

Intitulé* : Contribution de la composante virale dans le fonctionnement de l'holobionte *Ulve* (« laitue de mer »). Application à l'aquaculture régionale

Résumé en mode « ma thèse en 360 mots »:

Les ulves sont des algues endémiques des littoraux provençaux, à l'origine de marées vertes nécessitant des mesures de protection de la population et des frais de collecte sur les plages. Elles sont également utilisées dans diverses applications biotechnologiques d'avenir : par exemple, la start-up régionale Eranova (Port-Saint-Louis-du-Rhône)—partenaire du présent projet—cultive les ulves en bassin pour les transformer en bioplastique biodégradables. Ainsi, comprendre les déterminants de la croissance de l'ulve représentent à la fois des enjeux scientifiques et biotechnologiques majeurs, mais aussi un intérêt public immédiat.

Les ulves vivent en communauté avec les populations microbiennes et virales qui colonisent sa surface, formant un supra-organisme désigné « holobionte ». La biologie de l'algue est profondément influencée par ses interactions avec ses partenaires microbiens, mais les mécanismes en jeu, la nature des micro-organismes et la résilience de l'holobionte aux perturbations sont essentiellement inconnus. Le projet HOLOGREEN propose de réaliser une percée décisive dans la compréhension du fonctionnement de l'holobionte « ulve » et de sa réponse aux variations environnementales pour identifier les déterminants de la croissance algale. Le projet réunit 3 laboratoires (MIO, AFMB, MARBEC) et une start-up (Eranova) pour réaliser la première étude intégrée de tous les compartiments de l'holobionte (algue, eucaryotes microbiens, procaryotes et virus) dans des environnements contrastés dont principalement l'algoculture. Les retombées potentielles concernent la prévention des marées vertes et le développement biotechnologique pour la production et la transformation de biomasse d'ulve.

Au sein d'HOLOGREEN, le doctorant étudiera la composante virale pour élucider son influence sur le fonctionnement de l'holobionte. Il développera un programme pluridisciplinaire pour caractériser la diversité et la dynamique des populations virales associées aux ulves cultivées en bassin par Eranova par des approches métagénomiques, bioinformatiques et qPCR. Les données métagénomiques permettront d'identifier la nature des virus et de leurs gènes attestant des mécanismes d'infection. A l'aide des données produites par nos partenaires, la dynamique des populations virales permettra de caractériser les déterminants de la multiplication des virus, leur influence sur la croissance de l'algue et d'identifier les hôtes des virus parmi la flore microbienne et l'ulve elle-même. Le doctorant cultivera ces virus en laboratoire pour permettre leur caractérisation détaillée (morphologie, génome, évolution, cycle infectieux).

Présentation détaillée du projet de thèse

Intitulé* : Contribution de la composante virale dans le fonctionnement de l'holobionte *Ulve* (« laitue de mer »). Application à l'aquaculture régionale

Contexte: Les macro-algues du genre *Ulva* regroupent 86 espèces—certaines sont communément désignées sous le terme « laitue de mer »—et vivent pour la plupart dans des zones côtières peu profondes. Elles jouent un rôle important dans leur biotope, où elles modulent l'approvisionnement en ressources pour d'autres organismes et modifient l'état physique du milieu environnant ¹⁻³. Ces algues fournissent un habitat pour toute une série d'espèces aussi bien épibiontes, que des organismes microscopiques ou des invertébrés ⁴. Cependant elles sont aussi bien connues du public pour les marées vertes qu'elles provoquent dans de nombreuses régions côtières du monde—par exemple en Chine, en Bretagne ou dans une moindre mesure l'étang de Berre—en raison de l'eutrophisation des eaux qui favorisent des efflorescences massives et sont les prémisses d'une crise dystrophique. Ces marées sont nuisibles pour la santé, l'économie locale, et altèrent le fonctionnement des écosystèmes. Par ailleurs, la biomasse des ulves constitue une ressource émergente pour diverses applications agroalimentaires, pharmaceutiques et biotechnologiques ⁵. Par exemple, la société Eranova partenaire de ce projet produit de la biomasse d'ulve sur la commune de Port-Saint-Louis-du-Rhône (Bouches-du-Rhône) pour extraire l'amidon et le transformer en bioplastiques. Ainsi comprendre les mécanismes qui contrôlent la distribution et le développement des ulves, le déclenchement des efflorescences et leur dissipation, représentent à la fois des enjeux scientifiques et biotechnologiques majeurs, mais aussi un intérêt public immédiat.

Les preuves s'accumulent montrant que l'évolution et la biologie d'un organisme sont profondément influencées par les communautés microbiennes qui résident en son sein ou dans son environnement proche. Par exemple, les bactéries jouent un rôle dans l'initiation de la pluricellularité (e.g. induction de la formation de colonies chez le choanoflagellé *Salpingoeca*), dans l'assimilation de molécules complexes (e.g. digestion de polysaccharides de plantes ou d'algues chez les herbivores), dans le développement de l'hôte (e.g. induction de la fixation et de la métamorphose des larves d'invertébrés marins sur substrat). Cette nouvelle appréhension de la biologie a fait émerger le concept d'holobionte qui désigne le « supra-organisme » constitué de l'hôte eucaryote « complexe » (par ex., animal, végétal ou algue) et de tous les micro-organismes et virus qui interagissent avec lui (i.e., le microbiote). Chez les algues, les micro-organismes colonisent la surface de l'organisme en formant un biofilm composé de polysaccharides, de protéines et d'ADN libre (Figure 1). Dans cette matrice, les cellules interagissent entre elles par 'quorum sensing' ou transfert de gènes, et ont accès à divers molécules et nutriments produits par l'hôte, les épibiontes ou venant de l'environnement. Au sein de l'holobionte se déroule donc un concert d'interactions écologiques (e.g., mutualisme, compétition, parasitisme) dont l'équilibre peut être régulé par l'hôte (e.g., le « microbial gardening » ⁶) ou être perturbés au gré des changements environnementaux. Ces variations induisent des modifications dans la composition et la dynamique du microbiote associé, qui ont par ailleurs des conséquences sur la physiologie, la croissance et/ou l'état de santé de l'hôte ^{7,8}. A l'inverse, un microbiote résilient, capable de s'adapter à des perturbations externes, pourrait être caractéristique d'un holobionte en bonne santé.

Le fonctionnement de l'holobionte « Ulve » suscite aujourd'hui un intérêt scientifique grandissant tant il apparaît aujourd'hui comme une clé essentielle pour répondre aux enjeux évoqués en introduction. Des travaux pionniers ont démontré le rôle prééminent de la flore bactérienne dans la morphogenèse et la croissance des ulves ⁹⁻¹¹. D'autres ont révélé que les ulves modifient profondément la structure des communautés microbiennes environnantes et recrutent spécifiquement certaines bactéries à leur surface avec lesquelles elles établissent des

interactions symbiotiques. Il a été montré que les assemblages bactériens associés aux ulves subissent de considérables variations spatiales et saisonnières en particulier en réponse aux pollutions d'origines anthropologiques et aux stress environnementaux ¹². Ainsi, l'ulve s'impose aujourd'hui comme un modèle pour l'étude du fonctionnement de l'holobionte chez les macro-algues .

Malgré des avancées remarquables, ces travaux centrés sur le compartiment bactérien n'ont fait qu'effleurer la diversité des interactions en jeu; d'autres membres de la communauté microbienne pourraient également jouer un rôle clé dans le fonctionnement de l'holobionte ¹³. On sait très peu de choses sur la relation entre l'ulve et les archées, les micro-algues, les protozoaires, les champignons et les virus qui sont associés à ces organismes ¹⁴. Les virus en particulier ont une forte potentialité d'action au sein de l'holobionte car, ils peuvent non seulement infecter l'hôte, mais aussi d'autres microbes, tels que les bactériophages qui régulent la composition de la communauté bactérienne, ajoutant ainsi un niveau de complexité supplémentaire dans les interactions au sein de l'holobionte ¹⁵. La virologie des macro-algues reste encore aujourd'hui une *terra incognita* qui n'a été que très peu explorée. McKeown et al. ¹⁶ ont découvert des virus dans les laminaires appartenant aux genres *Laminaria* et *Saccharina*, et ont rapporté que les deux tiers des populations hôtes étaient infectées, soulignant l'importance d'incorporer des virus dans les études sur l'holobionte. La première caractérisation d'une communauté virale complète a été réalisée sur une Rhodophycée *Delisea pulchra* et a montré que le virome contenait des virus épiphytes et endophytes et comprenait des virus qui infectent les diatomées et les champignons, et des virus qui induisent la lyse cellulaire ¹⁷. Ces virus peuvent propager des maladies parmi les espèces hôtes ou faire partie du système immunitaire de l'holobionte et peuvent donc avoir des impacts positifs et/ou négatifs sur l'holobionte.

L'objectif scientifique du projet HOLOGREEN est de réaliser une percée décisive dans la compréhension du fonctionnement de l'holobionte « Ulve » et de sa réponse aux variations environnementales pour identifier les déterminants biotiques et abiotique de la croissance algale. Pour cela, nous proposons de mettre en œuvre la première étude intégrée de tous les compartiments de l'holobionte (hôte, eucaryotes microbiens, procaryotes et virus) sur une échelle de temps étendue (suivi ≥ 1 année) et dans des environnements contrastés. Ce projet réunit 3 partenaires académiques (MIO, MARBEC, AFMB) et la société (Eranova) dans un programme de recherche pluridisciplinaire unissant des experts en culture algale, phycologie, microbiologie, virologie, chimie analytique, (meta)-génomique, mathématiques et bioinformatique.

Cette demande de financement doctoral est adossée au projet HOLOGREEN déposé à l'APOG région SUD. Ce projet propose de réaliser une percée décisive dans la compréhension du fonctionnement de l'holobionte « ulve » et de sa réponse aux variations environnementales pour identifier les déterminants biotiques et abiotiques de la croissance algale. Il réunit 3 laboratoires académiques (MIO, AFMB, MARBEC) et une start-up régionale (Eranova). Cette dernière produit de la biomasse d'ulve par culture en bassin et la transforme en bioplastiques. Les partenaires mettront en œuvre un programme de recherche pluridisciplinaire pour réaliser la première étude intégrée de tous les compartiments de l'holobionte (l'algue hôte, eucaryotes microbiens, procaryotes et virus) sur une échelle de temps étendue (≥ 1 an) et dans des environnements contrastés dont principalement l'algoculture. Au delà des avancées scientifiques visées, les retombées du projet concernent le contrôle et la prévention des marées vertes mais aussi le développement biotechnologique pour la production et la transformation de biomasse d'ulve.

Projet doctoral: Au sein de HOLOGREEN, le/la doctorant(e) sera en charge de l'étude de la composante virale de l'holobionte pour élucider son influence sur la croissance de l'algue.

Un aspect original du projet HOLOGREEN est que nous concentrerons notre étude sur les ulves cultivées à échelle industrielle dans des bassins extra-marins de la société Eranova à Port-Saint-

Louis-du-Rhône. Ces cultures intensifiées (analogues à une marée verte perpétuelle) atteignent des densités critiques en algues qui sont favorables à l'apparition d'épidémies virales et représentent donc un environnement potentiellement fécond pour l'étude virologique.

Les deux premiers volets de la thèse viseront à caractériser la diversité et la dynamique des populations virales associées aux ulves par des approches métagénomiques, bioinformatiques et qPCR. Les données métagénomiques permettront d'identifier la nature des virus et de déduire des attributs métaboliques (i.e., gènes accessoires) attestant de leur mécanisme d'interaction avec l'hôte. En conjonction des données produites par nos partenaires, la dynamique des populations virales permettra de caractériser les déterminants biotiques et abiotiques de la réplication des virus, son influence sur la croissance de l'algue et de prédire les hôtes potentiels des virus parmi la flore microbienne et l'ulve elle-même. Les virus identifiés dans le contexte aquacole seront aussi recherchés sur des spécimens d'ulve prélevés dans leurs habitats naturels (étang de Berre et cotes bretonnes), notamment durant les périodes de marée verte pour tester l'implication potentielle de souches virales dans ce phénomène. Le projet ambitionne également d'isoler et de cultiver des virus modèles de l'holobionte en laboratoire. Cette étape plus fastidieuse permettra ensuite de caractériser la morphologie, les génomes viraux dans leur entièreté et de déterminer leur évolution. Elle ouvrira ainsi la voie à l'étude moléculaire des interactions avec leur hôte pour comprendre la diversité des mécanismes infectieux sous-jacente à l'immense diversité génétique virale observée dans la plupart des écosystèmes planétaires.

Ces travaux doctoraux permettront d'adresser les questions suivantes:

- Les communautés virales associées aux ulves varient-elles selon les écosystèmes investigués et la flore microbienne de l'holobionte?
- Les virus sont-ils impliqués dans les dynamiques des marées vertes et/ou la nécrose des ulves ?
- Quels déterminants abiotiques corrént avec la dynamique des populations virales ?
- Diversité et évolution des virus marins
- Variété des mécanismes infectieux viraux

Méthodologie: Le programme des recherches décliné sur 3 axes et s'appuiera sur une série longue d'échantillonnages des bassins de culture d'ulves (janvier à décembre 2021). Des échantillonnages ponctuels de marée verte seront aussi réalisés en 2022-2023 sur les sites de l'étang de Berre et Bretagne pour l'étude comparative.

La première tâche vise à dresser un inventaire de la biodiversité des virus à ARN et à ADN présents dans le bassin en utilisant une approche méta-génomique développée par le groupe de virologie du MIO (C. Desnues/G. Blanc). Six échantillons bimensuels seront utilisés à cette fin. Avec le soutien de Sonia Bouchard (IE CNRS virologie environnementale- MIO), le doctorant purifiera les ultra-viromes (0.2µm-100kDa; virus classiques) et les méga-viromes (0.8µm-0.2µm ; virus géants) à la surface des thalles et dans le liquide de culture; les ARN et les ADN viraux des 2 fractions seront extraits pour être analysés par séquençage à haut débit DNA-seq (génomes d'ADN) et de RNA-seq (génomes d'ARN). Le doctorant participera à la construction des bibliothèques de séquençage et à la manipulation du séquenceur Illumina MiSeq de l'IHU (Institut Hospitalo-Universitaire de la Timone, Méditerranée Infection). Avec l'aide des bioinformaticiens du MIO, et il sera chargé de l'analyse des séquences générées, y compris l'assemblage et l'annotation des métagénomomes. En utilisant ces données, il établira la diversité virale globale du bassin, reconstruira les séquences du génome des espèces virales les plus abondantes et déterminera leurs capacités métaboliques.

La deuxième tâche propose d'étudier la dynamique des populations virales au cours de la saison de production des bassins et identifier les facteurs biotiques (biomasse algale, populations microbiennes) et abiotiques (nutriments, charge en MO, salinité, pH, T°C) qui co-varient avec ces

dernières. Les acides nucléiques des échantillons hebdomadaires (surface des thalles et eau environnante traitées séparément), ainsi que les échantillons de marées vertes de l'étang de Berre et Bretagne seront extraits. Le doctorat effectuera une analyse quantitative (RT-)PCR sur la série chronologique de métagénomés (ARN et ADN) afin d'estimer les abondances des virus ciblés au fil des saisons. Les amorces PCR seront conçues pour amplifier spécifiquement les séquences de virus potentiellement intéressants identifiés dans les données métagénomiques (tâche 1) ou de virus isolés (tâche 3). En parallèle, la dynamique des populations procaryotes et micro-eucaryotes sera déterminée sur les mêmes échantillons par le partenaire MARBEC (Angélique Gobet, CR IFREMER) par approche barcoding 16S et 18S respectivement. Les paramètres physico-chimiques de la culture (T°, pH, O₂, CO₂, chl) seront enregistrés en continu par une sonde installée dans le bassin d'étude. Les quantifications de biomasse produite en bassin seront fournies par Eranova. La comparaison de ces séries de données (Barcodes, qPCR, paramètres physico-chimiques) permettra de caractériser l'influence réciproque de l'algue, des virus, de la flore microbienne et des facteurs abiotiques sur la dynamique des populations respectives. Cette étude permettra de répondre à une question importante posée par le partenaire industriel: les virus ont-ils un impact sur la production d'algue du système ?

Dans le troisième volet du projet, le doctorant participera au développement d'une souchothèque de micro-organismes et de virus modèles représentatifs de l'holobionte ulve. Dans le cadre du projet HOLOGREEN, notre ingénieure Sonia Bouchard assurera l'isolement de micro-algues et de protozoaires issus des bassins de culture des ulves. Le doctorant s'appuiera sur cette collection d'eucaryotes unicellulaires et sur des cultures d'ulve en laboratoire pour isoler des virus du bassin capable d'infecter ces organismes. Pour cela, il utilisera des approches de plaque assay sur milieu solide et/ou de co-cultures liquides utilisées en routine au laboratoire. Il pourra aussi s'appuyer sur la plateforme de cytométrie du MIO pour réaliser le tri des particules virales et caractériser la dynamique des lyses virales. Le doctorant décrira la morphologie (TEM), le cycle infectieux (microscopie) et le génome (séquençage) des virus isolés, ce qui ouvrira la voie à la caractérisation moléculaire de l'interaction virus-hôte et du cycle infectieux (e.g. transcriptomique/protéomique).

Plan de travail :

	2021	2022	2023	2024
Task 0: Sampling and preparation.				
Eranova basins weekly/monthly sampling	■	■	■	
Punctual nat. env. sampling (Berre, Bretagne)		■	■	
Nucleic acid prep for task 1 and 2		■	■	
Physicochemical parameters (plateforme chimie MIO)	■	■	■	
Task 1: Virome metagenomics.				
DNA-seq/RNA-seq libraries for bimensual samples		■	■	
ADN/ARN metaG sequencing (IHU sequencing facility)		■	■	
Sequence analysis - bioinformatics		■	■	■
Task 2: Viral population dynamics.				
Design and test of primers for qPCR		■	■	
Pop. data acquisition (qPCR) on weekly & nat. env. samples		■	■	■
Interpretation		■	■	■
Task 3: Virus isolation.				
Participation to isolation and lab. culture of microalgae and protists from the ERANOVA basins (S. Bouchard)	■	■	■	
Plaque assays and liquid co-cultures w/ weekly samples to isolate μ -eukaryotic viruses from the basins.		■	■	■
Virus characterization (microscopy, genomics) upon success of isolation, including ulva viruses isolated by IMBE		■	■	■
Task 4: PhD thesis writing				
				■

Task responsibility:

■ PhD candidate

■ Partners