'IRCP et la fondation Robert Wan, pour l'octroi d'une bourse « Tahiti perle », m'ayant permis de financer une partie des travaux réalisés.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	4
II. CONTEXTE GENERAL	5
1. <i>L'écosystème corallien : une oasis de vie menacée</i>	5
2. <i>La Polynésie française face au blanchissement</i>	6
La contamination des récifs de la Pf par les produits phytosanitaires.	8
Impact des herbicides et pesticides organochlorés sur l'environnement.....	8
III. METHODOLOGIE	11
1. <i>Du génome au métabolome, une approche globale</i>	11
2. <i>L'approche métabolomique</i>	11
3. <i>Design expérimental</i>	12
Pocillopora damicornis.....	12
Exposition de Pocillopora damicornis au chlordécone	12
Echantillonnage des coraux.....	14
Echantillonnage des eaux	14
Extraction de métabolites et acquisition des empreintes chimiques (partie en cours de réalisation)	15
Réalisation des empreintes chimiques : une approche globale et ciblée.....	16
L'extraction des métabolites des coraux.....	16
Principes des méthodes d'analyses	17
IV. RESULTATS / DISCUSSIONS.....	19
Observations lors de l'expérimentation	19
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	20
Bilan de travaux réalisés pendant le séjour de 4 semaines (25 mai – 4 juillet 2012)	21

I. Introduction

«*Les forêts tropicales de la mer*», c'est ainsi que sont considérés les récifs coralliens qui forment un écosystème riche, essentiel, mais en danger ! En effet, les récifs renferment la plus vaste communauté d'organismes marins, soit 30 % de la biodiversité des océans ; subviennent aux besoins d'un milliard de personnes ; mais subissent un phénomène dramatique et récurrent à l'échelle planétaire, « **le blanchissement des coraux** »^[1, 2]. A ce jour, 54 % des récifs sont menacés de disparition^[2].

Les causes de ce phénomène sont aujourd'hui relativement bien identifiées. En effet c'est suite aux modifications de l'environnement (des stress environnementaux) que les coraux subissent un dérèglement entraînant la perte de leurs symbiotes. Cependant, les mécanismes du phénomène de blanchissement ainsi que l'impact écologique de ces stress restent encore peu décrits.

Mon travail s'inscrit dans une étude qui a pour objectif d'étudier l'impact d'un stress chimique (le chlordécone ou képone, un pesticide organochloré) sur le transcriptome, le métabolome et sur les symbiotes du corail *Pocillopora damicornis*. Elle s'inscrit dans une démarche pluridisciplinaire en collaboration avec le Centre de Recherches Insulaires et Observatoire de l'Environnement de Polynésie Française (CRIOBE).

La partie bibliographique expose le contexte de l'étude et dresse un bilan sur les divers stress causant un blanchissement corallien dans le monde et en Polynésie française (Pf).

La deuxième partie présente le matériel et les méthodes utilisés.

Enfin la dernière partie est consacrée à la présentation des résultats obtenus. Une discussion sur les suites à donner à cette étude conclura ce rapport.

II. Contexte général

1. L'écosystème corallien : une oasis de vie menacée.

Les récifs coralliens constituent l'un des plus vastes écosystèmes de notre planète, ils occupent 600 000 km², soit environ 0.2% de la surface des océans. Les récifs abritent plus de 25% de la biodiversité marine mondiale, et sont souvent symbolisés par l'image d'une oasis dans le désert du fait de leur forte productivité. Ils renferment une biodiversité jamais égalée au niveau marin et remplissent des fonctions écologiques essentielles. La biodiversité actuelle est estimée à plus de 950 000 espèces comprenant environ 600 espèces de coraux scléractiniaires (les bâtisseurs du récif), près de 7 000 espèces de poissons et 50 000 espèces de mollusques dont la grande majorité vit dans les récifs coralliens^[3]. Au-delà de la biodiversité, l'écosystème corallien joue un rôle économique important : il est une source de nourriture, il a une forte valeur ajoutée pour le tourisme, et joue également un rôle essentiel dans la protection des côtes ^[4]. Les services rendus par les écosystèmes coralliens ont été estimés par l'économiste Pavan Sukhdev, à 170 milliards de dollars par an ^[5].

Les modifications environnementales, biotiques et abiotiques ont un impact direct sur le maintien de l'écosystème corallien. En effet, les bouleversements climatiques entraînent une augmentation de la température et du niveau de la mer, l'acidification des océans, l'augmentation de la fréquence des cyclones, ainsi qu'une perturbation du rythme des pluies ^[6, 7]. Ces perturbations participent grandement au **blanchissement des coraux** : un déclin des récifs suite à la rupture de la symbiose corail/zooplancton. Durant ce phénomène, la symbiose corallienne essentielle au maintien de l'animal est fortement perturbée. En effet, ce sont les algues symbiotiques du genre *Symbiodinium* qui fournissent à leur hôte (le polype) l'oxygène, ainsi que plus de 95 % des nutriments nécessaires à leur survie. Les apports nutritifs des zooxanthelles sont fondamentaux pour le corail. Or au cours du blanchissement, le corail perd ses zooxanthelles et / ou ses pigments chlorophylliens, une rupture prolongée de la symbiose entraînant alors la mort des coraux ^[8, 9, 10].

Sur une surface totale de récifs de 280 000 km², on estime que 20% des récifs coralliens ont été irrémédiablement détruits ou présentent peu de chances de récupération, 25% sont dans un état critique, 25% sont menacés, et seulement 30% demeurent dans un état satisfaisant.



Figure 1 : Photographie d'un récif avant et après les effets dramatiques du blanchissement.

(Photographie de Ray Berkelmans, Australian Institute of Marine Science).

Les évènements de blanchissement des coraux sont de plus en plus fréquents et leurs intensités croissent également. La perte ou plus vraisemblablement le profond bouleversement des récifs coralliens serait alors une catastrophe tant économique qu'écologique [11].

Le déclin de l'écosystème est encore plus accentué par des activités anthropiques croissantes telles que le développement non maîtrisé des zones côtières, les prélèvements des matériaux coralliens et la pratique intensive de la pêche lagunaire. A cela s'ajoutent des apports sédimentaires liés à de mauvaises pratiques culturelles et forestières sur les bassins versants, ou encore des déversements d'eaux usées non-traitées et riches en nutriments [12, 13]. L'élévation de la teneur en nutriments peut entraîner une perturbation de la reproduction des coraux scléactiniaires et crée une perturbation dans la dynamique des populations récifales. La présence des substances toxiques telles que les métaux lourds, les hydrocarbures, les polluants organiques persistants, les sels de cyanures et autres composés chimiques, sont autant de nuisances qui agissent en synergie avec les facteurs climatiques accentuant alors le phénomène de blanchissement des coraux [14, 15].

2. La Polynésie française face au blanchissement

La Polynésie française est un vaste territoire de 118 îles réparties autour de 5 millions de km², 75 % de la population vit à Tahiti et Moorea dans l'archipel de la Société. L'univers aquatique de la Polynésie est un environnement très riche en biodiversité, formant un écosystème. Un écosystème riche, mais aussi très fragile et de ce fait vulnérable aux bouleversements environnementaux.

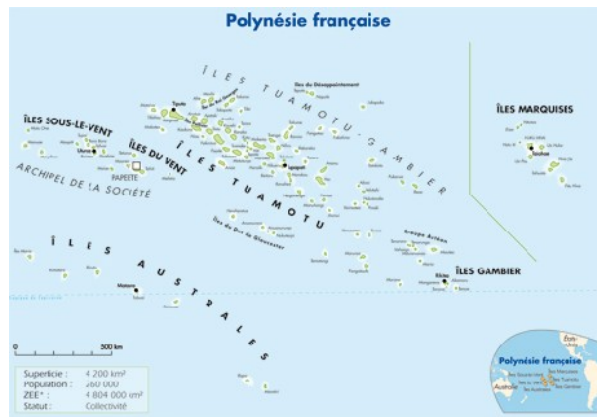


Figure 2 : La Polynésie française dans son contexte géographique.

En Polynésie française l'océan tient un rôle prédominant, il est au centre du patrimoine naturel et les polynésiens y puisent leurs principales sources de revenus. L'exploitation des récifs coralliens s'articule autour de trois principales activités : le tourisme, la culture de la perle et la pêche. Le tourisme, et la culture de la perle noire étant les deux piliers économiques du territoire [16]. La pêche, est une activité substantielle de la culture locale, pratiquée à des fins de subsistance et commerciale [16]. L'équilibre socio-économique polynésien est directement lié à l'état de l'écosystème corallien, et ce dernier n'est pas épargné par les phénomènes de blanchissement des récifs.

En effet les récifs de la Polynésie française subissent diverses pressions environnementales biotiques et abiotiques entraînant des phénomènes de blanchissements. Les îles de la Société, plus particulièrement Tahiti, Moorea et Bora Bora sont les plus impactées [17, 18].

Le programme « Polynesia Mana » (initié par le CRILOBE-EPHE) permet de réaliser un suivi de l'état de santé des récifs (poissons, coraux...) et des paramètres physico-chimiques associés (température, pH, salinité ...). Ainsi plusieurs cycles de dérèglements ont été enregistrés. Le site de Moorea a été affecté par 11 événements perturbateurs entre 1979 et 2009, dont 9 épisodes de blanchissements. L'augmentation de la température des océans, les cyclones et les pollutions en sont les principales causes.

Des études récentes ont également montré une contamination des récifs par des produits phytosanitaires. Une attention particulière a été portée à ces composés compte tenu de leurs présences ubiquitaires pouvant entraîner des conséquences écologiques et sanitaires dévastateurs [18, 19, 20, 21, 22].

La contamination des récifs de la Pf par les produits phytosanitaires.

Une contamination avérée des récifs de Tahiti et Moorea par des herbicides et des insecticides, a été mise en évidence lors d'une étude réalisée en 2011 dans le cadre d'un programme de recherche développé par l'Initiative Française pour les Récifs Corallien (IFRECOR) [23]. Des insecticides et des herbicides ont été recherchés dans des espèces représentatives des réseaux trophiques récifaux suivantes : *Chlorurus sordidus*, un poisson herbivore ; *Epinephelus merra*, un poisson carnivore ; *Halimeda crassata*, une algue verte ; *Tridacna maxima*, un mollusque ; *Fungia sp.*, un corail scléactiniaire et *Halodeima atra*, une holothurie. 100 % des échantillons récoltés referment des pesticides et contrairement aux résultats attendus, les sites non impactés par l'agriculture, « sites non agricoles », s'avèrent être les plus contaminés. La contamination par les pesticides organochlorés est générale avec une fréquence de 68,7% pour le lindane et une fréquence de 100 % pour le chlordécone. La présence ubiquitaire du chlordécone est très impressionnante sachant que cet insecticide n'aurait pas été homologué en Polynésie française. Une seconde étude réalisée sur l'ensemble du territoire (les 5 archipels de la Pf) confirme cette contamination généralisée [24], y compris dans les îles les plus reculées telles que les atolls des Tuamotu, où les activités agricoles sont pourtant très réduites voire inexistantes. Les teneurs en pesticides relevées sont de l'ordre du microgramme par kilogramme ($\mu\text{g}/\text{kg}$), bien en deçà de la limite maximale de résidus autorisés pour l'alimentation humaine ($20 \mu\text{g}/\text{kg}$), les aliments contaminés sont donc propres à la consommation. La présence de ces pesticides hautement toxiques et rémanents, doit néanmoins faire l'objet d'une vigilance spécifique compte tenu de leurs capacités à s'accumuler/ se bioamplifier dans les chaînes trophiques.

Impact des herbicides et pesticides organochlorés sur l'environnement

Les pesticides sont « la nouvelle menace des récifs », et les effets dévastateurs de ces molécules actives sont aujourd'hui avérés. L'ensemble de la chaîne trophique récifale (déjà profondément affectée par les bouleversements climatique) est perturbée par la présence de ces molécules rémanentes, actives à de très faibles concentrations, et pouvant avoir des effets synergiques [20, 21]. Leur présence à l'état de trace (l'ordre du microgramme par litre) suffit à entraîner un dérèglement de la physiologie des coraux à tous les stades de croissance. C'est ce que montre l'étude d'une équipe australienne qui a comparé l'impact des contaminants les plus communs incluant les grandes familles d'insecticides (organophosphates, organochlorés, carbamates et pyréthrénoïdes) [22]. C'est durant les

premières phases de vie (gamètes et larvaires) que les coraux sont les plus sensibles et les plus vulnérables. En effet, une exposition de 18h à de faibles concentrations entraîne une réduction de 50 à 100% de la métamorphose des larves (quelque soit la famille de pesticides testée. Les coraux adultes subissent un blanchissement lors d'une exposition à 10 µg/L de prefonos (un organophosphoré). La présence du fongicide MEMC à 1 µg/L, perturbe la fertilisation des gamètes, inhibe la métamorphose des larves, et entraîne un blanchissement. Les herbicides tel que le diuron, en inhibant la photosynthèse, perturbent profondément les échanges symbiotiques polype/zooxanthelles [24, 25, 26].

Le chlordécone (kepone) est connu pour ses effets dévastateurs. C'est un perturbateur endocrinien, classé comme potentiellement cancérigène pour l'homme par le centre international de recherche sur le cancer. Les fortes suspicions de son lien avec le cancer de la prostate ont été confirmées dans une étude épidémiologique réalisée par des chercheurs de l'Inserm en 2010 [27].

En raison de son caractère lipophile, le chlordécone peut non seulement se bioaccumuler mais aussi, en l'absence totale ou quasi-totale d'élimination métabolique, se bioamplifier dans les chaînes alimentaires aquatiques. Il se fixe sur des matières particulières (poussières, sols et sédiments) et organiques (organismes vivants) compte tenu de sa faible solubilité dans l'eau (de 1,0 à 3,0 mg/L) [28].

Ce pesticide a pollué et stérilisé les sols dans les Antilles françaises. Il y est interdit depuis 1993 mais toujours présent dans l'environnement du fait de sa demi-vie record de 7 siècles [29]. Il est toujours détecté dans certaines denrées végétales et animales, dans les sols, ainsi que dans les eaux de certains captages. À certains endroits l'eau souterraine contient des taux de chlordécone 100 fois supérieurs à la norme [30, 31] !

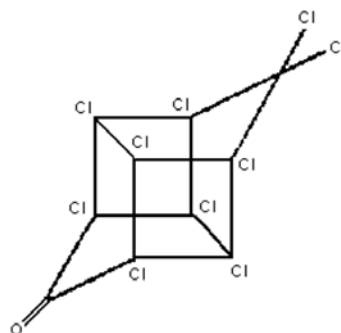


Figure 3 : Molécule de chlordécone

La conformation cyclique de la molécule associée à la présence des 10 atomes de chlore lui confère sa haute stabilité.

A ce jour aucune étude éco-toxicologique n'a été entreprise concernant l'impact de ce pesticide sur les coraux. La haute toxicité de cette molécule ubiquitaire en Pf, associé à la haute vulnérabilité du milieu, sont les principaux arguments qui ont orienté cette étude au cours de laquelle nous cherchons à apporter des éléments de réponses aux questions suivantes :

- ❖ Quels sont les effets d'une contamination par le chlordécone sur le corail ?
 - ✓ Quels sont les impacts d'un tel stress sur le transcriptome, et le métabolome du corail ?
 - ✓ Quels en sont les effets physiologiques ?
- ❖ **Comment varie le métabolome du corail lors d'une contamination par le chlordécone?**
 - ✓ **Quelles sont les molécules (famille de molécules) exprimées lors du stress ?**

Cette problématique s'inscrit dans le projet «Risques de l'utilisation des pesticides issus de l'agriculture sur les organismes coralliens de Polynésie française», et s'inscrit dans une démarche pluridisciplinaire, le projet soutenu par le Ministère de l'outre mer et dont le coordinateur est D Lecchini (CRIOBE).

→ Les travaux sont réalisés en collaboration avec le CRIOBE. Les expériences de stress ainsi que les études transcriptomiques et cytologiques sont réalisées par Véronique Berteaux-Lecellier (chercheur CNRS au CRIOBE), et Patricia Wecker (chercheur post-doctorant au CRIOBE).

→ C'est dans le cadre de ma thèse « Etude des métabolites des coraux scléactiniaires et caractérisation par métabolomique des stress environnementaux » que je réalise les études métabolomiques au Laboratoire de chimie des Biomolécules et de l'Environnement (LCBE) à l'Université de Perpignan, sous la direction de Isabelle Bonnard, Cédric Bertrand et Bernard Banaigs. Par conséquent, dans ce rapport, l'accent sera mis essentiellement sur l'étude métabolomique, les études génétiques, transcriptomiques et cytologiques ne seront évoquées que sommairement.

Mon projet de thèse s'inscrit dans l'axe 4 « médiation chimique » du Groupement de Recherche International (GDRI) « biodiversité des récifs coralliens », dont les objectifs sont de renforcer et consolider les connaissances sur ces écosystèmes dont la biodiversité est menacée.

III. Méthodologie

1. Du génome au métabolome, une approche globale

Une méthode d'exploration très générale a été développée, afin de comprendre l'impact de la perturbation étudiée, tant sur le plan génétique, transcriptomique, que métabolomique. En effet, l'exposition des coraux au chlordécone est susceptible d'induire des modifications lors de ces étapes clés de réactions et transformations métaboliques. Des études transcriptomiques, et métabolomiques sont donc réalisées en parallèle sur les mêmes échantillons. Il s'agit d'approches complémentaires qui devraient permettre d'établir des corrélations entre la présence ou l'absence de certains métabolites et gènes spécifiques, suite à l'exposition au chlordécone.

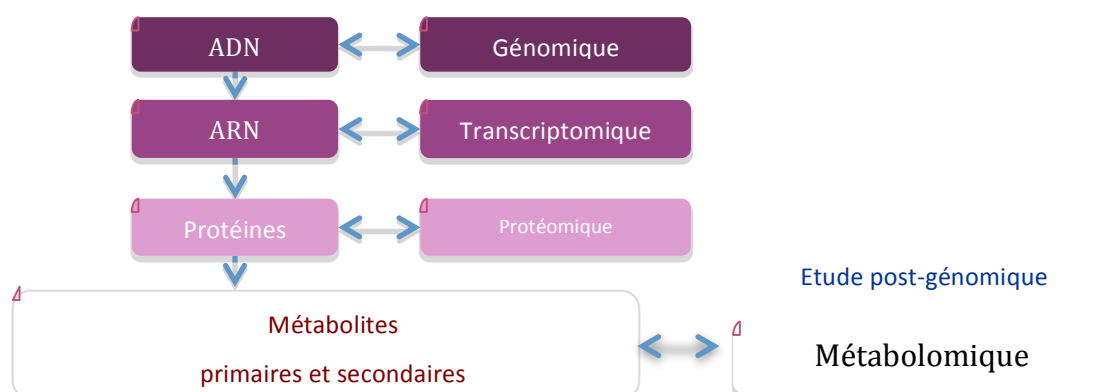


Figure 4 : Schéma général montrant les relations entre les sciences « omiques ».

2. L'approche métabolomique

Le métabolome est composé de l'ensemble des métabolites (molécules < 2000 Da) contenus dans un système biologique donné. Le métabolome s'inscrit dans un contexte post-génomique et représente l'ultime réponse d'un organisme suite à une altération génétique, une pathologie, une exposition à un toxique, ou à un tout autre facteur susceptible de perturber son fonctionnement. Il est par définition caractéristique d'un état physiologique donné [32, 33].

Les coraux et organismes marins en général, biosynthétisent des composés, notamment des métabolites secondaires qui jouent un rôle écologique important (défense, communications...) [33, 34, 35, 36, 37, 38]. L'analyse de ces composés permet d'acquérir une signature chimique (ou empreinte de l'espèce). Cette signature peut varier, en fonction de paramètres génétiques ou des facteurs environnementaux. Ces différences aboutissent alors à une signature chimique spécifique [32]. L'acquisition des empreintes chimiques réalisée par des techniques de chromatographies et de spectroscopies permet de détecter de faibles variations ainsi que de faibles doses de contaminants. En comparant les deux empreintes chimiques (corail sain / corail exposé au chlordécone), les métabolites caractéristiques de l'environnement « sain » et de l'environnement « stressé » pourront être mis en évidence. Les métabolites différents d'un état à l'autre pourraient alors servir de molécules indicatrices de ce stress spécifique.

3. Design expérimental.

Pocillopora damicornis

L'espèce de corail retenue est *Pocillopora damicornis*, elle est largement présente en Polynésie française, et aussi très répandue dans la plupart des récifs du globe.

L'espèce est un scléactiniaire de la famille des Pocilloporidae, elle vit en symbiose avec une microalgue de la classe des dinophyceae, *Symbiodinium*. De plus *Pocillopora damicornis* est une espèce de corail facilement identifiable dont la biologie et la physiologie sont bien appréhendées, cela est un atout non négligeable dans ce type d'étude et permet un gain de temps considérable dans la mise au point de la méthodologie.

Deux colonies cultivées dans le lagon de Moorea, ont été récoltées et fractionnées afin d'obtenir des fragments de 30 grammes environ, ces derniers ont ensuite été conservés dans un bac contenant de l'eau de mer naturelle 7 à 10 jours à température ambiante et en circuit ouvert.

Exposition de Pocillopora damicornis au chlordécone

Deux expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions, à une semaine d'intervalle.

Les coraux ont été exposés à trois concentrations de chlordécone.

- Une concentration faible de 3 $\mu\text{g/L}$, correspondant à celle mesurée en moyenne dans l'environnement récifal en Australie [23]. Il s'agit également de la teneur relevée dans les eaux de consommation en Martinique [39].

- Une concentration moyenne de 30 $\mu\text{g/L}$, correspondant à 3 fois la teneur en chlordécone relevée dans le sang des martiniquais [39]. C'est aussi la concentration mesurée dans les eaux au bord de l'usine de la rivière de James ainsi que dans les eaux de la baie de Chesapeake aux Etats-Unis [24].

- Une forte concentration de 300 $\mu\text{g/L}$. Une valeur extrême mais qui est celle mesurée encore aujourd'hui dans certains échantillons de la James River aux Etats-Unis [24].

Les boutures ont été placées dans 4 bacs en plastique contenant 20 litres d'eau de mer, à raison de 13 boutures pour chaque condition (3 $\mu\text{g/L}$, 30 $\mu\text{g/L}$, 300 $\mu\text{g/L}$) et 17 boutures dans le bac contrôle (0 $\mu\text{g/L}$). Les bacs ont été oxygénés et soumis aux conditions environnementales ambiantes. La durée totale des expériences est de 96 h.

Un suivi visuel et photographique est réalisé tout au long de l'expérience.

Compte tenu de la haute stabilité du chlordécone, la teneur de la molécule dans le milieu a été considérée comme étant stable tout au long de l'expérimentation [28, 29]. Par conséquent, l'ensemble des expériences a été réalisé en circuit fermé, aucun renouvellement de l'eau ou ajout de chlordécone n'a été réalisé.

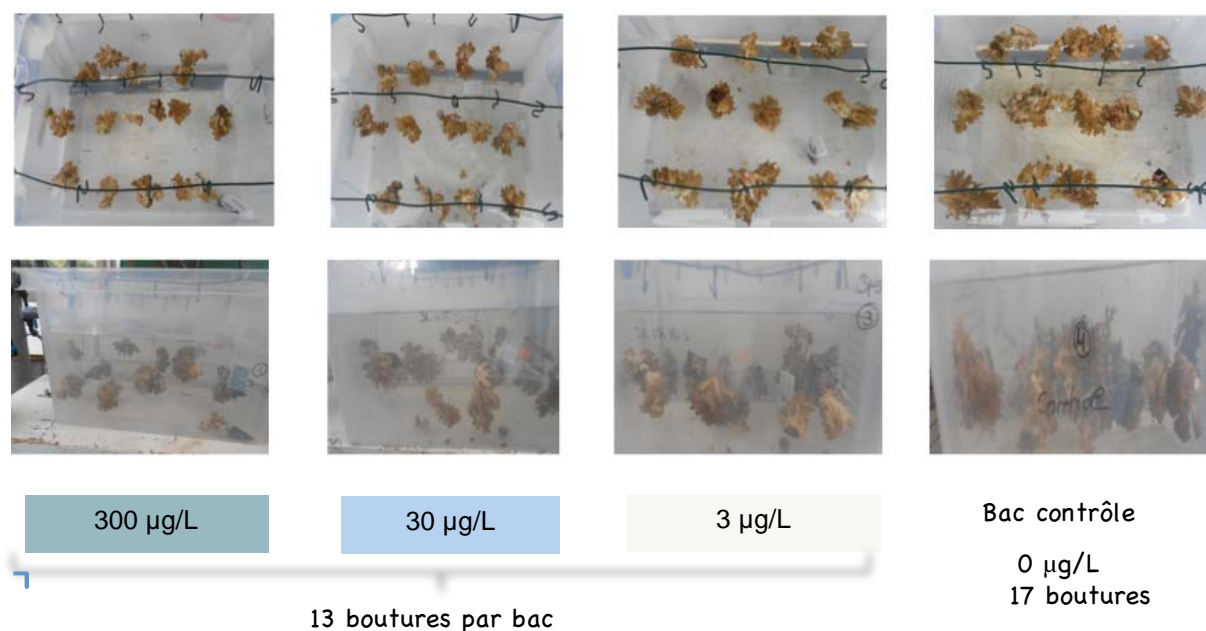


Figure 5 : Photographie du dispositif expérimental

Echantillonnage des coraux

Les coraux ont été échantillonnés après 4 h, 24h, et 74h d'exposition, 4 échantillons sont prélevés à chaque temps et dans chaque bac. Un échantillonnage à T_0 a été réalisé uniquement dans le bac contrôle. Chaque bouture de corail prélevée a été partagée en quatre fragments, destinés chacun à une étude spécifique. 20 g sont prélevés pour l'étude métabolomique, 10 g pour l'étude transcriptomique, 5 g pour l'étude cytologique, et enfin 2 à 3 cm pour l'analyse de la diversité des zooxanthelles et leur quantification.

Ce partage est illustré dans la figure 7 ci-dessous

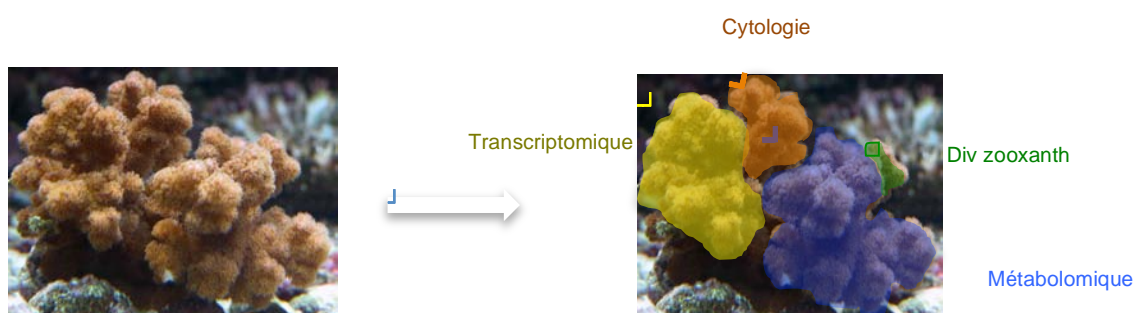


Figure 6 : Partage et répartition des fragments d'un échantillon de corail.

Les échantillons destinés à l'étude métabolomique sont immédiatement congelés dans de l'azote liquide, lyophilisés, puis stockés à moins 40°C. Ils sont ensuite amenés au LCBE et conservés à -80°C jusqu'à leur extraction.

Echantillonnage des eaux

A la fin de l'exposition au stress, 7 litres d'eau de chaque bac sont filtrés sur des cartouches SPE (Solid Phase Extraction) Strata XL (Phenomenex). La cartouche Strata XL a été retenue suite à une étude comparative préalablement réalisée au LCBE. Les polymères mixtes composés de groupements fonctionnels polaire/apolaire qui composent la phase stationnaire, lui confèrent une forte rétention pour une très large gamme de composés. De plus le format XL est composé de larges particules (100 μm) de grande porosité (300 Å) permettant ainsi de filtrer de grands volumes d'eau sans risque de colmatage.

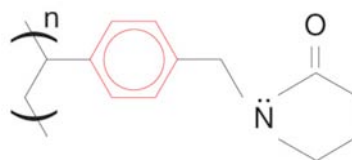


Figure 7 : La phase stationnaire de la cartouche Strata XL avec des groupements N-vinylpyrrolidone greffés sur un motif de styrène.

Les cartouches ont été conditionnées avec 20 mL de méthanol (MeOH) puis 10mL d'eau distillée. Sept litres d'eau de chaque bac ont été filtrés. Un rinçage a ensuite réalisé avec 100 mL d'eau distillée afin d'éliminer les sels. Les cartouches sont ensuite séchées, puis stockées à 4°C, puis acheminées au LCBE.

Les composés d'intérêt retenus sur la phase stationnaire seront élués par des solvants organiques moyennement polaire et apolaire (MeOH / DCM V:V). Les extraits seront ensuite analysés en chromatographie liquide couplée à un spectre de masse (LCMS) sur une colonne apolaire (cf chapitre acquisition des empreintes chimiques). La figure 9 illustre de façon schématique toutes les étapes d'une filtration sur cartouche SPE.

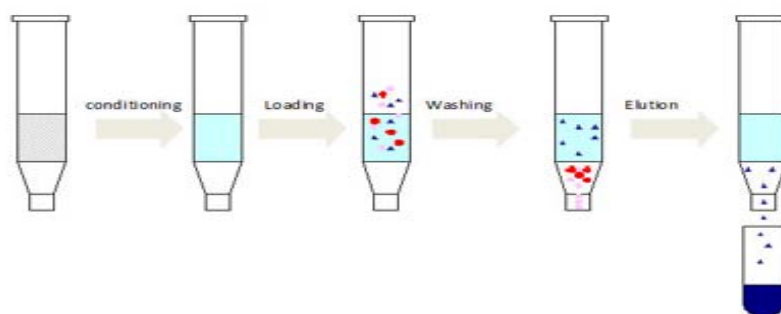


Figure 8: Le principe de la filtration sur cartouche SPE, avec les principales étapes. Les molécules d'intérêts retenues sur la phase stationnaire sont représentées par des particules bleues.

Extraction de métabolites et acquisition des empreintes chimiques (partie en cours de réalisation)

Réalisation des empreintes chimiques : une approche globale et ciblée.

L'approche globale consiste à réaliser une empreinte métabolique en caractérisant **le plus grand nombre possibles de métabolites** afin d'identifier les diverses voies métaboliques perturbées suite à un stimulus.

Les efforts seront aussi concentrés sur les **métabolites dits secondaires** (molécules spécifiques d'une espèce ayant des rôles écologiques important, et par conséquent susceptibles de varier en fonction des conditions environnementales) [37, 38] ; ainsi que sur les lipides plus précisément **les stéroïdes** caractéristiques des clades des zooxanthelles [40], et les **acides gras** aussi spécifiques d'une espèce [41, 42].

Il n'est pas possible d'analyser TOUS les métabolites avec une seule technique analytique. Une méthode d'extraction bi-phasique a été mise au point au LCBE, elle permet ainsi d'extraire simultanément une large gamme de composés, puis de les analyser avec différentes techniques chromatographiques.

Cette méthodologie est en cours de publication, seules les grandes étapes de la méthode ainsi que leurs principes sont exposés. Les gradients de solvants d'extraction / de chromatographies ainsi que les conditions d'acquisition des spectres RMN ne sont pas détaillés.

L'extraction des métabolites des coraux

Dans un premier temps, 15 à 20 g de coraux sont broyés dans un mortier, l'extraction est réalisée par un mélange de solvants composés d'eau, de méthanol et de dichlorométhane (H₂O/MeOH/DCM). Un partage liquide-liquide permet de séparer les molécules polaires (1) des molécules apolaires et moyennement polaires (2).

Dans un deuxième temps, 5 mg de la fraction (2) sont saponifiés, un partage liquide-liquide H₂O/MeOH/DCM permet de séparer les stéroïdes (3) contenus dans la fraction apolaire. Enfin une acidification de la fraction polaire suivit d'un partage liquide-liquide, permet de récupérer les acides gras (4) contenus dans la fraction apolaire. Le schéma récapitulatif ci dessous illustre le process d'extraction des métabolites. Chacune de ces catégories de molécules est ensuite analysée sur des systèmes spécifiques de chromatographie liquide ou gazeuse, et en RMN (LCMS, GCMS et RMN).

Principes des méthodes d'analyses

L'acquisition des empreintes chimiques est réalisée par résonance magnétique nucléaire (RMN) et par chromatographie liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (LCMS et GCMS).

- La RMN est une technique extrêmement puissante et universelle pour la détermination de la structure des molécules. En utilisant les propriétés magnétiques des noyaux, elle permet de voyager au coeur de la matière et d'établir une cartographie au niveau des atomes constituant les molécules. La RMN du proton ^1H permet l'obtention des spectres d'extraits complexes, à chaque extrait correspond une empreinte chimique spécifique. Le principal atout de la RMN est incontestablement de pouvoir donner une image qualitative et quantitative des fluides biologiques sans aucun a priori.

- La chromatographie est une technique analytique permettant la séparation de composés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Cette technique est basée sur les différences d'affinités entre la substance à analyser et deux phases, l'une stationnaire (la colonne), l'autre mobile (l'éluant). L'échantillon traverse la colonne entraînée par la phase mobile. En chromatographie liquide (LC), la phase mobile est composée de solvants, dans le cas de la chromatographie gazeuse (GC) la phase mobile est un gaz. Le choix de la phase stationnaire est fonction des molécules à analyser. Les colonnes ayant un greffage polaire (exemple polyéthylène glycols) retiennent préférentiellement les molécules polaires et inversement, pour l'analyse de molécules apolaires une colonne à greffage apolaire est préférée (exemple groupe octadecylsilanes).

La détection des composés séparés est représentée par un chromatogramme caractérisé par un ensemble de pics gaussiens. Deux paramètres permettent de décrire un pic chromatographique : le temps de rétention (t_r) et l'aire du pic.

La LC et la GC sont couplées à un spectromètre de masse (MS) qui permet la séparation en phase gazeuse de molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). La technique est extrêmement sensible et permet la détection fine des ions, ainsi que la détermination de leurs structures moléculaires.

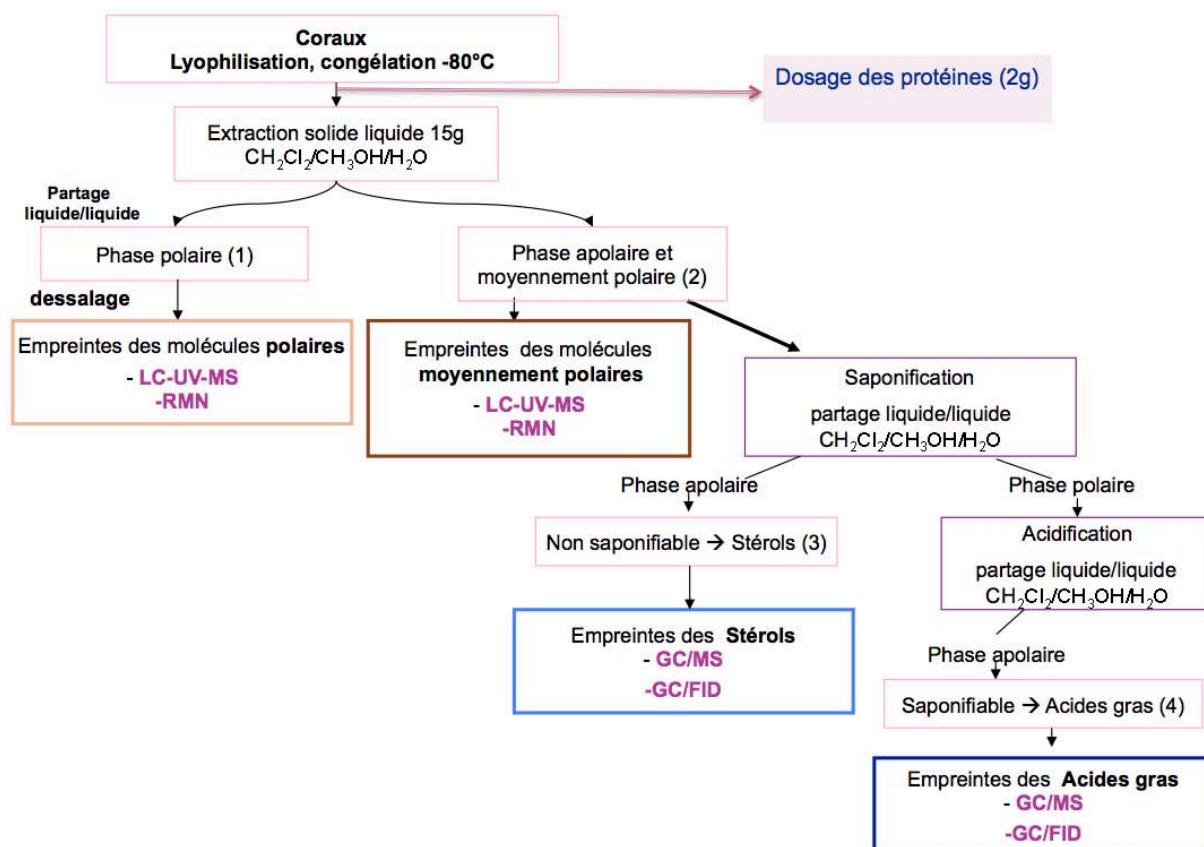


Figure 9 : Schéma récapitulatif du process d'extraction et d'acquisition des empreintes chimiques.

Les méthodes mises au point permettent l'analyse en série de nombreux échantillons, elles sont parfaitement reproductibles et ont une sensibilité élevée.

IV. Résultats / discussions

Ces parties du rapport sont incomplètes, les analyses métabolomiques étant en cours de réalisation.

Observations lors de l'expérimentation

Les paramètres physicochimiques relevés lors des 2 séries d'expériences réalisées à une semaine d'intervalle sont similaires.

D'un point de vue visuel, les coraux des bacs 300 µg/L et 30 µg/L réagissent de façon similaire au stress, les polypes se sont rétractés après 4h d'exposition. La coloration des boutures est pâle après 24h d'exposition, ce qui est en accord avec les effets observés lors d'études similaires. Un de nos tests réalisés lors de l'expérience préliminaire montre un blanchissement des coraux lors d'une exposition à une forte concentration. Il s'agit d'un « décollement » des tissus. Les mêmes effets ont été observés lors d'une étude sur l'impact du diuron (un herbicide) sur *Pocillopora damicornis* par l'équipe de Negris en Australie : « *polyps escaping from their skeletons* » ou littéralement 'des polypes s'échappant de leurs squelettes', sont les termes utilisés pour décrire le phénomène illustré sur les photographies ci-dessous (illustration 12)^[12]. Ici le phénomène est plus dramatique encore que le *blanchissement classique* (perte des zooxanthelles et / ou des pigments photosynthétiques) et aucune résilience n'est possible.



Figure 10 : Photographie de l'effet de 300 µg/L chlordecone sur *Pocillopora damicornis* après 3 jours et 4 jours.

Dans les bacs 0 µg/L et 3 µg/L pas de différence notables n'est observable à l'œil nu.

V. Conclusion et perspectives

Cette étude a été entreprise afin de comprendre les réactions métaboliques du corail *Pocillopora damicornis* suite à l'induction d'un stress par le chlordécone. Nous souhaitons ainsi apporter une contribution sur la compréhension des effets de ce pesticide dans l'environnement récifal de la Polynésie française. Les analyses métabolomiques, et transcriptomiques, ainsi que le suivi des zooxanthelles et leur lien éventuels avec la production de certains métabolites secondaires, devaient apporter des éléments de réponses sur les mécanismes sous-jacents.

Les résultats obtenus seront spécifiques au corail *Pocillopora damicornis*. Des travaux complémentaires devraient être réalisés sur d'autres espèces coralliennes afin de comparer la sensibilité et la réactivité des scléactiniaires face à un tel stress. Il serait également intéressant d'étudier simultanément l'effet de divers pesticides notamment ceux retrouvés le plus fréquemment en Polynésie française afin de prendre en compte les effets synergiques que peuvent avoir les pesticides sur les organismes récifaux.

Bilan de travaux réalisés pendant le séjour de 4 semaines (25 mai – 4 juillet 2012)

Semaine 1 :

Durant la première semaine, j'ai rencontré l'équipe de recherche. Une réunion a permis de définir le projet « stress chlordécone sur le scléactiniaire *Pocillopora damicornis*. Les objectifs et expériences à venir ont été définis.

-Nous avons mis en place toute la logistique nécessaire aux expérimentations.

-Nous avons réalisé une l'expérience préliminaire permettant d'ajuster les différents aspects à prendre en compte lors des futures expériences.

-Nous avons réalisé l'expérience préliminaire.

Semaine 2 :

Durant la deuxième semaine après une réunion et un bilan de l'expérience préliminaire, l'expérience N°1 a été réalisée.

Semaine 3 :

Durant la troisième semaine, j'ai été initié aux techniques de la génétique, j'ai caractérisé les clades de zooxanthelles selon un technique développée au CRIOBE.

En parallèle, nous avons réalisé les boutures de corail pour l'expérience N°2 et également préparé le matériel nécessaire.

Semaine 4 :

Durant la quatrième semaine, nous avons réalisé l'expérience N°2.

Puis une réunion a permis de faire le bilan sur l'ensemble du projet.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- [1] Baker. A.C et al., *Estuarine Coastal and Shelf Science*. **2008**, 80, 435-471.
- [2] Douglas. A.E. *Marine Pollution Bulletin*. **2003**, 46, 385-392.
- [3] Salvat. B. ; Bacchet P. in *Guide des récifs coralliens de Tahiti et de ses îles*,. Collection nature et environnement d'Océanie. **2011**
- [4] Miller. M.W et al., *Estuarine Coastal and Shelf Science*. **2011**, 91, 42-50.
- [5] Sukhdev. P. *Solutions*. **2011**, 6, 34-43.
- [6] Bhagooli. R ; Hidaka. M. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **2004**, 137, 547-555.
- [7] James. M ; Crabbe. C. *Computational Biology and Chemistry*. **2008**, 32, 311-314.
- [8] Strychar. K.B. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **2004**, 304, 99-121.
- [9] Flores-Ramírez. L.A ; Liñán-Cabello, M.A. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **2007**, 146, 94-202.
- [10] Vidal-Dupiol. J et al., *BMC Physiology*. **2009**, 14, 1-16.
- [11] Burt. J et al., *Marine Environmental Research*. **2011**, 72, 225-229.
- [12] Liu. P.J et al., *Marine Pollution Bulletin*. **2012**, 64, 1129-1135.
- [13] Reopanichkul. P. et al., *Marine Pollution Bulletin*. **2009**, 58, 1356-1362.
- [14] Hédouin. L et al., *Marine Environmental Research*. **2011**, 71, 149-161.
- [15] Bielmyer. GK et al., *Aquatic Toxicology*. **2010**, 97, 125-133.
- [16] Chin. A et al., in *Status of Coral Reefs Of Pacific and Outlook : 2011*. **2011**, 154-164.
- [17] Penin. L et al., *Comptes Rendus Biologies*. **2007**, 330, 171-181
- [18] Ross. J. *Marine Pollution Bulletin*. **2010**, 60, 1993-2006.
- [19] Negri. A et al., *Marine Pollution Bulletin*. **2005**, 51, 370-383
- [20] Kitada. Y et al., *Chemosphere*. **2008**, 71, 2082-2090.
- [21] Lewis. SE et al., *Environmental Pollution*. **2009**, 157, 2470-2484.
- [22] Markey.K.L et al., *Mar Ecol Prog Ser*. **2007**, 330, 127-137.
- [23] Roche.H et al., *Rev. Écol. (Terre Vie)*. **2011**, 66, 3-10.
- [24] Salvat.S et al., *Rev. Écol. (Terre Vie)*. **2012**, 67, 129-148.
- [25] Shaw C.M et al., *Marine Pollution Bulletin*. **2008**, 57 473-478.
- [26] Shaw C.M et al., *Marine Pollution Bulletin*. **2012**, 65, 355-362.
- [27] Multigner. L et al., *American Society of Clinical Oncology* . **2010**, 28, 3457-3462.
- [28] National Toxicology Program. *Department of Health and Human Services Report on Carcinogens, Twelfth Edition*. **2011**, 250-251.
- [29] Devault, D. *Abstract Congrès Annuel du Groupe Français des Pesticides, Banyuls*. **2010**, 05, 26-28.
- [30] Bocquenéa. G ; Francob. A. *Marine Pollution Bulletin*. **2005**, 51, 612-619.
- [31] Levillain. J et al., *Agriculture, Ecosystems and Environment*. **2012**, 159, 123-132.
- [32] Schnackenberg. L.K ; Beger, R.D. *Drug Discovery Today: Technologies*. **2007**, 4.
- [33] Bundy. J.B et al., *Metabolomics*. **2009**, 5, 3-21.
- [34] Gordon. BR ; Leggat W. *Marine Drugs*. **2010**, 8, 2546-2568.
- [35] Bae. BH et al., *J. Nat.Prod*. **2000**, 63, 1511-1514.
- [36] Cool. J.C. *Chem. Rev*. **1992**, 92, 613-631.
- [37] Mark E. Hay et al., *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **1996**, 200, 103-134.

- [38] Proksch. P. *Toxicon*. **1994**, 32, 639–655.
- [39] Multigner. L et al., *Epidemiology*. **2006**. 17, S372.
- [40] Tolosa. I ; De Mora, S. *Journal of Chromatography*. **2004**, 1045, 71-84.
- [41] Zhukova. N.V ; Titlyyanov. E.A. *Phytochemistry*. **2003**, 63, 197-195
- [42] Imbs. A.B et al., *Comparative Biochemistry and Physiology*. **2007**, 148, 314-321.