

GENETIQUE MOLECULAIRE ET AQUACULTURE : PERSPECTIVES
ET EXEMPLE D'APPLICATION
SUR LES MICROALGUES MARINES.

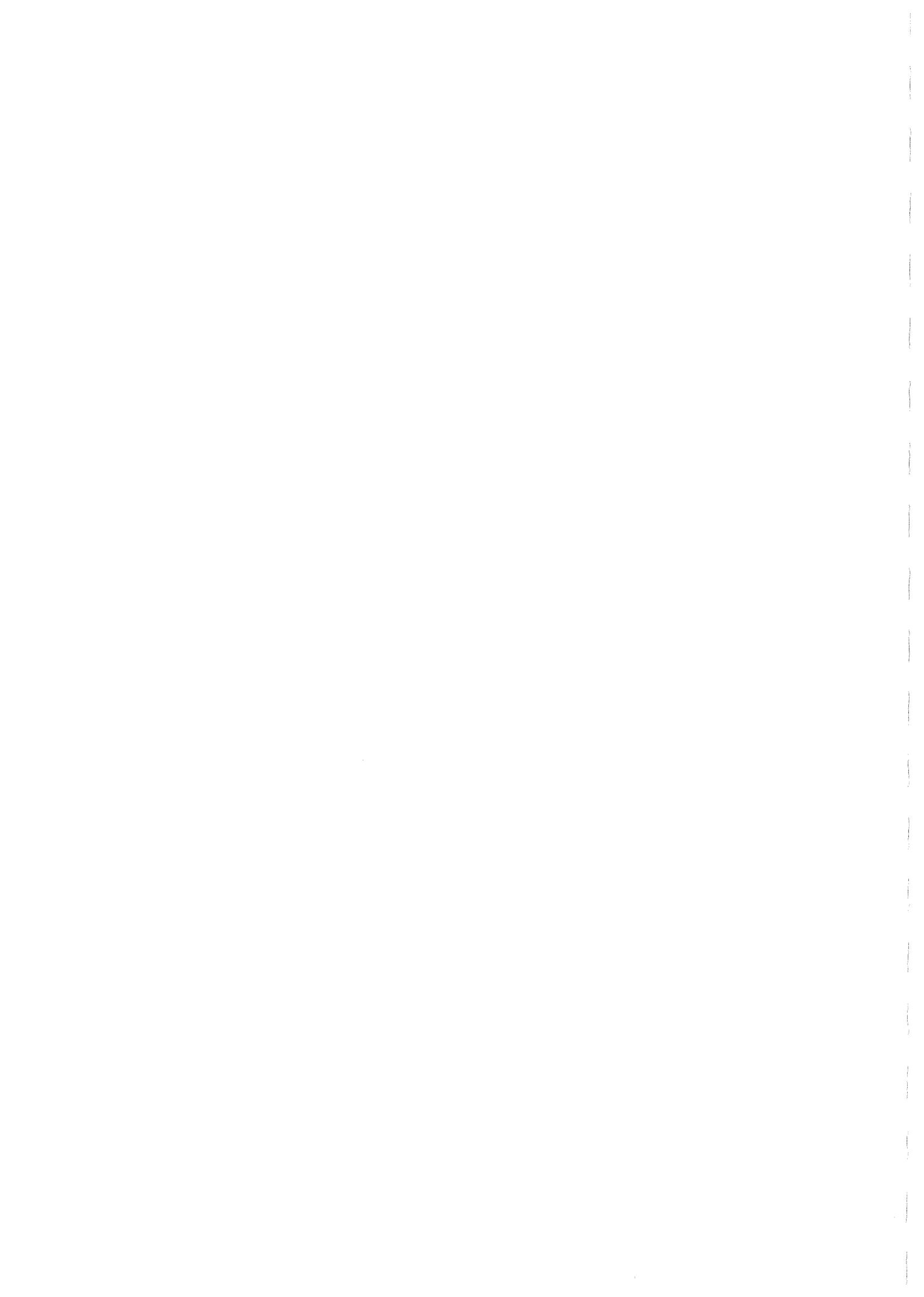
Nicole DEVAUCHELLE
IFREMER
BP 70
29280 - PLOUZANE

DEA de Biologie cellulaire et moléculaire
et Sciences de la santé

Université de Rennes I et de Bretagne Occidentale.

Septembre 1990

Ce travail a été réalisé dans les installations du laboratoire PMDC de l'Ifremer/BREST et au laboratoire d'algologie du Centre de Biologie de ROSCOFF avec l'aide de Gilles Salaun et Susan de GOER.



Ce travail a été réalisé dans les installations du laboratoire PMDC de l'Ifremer/BREST et au laboratoire d'algologie du Centre de Biologie de ROSCOFF avec le concours de Gilles Salaun et Susan de GOER.

1

GENETIQUE MOLECULAIRE ET AQUACULTURE : PERSPECTIVES ET EXEMPLE
D'APPLICATION
SUR LES MICROALGUES MARINES.

N. DEVAUCHELLE
IFREMER
BP 70
29280 _ PLOUZANE

PREMIERE PARTIE

PERSPECTIVES D'APPLICATION DES OUTILS DE LA GENETIQUE MOLECULAIRE EN
AQUACULTURE.

INTRODUCTION.	Page 2
I.1 L'AQUACULTURE.	4
I.2 AQUACULTURE et GENETIQUE MOLECULAIRE.	6
I.2.1 Les buts.	6
I.2.2 Les outils.	8
CONCLUSION	9

SECONDE PARTIE

PROFILS DE RESTRICTION DE L'ADN CHLOROPLASTIQUE DE MICROALGUES MARINES.

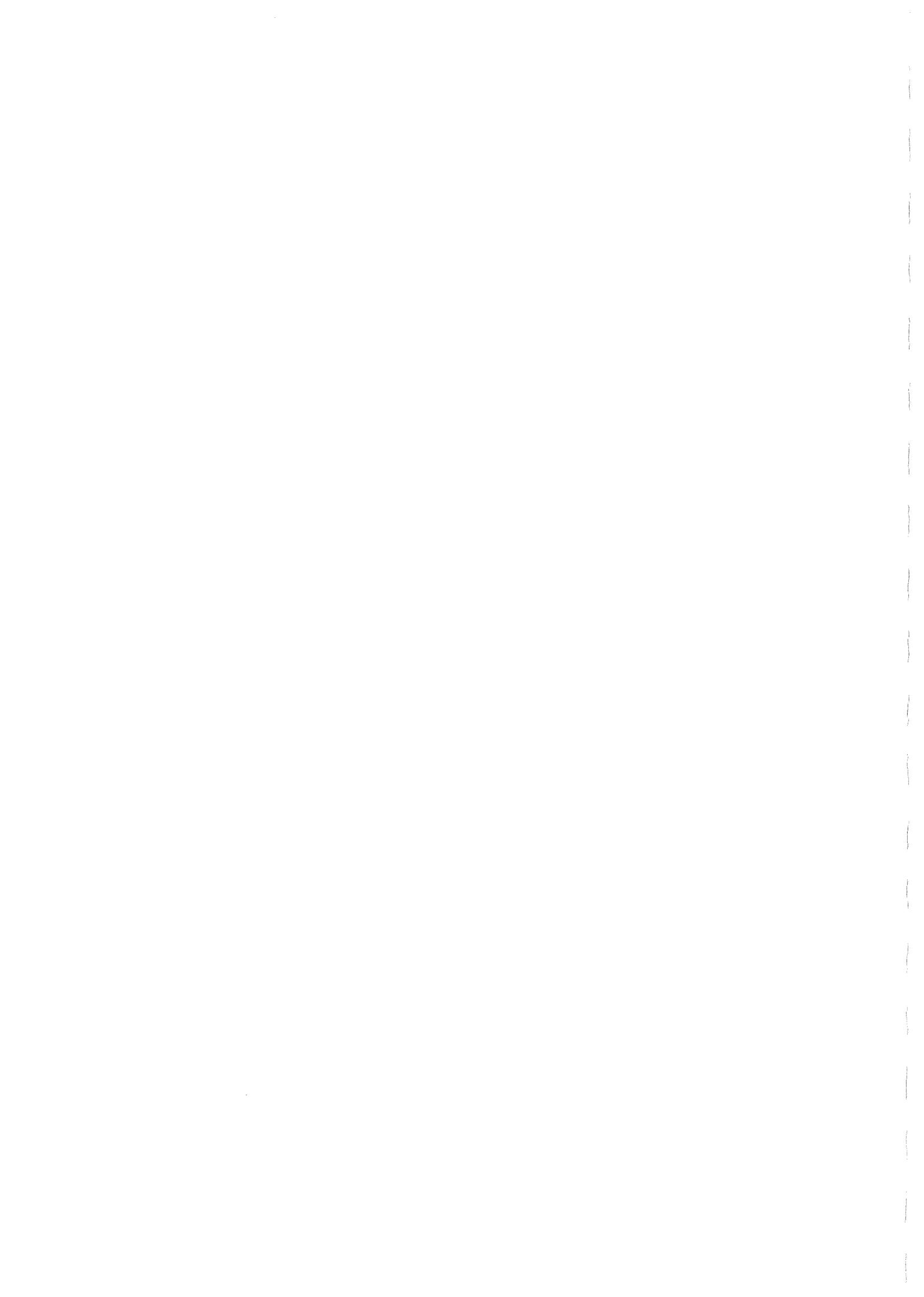
INTRODUCTION.	11
II.1 MATERIEL ET METHODES.	13
II.1.1 Culture des microalgues.	13
II.1.2 Extraction de l'ADN chloroplastique.	16
II.1.3 Traitement de l'ADN chloroplastique par les enzymes de restriction.	20
II.1.4 Test de la pureté de l'ADN chloroplastique.	21
II.2 RESULTATS.	21
II.2.1 Les cultures de microalgues.	21
II.2.2 L'ADN	25
II.2.2.1 Plan expérimental suivi.	25
II.2.2.2 Résultats détaillés.	27
II.3 DISCUSSION ET PERSPECTIVES.	31
II.3.1 Les techniques.	
II.3.2. Les résultats.	
CONCLUSION GENERALE.	33
BIBLIOGRAPHIE ET REMERCIEMENTS	34

INTRODUCTION GENERALE

La révolution des techniques utilisées en biologie cellulaire ces vingt dernières années donnent une conception nouvelle et évolutive du fonctionnement et de l'architecture de la cellule. L'intégration de ces données est indispensable au travail du biologiste attaché au développement de l'aquaculture, comme à celui de tout autre biologiste.

L'utilisation des nouvelles techniques n'est toutefois pas nécessaire à toutes les recherches. La biologie moléculaire et cellulaire a ses domaines de prédilection. Nous allons tenter, dans la première partie de ce rapport, de pointer ceux qui en aquaculture peuvent en bénéficier le plus. La seconde partie illustrera concrètement nos propos.

PREMIERE PARTIE



PREMIERE PARTIE

PERSPECTIVES D'APPLICATION DES OUTILS DE LA GENETIQUE MOLECULAIRE EN
AQUACULTURE.

INTRODUCTION.

I.1 L'AQUACULTURE

Page 4

Aquaculture traditionnelle et nouvelle.
Chiffres de production mondiale et française.

I.2 AQUACULTURE ET GENETIQUE MOLECULAIRE

6

I.2.1 Les buts.

6

I.2.2. Les outils.

8

CONCLUSION.

9

INTRODUCTION.

Situer l'importance d'une activité d'un point de vue économique permet de mieux saisir l'intérêt d'y développer une recherche. Avant de plonger dans le domaine de la génétique moléculaire, nous avons donc fait un point chiffré de l'aquaculture mondiale et française.

I.1 L'AQUACULTURE

On entend ici par aquaculture toutes les activités d'élevage en eaux douces, en eaux saumâtres et en eaux de mer destinées à la consommation humaine. L'aquaculture traditionnelle, la plus ancienne, est souvent opposée à l'aquaculture nouvelle, celle de la seconde moitié du XX^e siècle. L'ensemble produit en tonnage au niveau mondial environ 20% de la production par pêche soit 13 100 tonnes (tableau A). En tête des activités d'aquaculture se situent les poissons (52%), les algues (22%) et les bivalves (20%).

L'aquaculture traditionnelle est une aquaculture simplifiée : elle se résume, pour les élevages en mer à une capture ou à un captage d'animaux issus de reproduction naturelle et à leur transfert dans des zones propices à l'élevage. Soit les animaux dépendent de l'homme pour leur alimentation, ce qui fut longtemps le cas pour la sériole au Japon, et qui est encore le cas pour les crustacés de la ceinture intertropicale, soit ils s'en passent. Ils profitent alors des productions naturelles primaires et secondaires du milieu naturel (valliculture italienne, cultures de moules et d'huitres en France, coquilles St Jacques au Japon). Dans le cas des élevages en eaux douces, l'aquaculture traditionnelle correspond à des élevages de poissons dont les larves nécessitent peu de soins à l'éclosion : grandes larves ayant un important vitellus (truite), larves protégées par un parent (tilapia) etc.... Avant la pratique des fécondations artificielles, elle correspondait aussi à du grossissement de juvéniles capturés dans le milieu naturel (BILLARD, 1980). Le dénominateur commun des espèces d'aquaculture traditionnelle est la relative simplicité des systèmes d'élevage.

Par opposition à l'aquaculture traditionnelle, outre les impératifs de marché et de sites d'élevage décisifs dans toute activité d'élevage rentable, l'aquaculture nouvelle se heurte à des particularités biologiques qui compliquent l'élevage. Il est impératif de contrôler la reproduction des espèces en éclosérie. Pour une grande majorité d'entre elles, les larves sont petites et s'alimentent très tôt (coquille St Jacques, palourde, bar, turbot, crustacés). Il convient alors, et c'est une des difficultés majeures de l'aquaculture dite nouvelle, de leur fournir une nourriture spécifique dès l'éclosion. Les salmonidés marins ont de grandes larves. Leur particularité biologique réside plutôt dans un comportement migrateur. On peut penser que certaines procédures d'élevage se simplifieront au fil du temps, si l'aquaculture relance la reproduction naturelle et permet en passant par le captage ou la capture de larves de se passer du contrôle artificiel de la reproduction. C'est du moins envisagé pour certaines espèces, la coquille St Jacques française notamment (BOUCHER et DAO, 1989).

	* Monde (données 1987)	** En France (données 1989)	*** En Bretagne (données 1989)
Poissons	6 800	34	13
Mollusques	3 140	182	41
Algues	3 140	0,1	0,1
Crustacés	580	0,6	0
Total	13 180	212	54

Tableau A : L'aquaculture en milliers de tonnes.

Sources : * FAO, 1989.

** FAO, 1986.

MINISTERE DE L'AGRICULTURE 1986.

LAUREC, 1989, QUERELLOU ET BORIES, In press

*** DIRECTION REGIONALE DES AFFAIRES MARITIMES,
1987.

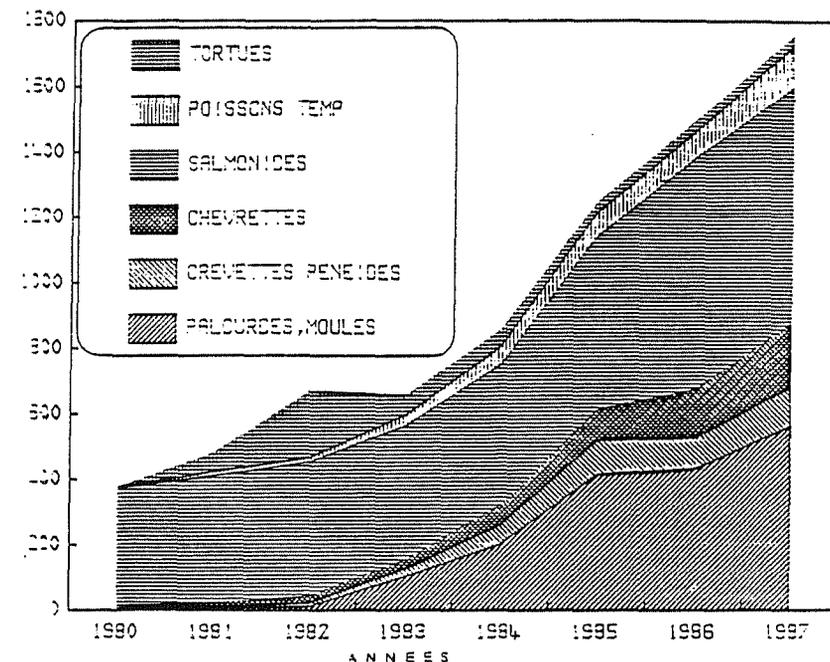


Figure A : Evolution de l'aquaculture marine française.

Source : DOSDAT, 1988

En France, la production par aquaculture était estimée en 1989 à 212 000 tonnes, soit 1.6 % de la production aquacole mondiale (tableau A). Elle concerne 4 catégories d'êtres vivants, par niveau de production décroissant : les mollusques bivalves, les poissons, les crustacés, les algues et les tortues (figure B). L'aquaculture qui aujourd'hui a un réel impact économique est l'aquaculture traditionnelle (98.8% des tonnages produits, 93.5 % en valeur à la production). Elle représente un peu plus de 20% des valeurs débarquées par pêche. Celle des bivalves (huîtres et moules) constitue 83.7 % de la production. Elle crée 20000 emplois permanents et saisonniers. Celle des poissons d'eaux douces (33000 tonnes, 88 % de truites et 12 % de poissons blancs) représente 15.6 % de la production en aquaculture traditionnelle. Ces activités connues dès le moyen âge ont réellement pris leur essor au XVIII^e et XIX^e siècle : la mise au point des méthodes de fécondation artificielle par l'allemand JACOBI (VIVIER, 1972) fut le point de départ des élevages de truites, les méthodes de captage développées par le français COSTE celui des huîtres (MARTEIL, 1979).

Avec 3000 tonnes de production annuelle, l'aquaculture nouvelle représente 1,1 % de la production aquacole française, 5/6 % en valeur (LAUREC, 1989, QUERELLOU et BORIES, in press). Initiée vers les années 1960/1970, elle est en constante progression (figure B). L'aquaculture nouvelle française sera essentiellement intensive. Elle se pratique à concentration élevée d'animaux placés en cage, bassins, étangs avec apport important d'aliments ou semés en pleine mer sans apport de nourriture lorsqu'il s'agit de filtreurs peu mobiles telles les palourdes et les coquilles St jacques.

I.2 AQUACULTURE ET GENETIQUE MOLECULAIRE

I.2.1 Les buts.

Il y a, on le voit plusieurs stratégies d'élevage possibles. Elles résultent du poids relatif des données économiques, des sites d'élevage disponibles et des caractéristiques biologiques des espèces. Un numéro spécial d'EQUINOXE (ANONYME, 1989) résume bien la diversité des voies d'élevage. Une des plus complexes est empruntée par des bivalves filtreurs, la coquille st jacques notamment dont le cycle d'élevage est résumé à titre d'exemple figure B.

Si l'on se place au niveau des difficultés biologiques de l'aquaculture, le recours aux techniques de génie génétique appelé aussi génétique moléculaire présente l'avantage de pouvoir analyser l'exprimé face à l'acquis génomique.

Cette démarche offre des perspectives intéressantes pour les aspects sélection (résistance à des maladies ou à des milieux extrêmes) et transformation d'une espèce. En aquaculture, les domaines d'application privilégiés sont les indicateurs de santé (prépathologie), la caractérisation, le diagnostic et la prévention de maladies connues, la génétique, enfin le contrôle hormonal des grandes fonctions physiologiques, notamment la croissance et la reproduction.

La compréhension des mécanismes physiologiques de la croissance et de la reproduction des poissons a d'ores et déjà bénéficié des outils de la génétique moléculaire (KOREN et al, 1988, HEW et al, 1989, RENTIER et al, 1989, PAKDEL et al, 1990, SALBERT et al, 1990, QUERAT et al, 1990).

Le CYCLE BIOLOGIQUE ET L'ÉLEVAGE de la COQUILLE ST-JACQUES

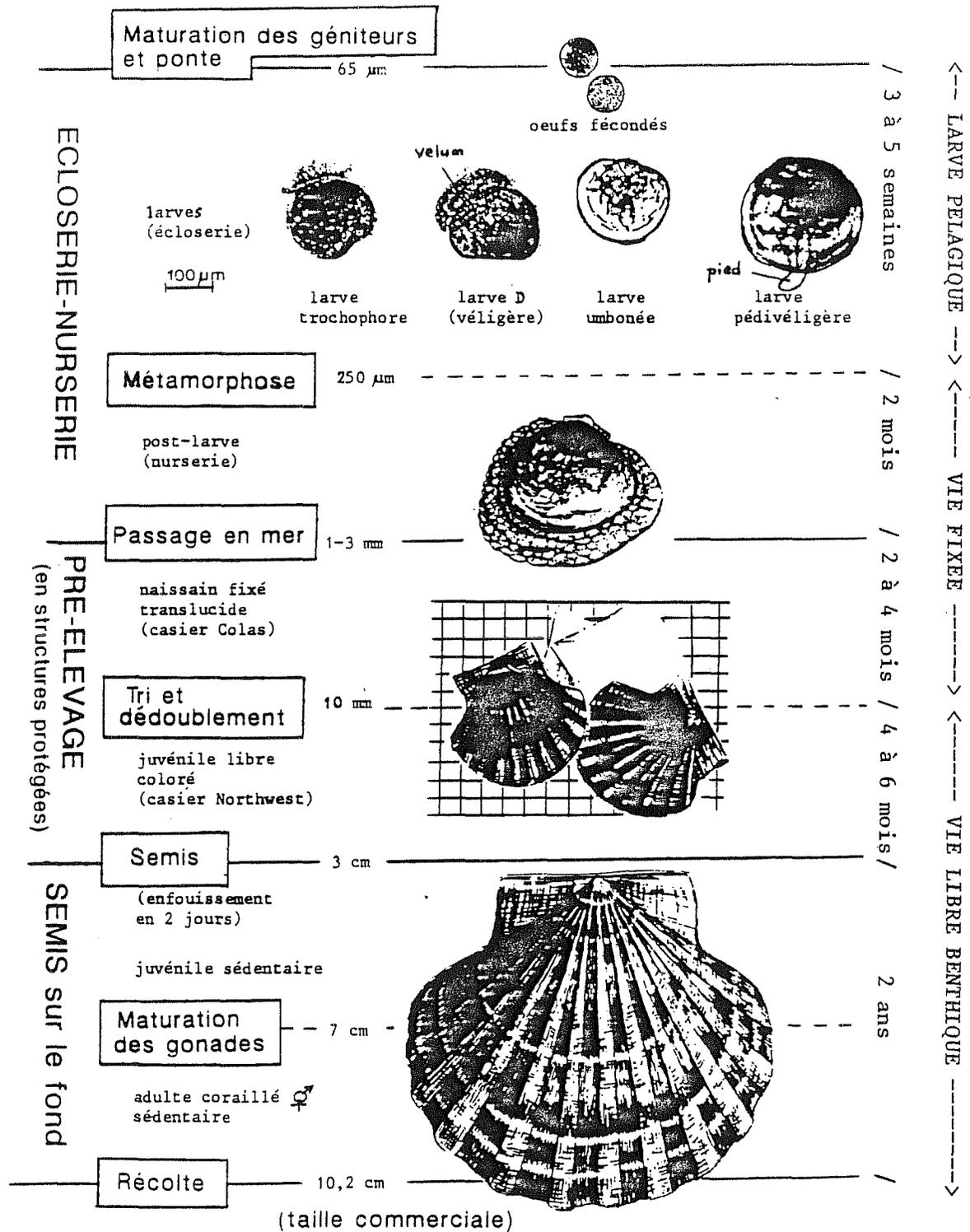


Figure B : Stratégie d'élevage de la coquille st Jacques.
Source : ANONYME, 1990.

En France, l'urgence à traiter certains problèmes tels que les epizooties, la pollution et la surcharge des bassins d'élevage qui touchent la conchyliculture -représentant 1.4 milliard de francs (données 1988) ou 97.5% de la valeur des productions aquacoles françaises- incite à utiliser d'abord ces outils en pathologie, "prépathologie" et croissance des mollusques (COUSIN et al (1989), Van WORMHOUDT et al, 1990, MIAHLE et al, 1989).

D'aucuns pensent qu'à terme, ces outils devraient surtout aider à déterminer les meilleurs compromis "génotype-milieu" soit pour faire fléchir une espèce vers un métabolisme particulier en modifiant son milieu de culture (cas des algues unicellulaires), soit pour choisir la population la mieux adaptée à un milieu d'élevage donné.

Aujourd'hui les outils utilisés appartiennent essentiellement aux outils de reconnaissance, un peu aux outils de transformation. Comme, "Par sa vision réductionniste des mécanismes vitaux, la biologie moléculaire est une science dont l'universalité s'applique à l'ensemble des êtres vivants, qu'ils appartiennent au règne végétal ou animal ou qu'ils vivent en milieu aquatique ou terrestre" (ALZIEU et BOURGOIN (1990), ses techniques instrumentales élaborées pour la médecine, l'agronomie et l'industrie des biotechnologies sont transposables à nos champs de recherche.

Dans tous les cas, les outils de la génétique moléculaire représentent pour le biologiste aquaculteur une occasion de compléter une panoplie d'outils traditionnels qu'il continuera à utiliser tout particulièrement en biométrie, physiologie et génétique.

Compte tenu des objectifs, les études devraient se situer indifféremment au niveau de l'ADN, de ses produits de transcription (ARN) et de traduction (protéines).

I.2.2 Les outils.

Les outils de reconnaissance permettront particulièrement :

- d'identifier espèces ou souches cultivées, ou dans le cas d'une pathologie, virus et bactéries par les profils de restriction, les cartes physiques et génomiques des ADN organitiques. Ces techniques sont déjà utilisées en aquaculture, pour distinguer les populations de saumon (PAVLA et al, 1989). L'étude présentée dans la seconde partie de ce rapport rentre dans ce domaine d'application.
- de discriminer espèces et(ou) variétés dans un but de sélection. Les techniques de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) sont alors utilisables comme critère de sélection précoce, comme cela se fait pour les plantes (LEFORT-BUSON et al, 1990a) afin de réduire le nombre de candidats à sélectionner par voie classique (LEFORT-BUSON et al, 1990b).
- de retrouver un gène à partir d'une protéine industrielle, d'une protéine produite par un pathogène ou traduisant un désordre profond (activation des oncogènes par exemple) voire au contraire une réaction bénéfique anti-infectieuse. Sont alors utilisées en association chromatographies, western, northern et southern blots.

- de situer un gène à partir de sondes hétérologues (techniques d'hybridation) pour plus tard créer une sonde homologue par séquençage. Ceci est d'ores et déjà pratiqué pour les hormones de croissance des poissons (cf paragraphe I.2.1).

- d'estimer le niveau de transcription ou de traduction d'un gène dans un environnement donné. Les western, southern et northern blot sont aussi complétés de chromatographies. L'analyse peut se faire sur des cellules tissu spécifiques, des cellules indifférenciées en culture ou prélevées in vivo. Cette approche est particulièrement séduisante pour étudier les relations entre xénobiotiques et organisme vivant.

Par les outils de transformation on peut envisager surtout :

- de créer des lignées cellulaires spécifiques utilisables en tant que support à des études de biotoxicité, de pathologie ou de pharmacodynamique.

- de tenter d'introduire un gène dans un génome. On rentre là dans le domaine de la transgénie qui sous-entend contrôle de l'introduction de gènes (par diverses méthodes : électroporation, virus transformés, rétrovirus, transposons...), et leur expression. Malgré son cortège de difficultés techniques et juridiques (HOUDEBINE, 1987, AVERT, 1990) offre néanmoins des applications intéressantes en prévention des maladies (vaccinations, résistances) et potentialités de croissance.

Les compléments souvent obligés aux procédures citées sont les techniques de clonage, la PCR (Polymerase Chain Reaction) et le séquençage.

CONCLUSION

Il est séduisant de pouvoir utiliser l'ensemble des techniques mises au point ces 15 dernières années dans le domaine du génie génétique. La modestie dans les objectifs est toutefois de rigueur car un abîme de connaissances sépare les espèces d'intérêt aquacole des mammifères, de la drosophile ou des plantes, principales cibles de la génétique moléculaire.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

SECONDE PARTIE

SECONDE PARTIE.

PROFILS DE RESTRICTION DE L'ADN CHLOROPLASTIQUE DE MICROALGUES MARINES.

INTRODUCTION	Page 11
II.1 MATERIEL ET METHODES	13
II.1.1 Culture des microalgues.	13
Conditions générales de culture	13
Espèces étudiées - Rappels de biologie	13
II.1.2 Extraction de l'ADN chloroplastique.	16
Centrifugation des algues, traitement des algues et	
récupération des acides nucléiques totaux	16
Séparation de l'ADN nucléaire, chloplastique et	
mitochondrial	20
II.1.3 Traitement de l'ADN chloroplastique par les enzymes de	
restriction	20
Enzymes utilisés	20
Electrophorèse et révélation des profils	20
II.1.4 Test de la pureté de l'ADN chloroplastique extrait	21
Sondes employées	
Préparation des sondes	
Hybridation	
II.2 RESULTATS	21
II.2.1 Les cultures de microalgues	21
II.2.2 L'ADN	25
II.2.2.1 Plan expérimental suivi	25
II.2.2.2 Résultats détaillés	27
*Pureté de l'ADN chloroplastique	
*Meilleure méthode d'extraction et de traitement	
*Quantités extraites	
*Densité	
*Profils de restriction	
II.3 DISCUSSION ET PERSPECTIVES	31
II.3.1 Les techniques	
II.3.2 Les résultats	

INTRODUCTION

Les algues unicellulaires isolées du plancton marin et mises en culture contrôlée ont constitué la nourriture de base la plus courante pour alimenter les jeunes stades de bivalves marins élevés en écloserie (EPIFANIO, 1981, WEBB and CHU, 1981, CHRETIENNOT-DINET et al, 1986), et ce depuis les essais fructueux de COLE en 1937 pour nourrir des larves d'huitres. En utilisant ces mêmes algues unicellulaires pour nourrir les proies vivantes (rotifères, artémias) distribuées aux larves de poissons, leur intérêt pour l'aquaculture s'est considérablement élargi (LE BORGNE, 1986)

Une trentaine d'algues, appartenant à 7 familles différentes sont cultivées en routine (AUDINEAU et al, 1985). Leur composition biochimique est caractéristique non pas d'une espèce, mais d'une souche. Par ailleurs la "qualité" nutritive de l'algue varie avec sa taille, sa digestibilité (PIERSON, 1983), l'âge de la culture, les formes (mobile, immobile) de l'algue et bien entendu la composition du milieu d'élevage (PARSONS et al, 1961, LAING, 1985, WIKFORS, 1986, UTTING, 1985). Constituant tout ou une partie importante de la nourriture des animaux marins produits en écloserie, de nombreux travaux se sont développés pour chercher l'espèce ou la souche la mieux adaptée à un élevage en tenant compte de l'espèce et du stade élevés. Aujourd'hui l'ensemble de ces travaux a permis de mettre en exergue le caractère hypervariable des cultures d'algues : hypervariable dans les productivités, dans les formes (mobile, immobiles) obtenues en culture, dans les compositions biochimiques (DELAUNAY et al, 1990) le niveau des contaminations bactériennes ou des contaminations entre souches d'algues. Pour clarifier ce dernier point, précisons que certaines espèces et surtout les différents clones d'une espèce n'étant pas différenciables morphologiquement, les laboratoires d'aquaculture conservent l'identité des souches d'algues recues, un jour d'un laboratoire spécialisé, par "hérédité" lors du repiquage. Mais des erreurs sont régulièrement relevées.

La nécessité de stabiliser et d'améliorer les cultures d'algues unicellulaires marines a tout naturellement suivi ces observations et conduit à engager pour les prochaines années des programmes de recherche interorganismes français dans ce domaine.

Le travail de DEA présenté se situe dans ce contexte. Il porte sur la réalisation de profils de restriction de l'ADN plastidial qui pourraient répondre à deux importantes questions dont la première est préliminaire à tout travail sur les algues : 1° Quel moyen développer pour identifier de manière irréfutable ce que l'on cultive?

2° quelles sont les aptitudes des différentes espèces à produire telle protéine ou tel conjugué protéique intéressant l'aquaculture ou toute autre industrie des algues (cosmétologie, pharmacologie par exemple). Dans ce domaine, la liste des produits intéressants est longue, ainsi que le souligne CALLEGARI, 1989.

Le choix de l'ADN plastidial repose sur plusieurs critères : en premier lieu il offre, chez les plantes supérieures ou inférieures l'avantage par rapport à l'ADN mitochondrial d'être court. Son génome n'excède pas 200 KB (PALMER, 1986, CATTOLICO et LOISEAUX de GOER, 1989). Par ailleurs, il enregistre plus rapidement dans le temps les mutations et événements marquants même s'il est plus constant que l'ADN mitochondrial au niveau de l'expression protéique (BONHOMME et al, 1989) : ses profils devraient donc être de bons marqueurs. Plusieurs travaux principalement axés sur l'étude des distances phyllogénétiques des espèces ont d'ailleurs montré la spécificité des ADN de chloroplastes chez les plantes supérieures (QUETIER et VEDEL, 1977) ou leur intérêt pour différencier plusieurs populations d'une même espèce, chez *Olisthodiscus luteus* (REITH et CATTOLICO, 1986) ou *Bryopsis* sp. (MISONOU et al., 1989). De plus, bien que ne représentant que 10% de l'ADN nucléaire (MARKOWICZ, 1988), l'ADN plastidial a l'avantage d'être mieux représenté quantitativement dans les cellules que l'ADN mitochondrial. De ce fait, on peut raisonnablement espérer obtenir des profils de restriction sans faire appel aux opérations de clonage ou d'amplification par PCR souvent nécessaires à l'obtention de profils et d'hybridations.

L'ADN plastidial n'est cependant pas facile à extraire, surtout chez les algues brunes contenant beaucoup de polysaccharides ou enrobées de mucus épais. Ce travail consistera donc pour une grande partie à extraire proprement l'ADN plastidial et à trouver les enzymes de restriction appropriées à l'obtention de profils de restriction simples à lire et complémentaires. Un travail mené sur *Pavlova* (SCARAMUZZI et HILLER, 1989) montre d'ores et déjà que cela est possible, mais la littérature ne détaille pas les techniques de traitement des cellules algales et de son ADN. Pour les développer sur nos microalgues marines, nous nous inspirerons des travaux menés sur des algues brunes macrophytes : *Pylaiella littoralis* (ALDRICH et al, 1982, LOISEAUX de GOER et al, 1988, MARCKOWICZ, 1988), *Olisthodiscus.luteus* (REITH et CATTOLICO, 1986) *Dictyota dichotoma* (KUHSEL et KOWALLIK, 1985), toutes proches phyllogénétiquement des deux algues que nous avons retenues comme modèle d'étude : *Pavlova.1* et *Isochrysis g.*.

II.1 MATERIEL ET METHODES

Les cultures de microalgues sont réalisées au laboratoire Physiologie, Microbiologie et Diversification de la Conhyliculture de l'IFREMER/BREST dirigé par J.C.DAO, l'extraction des acides nucléiques, à l'IFREMER/BREST ou au laboratoire d'algologie de ROSCOFF dirigé par B.KLOAREG.

II.1.1 Culture des microalgues

Conditions générales de culture et mesures.

Les cultures se déroulent en axénie dans une salle climatisée entre 18 et 20°C dans des ballons de verre de 20 litres. Les ballons remplis d'eau de mer pompée dans la rade de Brest et filtrée à 1 µm, sont autoclavés et ensemencés en algues à partir de souches axéniques provenant de l'IFREMER/BREST et du laboratoire d'algologie de MILFORD (CONNECTICUT/USA). Dans le premier cas, il s'agit de souches-filles repiquées tous les 15 jours qui peuvent dans nos conditions être de temps en temps contaminées et que l'on renouvelle régulièrement auprès de laboratoires spécialisés d'algologie, tel celui de Milford.

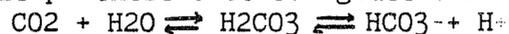
Le jour de la mise en culture, l'eau de mer est enrichie du milieu de CONWAY stérile (tableau 1) à raison de 1 ml / litre d'eau de mer. Pour activer la multiplication cellulaire, le bouchon hermétique du ballon est équipé d'une arrivée d'air mélangé à du gaz carbonique dans la proportion de 2 à 3% et pour éviter les surpressions, d'une sortie d'air. Avant l'arrivée dans le ballon les gaz sont filtrés sur un filtre à membrane, à 0,22 µm. Toute contamination bactérienne est ainsi évitée. La filtration permet aussi d'arrêter l'huile provenant occasionnellement des compresseurs.

L'arrivée des gaz a trois rôles :

- éviter l'agglomération des algues et donc leur mortalité précoce en les maintenant en suspension.

- forcer la multiplication cellulaire.

- maintenir le pH entre 8 et 8.2 grâce à la réaction:



L'apport en CO₂ est d'autant plus important que les cultures sont en permanence soumises à un éclaircissement de 6000 à 8000 lux.

Ainsi conduite, la culture passe par quatre phases de développement résumées sur la figure 1

Selon l'origine et la bonne santé des souches utilisées la culture atteint sa phase de plateau en 10 - 20 jours. C'est à ce moment que l'on effectue les prélèvements. Les concentrations algales sont estimées à partir d'observations en microscopie photonique sous cellules de Malassey. Les éventuelles pollutions bactériennes sont notées en même temps. L'identité des espèces sera faite par microscopie photonique à contraste de phase et microscopie électronique, après traitement des algues (tableau 2)

Espèces étudiées - Rappels de biologie

Deux espèces ont été étudiées dans ce travail : *Pavlova lutheri* et *Isochrysis galbana*. Pour cette dernière la souche tahitienne de *Isochrysis* g. (clone T.ISO ou tahitien) bien connue pour ses performances en aquaculture et la souche locale ont été suivies en parallèle.

Les 2 espèces sont des algues chromophytes appartenant à la classe des HAPTHOPHYCAE ou PRYMNESIOPHYCAE (GREEN, 1975, GREEN et PIENARR, 1977) et traditionnellement cultivées de par le monde dans les écloséries de poissons et de mollusques filtreurs : essentiellement les bivalves.

SOLUTION PRINCIPALE

H ₂ O	1	l	
Na ₂ EDTA	45	g	
Na NO ₃	100	g	Nitrate de Na
H ₃ BO ₃	33,6	g	Acide Borique
Na H ₂ PO ₄	20	g	Dihydrogénophosphate de Na
Mn Cl ₂ 4H ₂ O	0,36	g	Chlorure de Manganèse
Fe Cl ₃ 6H ₂ O	1,3	g	Chlorure Ferrique
Trace de métaux	1	ml	

Dosage : 1 ml par litre d'eau de mer

SOLUTION TRACE DE MÉTAUX

Zn Cl ₂	2,1	g
Co Cl ₂ 6H ₂ O	2,0	g
NH ₄ 6 MO ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0,9	g
Cu SO ₄ 5H ₂ O	2,0	g
Eau distillée	100	ml

Dosage : 1 ml/litre de solution + H Cl pour dissoudre les sels et obtenir une solution limpide.

SOLUTION VITAMINIQUE

Thiamine aneusine Hydrochloride (B1)	200	mg
Cyanocobalamine (B12)	10	mg
Eau distillée	100	ml

Dosage : 0,1 ml/litre d'eau de mer

SOLUTION SILICATÉE POUR DIATOMÉES

4 mg Na₂ SiO₃ 5H₂ O pour 100 ml d'eau distillée

Dosage : 2,5 ml/litre d'eau de mer

Tableau 1 : Composition du milieu de CONWAY

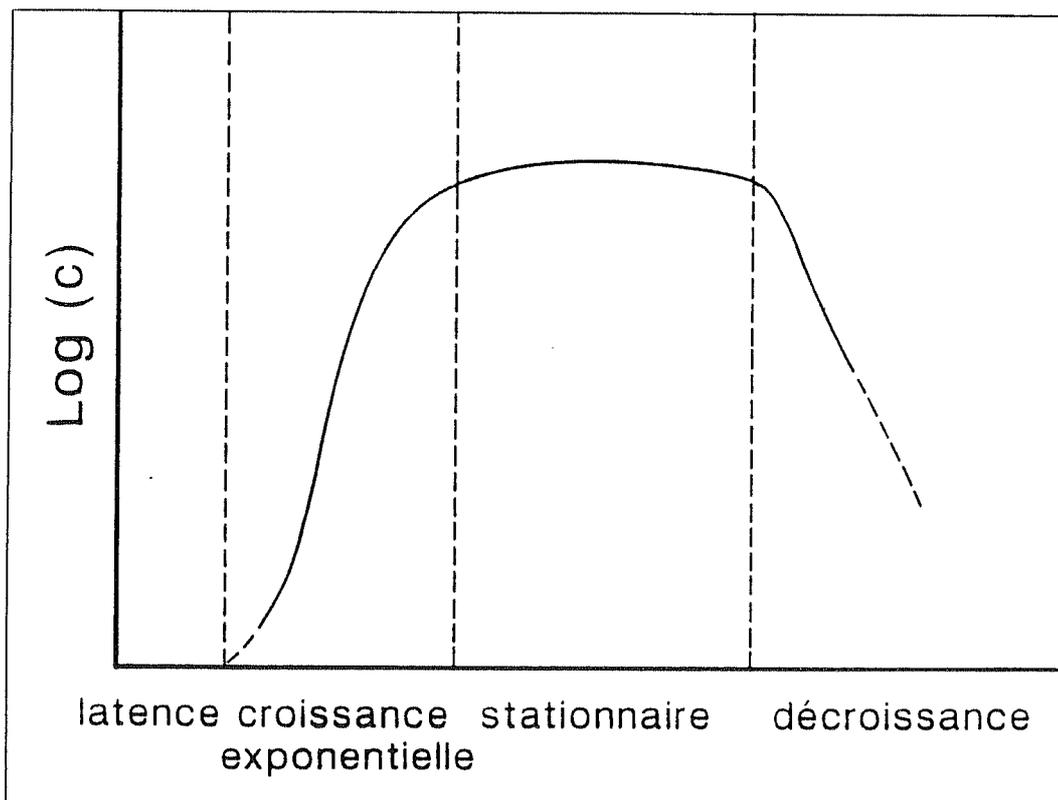
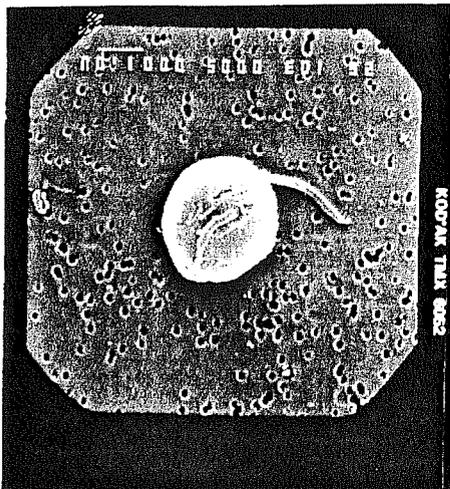


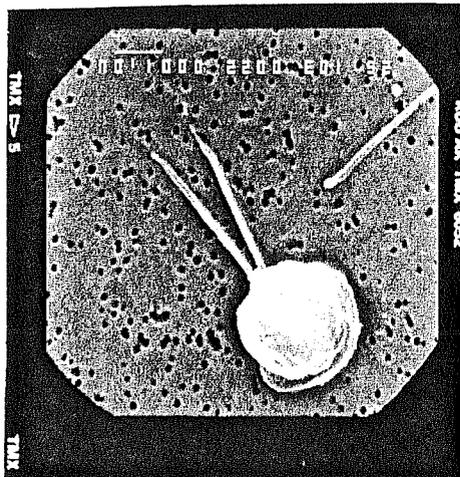
Figure 1 : Phases de culture des microalgues marines

- Fixer les algues au glutaraldéhyde à 2,5 % (1 heure à +4°C) au tampon cacodylate 0,2 M, pH : 7,3 ajusté à 1100 mOsm par du NaCl.
- Arrêter la fixation au tampon cacodylate.
- Récupérer les algues su membrane nucléopore en polycarbonate (porosité 0,22 µm).
- Déshydrater par des bains d'éthanol de degré croissant : 70 à 100°.
- Déshydrater complètement dans un appareil à point critique où l'alcool est remplacé par du CO2 liquide. L'évacuation du CO2 sous forme gazeuse permet d'éviter toute déformation des structures.
- Coller les filtres portant les algues sur des plots métalliques.
- Les placer dans un métalliseur dans lesquels les échantillons sont recouverts d'une mince pellicule d'or.

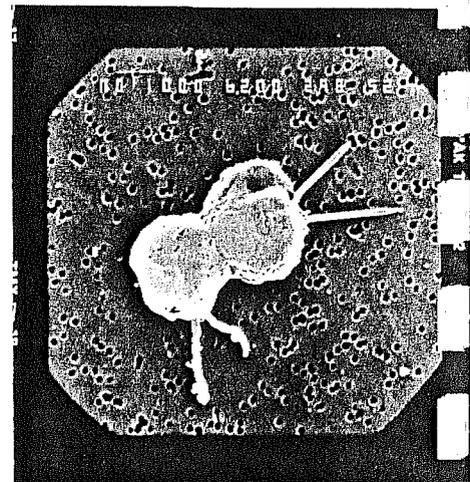
Tableau 2 : Résumé de la préparation des algues pour l'observation en microscopie à balayage.



1



2



3

Photos 1 et 2 : *Pavlova lutheri* (1) et *Isochrysis galbana* (2) vues en microscopie à balayage. Grossissement 6000.

Photo 3 : Vue d'une fission chez *Isochrysis galbana*

Dans les écloseries de poissons elles sont un maillon intermédiaire de la chaîne alimentaire, tandis que dans les écloseries de mollusques elles sont servies directement aux animaux qui en filtrant l'eau les absorbent pour se nourrir.

Ce sont des algues flagellées très petites (2-4 μm). Les cultures de *P. lutheri* se distinguent des cultures d'*I. galbana* par une coloration légèrement plus jaune, mais, sur les formes mobiles, la distinction des espèces se fait de manière plus formelle en microscopie à balayage lorsque la structure des flagelles et des haptonèmes est bien préservée (photos 1,2). En microscopie à contraste de phase on distingue parfois chez *I. galbana* un corps lipidique rouge-orange. Lorsque les conditions de culture sont défavorables, les espèces prennent des formes immobiles, qui elles aussi se reproduisent par fission. Une distinction par ces méthodes traditionnelles devient alors très difficile.

La fission dans le sens longitudinal (photo 3) est le mode de reproduction le plus courant pour les formes mobiles ou immobiles. La reproduction sexuée intervient rarement. Elle est connue chez *I. galbana* et inconnue chez *P. lutheri*.

II.1.2 Extraction de l'ADN chloroplastique

Remarque préliminaire : toutes les verreries, tubes et seringues sont stériles et siliconés ; les milieux sont stériles ; l'utilisation du Bromure d'Ethidium et du Hoescht comme colorants nécessite la mise au noir des échantillons d'ADN.

Centrifugation, traitement des algues et récupération des acides nucléiques totaux .

Les grandes lignes de ces trois étapes peuvent être résumées comme suit : les algues sont centrifugées pendant 20mn à 4000 tours (Centrifugeuse JOUAN GB 4.11, Rotor Max 4750). Le culot récupéré est placé dans un tube corex de 30 ml et traité au tampon C1 et au phénol chloroforme, puis éventuellement à la protéinase K pour digérer les membranes des algues et disperser les constituants des plastes. Cette première phase se fait en milieu sarkosylé pour favoriser l'attaque des lipides membranaires et empêcher l'ADN d'adhérer au verre. En outre, la présence de PVP (polyvinylpyrrolidone) est requise pour protéger l'ADN de l'attaque des polyphénols. L'extraction se poursuit par une précipitation de l'ADN à l'alcool (éthanol ou isopropanol) en milieu salin (présence d'ions sodium ou ammonium ; 0,2M ; pH=5,2). Les acides nucléiques totaux (ADN et ARN) doivent apparaître à ce moment sous forme de nuage blanchâtre filamenteux, un précipité très homogène indique des cassures d'acides nucléiques. Avant de séparer ADN et ARN on procède à un dernier nettoyage de la préparation à la protéinase K. En attendant leur séparation les acides nucléiques sont enfin placés dans un tampon C2 enrichi en chlorure de Césium.

Deux méthodes d'extraction légèrement différentes ont été testées. Elles sont détaillées figure 2. Dans cette phase d'extraction tous les échantillons traités sont doublés.

Tampon C1 : Tris, 50 mM ; EDTA, 20 mM ;
L.Sarkosyl, 4% ; Polyvinylpyrrolidone, 1%
pH : 8

Tampon C2 : Tris, 50 mM ; EDTA, 20 mM ; PVP, 1%
pH : 8

Tampon C3 : Tris, 50 mM ; EDTA, 20 mM ; Sarkosyl, 1%
pH : 8

Première méthode

- Ajouter au culot d'algues 15 ml de milieu C₁ + 5 mg de protéinase K
- Incuber 1 h à 40°C
- Rajouter 10 ml de phénolchloroforme
- Homogénéiser et centrifuger 15' à 10 000g
- Transférer la phase aqueuse (= 1 V) ; y ajouter 1 V d'isopropanol et 1/10^e V d'acétate de sodium
- Homogénéiser et centrifuger 25' à 10 000 g - 0°C
- Sécher le culot d'acides nucléiques (ADN + ARN)
- Redissoudre dans 1 ml de tampon C₂
- Rajouter 1,794 g de chlorure de Césium



Seconde méthode

- Ajouter au culot d'algues 10 ml de tampon C₁ + 10 ml de phénolchloroforme à température ambiante
- Emulsionner doucement 10' puis centrifuger 15' à 10 000 g
- Transférer la phase aqueuse (= 1 V) ; y ajouter 1 V de phénolchloroforme
- Emulsionner 5' et centrifuger 5' à 8 000 g
- Transférer la phase aqueuse (= 1 V) ; ajouter 2,5 V d'éthanol ou 1 V d'isopropanol et 1/10^e d'acétate de sodium 2,5 M pH = 5,2
- Homogénéiser puis laisser reposer 1 h à 4°C
- Centrifuger 30' à 10 000 g
- Sécher le culot d'acides nucléiques (ADN + ARN)
- Rajouter 1 mg de protéinase K et 1,5 ml de tampon C₃
- Incuber 1 h à 37°C
- Rajouter 1,794 g de chlorure de Césium



Laisser une nuit au réfrigérateur pour augmenter la dissolution

Ajuster le volume à 3 ml avec du tampon C₂

Figure 2 : Détail des méthodes d'extraction testées.

- Préparer la première couche :

3 ml de la solution contenant les acides nucléiques dissous en tampon C_2 et (ou) C_3

ajouter 1,756 g de $C_S Cl$; compléter à 6,425 ml avec du TE

colorer au BET (75 μ l)

- Introduire cette première couche dans un tube à sceller de 13 ml

- Préparer la seconde couche :

6,12 g de $C_S Cl$ dissous dans 6,425 ml de tampon C colorés au BET (75 μ l)

- L'introduire dans le fond du tube à sceller de 13 ml au moyen d'une pipette pasteur

- Sceller les tubes

- Centrifuger 20 heures à 60 000 g

- Ponctionner la bande d'ADN total

- Eliminer le BET du prélèvement en lavant 4 à 5 fois au Butanol saturé d'eau

- Compléter l'ADN en solution aqueuse (= 1 V) par 1 V d'eau stérile

- Précipiter l'ADN par 2 volumes d'Ethanol de la solution obtenue

- Laisser reposer 30' à 4°C

- Centrifuger 30' à 10 000 g

- Sécher le culot d'ADN

- Dissoudre à 37°C dans 1,2 ml de TE

- Ajouter 1,8 g de $C_S Cl$ et compléter à 1,98 ml avec du TE

- Colorer au Hoescht (15 μ l)

- Introduire dans un tube à sceller de 2 ml - sceller le tube

- Centrifuger 24 heures à 90 000 rpm (TL100 Beckmann - rotor TLA 100.2)

- Ponctionner l'ADN plastidial

- Eliminer le Hoescht en lavant plusieurs fois au butanol saturé d'eau

Figure 3 : Procédure détaillée d'extraction de l'ADN plastidial

①

②

③

- Faire une solution de 1 V d'ADN plastidial en solution aqueuse et 1 V de TE*

- Ajouter 2 fois le volume obtenu d'éthanol et laisser reposer 15' à 4°C

- Centrifuger 30' à 10 000 g

- Sécher le culot d'ADN

- Dissoudre dans 200 µl de TE

- Conserver au réfrigérateur ou à - 20°C

- A la solution d'ADN ou de TE ajouter 1/10^è du volume final de spermidine et 1/10^è du tampon de l'enzyme utilisée

- Introduire l'enzyme à raison de 50 U/µg d'ADN estimé

- Laisser au bain marie 1 h à 37°C

- Faire précipiter l'ADN avec 2 volumes d'éthanol de la solution obtenue et 1/10^è V d'acétate de sodium

- Centrifuger 30' à 10 000 g

- Sécher le culot d'ADN

- Dissoudre l'ADN dans 10 µl de TE

- Colorer au bromophénol** (0,25 % V)

- Déposer sur les gels colorés au BET (100 ppm) 10 µl par puits soit 1 à 3 µg d'ADN

- Procéder à l'électrophorèse :
1h30 à 85 V pour faire rentrer le colorant
12 à 10 h à 50 V

- Observer le gel sous UV

- Photographier les profils en présence d'une échelle milimétrée

Figure 4 : Traitement par les enzymes de restriction (1 et 2), mise en route de l'électrophorèse (3) et observation des profils de restriction

* pour 100 ml de TE : 0,12 g de TRIS + 0,037 g d'EDTA - pH 8

** solution de Bromophénol : 0,25 % de Bromophénol - 0,25 % de Xylène cyanol - 15 % de Ficoll 400

Séparation de l'ADN nucléaire, chloroplastique et mitochondrial :

La récupération de l'ADN plastidial (=chloroplastique) se fait par deux gradients continus de Chlorure de Césium -CsCl- (cf procédure décrite figure 3) réalisés en tubes scellés de polyallomère. Dans un premier temps ARN, ADN et contaminants divers (protéines, polyssacharides...) sont séparés sur un premier gradient bicouche (densités initiales de 1.4 et 1.68) coloré au Bromure d'Ethidium (BET). Celui-ci s'intercale dans la double hélice des acides nucléiques. La séparation se fait à 50000 g pendant 24 heures. L'ADN total est recueilli sous UV par prélèvement direct dans le tube scellé à la seringue. Le second gradient est monocouche. De densité initiale 1.67 il permet de séparer les ADN des organites (d=1.690) de l'ADN nucléaire plus lourd (d=1.71). Dans ce deuxième gradient, le colorant HOESCHT est utilisé pour sa faculté à se fixer sur A-T que l'on a généralement en quantité nettement plus importante dans l'ADN plastidial, comparé à l'ADN nucléaire. La récupération de l'ADN chloroplastique est aussi effectué en piquant directement le tube scellé sous UV.

Pour extraire les colorants des acides nucléiques, les prélèvements effectués à la seringue sont soigneusement lavés au butanol saturé d'eau.

Les quantités d'ADN nucléaire extraites sont calculées au spectromètre par absorption à 260nm. Par extrapolation, on connaît ainsi grossièrement les quantités d'ADN chloroplastique traitées.

II.1.3 Traitement de l'ADN chloroplastique par les enzymes de restriction :

Enzymes utilisés.

L'ADN chloroplastique est traité selon la procédure décrite figure 4. Deux enzymes ont été retenus : EcoR1 et BamH1. Xho1 a aussi fait l'objet d'un essai. Leurs sites de coupure sont rappelés ci-dessous. Ils sont utilisés en milieu chauffé à 37°C en présence de spermidine, dont le rôle est d'annuler les charges des molécules d'ADN et de faciliter l'accès aux enzymes.

Sites de coupure des enzymes de restriction:

EcoR1 : G A A T T C
BamH1 : G G A T C C
Xho1 : C T C G A G

Electrophorèse et révélation des profils (figure 4).

Des aliquotes de 10 µl colorés au Bleu de bromophénol sont déposés dans les puits de mini ou maxi gels d'agarose préparés à 0,7 %. Les électrophorèses de grands gels colorés au BET (10 ppm) durent de 12 à 18 heures. Au début, la migration est forcée (puissance : 85 V). Le reste du temps le générateur de puissance est réglé sur 50 V. A l'issue de l'électrophorèse, les gels sont observés sous UV et photographiés avec des polaroids négatifs. Une graduation de référence figurant auprès des gels permet de retrouver dans une étape ultérieure les bandes d'ADN hybridées.

II.1.4 Test de la pureté de l'ADN chloroplastique extrait.

Sondes employées. Cinq sondes hétérologues ont été utilisées : celle d'un gène mitochondrial CO1 (Cytochrome oxydase Sous unité 1 provenant du maïs) et celles de quatre gènes chloroplastiques, l'un codant pour les sous-unités de la Rubisco (Ribulose 1,5- biphosphate carboxylase/oxygénase), l'un pour le facteur d'élongation de transcription tufA provenant d'algues brunes, un troisième pour l'ARN ribosomique 23S et le quatrième codant pour la protéine D1 du photosystème II provenant de *Chlamydomonas*.

Préparation des sondes.

La figure 5 rappelle la procédure de préparation des sondes radioactives (dites sondes chaudes).

Hybridation.

Le test a été fait sur le profil de restriction obtenu sur l'ADN de *I. galbana* (clone T.ISO) coupé par BamHI. Après électrophorèse, la bande de gel nous intéressant a été découpée, dénaturée en milieu alcalin (*) et déposée sous une membrane de nylon pour transférer les bandes d'ADN (**) (cf procédure détaillée figure 6). L'opération dure 24 heures à l'issue desquelles la membrane de nylon est rincée, séchée et conservée à plat entre deux papiers Whatmann enfermés dans de l'aluminium. Une fois les sondes chaudes préparées, elle est reprise, découpée en 2 dans le sens de la longueur et placée dans un pilulier pour une préhybridation de 30 mn à 42°C dans 3 ml de tampon. L'hybridation se fait en ajoutant 10⁶ cpm de sonde par ml de tampon (***) pendant 1 à 2 heures à 42°C. Les hybridations sont révélées sur papier FUJI XRAYS.

* Milieu de dénaturation : 1.5M NaCl ; 0.5M NaOH

** Milieu de transfert : 0.25M NaOH ; 1.5M NaCl

*** Tampon de préhybridation et d'hybration :
rapid hybridization medium Amersham

II.2 RESULTATS

II.2.1 Les cultures de microalgues

Les cultures (photo 4 et 5) ont été prélevées entre 2 et 4 semaines d'âge. Les concentrations de cellules variaient de 10 à 20 10⁶ de cellules par millilitre de culture pour *Pavlova* et la souche locale d'*Isochrysis*, 50 à 70.10⁶ cellules par millilitre pour la souche tahitienne d'*Isochrysis* provenant de Milford. Ces valeurs correspondent à des valeurs normales de niveau de production, estimées à 15-17 10⁶ cellules par ml. Au plus 800ml, fournissant selon la concentration de la culture de 0.36 à 3g de culot humide d'algues, ont été utilisés. Pour faciliter les dissolutions et éviter les pollutions importantes par les polysaccharides, la quantité de culot traité ne doit pas excéder 1,5g par tube corex.

L'observation en microscopie à balayage a confirmé le caractère axénique des cultures. Elle a par contre laissé un doute sur l'identité des *Pavlova* mises en culture à partir des souches filles de l'IFREMER/BREST utilisées dans la première expérience. Celles-ci paraissaient plus proche d'*I. galbana*.

Dénaturer la sonde (fragment intragénique double brin) en chauffant à 100 °C 10mn puis en refroidissant brutalement dans de la glace.

Préparer en solution : 100 à 200 ng d'ADN dénaturé
10 µl de Buffer Amersham
4 µl de dATP, 4µl de dGTP et 4 µl de TTP
5 µl de Primers

Compléter à 50µl avec de l'eau bidistillée
Ajouter 5 µl de dCTP* radioactif (soit 3000 Ci/mmoles)
2 µl d'enzyme de Klenow

Incuber 30 mn à 37°C

Passer sur une minicolonne Sephadex G50

Figure 5 : Procédure de préparation des sondes radioactives par random priming.

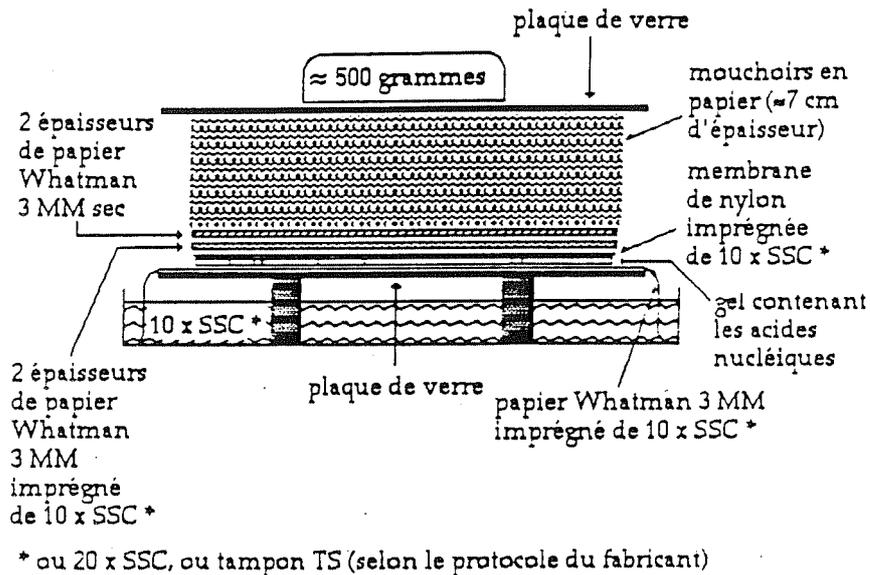
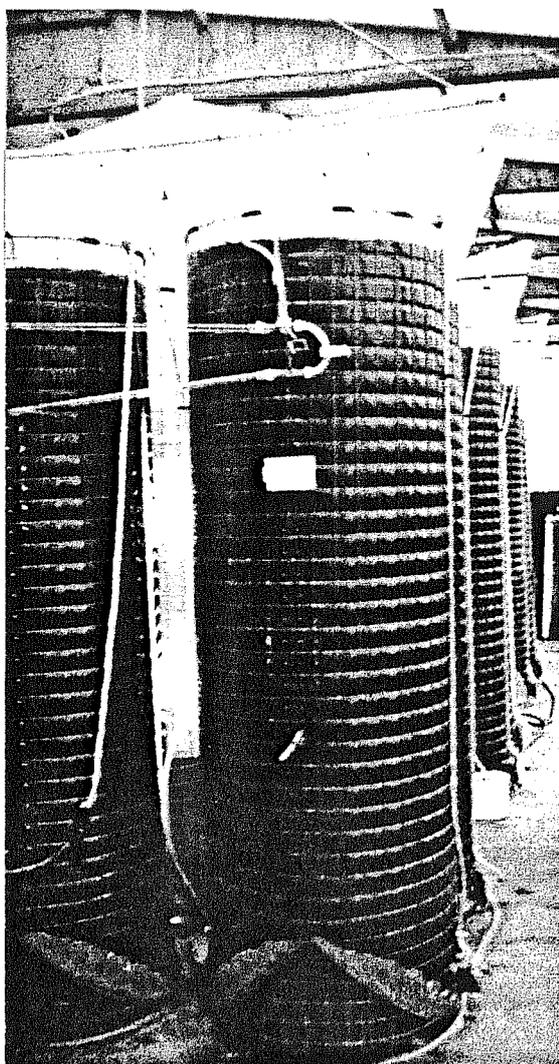
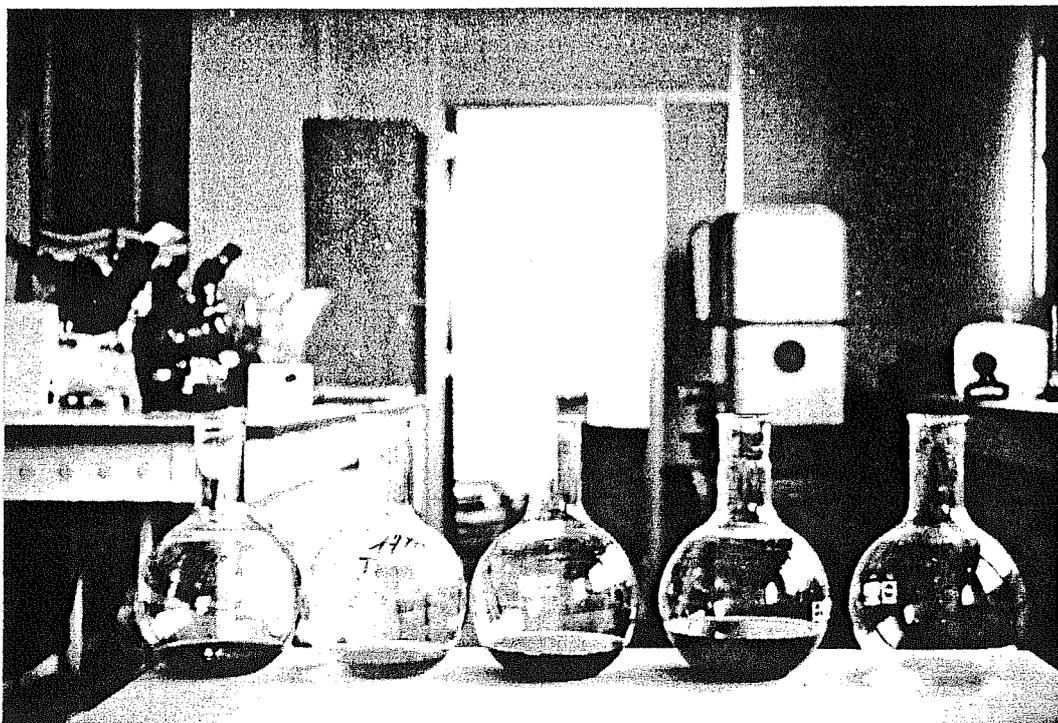


Figure 6 : Dispositif de transfert alcalin.



Photos 4 et 5 : Cultures d'algues en petits et grands volumes.

II.2.2 L'ADN

II.2.2.1 Plan expérimental suivi.

Quatre séries d'expériences ont été réalisées. Elles correspondent à des questions que nous nous sommes posées successivement en fonction des acquis. Nous résumons ci-dessous les questions posées. En même temps, les principaux résultats obtenus pour chacune des quatre étapes sont rappelés, avant de les analyser dans le détail :

Etape a) La première méthode d'extraction est-elle appropriée ?

La réponse est NON. L'ADN extrait est filamenteux mais très contaminé d'un produit muqueux. Les résultats des gradients ont été inattendus : premier gradient très sale, second gradient très hétérogène du point de vue de la densité des bandes d'ADN nucléaire, chloroplastique et mitochondrial (figure.7). L'électrophorèse qui a suivi sur de l'ADN coupé par BamH1 a donné des profils ininterprétables (figure 8) : Il y a des traînées. Ceci suggère que la présence de mucus a empêché la séparation des différents ADN et facilité leur dégradation. Une mauvaise action des enzymes de restriction ne semble pas pouvoir être mise en cause. A ce niveau de la recherche, ces résultats préliminaires suggèrent de revoir le traitement des algues dans la première phase d'extraction des acides nucléiques : les algues ont été "bousculées" à deux reprises : par le transport (1 heure pour BREST-ROSCOFF), et une seconde fois au cours de la dissolution à chaud dans la solution phénol-chloroforme/tampon C1, stratégie retenue pour que la digestion des membranes se fasse au mieux. Ces microalgues brunes contenant des sacs de polysaccharides qui libèrent leur contenu en cas de traitement brutal, la principale conclusion de l'étape a) est donc de manipuler les algues délicatement et le moins possible.

Les algues testées dans cette première étape sont : *Pavlova lutheri* de MILFORD et BREST, *Isochrysis galbana*, clones tahitien et local, provenant de MILFORD.

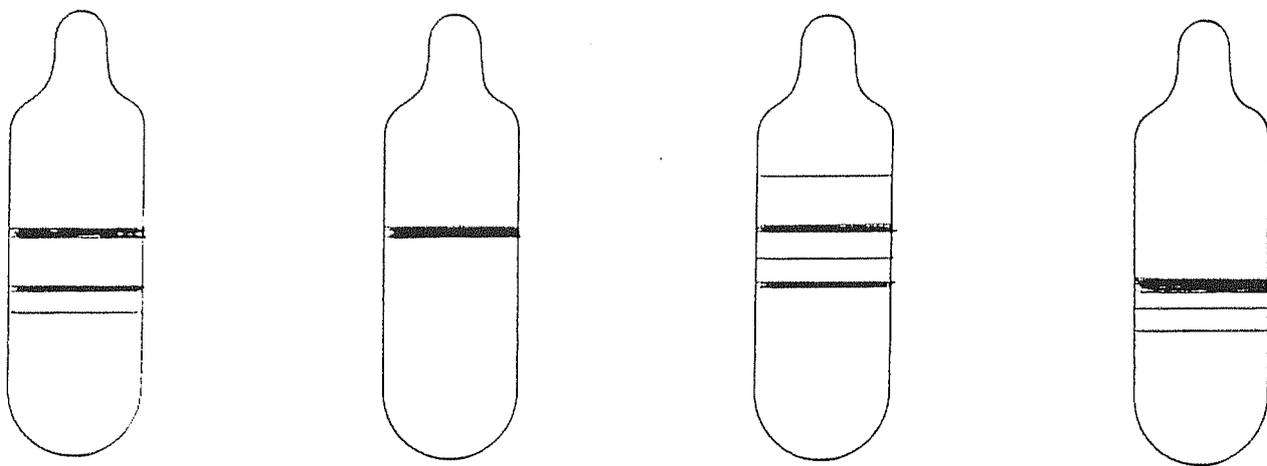
Etape b) La seconde méthode d'extraction est-elle mieux adaptée ? Les profils de restriction, s'ils sont nets révèlent-ils l'impureté soupçonnée de la culture de *P. lutheri* ?

Les extractions sont faites sur *Pavlova* et *I. galbana*, clones local et tahitien provenant de l'algothèque de l'IFREMER/BREST. Les enzymes BamH1 et EcoR1 ont été utilisés pour les trois cultures ; l'enzyme Xho1 a été testé sur *P. lutheri*, simplement. Cette étape fournit deux informations importantes : l'ADN extrait est filamenteux et pratiquement exempt de mucus ; après la purification sur gradient de CsCl c'est essentiellement de l'ADN chloroplastique (photo 6) ; les profils de restriction sont interprétables (figure 9) surtout lorsque l'ADN chloroplastique est coupé par BamH1 comparé à EcoR1 qui donne, comme souvent pour l'ADN chloroplastique, trop de bandes. Pour *P. lutheri* et *I. galbana*, clone tahitien, les profils sont identiques, confirmant la pollution entre souches.

Etape c) Les profils de restriction de l'étape b) étant intéressants mais perfectibles, peut-on les améliorer en doublant, pendant la phase d'extraction des acides nucléiques du traitement 1 le temps de digestion à la protéinase K ? Par ailleurs réédite-t-on les premiers profils de restriction obtenus ? Enfin que donnent les profils de restriction des cultures garanties provenant de l'algothèque de MILFORD comparés à ceux obtenus à partir des souches visiblement contaminées sur lesquelles l'étape b) a été réalisée ?

Bien que très propres, les acides nucléiques obtenus étaient dénaturés. La cause la plus probable nous a paru être une contamination bactérienne du tampon âgé de 1,5 mois.

Etape d) L'étape c) étant renouvelée avec des tampons frais, l'ADN extrait est filamenteux et non dénaturé.



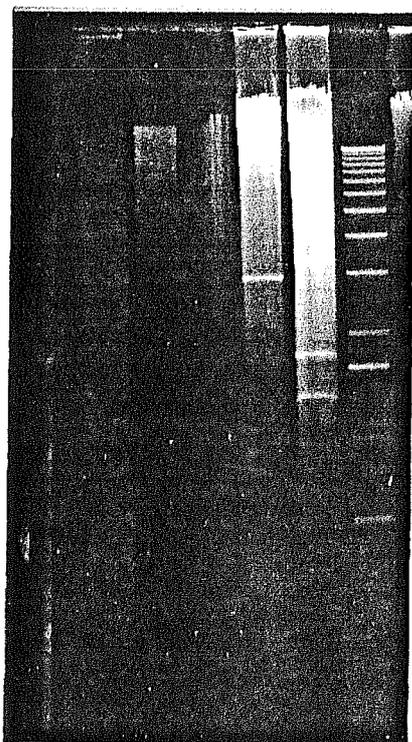
Pavlova/IFREMER = P₁

Pavlova/Milford = P₂

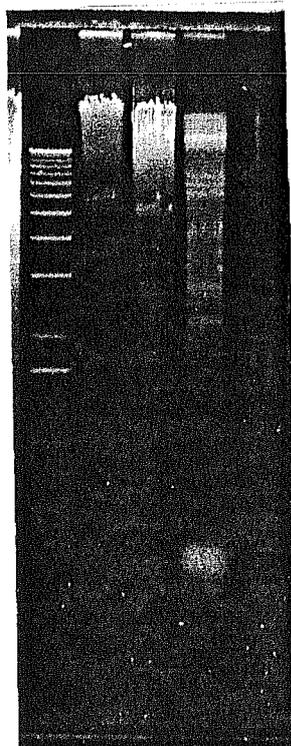
Isochrysis/Milford

Isochrysis/
Milford = I₂
clone local

Figure 7 : Bandes d'ADN obtenues à l'étape B)



P₁ (Bandes basses)
P₂ (Bande haute)
P₂ (Bande basse)
I₁ (Bande haute)
I₂ (Bande basse)



I₂ (Bande haute)
I₂ (Bande basse)

Figure 8 : Profils de restriction observés à l'issue de l'étape A). L'enzyme utilisée est BAMH1.

ADN mitochondrial
 ADN chloroplastique
 ADN nucléaire

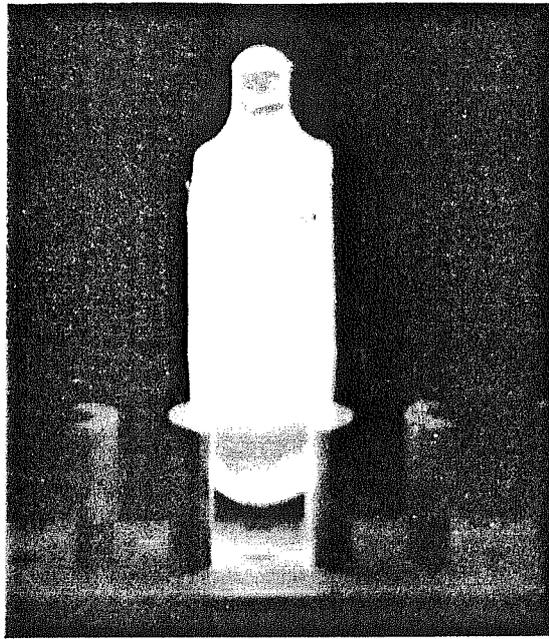
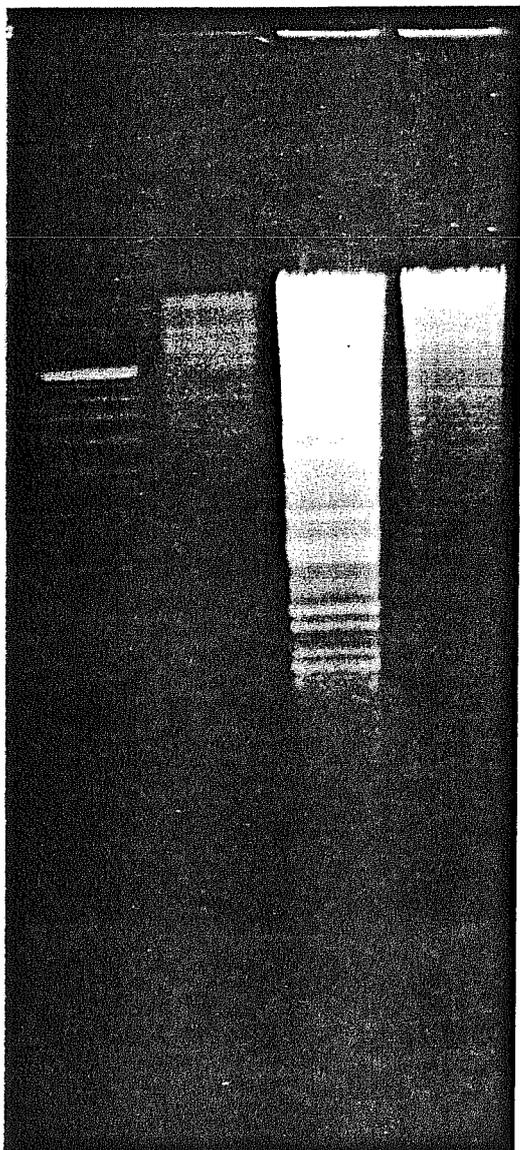


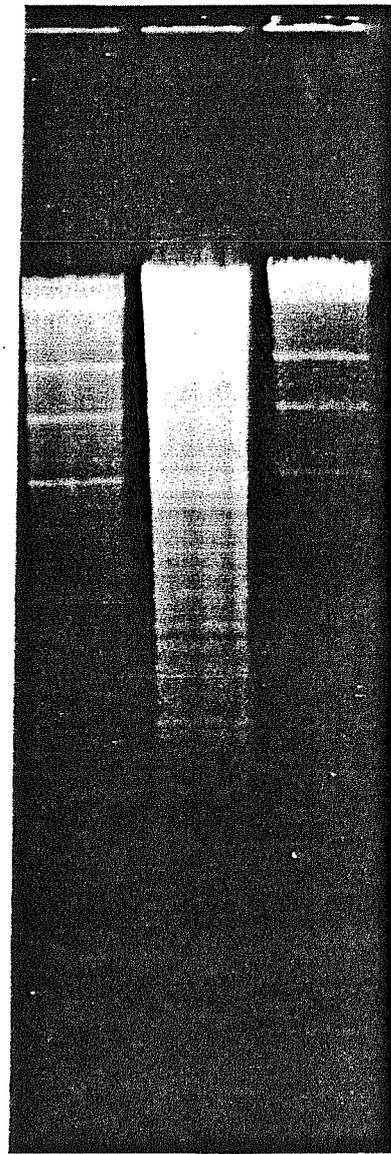
Photo 6 : Bandes d'ADN obtenues à l'étape B.

ADN
 coupé
 par
 EcoR1



Ech. 1KB Pavlova Iso. T.Iso.

ADN
 coupé
 par
 BamH1



T.Iso Iso Pavlova

Figure 9 : Profils de restriction obtenus à l'étape B)

II.2.2.2 Résultats détaillés

*Pureté de l'ADN chloroplastique : l'hybridation avec les sondes mitochondriale et chloroplastiques indique la nette prédominance de l'ADN chloroplastique (figure 10) : il n'y a pas d'hybridation avec COI. Par contre TufA, psBa, 23S et Rubisco hybrident bien. Si l'ADN traité a été contaminé il ne l'aura été que très faiblement, à la ponction : la séparation sur gradient de chlorure de Césium ayant été efficace.

*Meilleure méthode d'extraction et de traitement : la première méthode consistant à traiter les algues à chaud avec de la protéinase K puis au phénol chloroforme nous a donné de piètres résultats : en effet, l'ADN extrait était bien filamenteux, mais fortement contaminé de mucus. La séparation des ADN en gradient de chlorure de Césium est totalement aberrante. L'électrophorèse révèle des trainées d'ADN coupé et les bandes sont très difficilement interprétables (figure 8). Le traitement a eu lieu après une heure de transport des algues. Bien qu'il soit peu probable que le transport soit seul à l'origine de ce phénomène, on ne peut en écarter l'hypothèse.

La seconde méthode consistant à traiter en tampon Cl et phénol chloroforme à froid est nettement meilleure. Dans le premier essai, nous avons obtenu de l'ADN propre et filamenteux. Dans le second essai, l'ADN était aussi très propre, mais cassé. Dès la première extraction à l'éthanol, il apparaissait sous forme de flocculat. L'âge des tampons utilisés et leur éventuelle contamination bactérienne pouvait être seule mis en cause. Un troisième essai consistant à travailler avec des tampons frais selon la même procédure a confirmé l'efficacité de cette méthode pour dissoudre les membranes et extraire proprement l'ADN chloroplastique. Les préparations les plus aisées et les plus propres ont été obtenues avec des quantités d'algues allant de 0,36 à 1,5 g maximum.

*Quantités extraites : les quantités d'ADN nucléaire extraites, estimées au spectrophotomètre par l'absorbance à 260nm (figure 11) indique des différences entre espèces. Une seule série de mesures a été réalisée, car ce n'était pas l'objet de ce travail et avant toute utilisation ils demandent à être confirmés :

Pavlova : 94 µg par g de culot humide
T.Iso : 6.62 µg par g de culot humide
Iso : 7.62 µg par g de culot humide

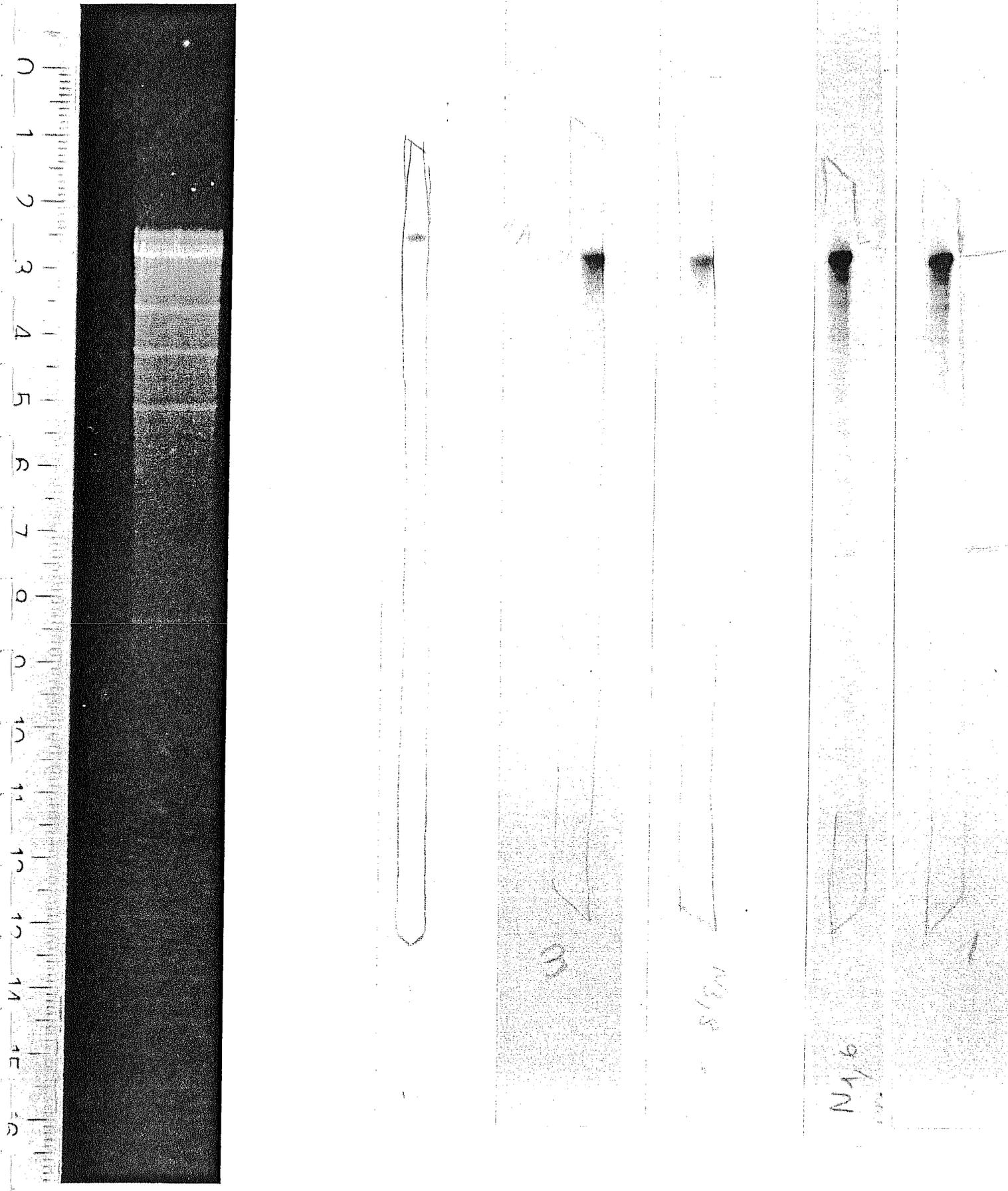
Selon cette première approche, *Pavlova* contiendrait dix fois plus d'ADN nucléaire que les *Isochrysis*. Le rapport ADN nucléaire/poids humide des algues est de l'ordre de 1/100 000

Par extrapolation, l'ADN Chloroplastique représente 1/1 000 000 et l'ADN mitochondrial 1/10 000 000.

Le taux d'humidité des culots étant de 70 à 80 %, les rapports sont à diviser par un facteur 4/5 pour obtenir la concentration d'ADN en matière sèche.

*Densités. L'ADN plastidial combiné au Hoescht a une densité de 1.716, l'ADN nucléaire, 1.73 et l'ADN mitochondrial une densité de 1.67.

*Profils de restriction : A l'issue de cette première investigation, BamH1 qui produit 9 bandes sur *I. galbana* clone local, et Xho1 (en complément) sont plus intéressants que EcoR1 qui coupe trop souvent et rend la lecture des profils difficile. Le génome plastidial d'*I. galbana* clone tahitien a été estimé à 94 KB (figure 12), celui de *I. galbana* clone local paraissant partiellement dénaturé est plus difficile à lire.



Isochrysis galbana
coupé par BamHI

Hybridations avec

PsbA
~23KB

Tuf A
~20KB

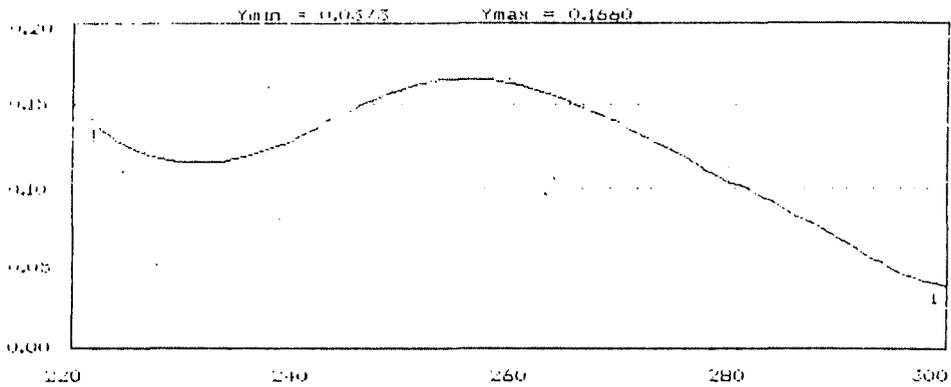
Tuf A
23S ~18KB

Rubisco
20-18 kb ?
CO1 non
hybridé

Figure 10 : Résumé des résultats de l'hybridation du profil de restriction de *I.galbana*.

WAVELENGTH SCAN ADN NUCLEAIRE T. ISOCHRYSIS GALBANA DILUE 5 FOIS (500UL)

23-03-1989 16:52

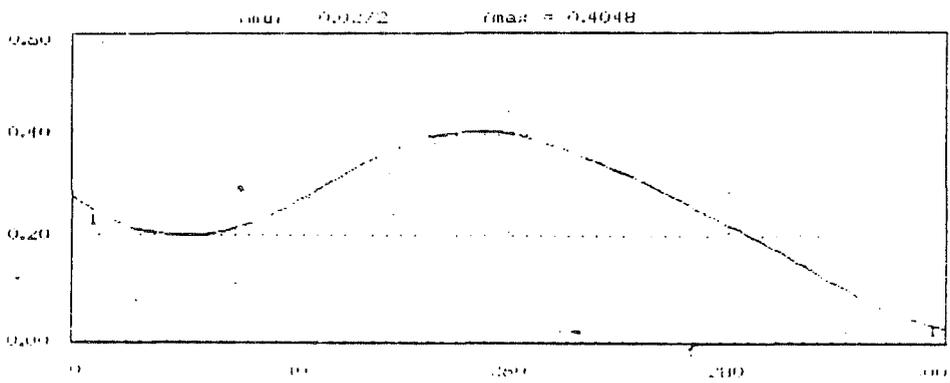


FOTRON INSTRUMENTS

UVIRON 750

WAVELENGTH SCAN ADN NUCLEAIRE PAVLOVA LUTHERI DILUE 5 FOIS (500UL)

23-03-1989 16:44

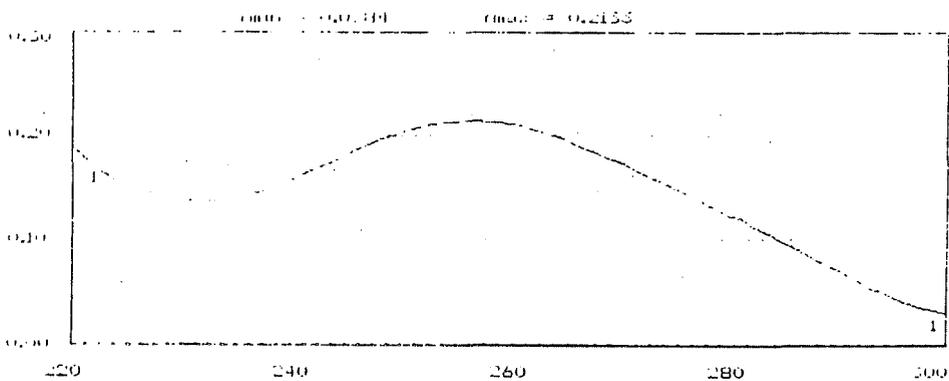


FOTRON INSTRUMENTS

UVIRON 750

WAVELENGTH SCAN ADN NUCLEAIRE ISOCHRYSIS GALBANA DILUE 5 FOIS (500UL)

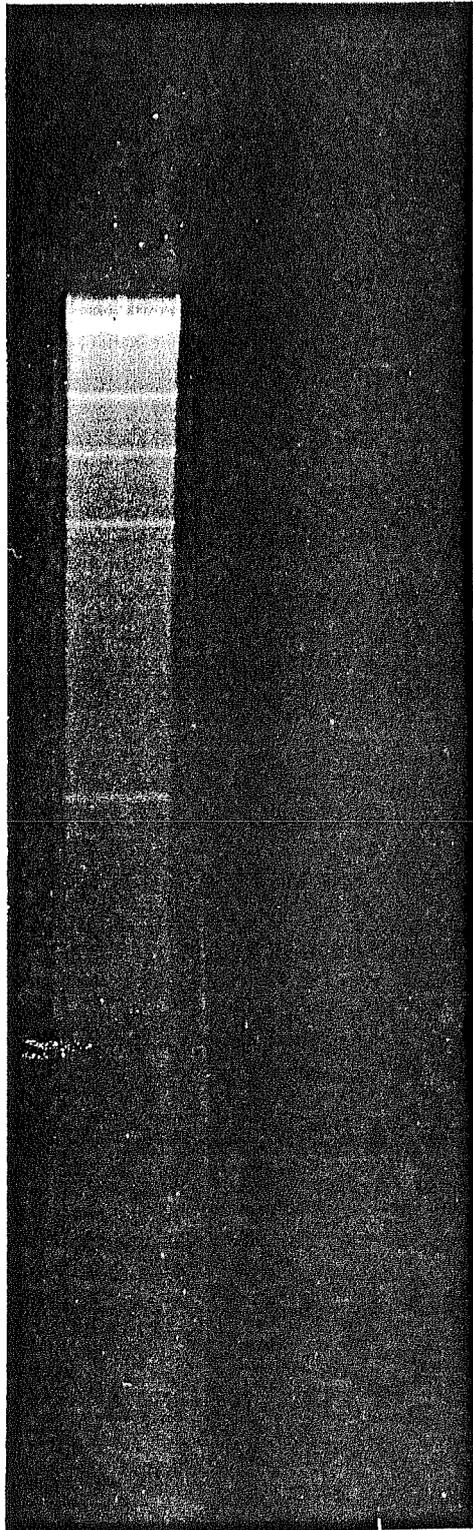
23-03-1989 16:52



FOTRON INSTRUMENTS

UVIRON 750

Figure 11 : Profils d'absorbance de l'ADN à 260 nm.



23 KB psbA
 20 KB TufA
 18 KB 23S + Rubisco

11 KB
 8,4 KB
 6,2 KB

3,2 KB
 Traces d'hybridation de
 Rubisco.

2,1 KB
 1,9 KB

Figure 12 : Taille des segments d'ADN plastidial d'*Isochrysis galbana*,
 clone Tahitien, coupé par BamH1.

II.3 DISCUSSION

II.3.2 Les techniques.

La mise au point d'une technique d'extraction pour les microalgues s'est basée sur une caractéristique des végétaux inférieurs : la différence de densité des ADN nucléaire, plastidial et mitochondrial qui n'existe pas chez les végétaux supérieurs.

Celle retenue pour *P. lutheri* et *I. galbana* n'implique pas une séparation des organites cellulaires qui, pour les macroalgues, est une pratique courante (MARCKOWICZ, 1988). Elle est donc plus simple de mise en oeuvre.

Il y a certainement des variantes efficaces à la méthode retenue à l'issue de ce rapport. Nous recommandons cependant pour toute autre méthode d'extraction de maintenir deux points :

- le traitement en douceur des algues avant extraction pour éviter un mélange intime et indissociable des polysaccharides avec l'ADN et les dégradations à l'intérieur des cellules.

- l'attaque directe à température ambiante des cellules par le phénol-chloroforme.

Pour récupérer l'ADN plastidial nous avons choisi de travailler en deux gradients continus de chlorure de césium avec utilisation de colorants mutagènes. Il y a une alternative à cette technique qui consiste à récolter l'ADN non coloré à l'aide d'un collecteur de gradients relié à un spectrophotomètre qui mesure l'absorbance à 260nm. Les fractions de plus faible densité, correspondant à l'ADN plastidial sont regroupées et reprecipitées à l'alcool. Nous ne l'avons pas testée mais il faut souligner les atouts de cette technique testée avec succès sur *Pylaiella littoralis* par exemple (MARCKOWICZ, 1988) : suppression des colorants mutagènes, possibilité de travailler sur de l'ADN plastidial fractionné et enfin quantification simultanée des ADN extraits (1 DO représente 50 µg/ml d'ADN bicaténaire)

En ce qui concerne l'électrophorèse et les digestions, la méthode utilisée a permis l'obtention d'une série de profils intéressants et de choisir les enzymes de restriction ne coupant ni trop ni trop peu le génome plastidial (BamHI et XhoI) et donnant par conséquent des profils caractéristiques. On ne peut exclure la possibilité de les améliorer en modifiant les intensités du générateur ; de même il serait envisageable d'optimiser les techniques de transfert et d'hybridation.

II.3.1 Les résultats.

Nous ne considérerons les résultats concernant la taille du génome plastidial comme définitifs qu'après confirmation à l'issue d'une autre série d'expériences, bien que les valeurs obtenues soient en accord avec la littérature.

Ainsi, les 94 KB calculés pour les génomes plastidiaux de *P. lutheri* et *I. galbana*, clone tahitien, sont conformes aux fourchettes de valeurs connues pour d'autres chromophytes : 110 KB à 180 KB citées par REITH et CATTOLICO, 1986.

Les quantités d'ADN extraites ont été évaluées à 10^{-2} pg/cellule. Cette valeur est faible. On peut penser que l'extraction d'ADN n'a pas atteint les 10 % de l'ADN total généralement obtenus (MISONOU et al, 1989).

Les enzymes de restriction choisis sont bien connus. Dans notre première approche, deux sont intéressants en complément : BamH1 et Xho1 : le nombre et la taille des bandes obtenues (respectivement 9 et probablement 7) permet d'identifier une espèce, voire une souche. Pour réaliser des cartes physiques ou génomiques de restriction il sera bien entendu nécessaire d'élargir la palette d'enzymes utilisés. Il est généralement admis que dans ce cas, il faille 3 enzymes employées en simple et double digestion.

Concernant l'utilisation des profils obtenus, la détection de contamination involontaire entre *P. lutheri* et *I. galbana*, clone tahitien permet d'envisager l'utilisation de cette technique pour des algues à caractères morphologiques très difficilement distinguables. Le temps pour mettre en oeuvre la reconnaissance serait, en routine, de trois jours pour une dizaine d'espèces ou de populations.

L'étude des profils peut aussi révéler des micromodifications du génome plastidial révélés par les profils de restriction des clones Tahitiens et locaux d'*I. galbana* qui permettent une distinction entre souches. Ces données confortent celles de ALDRICH et CATTOLICO (1986) qui révélaient aussi l'existence de micromodifications entre les populations d'*Olisthodiscus luteus*. Dans le cas présent et compte tenu de l'évolution de la classification des algues on peut se demander si les deux souches d'*I. galbana* appartiennent à la même espèce : en effet la classification de ces petites algues est difficile. Elle est régulièrement revue. Ce fut le cas en 1975 (GREEN) pour *Pavlova*. Et, depuis l'avènement des techniques du génie génétique, elle est en pleine révolution.

Il n'en reste pas moins que d'un point de vue aquacole, ce résultat est intéressant et que l'analyse des profils de restriction pourrait être étendu à toute espèce animale ou végétale qui, à un moment de son cycle pose des problèmes d'identification d'espèce ou de population telles les populations locale et tahitienne d'*I. galbana*. Une autre application est la détection de pollutions involontaires entre algues. Elle a été illustrée sur *P. lutheri* et *I. galbana*, dont on peut contrôler les spécificités morphologiques sans problème majeur. Cette application trouvera tout son sens sur des espèces ou des stades d'algues qui sont indifférenciables par des critères morphologiques.

Ces mêmes profils, hybridés à des sondes ont aussi un avenir dans la reconnaissance des individus ou des populations transformées ou naturelles ayant des propriétés particulières de production protéiques. Rejoignant le domaine des empreintes génétiques, ce point a été abordé dans la première partie de ce rapport. Nous ne les rediscuterons donc pas ici.

Outre l'aspect appliqué qui soutenait notre démarche, ces techniques et les résultats qu'elles engendrent conviennent à des études plus fondamentales de phyllogénie des algues : ainsi, elles sont utilisées sur les génomes plastidiaux afin de vérifier les théories mono ou polyphyllétiques de l'endosymbiose (ASSALI et al, sous presse, CATTOLICO et LOISEAUX de GOER, 1989).

CONCLUSION GENERALE

Trois idées force émanent de la réflexion globale Génétique moléculaire et aquaculture :

- L'analyse des performances ou de l'absence des performances en aquaculture tient autant à l'oeil de l'éleveur, à l'usage de balances, à l'utilisation de HPLC ou de chromatographies diverses qu'à l'emploi de techniques plus récentes telles celles du génie génétique ou enzymatique. C'est dans la complémentarité de ces méthodes de travail que nous trouverons une solution à l'amélioration des productivités des fermes aquacoles.

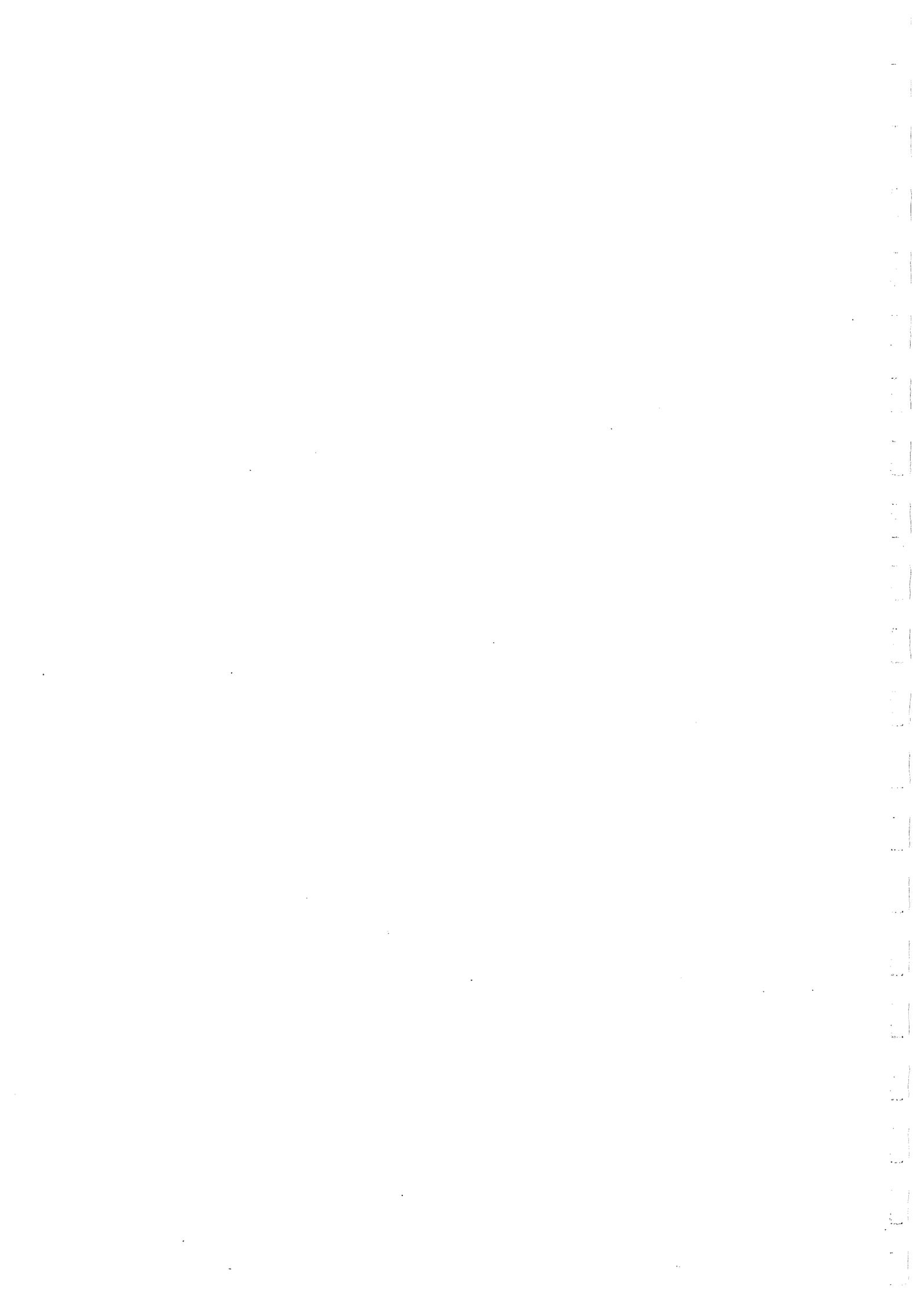
- Les protéines sont un composant majeur du vivant. Mais il y en a d'autres à ne pas négliger, les glucides par exemple sur lesquels on se penche peu.

- L'expression d'un génome, le métabolisme dans son ensemble sont largement modulables par l'environnement. Il convient d'en tenir compte surtout lorsque l'élevage se pratique en milieu aqueux, hypervariable dans ses composantes physicochimiques.

Enfin, la définition agroalimentaire que nous avons donnée à l'aquaculture est restrictive. L'exploitation de molécules produites par certaines espèces, tels les polysaccharides chez l'ascidie, les pigments chez les algues ouvre en effet une autre voie à l'aquaculture, celle de l'industrie chimique et pharmaceutique. Encore embryonnaire en France, elle pourrait devenir une direction avantageuse de l'aquaculture, dans laquelle les outils de génétique moléculaire trouveraient largement leur place.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES



Aldrich J., Gelvin S. and Cattolico R.A., 1982. Extranuclear DNA of a marine chromophytic alga. *Plant Physiol.*, 69:1189-1195.

Anonyme, 1989. Espèces et techniques d'élevage. Equinoxe, N° spécial "Devenir Aquaculteur" : 17-24.

Anonyme, 1990. L'élevage de la coquille saint-Jacques. Document IFREMER, Comité Local des Pêches de Brest, Comité Interprofessionnel de la coquille Saint-Jacques, Comités Locaux des Pêches Maritimes et Comité d'Expansion des Côtes d'Armor, 8 pp.

Assali N.E., Mache R. and Loiseaux de Goër S., in press. Evidence for a composite phylogenetic origin of the plastid genome of the brown algae *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. *Plant Molecular Biology*.

Audineau P., Blancheton J.P., Merea, 1985. Production d'algues unicellulaires. Rapport MEREAA, Station IfREMER, Palavas les Flots, 19 pp;

Billard R., 1980. L'étang et l'agriculture des eaux. Actes de Colloque sur la Pisciculture en étang, Arbonne La forêt, France, 11 mars 1980 : 15-28.

Bonhomme S., Bird S. and Bonen L., 1989. Comparaison of the wheat mitochondrial atp9 gene sequence with mitochondrial and chloroplast homologues from other plants. *Plant Molecular Biology* 13 : 395-397.

Boucher J., Dao J.C., 1989. Repeuplement et forçage du recrutement de la coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*). In : L'Homme et les Ecosystèmes halieutiques et aquacoles marins, J.P. Troadec Ed., IFREMER : 312-359.

Bourgoin J., Alzieu C., 1990. La biologie moléculaire et l'écotoxicologie marine. In : L'environnement littoral en l'an 2000. Quels enjeux pour la recherche? Rapport IFREMER : 27-29.

Callegari J.P., 1989. Feu vert pour les microalgues. Biofutur, février 1989, 25-40.

Cattolico R.A. and Loiseaux-de Goër S., 1989. Analysis of chloroplast evolution and phylogeny : a molecular approach. In : The chromophyt algae : problems and perspectives. Ed JC GREEN BSC Lead Beater and WL DIVER. Clarendon Press Oxford : 85-100.

Cavert D., 1990. RFA : vers une nouvelle loi sur le génie génétique. Biofutur, 87 : 42-45.

Chretiennot-Dinet M.J., Robert R. et His E., 1986. Utilisation des "Algues-Fourrage" en aquaculture. *Ann. Biol.*, XXV(2):97-119.

Cousin K., Le Gall G., Mourad K., Shire D., Mialhe E., Grizel H., 1989. Epidémiologie et taxonomie des rickettsioses des mollusques marins : la coquille saint-Jacques. Colloque "Culture in vitro" des gènes par P.C.R. Applications aux domaines vétérinaires, 14-15 décembre 1989, Ploufragan, France.

Delaunay F., Marty Y. et Galois R., 1990. Besoins lipidiques des larves de *Pecten maximus*. Communication présentée au Colloque Groupement de Coopération scientifique, Bases biologiques de l'Aquaculture, Guidel, France, 5-7 septembre 1990.

Direction Régionale des Affaires Maritimes, 1987. Production Aquaculture en mer de Bretagne, Note interne.

Dosdat A., 1988. Production Aquaculture Nouvelle. Note interne IFREMER.

Epifanio C.E., 1981. Phytoplankton and yeast as foods for juvenile bivalves : a review of research at the University of Delaware. Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition : biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition, Special Publication n°2, Pruder G.D., Landgom C and Conklin Eds., Rehoboth Beach, Delaware, Octobre 1981.

FAO, 1986. Development of aquaculture in Europe. Fifteenth FAO Regional conference for Europe. Istanbul, Turkey, 28/4-2/5/1986, 24 pp.

FAO, 1989. Aquaculture Development and Coordination Program.

Green J.C. and Pienaar R.N., 1977. The taxonomy of the order isochrysidales (Prymnesiophyceae) with special reference to the genera *Isochrysis* parke, *Dicrateria* parke and *Imantonia* Reynolds. J. mar. biol. Ass. U.K., 57:7-17.

Green J.C., 1975. The fine-structure and taxonomy of the haptophycean flagellate *Pavlova lutheri* (Droop) comb.nov (= *Monochrysis lutheri* Droop). J. mar. biol. ,ass. U.K., 55:785-793.

Hew C.L., Trinh K.J., DU S.J., Song S., 1989. Molecular cloning and expression of salmon pituitary hormones. Fish Physiol. Biochem., 7(1-6) : 375-380.

Houdebine L.M., 1987. Les animaux transgéniques. La Recherche, 188(18) : 684-694.

Koren Y., Sarid S., Yaron Z., Daniel Y., 1988. Carp growth hormone mRNA : Molecular cloning and sequencing. French Israeli Symposium, Tel-Aviv (Israel), 10 nov 1986, 44 : 233-236.

Kuhnel M. and Kowallik K.V., 1985. The plastome of a brown alga, *Dictyota dichotoma*. Plant Molecular Biology, 4:365-376.

Laing I., 1985. Factors affecting the large-scale production of four species of commercially important marine algae. Aquaculture, 44:161-166.

Laurec A., 1989. Les grandes orientations de la recherche sur les pêches et cultures marines en France. Rapport IFREMER, 37 pp.

Le Borgne Y., 1986. La culture des microalgues. In : Aquaculture, Ed. Technique et Documentation Lavoisier. Volume I : 182-192.

Lefort-Buson M., Rodolphe F., Charcosset A., 1990a. De nouvelles perspectives pour l'analyse génétique des caractères quantitatifs. 1ère partie : A la recherche des locus importants. Biofutur, 91 : 30-37.

Lefort-Buson M., Rodolphe F., Charcosset A., 1990b. De nouvelles perspectives pour l'analyse génétique des caractères quantitatifs. 2ème partie : La sélection assistée par marqueurs. Biofutur, 92 : 42-47.

- Loiseaux-de Goër S., Markowicz Y., Dalmon J. and Audren H., 1988. Physical maps of the two circular plastid DNA molecules of the brown alga *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. *Curr. Genet.*, 14:155-162.
- Markowicz Y., 1988. Structure et organisation du genome plastidial de l'algue brune *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. Thèse de docteur en biologie, Université Joseph Fourier de Grenoble, 128 pp.
- Markowicz Y., Loiseaux-de Goër S. and Mache R., 1988. Presence of a 16S rRNA pseudogene in the bi-molecular plastid genome of the primitive brown alga *Pylaiella littoralis*. *Evolutionary implications*. *Curr. Genet.*, 14:599-608.
- Marteil L., 1979. La conchyliculture française, l'ostréiculture et la mytiliculture, 3ème partie, 329-451.
- Mialhe E., Boulo V., Cousin K., Grizel H., 1989. Applications of monoclonal antibodies and DNA probes to new diagnostic methods for pathogens of molluscs. First International Marine Biotechnology Conference, Tokyo (Japan), 4-6 sept. 1989, 39 pp.
- Ministère de l'Agriculture, 1986. Note sur l'aquaculture continentale française en 1985, 7 pp.
- Misonou T., Ishihara J., Pak J.Y. and Nitta T., 1989. Restriction endonuclease analysis of chloroplast and mitochondrial DNAs from *Bryopsis* (Derbesiales, Chlorophyta). *Phycologia*, 28(4):422-428.
- Pakdel F., Féon S., le Gac F., Le Menn F., Valotaire Y., 1990. Isolement et caractérisation d'un ADNc complet du récepteur des oestrogènes (RE) chez la truite. Etude de l'expression des ARNm RE dans le foie et mise en évidence dans d'autres organes. Communication présentée au Colloque Groupement de Coopération Scientifique, Bases Biologiques de l'Aquaculture, Guidel, France, 5-7 septembre 1990.
- Palmer J.D., 1986. Chloroplast DNA and phylogenetic relationships. In : *DNA Systematics*, Ed. by S.K. Dutta, Vol. 2 : 63-79.
- Palva.T.K., Lehvaslaiho H., Palva E.T., 1989. Identification of anadromous and non-anadromous Salmon stocks in Finland by mitochondrial DNA analysis; *Aquaculture*, 81 : 237-244.
- Parsons T.R., Stephens K. and Strickland J.D., 1961. On the chemical composition of eleven species of Marine Phytoplankters. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 18(6):1001-1016.
- Pierson W.M., 1983. Utilization of eight algal species by the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 68:1-11.
- Querat B., Jutisz M., Fontaine Y.A., Counis R., 1990. Régulation de l'expression des gènes de la GTH-II chez l'anguille. Communication présentée au Colloque Groupement de Coopération Scientifique, Bases biologiques de l'aquaculture, Guidel, France, 5-7 septembre 1990.

Querellou, J et Bories, J., in Press. Aquaculture in France. Presented at the International Aquaculture Conference, Bordeaux, France, 2-4 Octobre 1989.

Quetier F et Vedel F., 1977. Heterogeneous population of mitochondrial DNA molecules in higher plants. *Nature*, 268:365-368.

Reith M. and Cattolico R.A., 1986. Inverted repeat of *Olisthodiscus luteus* chloroplast DNA contains genes for both

Rentier-Delrue F., Swennen D., Mercier L., Lion ., Benrubi O., Martial J.A., 1989. Molecular cloning and characterization of two forms of trout growth hormone cDNA : Expression and secretion of tGH-II by *Escherichia coli*. *DNA*, 8(2) : 109-117.

Salbert G., Le Goff P., Jego P., Valotaire Y., 1990. Etude de l'ARN messenger du récepteur aux oestrogènes dans l'axe hypothalamo-hypophysaire chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Communication présentée au Colloque Groupement de Coopération Scientifique, Bases Biologiques de l'Aquaculture, Guidel, France, 5-7 septembre 1990.

Scaramuzzi C. and Hiller R., . Molecular studies of the light--hervesting complex of the alga, *Pavlova lutherii*. Poster

subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and the 32,000-dalton QB protein : Phylogenetic implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:8599-8603.

Utting S.D., 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquacultural Engineering*, 4:175-190.

Van Wormhoudt A., Donval A., Toullec J.Y., XU L. et Sellos D., 1990. Carcatérisation des hormones peptidiques contrôlant la croissance : étude des séquences nucléotidiques codant pour ces problèmes. Communication présentée au Colloque Groupement de Coopération scientifique, Bases Biologiques de l'Aquaculture, Guidel, France, 5-7 septembre 1990.

Vivier P., 1972. La pisciculture . Presses Universitaires de France, "Que sais-je?", 127 pp.

Webb K.L. and Chu F.L.E., 1981. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. *Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition : biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition*, Special Publication n°2, Pruder G.D., Landgom C and Conklin Eds., Rehoboth Beach, Delaware, Octobre 1981.

Wikfors G.H., 1986. Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscal food species by varying nitrate and phosphate. *Aquaculture*, 59:1-14.