

ORGANISE
par
IFREMER ET ADEBIO



DEUXIEME COLLOQUE
BIOTECHNOLOGIES MARINES

AVEC LE CONCOURS

DE LA REGION
POITOU CHARENTE



ET

DU CONSEIL GENERAL
DE CHARENTE MARITIME



La Tremblade 28-30 mai 1991.

ORGANISE

par

IFREMER ET ADEBIO

DEUXIEME COLLOQUE

BIOTECHNOLOGIES MARINES

AVEC LE CONCOURS

**DE LA REGION
POITOU CHARENTE**

ET

**DU CONSEIL GENERAL
DE CHARENTE MARITIME**

La Tremblade 28-30 mai 1991.

REMERCIEMENTS

Le succès de ce colloque tient tout d'abord aux nombreux participants, chercheurs d'organismes différents, industriels et responsables régionaux du développement des biotechnologies marines qui ont tous contribué activement au cours de ces trois jours.

Il tient ensuite, au cadre, à l'organisation et à l'accueil réservé par les personnels du Village Vacances PTT de Ronce les Bains et par les collègues d'IFREMER qui ont largement contribué à cette réalisation. Il tient, enfin, au moyen financier et je dois souligner l'aide active de la région Poitou-Charentes, du Conseil général de Charentes Maritimes et d'IFREMER.

Que tous, Présidents, participants, collègues et hôtes soient remerciés pour leur contribution à ce deuxième colloque sur les biotechnologies marines.

L'organisateur local
H. GRIZEL.

PREAMBULE

Ce document est une compilation des présentations effectuées lors du deuxième Colloque de Biotechnologies Marines qui a eu lieu à Ronces les Bains du 28 au 30 mai 1991. Le contenu des notes reproduites dans ce document est sous la responsabilité des auteurs.

SOMMAIRE

INTRODUCTION DU COLLOQUE PAR Y. LE GAL

Thème I - Biotechnologies des microalgues et cyanobactéries

Introduction par Y. HENOCQUE et C. GUDIN	8
Génie des procédés : D. CHAUMONT	10
Génie microbiologique : B. BERLAND	14
Génie génétique : J.P. DUBACQ	19
Ecophysiologie : C. THEPENIER	25

Thème II - Biotechnologies des macroalgues

La production massive de gamétophytes en free-living chez <i>Laminaria digitata</i> (L.) LAMOUR :	
R. PEREZ et R. KAAS	29
L'exploitation des macroalgues = originalité de la filière française : S. MABEAU	40

Thème III - Bactéries Hydrothermales

Les microorganismes des écosystèmes hydrothermaux sous-marins profonds : G. BARBIER	54
Biologie moléculaire du gène chez <i>Archaeobacteries</i> extremophiles : P. FORTERRE	61
Utilisation et potentialités des enzymes thermostables : M. D. LEGOY	69
Les polysaccharides bactériens : M. MILAS	74

Thème IV - Chimie et Biochimie des substances naturelles

Introduction par L. CHEVOLOT	91
Le programme SMIB : J.M. CHANTRAINE et C. DEBITUS	92
Les antibiotiques d'origine marine :	
L. BOURGUET-KONDRACKI	107
Activités antibactériennes et antifongiques chez des Algues marines : D. PESANDO, N. BOUAICHA et S. PUISEUX-DAO	110
Utilisation des substances naturelles marines :	
L. CHEVOLOT	134
Propriétés antioxydantes d'extraits d'algues :	
B. LE TUTOUR	135
Screening et méthodologie de recherche de produits potentiellement anticancéreux : C. ROUSSAKIS	166
Substances antitumorales d'origine marine : bilan et perspectives : M. GUYOT	169

Thème V - Valorisation des produits de la mer

Introduction par P. DURAND	174
Bilan des matières premières exploitables : G. MARCO	176
Génèse enzymatique de substances d'arômes : J.M. BELIN	181
Chitine, chitosane, production, propriétés physico- chimique et applications : A. DOMARD	194

Stratégie de valorisation de co-produits : un défi pour la filière mer en Bretagne : Y. BATREL	200
Conclusion par P. DURAND	208
Thème VI - Transfert de gènes	
Stratégie de recherches sur la transgénose chez les Invertébrés marins en vue de l'obtention de souches résistantes aux maladies : E. MIALHE <i>et al.</i> ,	210
Thème VII - Biotechnologies et lutttes contre les pollutions marines dues aux hydrocarbures	
Traitement du pétrole brut par fermentation : biodégradation, production de biomasse et de biosurfactants : J. C. BERTRAND et M. GILEWICZ	217
Perspectives ouvertes par le génie génétique sur le traitement des pollutions par les hydrocarbures : C. DANGLLOT, B. LEMLIH, W. KUCHTA et R. VILAGINES	228
Accélération de la biodégradation des hydrocarbures : A. BASSERES et A. LADOUSSE	244
Thème VIII - Biocapteurs	
Biocapteurs : Principes et potentialités : L. BLUM, et P. COULET	249
Thème IX - Microorganismes recombinés	
La survie des entérobactéries en mer : G. FLATAU, R. CLEMENT et M. GAUTHIER	258
Thème X - Législation et propriété industrielle	
Droit et biotechnologies marines : encadrement actuel et évolution probable : C. NOIVILLE	266
Annexe I - Liste des participants	

LES BIOTECHNOLOGIES MARINES

Yves LE GAL

Laboratoire de Biologie Marine du Collège de France
29182 Concarneau cédex

Le cadre général de ce deuxième colloque national de Biotechnologies marines peut être défini de deux manières. Ce sont, en premier lieu, les aspects fondamentaux qui dessinent l'enveloppe d'une discipline dont l'aspect multidisciplinaire peut donner, parfois, aux observateurs extérieurs et pressés une image floue.

Il convient tout d'abord de rappeler l'ancienneté du monde vivant marin. Ses 3 milliards d'années représentent un âge respectable si on le compare à celui des premiers êtres terrestres. Ceci a pour conséquence une diversité d'espèces, de systèmes d'organisation, de formes, de solutions adaptatives dont les récentes recherches dans le domaine de l'évolution moléculaire donnent un premier aperçu. On assiste réellement aujourd'hui à une expansion d'une exceptionnelle ampleur de notre univers vivant. Et ce phénomène a pour base essentielle ce que nous apprenons des organismes et systèmes marins.

Le monde vivant est complexe comme l'est tout élément aquatique, mais avec un changement d'échelle et un effet multiplicateur correspondant à la multiplicité et aux possibilités d'interaction entre les différents systèmes. Dans cet ensemble, le biochimiste remarquera en particulier l'existence de réseaux d'interactions agissant à différents niveaux en termes de concentrations de molécules. Au niveau le plus élevé, les réseaux trophiques déterminant les grands équilibres sont sous-tendus par des interactions plus subtiles de type métabolique : on sait en effet que de nombreux cycles métaboliques à l'intérieur d'un individu sont altérés ou tronqués. La continuité des voies est cependant assurée grâce au transfert de molécules entre organismes de différentes espèces. Les cycles métaboliques complets agissent en réalité sur le fonctionnement complémentaire de multiples organismes.

A un niveau plus subtil, les écosystèmes marins sont stabilisés, régulés par des réseaux de communication faisant intervenir des signaux (attractants, répulsifs), des toxines et constitués de molécules aux structures tout à fait originales.

D'une manière générale, il est de plus en plus clair que nos connaissances sur la chimie et la biochimie des systèmes marins sont encore très fragmentaires et ne représentent très vraisemblablement qu'une infime partie de ce qui reste à découvrir, à exploiter et à gérer.

On observe actuellement un mouvement de grande ampleur, notamment au Japon, aux USA, et dans le domaine particulier de la valorisation des sous-produits de la pêche, dans les pays scandinaves. Dans ces deux pays, l'exploitation de ressources biologiques en biomasse mais surtout en diversité marines constituent réellement une nouvelle frontière et un objectif majeur pour la science, la technologie, le développement des décennies à venir. Ce mouvement se traduit de manière visible par un certain nombre d'initiatives et de réalisations : création au Japon du Marine Biotechnology Institute (MBI), tenue de colloques internationaux de Biotechnologie marine (Tokyo, 1989 ; Baltimore, 1991).

A noter également la création par l'Université de Tokyo d'une chaire de Biotechnologie Marine (RCAST Chair of Marine Biotechnology) destinée aux chercheurs étrangers.

Le champ des activités relevant des biotechnologies marines est vaste et recouvre des domaines extrêmement variés (Fig. 1). Dans cet ensemble, ce sont les opérations de valorisation de sous-produits de la pêche et de l'aquaculture qui représentent non seulement les tonnages traités les plus considérables mais aussi la majorité des réalisations industrielles existantes (autolyse enzymatique des produits de la pêche, traitement des algues, production de chitine, etc.).

Mais il ne faut pas négliger l'émergence d'autres secteurs, porteurs d'une plus grande valeur ajoutée : enzymes, peptides biologiquement actifs. A noter le secteur particulièrement prometteur des adhésifs et celui, d'une considérable importance économique du fouling et des substances antifouling extraites d'organismes marins.

Le domaine des substances naturelles d'origine marine est encore relativement peu développé en comparaison de l'énorme potentiel qu'il représente en pharmacie ou en cosmétologie. Il est clair cependant que des développements tout à fait intéressants sont attendus de ce secteur même si, à ce jour, seule une petite dizaine de substances a donné lieu à des développements industriels.

Un troisième grand domaine est constitué par les applications des connaissances en biologie du développement. La maîtrise des opérations d'aquaculture suppose que l'on dispose de données

précises sur le déroulement au niveau moléculaire des programmes de développement et, qu'éventuellement, on sache adapter les techniques du génie génétique à la production d'organismes plus productifs, plus stables ou plus résistants.

A cette aquaculture alimentaire, il convient d'ajouter un domaine nouveau et tout à fait important : celui de la production d'organismes marins modèles destinés aux expérimentations animales. Il s'agit ici de produire des lignées définies d'aplysies, de crevettes, d'éponges, comme on sait le faire aujourd'hui pour les rats ou les souris.

Cette aquaculture-là se réalise dans des conditions tout à fait particulières de rentabilité et doit être prise en compte sérieusement par les scientifiques.

Ce vaste ensemble d'activités, de domaines de recherche, de procédés biotechnologiques peut apparaître disparate . Ceci, d'autant plus qu'en France de nombreux acteurs interviennent dans des "Biotechnologies Marines" (Fig. 2).

Le secteur public y est représenté par ses grands organismes : CNRS, IFREMER, ORSTOM, mais aussi, pour certains secteurs très particuliers, par le CEA, l'INSERM, l'INRA.

Les universités participent très activement à ce mouvement même si la dispersion des équipes et les conditions souvent difficiles qui leurs sont faites masquent l'importance et l'impact de l'effort réalisé.

Ce qu'il convient de signaler, cependant, c'est l'existence d'une réelle cohésion de ce très vaste ensemble.

En tout premier lieu, il convient de signaler les liens financiers créés par les systèmes d'associations (CNRS) et d'incitation (IFREMER) entre de nombreux laboratoires ou institutions.

Ensuite, et en dehors de ces liens officiels, il ne faut nullement négliger l'intérêt et l'impact de l'ADEBIO-Biotechnologies Marines comme lien et élément de structuration de ces activités : création de réseaux, organisation de colloques, de tables rondes, réalisation (même modeste) d'un annuaire.

L'ADEBIO-Biotechnologies Marines, grâce aux liens qu'elle crée entre les chercheurs, les équipes et les industriels assure un ensemble de ponts et de communications qui, sans doubler aucunement les activités des grands organismes, facilite efficacement les concertations et les activités conjointes. Le présent colloque s'inscrit parfaitement dans cette dynamique.

Figures

Fig. 1 : Panorama des Biotechnologies Marines

Fig. 2 : Les Biotechnologies Marines en France

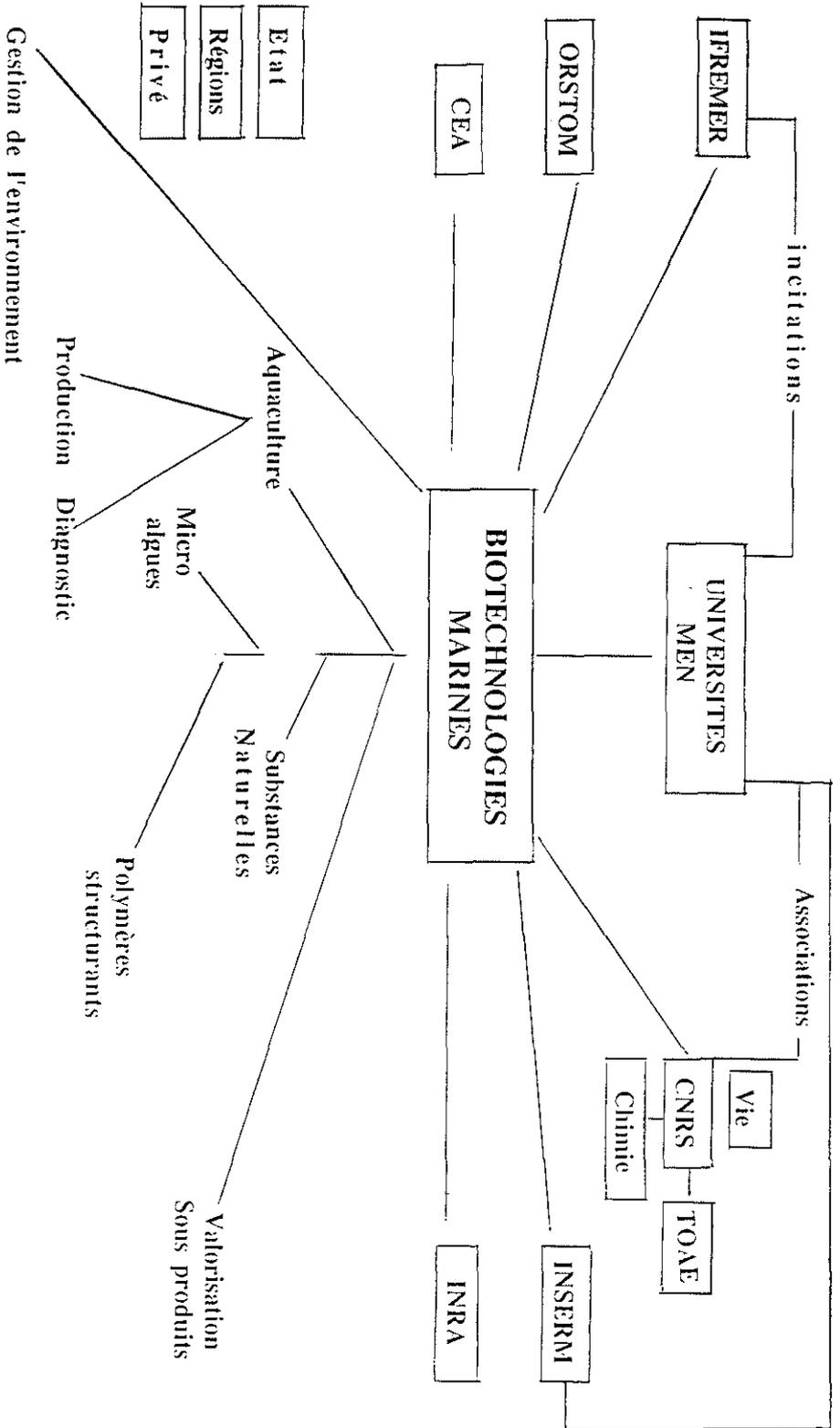


Figure 2

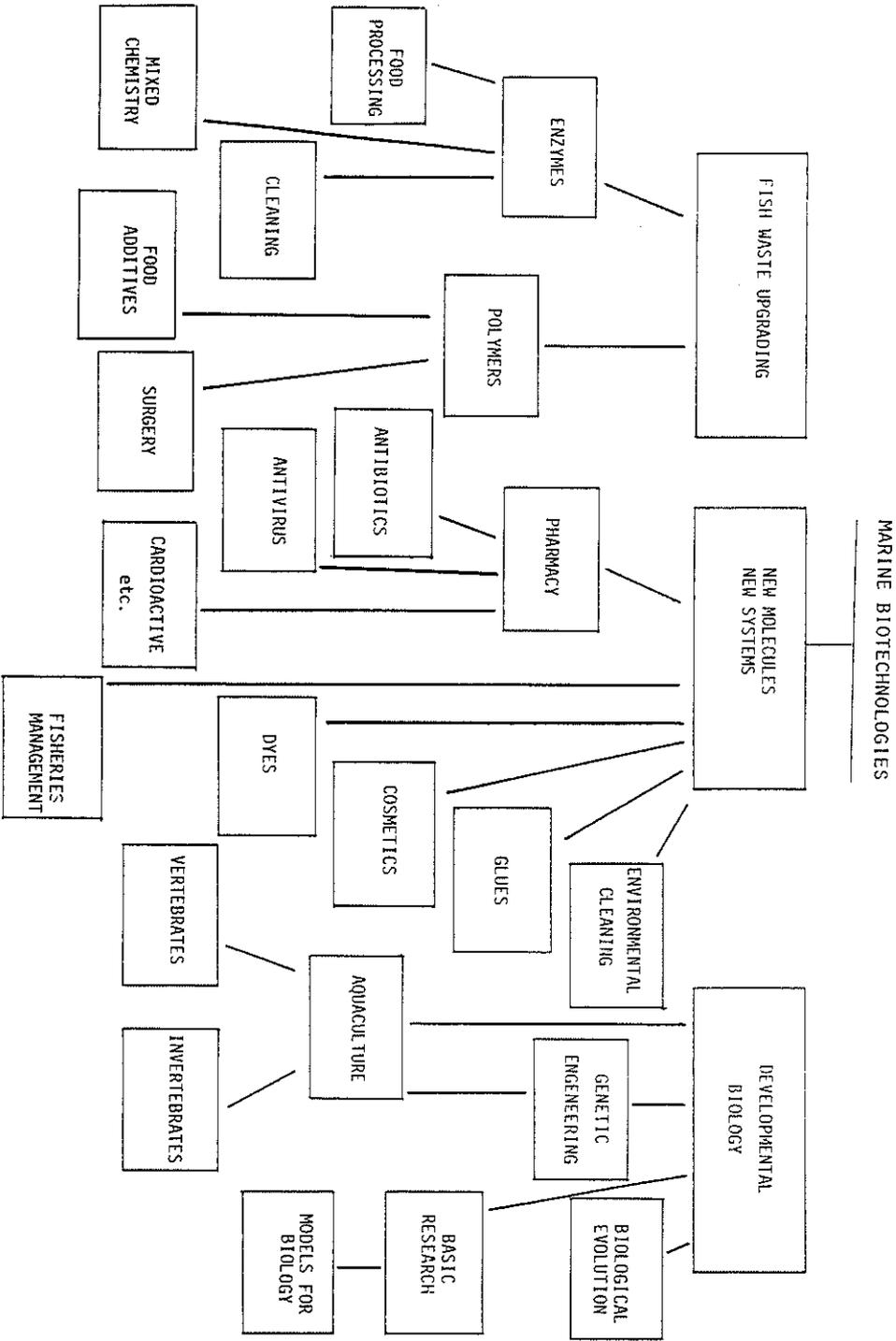
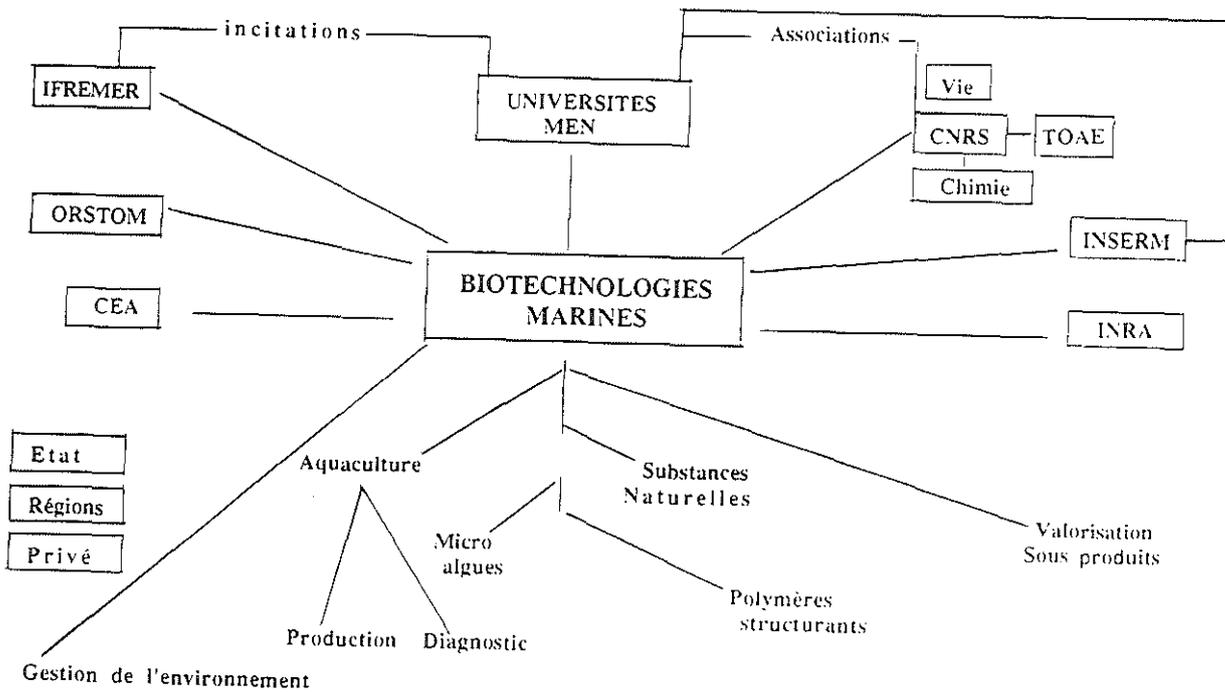
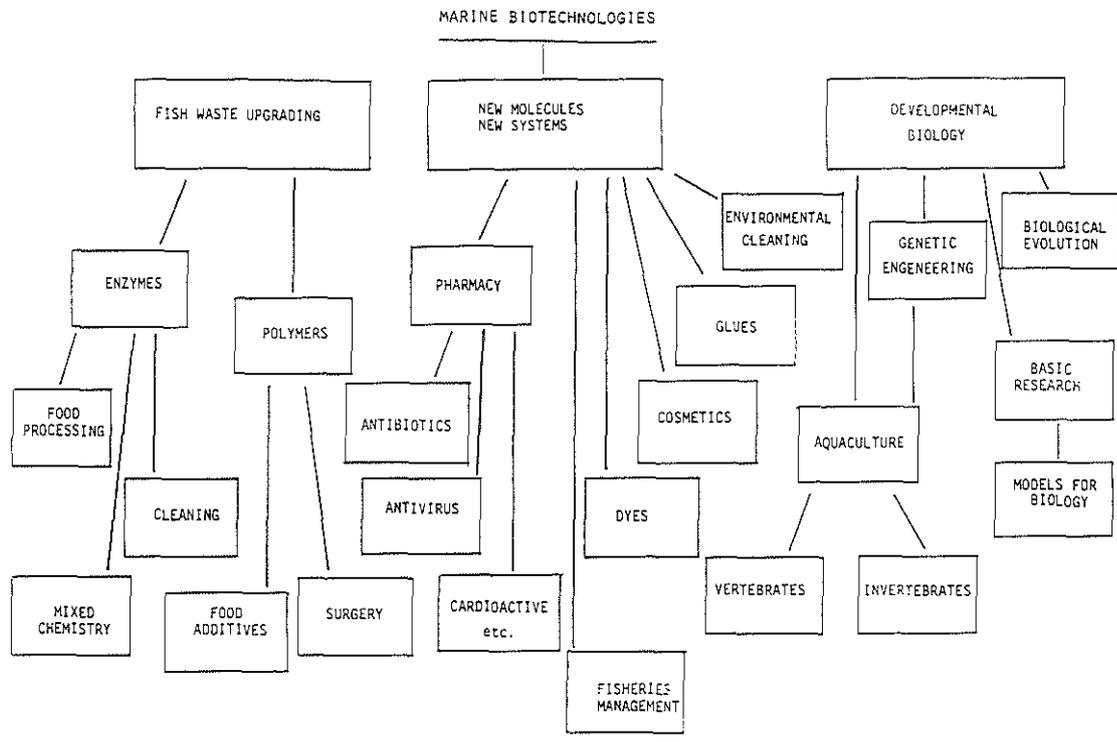


Figure 1



T H E M E 1

BIOTECHNOLOGIES DES MICROALGUES

ET DES CYANOBACTERIES

BIOTECHNOLOGIE DES MICROALGUES ET DES CYANOBACTERIES

- ETAT DES RECHERCHES -

Animateur: Y.HENOCQUE

HENOCQUE.Y: IFREMER Technopolis 40, 155 rue JJ.Rousseau.
92138 Issy-les-Moulineaux cédex.

GUDIN.C: Laboratoire de Biotechnologie des Microalgues/DPVE.
CEN Cadarache. 13108 St Paul-les-Durance cédex.

Lors de la réunion de travail des 7 et 8 Novembre 1990 à Cadarache, le principe de la constitution d'un réseau national de recherches en Biotechnologie des Microalgues et des Cyanobactéries a été retenu. Afin de préparer les bases d'une programmation coordonnée, plusieurs groupes de travail ont été constitués autour de grands thèmes horizontaux, sous l'impulsion de C.GUDIN, chargé de mission par le Ministère de la Recherche et de la Technologie pour établir un bilan sur les recherches menées en France sur la Biotechnologie des Microalgues et des Cyanobactéries.

Ceci a donné lieu à la publication par le Réseau d'un annuaire de Biotechnologie des Microalgues et des Cyanobactéries disponible sur demande auprès de Y.HENOCQUE (IFREMER) ou C.GUDIN (CEA). Les rapports des 5 groupes de travail et le rapport final de C.GUDIN sont également disponibles sur demande auprès de C.GUDIN.

Le constat d'ensemble fait apparaître les points suivants:

- Une centaine de chercheurs travaillent en France sur cette thématique, de l'amont vers l'aval.

- Les recherches sont effectuées dans ou instituts variés.

- Les équipes sont souvent de petite taille (1 à 2 personnes) et très dispersées géographiquement, d'où la nécessité d'un Réseau. A noter toutefois une coopération active entre l'IFREMER et le CEA dans le cadre d'une convention de recherches, Cadarache étant pour l'instant le lieu privilégié de cette collaboration avec la perspective d'un pôle Méditerranéen de transfert industriel qui est assuré par USSI-INGENIERIE dans le cadre de la Société d'Héliosynthèse (Salins de Giraud, 1992).

Sont présentés ci-après les rapports des groupes de travail suivants:

- Génie Génétique: JP.DUBACQ.
Ecophysiologie: C.THEPENIER.
- Génie microbiologique: B.BERLAND.
- Génie des procédés: D.CHAUMONT.

A signaler qu'un DEA de Biotechnologie marine incluant un enseignement de Biotechnologie des Microalgues et des Cyanobactéries est opérationnel depuis 1990 à la Faculté d'AIX-MARSEILLE 2 (COM). Le responsable du DEA est Mr JC.BERTRAND et les responsables de l'enseignement de Biotechnologie des Microalgues et des Cyanobactéries sont C.GUDIN et B.BERLAND.

GENIE DES PROCÉDES

Daniel CHAUMONT

Groupe de Biotechnologie des Microalgues

DPVE / CEN de Cadarache

13108 SAINT-PAUL-LES-DURANCE CEDEX

Si l'on analyse l'ensemble des brevets internationaux postérieurs à 1971 relatifs aux procédés de production de microalgues, on constate que globalement, la technologie se trouve répartie dans 2 pays :

- USA : technologie de culture à ciel ouvert (lagunes ou bassins plus ou moins aménagés) avec comme objectif la production de biomasse (en particulier de Spirulina) ou l'épuration d'eaux usées,

- FRANCE où le savoir-faire réside en particulier dans la technologie des réacteurs clos. Ce savoir-faire constitue une spécificité reconnue mondialement. Cette technologie s'adresse à la production contrôlée de biomasse ou de métabolites à haute valeur ajoutée. Son principal avantage est de permettre une meilleure stabilité qualitative de la biomasse (culture continue) et des productivités plus élevées. La plupart des facteurs de production est contrôlée : elle autorise ainsi l'orientation du métabolisme de l'algue vers la synthèse du métabolite recherché. C'est ainsi que l'oxygène agit sur la synthèse d'antioxydant (enzymes, vitamines), la lumière sur celle des pigments (caroténoïdes, phycoérythrine) et la température sur celle des acides gras polyinsaturés (acide arachidonique, acide écosapentaénoïque).

On oppose depuis longtemps ces 2 technologies non seulement sur le plan technique mais aussi sur le plan économique. En réalité, les prix de revient sont du même ordre de grandeur. En effet, les concentrations cellulaires obtenues en système clos sont 10 à 20 fois plus importantes et les coûts de récolte pour séparer la biomasse cellulaire contrebalancent ainsi des coûts de production plus élevés liés à un investissement important.

Une des principales conclusions du dernier Congrès d'Algologie Appliquée (Tiberias, Israël, Janvier 1990) a été de reconnaître que la culture de microalgues à ciel ouvert avait atteint ses possibilités maximales et que la différence existant entre les potentialités biologiques des microalgues et les productivités réellement obtenues ne pourra être réduite que par la culture en réacteur clos.

Ce congrès a également permis de faire le point sur les différents systèmes clos à l'étude :

- Réacteur tubulaire horizontal (Groupe de Biotechnologie des Microalgues, CEN de Cadarache - Brevets Français n°87 13647, 90 00279, 91 03781)

- Réacteur tubulaire vertical (PHOTOBIOREACTOR LTD, Murcia, Espagne) ou incliné (Collaboration CEA / IFREMER)

- Réacteur hélicoïdal (Université de Murdoch, Australie)

- Fermenteur classique, non transparent et éclairé par des fibres optiques plongeant dans la culture (O.V.I., Bordeaux).

La première recommandation du Groupe de Travail "GENIE DES PROCÉDES" est de poursuivre l'effort de recherche dans le domaine des réacteurs clos afin de conserver l'avance technologique acquise, avec comme objectifs

- Une meilleure fiabilité
- Une optimisation sur le plan technique de ce concept.

Pour atteindre ces deux objectifs, les 2 principales voies de recherche identifiées sont les suivantes:

- HYDRODYNAMISME ET TECHNOLOGIE DE CIRCULATION DE LA CULTURE

La mise en circulation de la culture a pour double finalité de maintenir la suspension de microalgues homogène et d'assurer de bons transferts gaz / liquide / cellule. Une solution consiste à maintenir un régime turbulent et donc une vitesse de circulation élevée. De telles conditions de culture engendrent des forces corrosives au niveau cellulaire. Il s'agit donc de trouver, en fonction des caractéristiques de chaque espèce de microalgue, un juste milieu entre cette fragilité cellulaire et la nécessité de maintenir un régime de fluide turbulent. L'air-

lift est une technologie particulièrement adaptée pour circuler des microalgues fragiles (espèces flagellées comme Haematococcus, Dunaliella...) et sa supériorité par rapport aux pompes a été démontrée.

- L'ASEPSIE

Mis à part quelques cas particuliers comme Spirulina (culture entre pH 9 et 11), Dunaliella (eaux sursalées, 3M NaCl), Scenedesmus ou Chlorella (algues écologiquement dominantes), la plupart des cultures sont sensibles aux contaminations. La réalisation d'une culture monospécifique implique :

- De disposer de souches axéniques obtenues au laboratoire par micropipettages ou étalements en boîte de Pétri. Cette axénie doit être maintenue au cours de la préparation des différents inocula nécessaires à la mise en culture d'une unité de production de microalgues.

- Pour maintenir cette stérilité, les réacteurs de culture doivent obéir aux principaux impératifs suivants:

- Efficacité de la stérilisation préalable
- Résistance du photobioréacteur aux agents stérilisants
- Fiabilité des composants inaccessibles (sondes de mesure, pompes...)
- Contrôle des échanges avec l'ambiant
- Configuration du système de culture (en particulier absence de points bas)
- Prévention de l'adhérence des algues sur les parois des tubulures
- Etanchéité des différentes parties du système de culture les unes par rapport aux autres.

Une solution envisageable est la pressurisation du réacteur de culture. Une pression interne supérieure à l'ambiant de l'ordre de 0,5 à 1 bar permet en effet, dans le cas où des échanges culture /ambiant existent, de n'avoir que des échanges de l'intérieur vers l'extérieur du réacteur évitant ainsi toute contamination de la culture. Ce Type de réacteur est actuellement étudié à Cadarache par A. MULLER-FEUGA dans le cadre de la collaboration CEA / IFREMER.

La deuxième recommandation du groupe de travail est de diversifier la technologie de culture par l'étude de nouveaux types de réacteurs.

- REACTEUR A CELLULES IMMOBILISEES pour la production de métabolites excrétés dans le milieu de culture (polysaccharides, hydrocarbures, toxines, agents d'osmorégulation...) ou pour la dépollution par bioaccumulation d'éléments. Une compétence dans ce domaine est disponible : UTC de Compiègne, INTECHMER, CEA (C. Thepenier, Thèse UTC de Compiègne, 1984).

- REACTEUR A DIALYSE mettant en oeuvre des échanges à travers des membranes et destiné à la culture d'algues très fragiles (Dinoflagellés...).

Enfin le groupe de travail recommande des thèmes d'études plus généraux :

- PILOTAGE DES PHOTOBIOREACTEURS : automatisme, système de surveillance et d'alarme connecté au réseau de télécommunication

- MODELISATION : utile pour la conception et le dimensionnement des outils de production et leur exploitation.

GENIE MICROBIOLOGIQUE

- B.BERLAND -

Centre Océanologique de Marseille,
Rue de la batterie des lions.13007 MARSEILLE.

Plus de 1000 souches de Microalgues et de Cyanobactéries ont été répertoriées en France. Elles se répartissent comme suit:

- Souches d'origine dulçaquicole: 650
- Souches d'origine marine: 300
- Souches d'origine terrestre: 60
- Souches de sédiments: quelques unes.

LES COLLECTIONS

Leur contenu:

8 Algothèques contenant au moins 30 souches ont été répertoriées dans 7 administrations ou instituts:

INSTITUT PASTEUR (PARIS) :	essentiellement des Cyanobactéries.	420
MUSEUM D'HISTOIRE NATURELLE: (PARIS)	souches d'eau douce: Chlorophycées, Euglènes.	400
UNIVERSITE DE CAEN:	souches marines: Phytoflagellés notamment.	110
CEA (CADARACHE):	souches à intérêt industriel	80
INSERM (VILLEFRANCHE/MER):	souches marines: Diatomées notamment.	65
COM (MARSEILLE):	souches marines.	60
INRA (THONON LES BAINS):	souches d'eau douce: Chlorophycées, Cyanobactéries.	50
IFREMER (BREST):	souches marines pour aquaculture.	30

Différents laboratoires possèdent une collection de taille réduite, correspondant à une thématique bien précise:

- IFREMER (NANTES): Dinoflagellés toxiques.
- UNIVERSITE (NANTES): Navicula ostrearia.
- UNIVERSITE (TOULOUSE): Diatomées d'eau douce.
- UNIVERSITE (PERPIGNAN): Plancton thermal.
- UNIVERSITE (AIX-MARSEILLE 2): Cyanobactéries d'eau douce.

La plupart des souches ont été isolées par les chercheurs de ces laboratoires. Les niches écologiques sont en général identifiées.

La majorité des Cyanobactéries sont axéniques mais par contre peu de Microalgues eucaryotes le sont.

Peu de souches sont manipulées. Elles le sont uniquement par forçage physiologique ou par sélection phénotypique (essentiellement les Cyanobactéries). Quelques espèces font l'objet d'études génétiques.

Seules 2 algothèques possèdent un catalogue:

- L'INSTITUT PASTEUR qui diffuse un catalogue international.
- L'UNIVERSITE DE CAEN qui a publié une liste dans une revue internationale.

Leur entretien:

Les Microalgues eucaryotes sont entretenues en milieux liquide ou gélosé. Seules les Cyanobactéries de l'INSTITUT PASTEUR sont conservées dans l'azote liquide.

Presque toutes les collections ont eu des problèmes de contamination par des bactéries ou des champignons entraînant parfois la perte des souches. Quelques cas de virus ont été constatés et identifiés: les souches sont alors repurifiées ou réisolées.

Ces collections sont la plupart du temps entretenues avec des crédits de fonctionnement de laboratoire. L'entretien incombe souvent à des chercheurs, des techniciens, voire des étudiants dont ce n'est pas la tâche prioritaire. Seule la collection de Cyanobactéries de L'INSTITUT PASTEUR bénéficie de fonds propres et d'une technicienne à mi-temps.

L'équipement est en général limité à une hotte à flux laminaire et une salle de culture. Le CEA possède des enceintes climatisées (photopériode et thermopériode).

TAXONOMIE

Les déterminations sont en général effectuées sur des critères morphologiques, appuyées parfois par des mesures par analyseur d'images. Une approche par biologie moléculaire est mise en oeuvre chez les Cyanobactéries.

Très peu de collections sont supervisées par des taxonomistes. Un certain nombre de souches ne sont identifiées que jusqu'au genre.

ACQUIS SUR LA MICROBIOLOGIE DES CULTURES

Les contaminants:

De grandes difficultés sont observées pour maintenir des cultures algales axéniques sur une longue durée, notamment en mode continu. La limitation est surtout d'ordre méthodologique. Les contaminants les plus courants sont les bactéries, les champignons et les virus. Il est difficile de s'en débarrasser par des variations des paramètres de culture: -pH -température -salinité.... Il n'existe pas de traitement direct qui n'affecte pas momentanément le développement algal.

Dans les cultures en masse on observe parfois des contaminations avec des Protozoaires (ciliés, amibes) et d'autres microalgues. Il est possible alors en fonction de l'espèce contaminante de limiter son développement en jouant sur les conditions de culture (pH, taux de dilution, éléments nutritifs). Par contre il est très difficile de se débarrasser des formes résistantes.

Interactions entre microorganismes:

Il a souvent été observé la présence de substances ectocrines stimulantes ou inhibitrices dans les filtrats de culture de nombreux microorganismes. De même les phénomènes de compétition nutritionnelle ne sont pas négligeables. Ainsi en rendant les souches axéniques, on observe parfois des modifications de leur croissance.

LES POINTS A CONSOLIDER

- Répertorier toutes les souches pour établir un catalogue national mentionnant les caractéristiques écophysologiques et nutritionnelles.

- Etablir une banque de données sur les espèces les plus étudiées.

- Regrouper la collection en un nombre limité de laboratoires (de préférence aux endroits où il y a un taxonomiste).

- Affecter les moyens nécessaires à l'entretien des collections.

- Maintenir quelques taxonomistes.

LES RECHERCHES A DEVELOPPER

- Développer des méthodes d'identification plus performantes (chimiotaxonomie, ARN ribosomal).

- Développer les recherches sur les interactions entre microorganismes: compétition, symbiose, pathologie.

- Développer les méthodes de préservation des souches (cryopréservation, lyophilisation).

**LISTE DE MICROALGUES ET DE CYANOBACTERIES
ETUDIEES EN FRANCE**

LABORATOIRE	CLASSE	ESPECE
CEA Cadarache	Rhodophycées	Porphyridium cruentum Porphyridium aerugineum
	Chlorophycées	Haematococcus pluvialis Dunaliella salina Chlamydomonas mexicana
	Haptophycées	T.Iso
INSERM/CNRS Villefranche/mer	Diatomées	Chaetoceros lauderi Asterionella japonica
	Dinophycées	Prorocentrum minimum Gambierdiscus
IFREMER Brest et Nantes	Chlorophycées	Dunaliella tertiolecta Tetraselmis suecica
	Dinophycées	Alexandrium tamarense Prorocentrum lima Gyrodinium aureolum
	Haptophycées	T.Iso Pavlova lutheri
	Diatomées	Skeletonema costatum
ENS Paris	Rhodophycées	Rhodella violacea
	Cyanobactéries	Spirulina
ENSCP Paris	Chlorophycées	Botryococcus braunii
COM Marseille	Chlorophycées	Nannochloropsis salina
	Dinophycées	Prorocentrum minimum
	Haptophycées	Pavlova lutheri
	Diatomées	Thalassiosira pseudonana
INRA Thonon	Cyanobactéries	Oscillatoria rubescens Microcystis
INSTITUT PASTEUR Paris	Cyanobactéries	Calothrix Synechocystis
UNIVERSITES Caen	Chlorophycées	Brachiomonas submarina Monodus subterraneus
	Rhodophycées	Rhodella
Nantes Luminy	Diatomées	Phaeodactylum tricornutum
	Diatomées	Navicula ostrearia
	Cyanobactéries	Synechocystis
INTECHMER	Rhodophycées	Rhodella violacea

Biotechnologie des microalgues et des cyanobactéries: Génie génétique

1- Bilan des recherches en cours.

1-1. Equipes travaillant dans le domaine:

Le but de cet exposé n'est pas un recensement exhaustif des équipes et des travaux mais un ciblage des groupes en fonction des objectifs du réseau microalgues et un état de l'avancement des travaux. Dans les mois qui vont suivre certaines lignes de recherche d'une équipe peuvent être abandonnées ou apparaître dans un autre groupe qui ne sera pas cité ici. Il s'agit donc d'une image instantanée et fluctuante.

1-1-1 Equipes spécifiquement impliquées dans des travaux sur des microalgues:

Ces équipes se distinguent par la plus grande variété des algues utilisées, la diversité des aspects abordés et le fait que les algues sont leur matériel principal sinon exclusif.

✧ Institut Pasteur - Unité de physiologie microbienne (N. TANDEAU de MARSAC), Cyanobactéries: génome, adaptation à l'environnement.

✧ ✧ Ecole Normale Supérieure - Laboratoire des biomembranes et surfaces cellulaires végétales CNRS URA 311 (J.C. DUVAL) antenne photosynthétique des algues et des Cyanobactéries: fonctionnement, composition et régulation de la biosynthèse, gènes impliqués.

✧ ✧ ✧ Equipe de Biologie cellulaire et moléculaire des algues marines à ROSCOFF, (S. de GOER, B. KLOAREG), préparation et culture des protoplastes, génome chloroplastique d'algues ou de protoplastes d'algues brunes et rouges, génome nucléaire.

✧ ✧ ✧ ✧ CEA Cadarache (C.GUDIN) sélection de souches productives et cultures en masse et également CEA Laboratoire des Cyanobactéries (F. CHAUVAT) radiorésistance et expression de gènes codant pour des hormones et des antibiotiques chez *Synechocystis*.

D'autres équipes comme celle de F. JOSET à Marseille (*Synechocystis*) travaillent également sur les microalgues.

1-1-2 Equipes utilisant entre autres matériel expérimental, des microalgues, dans leur domaine de recherche

Ces diverses équipes utilisent les algues essentiellement comme modèle pour des études biochimiques et physiologiques.

-IBPC (P. JOLIOT, F.A. WOLLMAN, P. BENNOUN) pour la biologie moléculaire et la génétique du chloroplaste chez *Chlamydomonas*;

-CNRS GIF Laboratoire de Biochimie des membranes (A. TREMOLIERES J. GARNIER) pour le chloroplaste de *Chlamydomonas* et les lipides;

-CNRS GIF Laboratoire de photosynthèse (A.L. ETIENNE, C. ASTIER) pour la photophysique et l'analyse biochimique et génétique de l'appareil photosynthétique des Cyanobactéries.

1-2. Bilan des activités en cours dans les différentes équipes plus spécifiquement concernées:

1-2-1. Activités concernant les complexes pigmentaires

Elles concernent soit les phycobilisomes des Cyanobactéries et des algues rouges soit l'antenne des algues brunes ou d'autres pigments.

⊗ Les recherches sont très avancées en ce qui concerne les **Cyanobactéries**. Les gènes de nombreuses **apoprotéines des phycobilisomes** ont été **clonés** et la régulation de leur expression a été étudiée en fonction de divers facteurs de l'environnement tels que la lumière et les conditions nutritionnelles (ex: **adaptation chromatique**, disponibilité en soufre). Cette régulation s'effectue au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Grâce à l'utilisation de **mutants** et de manipulations génétiques sur des Cyanobactéries on peut encore approfondir l'étude. Ces modifications de l'équilibre des composants des phycobilisomes peuvent être utilisées pour orienter une culture vers la production spécifique de certains pigments.

⊗ ⊗ Pour ce qui concerne les **Rhodophycées**, les travaux sont moins avancés mais déjà l'utilisation des sondes cyanobactériennes a permis d'aborder l'étude du génome des algues rouges, notamment de **cloner et d'analyser les gènes codant pour les apoprotéines de la phycoérythrine** chez la microalgue marine: *Rhodella*.

⊗ ⊗ ⊗ Le génome des **Phéophycées** est étudié surtout au niveau chloroplastique sur une "microalgue" filamenteuse: *Pylaiella*. Ce génome est cartographié et connu de façon très détaillée. Il apporte des informations sur l'**origine et l'évolution de l'ADN des plastes**. Ce travail montre l'origine multiple probable du plaste des Phéophycées faisant intervenir au moins 2 endosymbiontes dont l'un serait proche des bactéries pourpres et l'autre cyanobactérien.

⊗ ⊗ ⊗ ⊗ Par ailleurs l'étude de la structure et du fonctionnement de l'antenne des algues (Cyanobactéries, Algues rouges et Algues brunes) a abouti à l'**isolement de protéines de l'appareil photosynthétique** et à la préparation des anticorps correspondants. Ils permettent d'aborder des problèmes plus complexes liés au génome nucléaire et aux **interactions de contrôles entre le noyau et le plaste** pour l'édification des structures photosynthétiques. Ce travail a déjà été entrepris par la préparation des ARN et ADN en utilisant soit des protoplastes (*Laminaria*, *Chondrus*) soit des microalgues telles que *Rhodella* (Rhodophycée) et *Giraudyopsis* (Chrysophycée). Ceci doit permettre d'accéder maintenant à l'étude de **gènes nucléaires et chloroplastiques**.

⊗ ⊗ ⊗ ⊗ ⊗ **Caroténoïdes et Xanthophylles**

En ce qui concerne les pigments caroténoïdes, des études sur les modifications induites par les conditions de culture et les phénomènes de **photoinhibition** sont actuellement en cours. Ils sont essentiellement orientés vers le **cycle des xanthophylles** qui permet de modifier les proportions de différents pigments en réponse à un excès d'éclairement. Ces modifications contrôlées donnent accès à une composition spécifique par un traitement post-culture. La production de **pigments spécifiques** tels que l'**astaxanthine** est également étudiée.

1-2-2 Activités ne concernant pas les pigments:

⊕ **Expression de certains gènes** Chez les Cyanobactéries, les gènes qui spécifient des étapes de certains types de **différentiation** ont été étudiés. Par exemple la **glutamine-synthétase** et une **nucléotide-cyclase** ont été caractérisées. Leur régulation par phosphorylation semble importante pour le développement des hétérocystes et la fixation de l'azote. De même, un **gène essentiel pour le développement des vésicules à gaz** a été identifié chez *Pseudanabaena*.

Dans un travail portant sur l'espèce *Synechocystis* PCC6803 l'équipe de CHAUVAT a beaucoup étudié le problème du **fonctionnement des promoteurs et l'expression de vecteurs** dans cette Cyanobactérie. Il poursuit ce but en étudiant les processus de recombinaison génétique par analogie avec *E. coli* afin de limiter le remaniement des plasmides introduits dans la cyanobactérie. Sur cette même espèce F. JOSET étudie des mutants de perméases.

Chez *Pylaiella* les **ARNr 16S, l'espaceur de l'opéron ribosomique et les 2 sous-unités de la Rubisco** ont été analysés, avec la même optique de compréhension de l'origine phylogénétique des Phéophycées. Cette étude se poursuit avec les ARN 5S et 23S.

1-2-3 Activités dans le domaine biotechnologique:

⊕ La préparation de **protoplastes** surtout orientée vers les macroalgues, l'extension de cette activité aux microalgues est en cours. Avec des *Sphacelaria*, des débuts de régénération sont obtenus. Les **protoplastes** de macroalgues (*Laminaria, Chondrus*) sont une forme particulière de microalgue qui doit permettre de travailler avec les mêmes objectifs que ceux envisagés avec des espèces unicellulaires .

⊕ ⊕ L'obtention et utilisation de **mutants**: de nombreux travaux fondamentaux ont fait appel à la mutagenèse aussi bien avec les Cyanobactéries essentiellement *Calothrix, Synechocystis* qu'avec les algues vertes du type *Chlamydomonas* . En dehors de ces espèces **peu de souches mutantes** ont été obtenues et toute l'exploitation de cette technologie reste à intensifier ou à créer autant pour des études fondamentales que pour des applications .

On peut également noter dans ce chapitre des travaux sur la **transformation** pour obtenir la production d'hormones (somatomédine) par **génie génétique** chez une cyanobactérie.

⊕ ⊕ ⊕ **La sélection de souches et la productivité en conditions contrôlées**

La **sélection des souches** les plus productives dans un cadre expérimental puis préindustriel, et la **définition des conditions optimales de production**. L'aspect sélection est important dans le cadre du présent rapport, il sera retrouvé dans le rapport concernant les procédés industriels.

2- Recherches à développer ou à initier

Les modèles actuellement utilisés (Cyanobactéries, *Rhodella, Pylaiella, Giraudyopsis* et divers protoplastes) permettent d'aborder de nombreux problèmes physiologiques, de biosynthèse et de régulation. Dans cette optique il convient tout d'abord d'affermir et de compléter les connaissances dans le cadre des modèles biologiques déjà étudiés. A partir de ces études, un transfert des connaissances sur d'autres matériaux présentant des spécificités intéressantes pourra alors être envisagé (biotechnologie des protéines, des pigments, amélioration et transformation des souches...). Par ailleurs d'autres lignes de recherche peuvent (doivent) être ouvertes pour préparer dès maintenant ce transfert .

2-1 Programmes en cours et à développer:

Ces programmes ont été exposés au **chapitre 1**, ils peuvent être résumés par trois directions de recherche qui sont déjà, mais doivent devenir de plus en plus, interactives scientifiquement (échange de chercheurs, mise en réseau informationnel) et techniquement (échanges de souches, de sondes, de technologies) c'est l'un des objectifs du réseau microalgues :

2-1-1 Contrôle génétique de l'organisation de l'appareil photosynthétique

➡ Connaissance des **gènes** codant pour les divers éléments des complexes **photosynthétiques** dans les divers types d'algues, ce qui nécessite également de poursuivre l'analyse détaillée de ces complexes dans diverses situations physiologiques et en utilisant divers mutants par exemple les mutants pigmentaires de *Chlorella*;

➡ Etude des "**linkers**" notamment ceux de haut poids moléculaire, qui assurent la stabilité des phycobilisomes, leur ancrage membranaire et concourent à l'efficacité des transferts énergétiques;

➡ Contrôle génomique et **régulation** de l'équipement pigmentaire dans les différents modèles (adaptation chromatique, adaptation à l'environnement et aux carences en minéraux), et la **comparaison des régulations géniques** pour des composants analogues chez une cyanobactérie d'une part et des eucaryotes d'autre part (régulations avec interactions nucléochloroplastiques).

2-1-2 Métabolisme et physiologie

➡ La biosynthèse et les modifications possibles des teneurs en **caroténoïdes** doit aussi être abordée pour mieux profiter des possibilités spécifiques des microalgues.

➡ La connaissance d'**autres enzymes et gènes** et importance de leur régulation pour le **métabolisme** (lipides, pigments) aboutissant à la notion de métabolisme intégré, à la **différenciation cellulaire** et à la **phylogénie**.

2-1-3 Biotechnologies:

➡ La **production de mutants** des différentes catégories de microalgues doit être amplifiée. Aujourd'hui essentiellement centrée sur les Cyanobactéries, elle est limitée à certaines souches et à certains types pigmentaires (*Chlorella*) de métabolismes ou de différenciation, tels le métabolisme azoté, la perméabilité aux glucides... En dehors de mutants photosynthétiques ce sont essentiellement des mutations concernant les acides aminés qui ont été étudiées. Des problèmes concernant le passage temporaire à l'hétérotrophie doivent être sérieusement appréhendés pour une future sélection. La **transformation génétique** des microalgues est actuellement difficile sinon impossible, en tout cas elle est restreinte à quelques cas cyanobactériens. Ce sujet doit être absolument développé pour offrir des possibilités accrues d'utilisation de souches modifiées.

➡ La préparation et la **culture des protoplastes de microalgues** et l'utilisation de la **variabilité génétique** des cellules obtenues est également exploitable pour l'**amélioration des souches** puis leur sélection.

➡ Les conditions d'une **productivité optimale** compte-tenu des facteurs de l'environnement et de la souche utilisée.

2-2 Recherches à initier dans ce domaine

Un certain nombre de points nécessitent une prise en compte rapide pour permettre d'exploiter ultérieurement les acquis. Un rapide bilan fait apparaître un besoin d'initier des recherches dans les domaines suivants:

2-2-1 Contrôle génétique, biochimique et physiologique de l'organisation de l'appareil photosynthétique.

➡ La biosynthèse des **chromophores des Cyanobactéries**: en effet les connaissances sur les apoprotéines sont bien plus avancées que celles sur les chromophores. Ils participent bien entendu à la régulation de l'équipement pigmentaire et leur étude métabolique puis génomique est essentielle. L'association du chromophore à l'apoprotéine est probablement un élément général de régulation de la stabilité des édifices protéo-pigmentaires chez les Cyanobactéries comme chez les autres Algues, ceci justifie tout à fait une ligne de recherche.

2-2-2 Métabolisme et physiologie:

➡ Les **composants polysaccharidiques pariétaux** des microalgues pourraient dans ce domaine fournir un sujet d'étude porteur. Une approche des enzymes de synthèse de polysaccharides pariétaux telles que les galactane-hydrolases et sulfohydrolases a été envisagée soit par une purification des enzymes à partir de protoplastes, soit grâce à des enzymes bactériennes qui ont été purifiées par ailleurs et qui pourraient fournir les sondes permettant une approche par la biologie moléculaire. Ceci exige préalablement une banque de gènes nucléaires. Certaines microalgues pourraient être des modèles pour l'étude de la production de polymères sulfatés.

2-2-3 Biotechnologies:

➡ Le **transfert d'ADN chez les Cyanobactéries** est rendu difficile par la présence d'**enzymes de restriction endogènes**. Ceci restreint très fortement les possibilités de transformation à quelques souches bien caractérisées. Cette présence d'enzymes de restriction est associée à une protection de l'ADN des Cyanobactéries par des **méthylases**. L'étude des gènes codant pour ces enzymes, de leur régulation et des conséquences de leur inactivation est un préalable à toute manipulation orientée et efficace des souches concernées.

➡ L'**exploration systématique** des caractéristiques physiologiques, biochimiques et génomiques de nombreuses souches n'est pas actuellement réalisée sauf pour les banques de mutants de *Chlamydomonas*. En ce qui concerne les Cyanobactéries les travaux portent actuellement sur trois souches, deux unicellulaires pour ce qui concerne la photosynthèse et une filamenteuse pour la fixation de l'azote. Ceci ne représente qu'une très faible partie des **potentialités des différentes collections** (plus de 400 souches à l'Institut Pasteur!... et d'autres dans les laboratoires associés au projet) . Une mise en valeur de cette richesse des collections est aussi un investissement d'avenir. Dans cette même optique, il est tout à fait indispensable de mettre au point une technique d'**identification des souches** telle que la possibilité d'utiliser les hybridations hétérologues et les profils de restriction de l'adn total chez les Cyanobactéries et les **profils de restriction de l'ADN plastidial** chez eucaryotes. Cette opération devrait déboucher sur un **catalogue informatisé** des souches.

3- Conclusions

En conclusion, il est apparu que certains domaines de recherche sont déjà bien avancés, qu'ils commencent à interagir; d'autres le sont moins mais leur développement est essentiel. Toutes ces actions doivent être encouragées ou initiées à l'occasion de projets intégrant les spécificités de chacun. Il s'agit essentiellement pour le génie génétique de:

-la synthèse et la régulation génique et physiologique des composants de l'appareil photosynthétique, les complexes pigments-protéines, les caroténoïdes, les chromophores et leur importance régulatrice;

-la synthèse d'autres molécules biologiques d'intérêt particulier (lipides, polysaccharides...);

-la transformation génétique et les enzymes de restriction et de méthylation pour obtenir des possibilités de génie génétique;

-l'exploitation systématique de la grande variété génétique des microalgues par l'exploitation des collections, l'obtention de mutants, la production et la régénération de protoplastes;

-l'optimisation des conditions physiologiques de développement en fonction des produits recherchés.

La mise en commun des moyens et des capacités doit permettre une progression plus rapide. D'autre part les acquis des différentes équipes peuvent permettre une réflexion en aval au niveau de la physiologie et de la production d'algues à intérêt industriel. C'est là un des objectifs du réseau.

ECOPHYSIOLOGIE

- C.THEPENIER -

Groupe de Biotechnologie des Microalgues
DPVE/CEN Cadarache
13108 St PAUL-LES-DURANCE CEDEX

Il s'agit d'étudier l'action des paramètres de culture en conditions contrôlées sur l'expression métabolique des Cyanobactéries et des Microalgues afin de:

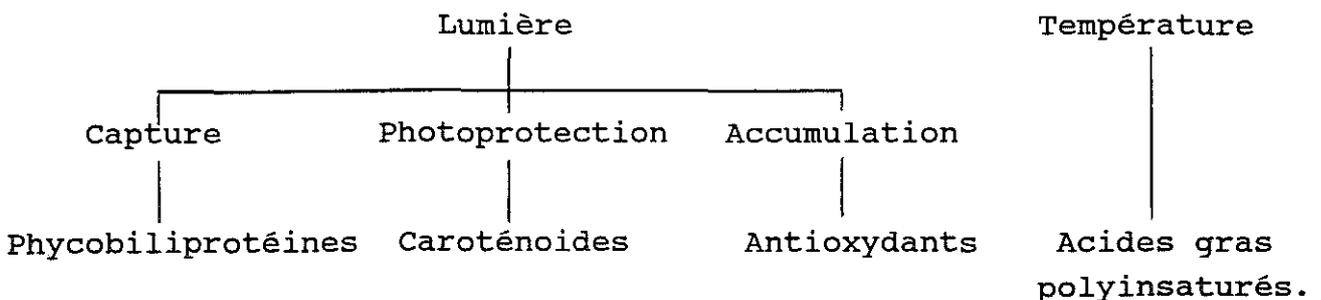
- Déterminer les paramètres "clés" de l'expression du métabolite étudié.
- Comprendre le mécanisme d'action des paramètres.

Les principaux paramètres étudiés sont:

- La lumière (intensité, photopériode),
- La température,
- La nutrition minérale: N (teneur, nature du sel), P...,
- L'apport de C inorganique,
- La teneur en O₂ dissous,
- L'osmolarité.

Les métabolites étudiés sont très variés: il s'agit à la fois de recherches sur les métabolites "spécifiques des Microalgues et des Cyanobactéries" et de recherches sur des activités antibactériennes, antifongiques... ou encore sur les toxines.

Pour les métabolites "spécifiques" qui peuvent être présents à forte concentration dans la biomasse cellulaire, on peut schématiser de façon simplifiée les relations paramètres/métabolites comme suit:



Ces recherches sont effectuées à:

- INSTITUT PASTEUR
- ENS
- IFREMER
- CEA
- INSERM
- CNRS
- UNIVERSITES

LES CAROTENOIDES

Principales molécules

Il s'agit principalement de caroténoïdes stockés dans des globules chloroplastiques ou cytoplasmiques tels que le B-carotène et l'astaxanthine.

Souches étudiées

- Dunaliella salina
- Haematococcus pluvialis

Recherches

Etude des paramètres favorisant la caroténogénèse (le rôle prépondérant de la lumière a été mis en évidence) et du mécanisme de photoprotection (rôle de l'O₂?).

Caractéristiques obtenues à ce jour

- β -carotène: concentration 10% de la MS cellulaire
- Astaxanthine: 3 à 5% de la MS cellulaire.

Autres molécules

Lutéine, zéaxanthine.

Nombre de laboratoires travaillant sur cette thématique: < 5

Concurrence internationale importante:

USA, Australie, Israel.

LES PHYCOBILIPROTEINES

Il en existe 3 types: - Phycoérythrine
 - Phycocyanine
 - Allophycocyanine

Souches étudiées

- Cyanobactéries: Calothrix
 Synechococcus

- Microalgues: Rhodella violacea
Porphyridium cruentum

Recherches

Etude des paramètres agissant sur la teneur et la répartition en phycobiliprotéines. Le rôle de la lumière (quantité, qualité (adaptation chromatique)) est connu. Le rôle de certains éléments nutritifs est en cours d'étude (Na⁺, SO₄⁼).

Etudes visant à comprendre les mécanismes de régulation de la synthèse des différentes phycobiliprotéines.

Nombre de laboratoires travaillant sur cette thématique: < 5

LES ACIDES GRAS POLYINSATURES

Les acides gras les plus spécifiques chez les Microalgues sont ceux à 20 ou 22 C et au moins 4 insaturations:

- C20:4 ω 6 Acide arachidonique
- C20:5 ω 3 Acide eicosapentaénoïque
- C22:6 ω 3 Acide docosahexaénoïque

Principales souches étudiées

Les souches du fourrage aquatique:

- T-Iso
- Pavlova lutheri
- Dunaliella tertiolecta
- Phaeodactylum tricornutum

Autres souches:

- Porphyridium cruentum

Recherches

Etudes des paramètres agissant sur la teneur et la composition en AGPI: le rôle prépondérant de la température a été mis en évidence (température de culture, "choc" thermique). Les études visent à identifier les classes de lipides affectées, à quantifier les cinétiques des modifications observées et à étudier la réversibilité de ces modifications.

Initiation d'études sur les désaturations.

Nombre de laboratoires travaillant sur cette thématique: 5 à 10.

LES ANTIOXYDANTS

Ils sont enzymatiques (superoxyde dismutase) ou non enzymatiques (ascorbate, tocophérols, caroténoïdes).

Souche étudiée

Porphyridium cruentum

Recherches

Identification des paramètres favorisant la production d'antioxydants: lumière?, teneur en O₂ dissous?....Détermination de la nature des mécanismes de protection mis en jeu.

Nombre de laboratoires travaillant sur cette thématique « 5

RECOMMANDATIONS

- Inciter les recherches sur la caroténogénèse, lesquelles font défaut en France.

- Articuler les recherches sur les phycobiliprotéines des Cyanobactéries et des Microalgues.

- Articuler les recherches sur les lipides membranaires avec un accent particulier sur les AGPI et les désaturations.

T H E M E I I

BIOTECHNOLOGIES DES MACROALGUES

LA PRODUCTION MASSIVE DE GAMETOPHYTES EN FREE-LIVING CHEZ *LAMINARIA DIGITATA* (L.) Lamour.

par R. PEREZ et R. KAAS*

Résumé : Les peuplements de *Laminaria digitata* (L.) Lamour. ne suffisent plus à satisfaire les besoins de l'industrie des alginates qui extrait de cette espèce un acide alginique de haute qualité. La culture est donc envisagée. Elle se heurte à 2 problèmes :

- la difficulté que l'on a à obtenir suffisamment d'éléments reproducteurs pour l'ensemencement des collecteurs,
- la prolifération de filaments appartenant à *Ectocarpus sp.* dans les cultures de gamétophytes.

La difficulté à obtenir des spores peut être contournée par un ensemencement au moyen de gamétophytes produits en grande quantité par multiplication à volonté de quelques uns dans des conditions de température et d'éclairement critiques qui sont 18,5°C et 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

La présence quasi constante d'*Ectocarpus sp.* dans les suspensions de gamétophytes est liée au fait que le compétiteur vit en endophyte dans les tissus de la laminaire. Les nombreux essais d'erradication, sans altérer les gamétophytes, n'ont pas été, pour l'instant, suivis d'effet.

Abstract : The harvest of the wild *L. digitata* fields of the Brittany coasts is not able to feed the needs of the alginate industry that extracts from this species an alginic acid of a high quality. The cultivation of *L. digitata* seems necessary. This project comes up against two problems :

- the difficulty for obtaining the quantity of spores able to sow cultivation frames,
- the invasion of *Ectocarpus sp.* as a disease in the gametophytes and germlings cultures.

We show that the sowing by spores can be replaced by the sowing with a free-living suspension of gametophytes produced in great quantity from multiplication of some of them in critical conditions of life : 18,5°C and 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. These conditions stop the gametogenesis and increase the vegetative growth. When the temperature falls down to 15°C, the gametogenesis occurs again.

The contamination by *Ectocarpus sp.* comes from the fact that this algae lives as an endophyte into the *L. digitata* tissues. The trials for destroying it, without killing the gametophytes, are still unsuccessful.

* IFREMER - Centre de Nantes - Laboratoire d'Aquaculture.

L'algue brune *Laminaria digitata* (L.) Lamour. est pratiquement la seule laminariale utilisée par l'industrie française des alginates en raison de l'acide alginique de qualité qu'elle renferme.

Malgré l'élévation du rendement des bateaux-goémoniers, malgré les diverses tentatives du Comité Interprofessionnel pour mieux gérer l'exploitation et répartir l'effort de récolte sur l'ensemble des peuplements, malgré la recherche et la cartographie de nouveaux champs, le tonnage prélevé annuellement ne parvient pas à dépasser 65 000 tonnes fraîches alors que les besoins des usines tournent autour de 90 000 t. En fait, il semble que ces 65 000 t représentent la limite extrême que l'on puisse espérer dans les conditions de récolte actuelle.

En effet, les années où ce tonnage est atteint sont généralement suivies d'une année marquée par une chute à 50 000 à 55 000 t. En outre, lorsque les tempêtes d'hiver dévastent les aires à laminaires, les goémoniers ont beaucoup de difficultés à cueillir plus de 50 000 t car les peuplements clairsemés sont envahis par une algue inexploitable, *Sacchoriza bulbosa*.

Aux besoins de l'industrie des alginates, s'ajoutera prochainement la demande en jeunes *L. digitata* que va occasionner progressivement le marché naissant des algues alimentaires. De même, l'élevage des oursins dont le développement est prévisible à court terme nécessitera quelques milliers de tonnes supplémentaires : ces échinodermes sont en effet de grands consommateurs de cette algue. On arrive à la conclusion que seule la culture intensive de *L. digitata* permettrait de satisfaire les besoins de toutes ces activités.

Bien qu'on soit tout à fait capable de produire en grandes quantités certaines laminariales telles de *L. japonica* (1 500 000 t) et *Undaria pinnatifida* (près de 500 000 t), bien que le cycle de reproduction de celles-ci soit identique à celui de *L. digitata*, on ne parvient pas à cultiver cette dernière malgré les nombreuses études qui ont été réalisées.

On se heurte en effet à deux problèmes cruciaux qu'il est nécessaire de résoudre pour pouvoir aller de l'avant.

Le premier a pour origine la difficulté qu'il y a à obtenir un grand nombre de spores à partir de *L. digitata* ; les quelques zoïdes libérés ne suffisent pas pour ensemercer correctement des collecteurs.

Le deuxième problème est dû à la présence dans les tissus même de la laminaire de filaments ressemblant par leur morphologie et l'aspect des sporocystes pluriloculaires à ceux de l'espèce *Ectocarpus siliculosus* (Dillw.) Lyngb.: ceux-ci apparaissent dans les suspensions de gamétophytes et se développent si rapidement qu'ils parviennent à éliminer les gamétophytes, soit dans les ballons de free-living, soit sur les collecteurs.

La présente note fait le point des travaux qui ont été effectués pour tenter d'apporter une réponse aux obstacles évoqués ci-dessus.

I - LAMINARIA DIGITATA ET L'EMISSION DES SPORES.

A) OBSERVATIONS SUR LA FERTILITE DE *L. DIGITATA*.

Chez *L. digitata*, la fertilité se manifeste par l'apparition du haut vers le bas des lanières de taches marron-foncé, d'abord isolées, puis plus ou moins confluentes, les sores, tigrant la lame et formant un léger relief à la surface de la lame.

Pérez (1971 et Cosson (1973) ont constaté que la sorogénèse a lieu, pour la plupart des plants, en juin-juillet et en octobre-novembre. Si l'hiver est particulièrement doux, elle débute dès mars. Il arrive de trouver quelques lames fertiles en dehors de ces périodes.

La coupe transversale d'un sore vue au microscope montre la présence sous la cuticule de très nombreux sacs, les sporocystes, protégés par des poils recourbés, les paraphyses. A l'intérieur de chaque sporocyste on compte 40 à 50 grains, les spores. La structure est donc typiquement celle d'une laminariale fertile.

Avec les laminariales comme *L. japonica*, *Undaria pinnatifida*, *Alaria esculenta*, *Macrocystis pyrifera* ou *Sacchoriza bulbosa*, on parvient à obtenir assez facilement des émissions massives de spores à partir d'un bouquet de lames ou de sporophylles fertiles. *L. digitata* réagit différemment : si, par chance, une lame libre quelques zoïdes biflagellés, les autres ne donnent rien, ou presque, bien qu'elles aient été toutes placées dans les mêmes conditions.

Les différentes cultures réalisées en laboratoire sont généralement obtenues en plaçant au hasard dans des boîtes de Pétri disposées d'abord à l'obscurité puis à la lumière, de nombreux morceaux de lanières portant des sores, dans l'espoir d'une émission qui advient parfois pour deux ou trois fragments.

On n'a pu identifier le ou les facteurs déclenchant ce phénomène bien que de nombreuses actions aient été tentées. La déshydratation partielle des tissus, les chocs de température, les variations de pH, la lumière, la photopériode, la dessalure, les flashes lumineux, les différentes radiations visibles, toutes ces conditions qui ont un effet sur les autres laminariales, sont inefficaces sur *L. digitata*. L'incidence de différents milieux nutritifs est nulle.

Tout se passe comme si, chez *L. japonica* et *Undaria pinnatifida*, il existait une large période pendant laquelle les spores sont prêtes à être libérées si bien que beaucoup de sporophylles émettent simultanément au moindre choc hydrique. Chez *L. digitata*, par contre, chaque lame, et même chaque lanière, semble avoir un pic étroit de maturité ; De ce fait, les pics des unes et des autres n'étant pas synchrones, le moment où une lame est prête à libérer ses spores ne correspond pas à celui où la lame voisine atteint la maturité pour libérer les siennes.

On ne sait pas identifier ce pic de maturité ; ainsi, l'émission se limite-t-elle le plus souvent à quelques spores (20 000 par ml) au lieu de la multitude (3 000 000 par ml) délivrée par d'autres laminariales, quelle que soit la quantité de lames déposées dans un même bain.

La concentration de spores à laquelle on parvient n'est jamais suffisante pour ensemercer correctement des collecteurs car la distance entre les gamétophytes est trop importante pour qu'il y ait suffisamment de rencontres entre gamètes mâles et femelles. En conséquence, à terme, il n'y a pas assez de zygotes et de plantules pour alimenter une culture intensive.

Nous avons cherché le moyen permettant de produire, en dépit de la faible quantité de spores disponibles, un stock important de gamétophytes par free-living capables de générer, au moment souhaité, une multitude de gamètes.

b) Technique utilisée pour la libération des spores

Dans une population de *L. digitata*, on repère de longues lames fertiles dont on prélève les lanières présentant la plus grande surface de sores sombres. On élimine les bordures souvent épiphytées ou nécrosées.

Les fragments ainsi obtenus sont traités afin que toute vie soit détruite à leur surface. Pour cela, on les soumet :

- à un brossage soigneux et répété sur leurs 2 faces dans 4 bains successifs d'eau de mer autoclavée,
- à un trempage pendant 2 mn dans un bain d'eau de mer additionnée de 0,5 % d'hypochlorite de sodium à 12°C,
- à un rinçage dans 2 bains d'eau de mer stérilisée contenant $5 \mu\text{g.l}^{-1}$ d'oxyde de germanium

Les fragments sont essuyés avec du papier buvard et laissés à l'obscurité dans une enceinte isotherme à 15°C jusqu'à ce que leur poids diminue de 25 à 30 % suite à un début de déshydratation. Cela demande environ 16 h. Une accélération de la perte d'eau par ventilation ou chauffage conduit à l'inverse de l'effet recherché : la quantité de spores libérées est très faible ou nulle. Il en est de même lorsque la chute de poids dépasse 35 %.

Si les morceaux de laminaire sont remis dans l'eau de mer, la réhydratation brutale provoque l'éclatement de certains sporocystes puisque quelques spores nageantes apparaissent dans le liquide. Le fait qu'elles se déplacent rapidement en ligne droite témoigne de leur vitalité. Ce point est important car on peut observer

parfois sous le microscope, notamment après une trop forte déshydratation, une multitude de spores immobiles : aucune d'elles ne germe ; elles perdent leurs pigments et disparaissent.

On est généralement loin de la nuée de spores fusant dans tous les sens obtenue avec *L. japonica* ou *Undaria pinnatifida*. Avec *L. digitata*, l'observation au microscope permet de compter à peine 3 à 5 zoïdes biflagellés sous le halo à la magnification 100.

On pourrait penser logiquement que, pour en obtenir plus, qu'il suffirait de prolonger le temps de séjour des lames dans l'eau ou/et d'augmenter le nombre de fragments. En fait, en opérant ainsi, on provoque une exsudation massive de phycocolloïdes dont la concentration devient alors toxique pour les spores.

Haug et Larsen (1956,1960,1963) ont montré que ces phycocolloïdes sont principalement localisés dans le cortex et la medulla. C'est pourquoi, une fois les fragments fertiles partiellement déshydratés, nous ne les utilisons pas intégralement ; nous décollons en copeaux à l'aide d'un scalpel la fine couche superficielle qui renferme les sporocystes. Les copeaux sont brusquement plongés dans un bécher contenant 200 cm³ d'eau de mer stérile, à 15°C, brassée par un agitateur magnétique, sous un éclairage continu "lumière du jour" de 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Cette procédure des copeaux permet d'augmenter la surface de sores mobilisés, d'allonger la durée de leur maintien dans l'eau, de faire appel à l'agitation, sans pour autant élever la quantité de phycocolloïdes dans le bécher.

On parvient ainsi à une concentration en spores mobiles 3 fois supérieure à celle obtenue avec la première méthode.

Le contenu du bécher est filtré sur toile à blutter à mailles de 10 μm de façon à éliminer les débris d'algue et les longues chaînes de phycocolloïdes. Les spores mesurant 4 à 6 μm passent au travers.

On récupère une suspension S. C'est à partir de suspensions S de ce type qu'ont été réalisées les expériences décrites ci-après.

II – DEFINITION DES CONDITIONS OPTIMALES POUR LE DEVELOPPEMENT DES GAMETOPHYTES.

Ces expériences ont pour but d'établir s'il est possible, malgré la faible concentration de spores dont on dispose, de trouver des conditions permettant d'appliquer à *L. digitata* le procédé de multiplication des gamétophytes tel qu'il a été utilisé par Pérez et Kaas (1984, 1991) pour *Undaria pinnatifida* et *L. japonica*.

A) INFLUENCE DE L'ECLAIREMENT

L'action de l'éclairage sur la transformation de la spore en embryospore et le développement des gamétophytes de *L. digitata* a été suivi par de nombreux auteurs (Sauvageau,1918 ; Hamel,1931 ; Kain, 1964 ; Sundene, 1964 ; Pérez, 1971a, 1971b ; Cosson,1973 ; Lüning, 1980, 1981 ; Dring, 1985). Pour affiner leurs conclusions et analyser comment en tirer parti dans la perspective d'une stratégie de culture, nous avons préparé 10 séries de 5 boîtes de Pétri contenant chacune 150 cm³ d'une solution nutritive synthétisée avec :

- 1000 ml d'eau de mer autoclavée,
- 2 ml de Miquel A,
- 1 ml de Miquel B,
- 1 ml de provasoli 6,
- 50 μg de Kanamycine sous forme de sulfate,
- 5 μg d'oxyde de germanium.

On disperse dans chacune 3 cm³ de la suspension S.

Dans la salle expérimentale où la température est maintenue à 15°C, chaque série est soumise à un état "éclairage, photopériode, qualité de lumière" qui lui est propre, comme l'indique le tableau 1.

Eclairém ^t	Qualité	Radiations		TUBES FLUORESCENTS "LUMIERE DU JOUR"																			
	Intens* ^t	Rouges		5		10		20		30		40		60		100		150		250			
		Photop H	12 JN	24 J	12 JN	24 J	12 JN	24 J	12 JN	24 J	12 JN	24 J	12 JN	24 J	12 JN	24 J	12 JN	24 J	12 JN	24 J	12 JN	24 J	
SERIE	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	
Jours	1																						
Comptes	4																						
	8	2	2	2	2	3	3	3	4	4	5	4	5	5	7	6	6	6	7	7	6	7	7
Depuis	12																9	10	9	9	10	10	10
	16	4	4	3	4	6	9	9	10	9	11	10	12	11	13	12	12	G	G	G	G	G	G
La	20																						
	24											16	17	G	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Fixation	28	8	8	9	9	12	11	12	16	17	16	G	G	P	P								
	32								18	G	G	P	P										
Des	36							16	G	P	P												
	40							G	P														
Spores	44					16	15	P	P														
	48	10	12	10	10	G	G	P	P														

chiffre : nombre de cellules du gamétophytes femelle

G : gamétogénèse

P : premières plantules

J : jour

N : nuit

* : $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Tableau 1 : influence de l'intensité et de la qualité de l'éclairage sur le développement des gamétophytes, la gamétogénèse et l'apparition des plantules.

La solution nutritive est remplacée au septième jour, puis tous les trois jours.

En général, à conditions identiques, les gamétophytes de *L. digitata* ont un développement plus lent que ceux d'*Undaria pinnatifida* et de *L. japonica*.

Si le passage de la spore à l'embryospore se fait de la même manière (dans les 2 premiers jours et indépendamment des facteurs extérieurs), l'évolution en gamétophyte demande plus de temps et est fortement influencée par l'environnement.

En lumière rouge (660 μm), la croissance est particulièrement faible, la teinte des cellules sombre et il n'y a jamais apparition de plantules, ce qui était prévisible suite aux travaux de Lüning et Dring (1975) et de Dring (1985) : les radiations rouges ne permettent pas la gamétogénèse.

En éclairage type "lumière du jour, alors que chez *L. japonica*, l'embryospore demande un minimum de 15 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour évoluer en gamétophyte, chez *L. digitata*, une intensité de 5 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ suffit à provoquer le développement du gamétophyte mâle et du gamétophyte femelle. La production de gamètes n'intervient que vers le 50^{ème} jour et la germination des plantules vers le 55^{ème} lorsque le gamétophyte mâle est un buisson de 15 à 20 cellules et le gamétophyte femelle un organisme de 12 à 15 cellules. D'après Cosson (1973), les filaments réagissent plus à la quantité totale de lumière reçue qu'à l'intensité elle-même.

A mesure que l'intensité augmente, on observe une légère accélération du développement et une apparition plus rapide de la gamétogénèse (au seizième jour sous 100 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), ce qui limite la taille des filaments à environ 8 cellules sous les plus fortes intensités.

Dans tous les cas, il y a gamétogénèse et apparition de plantules, d'autant plus rapidement que l'éclairement appliqué est intense. Contrairement à *L. saccharina* (Lüning, 1980, 1981, 1988), la photopériode ne semble pas avoir d'influence significative tant sur le moment où naissent les sporophytes que sur la densité.

Au dessus de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, les plantules ont tendance à se détacher 7 à 8 jours après leur germination. Il se pourrait que l'on ait, comme chez *L. japonica*, un problème de photosensibilité du crampon.

On observe çà et là dans les cultures un phénomène dont nous parlerons plus loin : la présence de thalles d'Ectocarpacées, peu développés et stériles sous radiations rouges, mais en longs filaments porteurs de sporocystes pluriloculaires ailleurs.

B) INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

Des séries de boîtes de Pétri sont préparées comme précédemment à 15°C . Tandis que l'une d'elles est maintenue à 15°C , chacune des autres est amenée progressivement, avec une variation de $0,5^\circ$ par jour, à une température propre comme l'indique le tableau 2.

Temp.	10		11		12		13		14		15		16		17		18		19		20		21		22		
	J	N	J	N	J	N	J	N	J	N	J	N	J	N	J	N	J	N	J	N	J	N	J	N	J	N	
1																											
4	2		3		4		4		4		4		3		4		5		5		6		4		5		
8																											(
12									11		11		11		11		12		11		7		8		()	
16																										()
20	5		7		8		12		16		G															()
24									G		P		18		18		19		16		14		()	()	
28									14				G								()	()	())
32			12		12		G		P				P		20)	(()	())
36	9		G		G		P								G		22		18		()	()	()	
40			P		P)	(()	())
44	10														P						()	()	())
48	G																25		28)	(()	())
52																					()	()	())
54	P)	(()	())

Chiffre : nombre de cellules du gamétophyte femelle

G : gamétogénèse

P : premières plantules

)

(: décoloration

)

Tableau 2 : influence de la température sur la croissance des gamétophytes, la gamétogénèse et le développement des plantules.

Pour tous les cas, on a adopté un éclairement aux caractéristiques "lumière de jour" de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ainsi que deux types de photopériode 12-12 et 24-0. Comme l'a constaté Cosson (1972, 1973), 15°C constitue la température qui conduit le plus rapidement à la production de plantules. Il les voit apparaître au bout de 30 jours alors que nous les obtenons dès le 16^{ème}. Sans doute, faut-il attribuer cette différence au milieu nutritif employé ; il utilise un dérivé du milieu ESI qu'il a modifié en "ES-Tris".

Entre 16° et 17°C , la gamétogénèse est retardée au profit de l'activité méristématique.

Au-dessus de 18°C, on n'observe plus de gamétogénèse ; entre 18 et 19°C, le développement des gamétophytes des deux sexes se traduit par la formation continue de très longs filaments abondamment ramifiés.

A partir de 20°C, les divisions s'arrêtent après 5 à 6 cellules ; des formes de résistance s'ébauchent chez les gamétophytes femelles dont certaines cellules s'arrondissent et épaississent leurs parois tandis que d'autres se décolorent ; tous les gamétophytes mâles sont détériorés. Cette détérioration semble être irréversible car le retour progressif à 15°C ne modifie pas l'évolution et ne fait pas réapparaître la gamétogénèse.

A 22°C, il n'y a pas de survie.

En plaçant des spores nageantes à cette température, Cosson (1973) vérifie qu'aucune ne germe ; déjà, à 20°C, il observe 70 % de mortalité.

Il est clair que les gamétophytes de *L. digitata* supportent très mal les températures supérieures à 20°C et pas du tout celles au-delà de 22°C ; ils ne présentent même pas de formes de résistance, telles que celles décrites chez *L. japonica* ou *Undaria pinnatifida*.

Ces constatations recourent parfaitement les observations que l'on peut faire dans la nature: Les plus beaux peuplements de *L. digitata* s'étendent de l'île de Bréhat à la pointe de Penmarc'h où la température estivale ne dépasse pas en général 16°C ; entre le Sud de la Bretagne et le Morbihan, les champs deviennent hétérogènes. On ne trouve plus l'espèce au-delà de l'île de Noirmoutier : la température y atteint en été 20°C. On note cependant une exception : quelques colonies de *L. digitata* vivent le long de la côte cantabrique (Seoane-Camba, 1965) ; mais, elles correspondent à des zones de remontées d'eau froide (up-welling).

En-deçà de 15°C, le développement des gamétophytes est d'autant moins rapide que la température est basse; En outre, la gamétogénèse se déclenche de plus en plus tard. A 10°C, il faut attendre presque 2 mois avant d'observer les premières germinations de plantules. Bien qu'elles deviennent aussi nombreuses qu'à 15°C, leur croissance en longueur est cependant 4 fois plus faible.

Pour obtenir la multiplication des gamétophytes, il faut se situer dans des conditions où l'activité méristématique est intense et où la gamétogénèse peut être suspendue car le déclenchement de cette dernière stopperait la division cellulaire.

La comparaison des tableaux 1 et 2 conduit à la conclusion que ces conditions sont remplies lorsque l'éclairement en lumière du jour est entre 40 et 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ et la température entre 18 et 19°C. Nous avons essayé de le vérifier expérimentalement en nous basant sur les valeurs suivantes :

- température : 18,5°C ;
- éclairement lumière du jour: 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$;
- photopériode: 24 de jour sur 24 ;
- maintien en suspension des gamétophytes par free-living.

III - MULTIPLICATION DES GAMETOPHYTES EN FREE-LIVING

La technique utilisée est comparable à celle appliquée à *Undaria pinnatifida*.

Un ballon de 2 l est rempli aux 3/4 de la solution nutritive formulée ci-dessus, à l'exception du milieu Miquel B qui est ajouté en dernier. Il se produit un nuage de phosphate de calcium. On y verse alors 100 cm^3 de la suspension contenant les spores nageantes. Ces dernières perdent leurs flagelles, se fixent sur les fibres du précipité et germent vers le 5ème jour.

On provoque une agitation par injection d'air qui a été stérilisé par barbotage dans une solution de sulfate de cuivre à 20 %. L'air dissout progressivement le précipité de phosphate de calcium et libère les gamétophytes naissants.

Parallèlement, la température est portée de 15 à 18,5°C par élévation de 0,5°C par jour pour éviter le risque de choc thermique.

Comme le laissent prévoir les expériences précédentes, la croissance puis la multiplication des gamétophytes par segmentation s'effectuent lentement par rapport à *Undaria pinnatifida*. La coloration brun clair n'apparaît qu'au bout de quinze jours alors que les gamétophytes ne sont pas encore ramifiés. Il faut près de 2 mois pour aboutir à un ballon de 2 l opaque et plus de 3 mois et demi pour, à partir d'un ballon de 2 l, obtenir un ballon de 6 l à la concentration maximale de gamétophytes.

Si la température est abaissée en-dessous de 16°C, on observe, dix jours plus tard, la présence de plantules dans la suspension. On peut s'étonner que, malgré le peu d'éclairement pénétrant dans le ballon, il puisse y avoir production de gamètes ; en fait, la gamétogénèse affecte sans doute les gamétophytes lorsque, au gré du courant induit par le bullage, ils viennent à la périphérie.

Après le 2ème mois, il est difficile de maintenir les gamétophytes en suspension que ce soit en augmentant la puissance de l'air qui assure le brassage ou en pratiquant un broyage pour raccourcir ces organismes.

Une observation attentive au microscope de la culture révèle, mêlés aux gamétophytes de *L. digitata*, des filaments ayant la morphologie d'*Ectocarpus siliculosus*⁽¹⁾ (Dillw.) Lyngb., de plus en plus nombreux et de plus en plus longs à mesure que le temps passe. Ceux sont eux qui piègent les gamétophytes dans le réseau qu'ils constituent. Ils génèrent ainsi la formation de lourds amas qui sédimentent sur le fond du ballon où ils se dégradent.

A 18,5°C, *Ectocarpus sp.* prolifère selon deux procédés :

- par segmentation lorsque les filaments sont cassés par l'agitation ;
- par les spores libérées de ses nombreux sporocystes pluriloculaires.

Ainsi, l'ectocarpacée envahit littéralement le ballon et élimine les gamétophytes de laminaire.

Cette présence quasi constante, en dépit des soins apportés à la création du free-living et quelle que soit l'origine des lames fertiles, a confirmé qu'il ne s'agit pas d'un simple phénomène de contamination au cours des manipulations.

Nos efforts se sont focalisés sur l'élimination de ce compétiteur.

IV - LA LUTTE CONTRE *ECTOCARPUS SP.*

A) LES MOYENS CHIMIQUES

La destruction d'*Ectocarpus sp.* a été tentée à deux niveaux :

- sur la lame fertile car on pouvait supposer que le contaminant était en épiphyte sur la lame fertile et avait résisté tant au brossage qu'à l'action de l'eau de javel ;
- dans le ballon de free-living même.

a) La stérilisation de la surface de la lame.

Le but a consisté à déterminer la concentration maximale d'hypochlorite et la durée maximale d'exposition qu'il est possible d'utiliser sans tuer le contenu des sporocystes.

(1) Nous avons conservés la dénomination *Ectocarpus sp.* car *E. siliculosus* n'a pas été, à notre connaissance, signalé comme endophyte.

Des lanières fertiles ont été débarrassées de leur bordure souvent épiphytée et de toute tache ou déchirure suspecte. Dans leurs sores, on découpe des lots de fragments de 5 à 6 cm de longueur et 2 cm de largeur. Chacun des lots est plongé dans une solution "eau de mer-hypochlorite de sodium à 12°C1" qui lui est propre et pendant une période déterminée. Les doses choisies vont de 5 à 30 ml.l⁻¹; les durées de 1 à 25 mn.

Le trempage dans la solution biocide est suivi de trois rinçages en eau de mer azoïque. Après avoir soumis les morceaux de laminaire à une déshydratation partielle, on observe à la remise à l'eau l'état des spores qui sont émises.

Le tableau 3 résume l'expérience et les résultats.

DOSE ppm	DUREE DU TRAITEMENT (mn)					
	1	5	10	15	20	25
5	V	O	V	V	I	I
10	V	V	I	O	I	O
15	O	O	O	I	I	O
20	V	O	O	O	O	O
25	I	I	O	O	O	O
30	O	O	I	O	O	O

Tableau 3 : influence du traitement des lames fertiles par l'hypochlorite de sodium. V : émission de spores nageantes ; J : présence de spores immobiles ; O : pas de spores.

L'interprétation de ceux-ci est délicate car les fragments peuvent ne pas libérer de zoïdes sans avoir été pour autant affectés par l'oxydant. Cependant, lorsqu'on voit au microscope des spores se déplaçant rapidement en ligne droite, on peut conclure que les conditions de traitement n'ont pas altéré leur vitalité. Si, par contre, les spores sont immobiles et ne germent pas, il est permis de penser qu'elles ont été tuées par le biocide.

On distingue 3 situations limites auxquelles il y a encore survie de spores :

15 mn de trempage à 5 ppm,
10 mn à 10 ppm,
1 mn à 20 ppm.

Des essais sur des cultures d'*Ectocarpus sp.* en boîtes de Pétri, soumises à ces doses pendant ces durées, montrent que l'algue est radicalement décolorée et détruite.

Si elle avait été à la surface des fragments traités à l'hypochlorite, elle aurait dû être tuée et donc absente de la suspension de gamétophytes obtenue avec les spores libérées.

Or, on voit rapidement apparaître *Ectocarpus sp.* dans le free-living. C'est que l'espèce provient, non de la surface de l'algue, mais de l'intérieur des tissus où elle vit en endophyte. Elle libère sans doute des éléments reproducteurs (spores ou brins) au moment où *L. digitata* émet ses spores. C'est à la même conclusion qu'est parvenu Brindkhuis (1986) ; cultivant des cals de *Laminaria* à partir de tissus prélevés dans la zone stipofrontale de l'algue, il voit régulièrement apparaître des filaments d'*Ectocarpus sp.* dans les préparations.

Ne disposant pas de solution pour éliminer l'endophyte dans la lame sans risquer de tuer les spores de *Laminaria*, nous avons tenté de le détruire au sein même de la suspension de gamétophytes.

b) Les essais d'élimination dans la suspension.

Nous avons recherché un produit chimique agressif qui pourrait, à une certaine dose et pour un certain temps d'application, détruire *Ectocarpus sp.* sans modifier les capacités des gamétophytes. Ont été ainsi testés le sulfate de cuivre, l'acide sulfurique, le kathon, la hyamine, la réglone, la dimanin A, l'hypochlorite de sodium à 12°C1. Dans tous les cas, *Ectocarpus sp.* se révèle plus résistant que les gamétophytes excepté avec l'hypochlorite pour lequel on observe (tabl. 4) une certaine sélectivité puisque à une dose comprise entre 0,75 et

1 ml.l⁻¹ appliquée pendant 2 h, *Ectocarpus* sp. est irréversiblement détruit tandis que les gamétophytes femelles restent colorés et survivent. Les gamétophytes mâles, plus sensibles sans doute en raison de la minceur de leur membrane, sont décolorés bien avant (0,5 ml.l⁻¹). Pour cette dernière raison, le procédé est inapplicable.

DOSE PPM	TEMPS A PARTIR DE L'APPLICATION DE LA DOSE											
	1			2			3			4		
	M	F	Ec	M	F	Ec	M	F	Ec	M	F	Ec
0,05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,50	+	+	+	+-	+	+	-	+	+	-	+	+
0,75	+	+	+	+-	+	+	-	+	+	-	+	+
1	+	+	+	-	+	+-	-	+	-	-	+	-
2	-	+-	-	-	+-	-	-	+-	-	-	+-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 4 : effet des dose d'hypochlorite de sodium sur les gamétophytes de *L. digitata* et sur les filaments d'*Ectocarpus* sp. - : destruction totale ; +- : dégradation partielle ; + : pas d'effet significatif.

B) LES MOYENS PHYSIQUES

Nous avons également testé la possibilité d'éliminer le compétiteur par 2 types de procédés physiques.

* La filtration

Dans la dizaine de jours qui suit l'ensemencement des ballons avec les spores, les thalles d'*Ectocarpus* sp. forment rapidement des amas de 70 à 80 μm de diamètre alors que les gamétophytes sont encore linéaires et courts (30 à 40 μm).

Nous avons opéré des filtrations sur toile à blutter à maille de 50 μm en espérant que *Ectocarpus* sp. serait retenu sur le filtre. Beaucoup de thalles le sont effectivement ; mais, quelques fragments parviennent à traverser les mailles et à relancer la prolifération.

* L'éclairement sous radiations rouges

Lors des l'expériences sur l'influence de l'éclairement, nous avons constaté qu'en lumière rouge les filaments d'*Ectocarpus* sp. ne s'allongeaient pas et ne portaient pas de sporocystes. D'où l'idée de créer des suspensions de gamétophytes uniquement sous radiations rouges. Les essais en ballons ont confirmé ces observations; là encore, le compétiteur est freiné dans son développement mais non éliminé. En effet, lorsqu'on expose le ballon en lumière blanche pour obtenir la gamétogénèse, *Ectocarpus* sp. reprend sa multiplication. Quand la suspension est pulvérisée sur les collecteurs et que ces derniers sont placés dans un bassin d'eau de mer enrichie, *Ectocarpus* sp. envahit toute la cordelette et étouffe les bouquets de plantules naissantes.

Aucun des procédés employés n'a été réellement efficace. Nous devons donc consacrer nos efforts sur ce point.

CONCLUSION

Nous avons montré qu'il est possible de produire à volonté par multiplication en free-living de grandes quantités de gamétophytes de *L. digitata* à partir de quelques spores libérées, en établissant les conditions qui permettent à la fois la suspension de la gamétogénèse et une forte croissance végétative : éclairement de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ et température de 18,5°C.

A partir du stock ainsi créé, il devient envisageable d'ensemencer des collecteurs et d'obtenir suffisamment de plantules pour approvisionner une culture intensive, ce qui n'était pas possible directement à partir des spores, vu la trop faible quantité émise par la laminaire.

Un obstacle reste cependant à franchir : la contamination par *Ectocarpus sp.* Une étude fine de la biologie de cette algue livrera peut-être le point sensible qui autorisera la destruction de l'importun sans détériorer les gamétophytes ou les plantules de *L. digitata*.

En dernier recours, on pourrait certes envisager l'isolement des gamétophytes sous la loupe binoculaire ou le microscope par micromanipulation et leur culture unialgale en boîtes de Pétri à 18,5°C (pour qu'ils ne deviennent pas fertiles) jusqu'à ce que l'on soit certain qu'ils ne sont pas contaminés par *Ectocarpus sp.* A ce moment-là seulement, on les placerait ensemble en ballons pour qu'ils se multiplient rapidement. Cela demanderait plus de soins et de temps par rapport au procédé utilisé pour *Undaria pinnatifida* ; mais, il ne semble pas y avoir d'obstacle technique. On préférerait cependant un moyen plus rapide et moins coûteux.

Références bibliographiques

- Brinkhuis B.H., Levine H.G., Rowland R.G., Collantes G., 1986. Tissus culture of *Laminaria saccharina*. *J. Phycol.* **13**, 328-335.
- Cosson J., 1972. Thèse de doctorat de 3e cycle. Univ. Caen France.
- Cosson J., 1973. Action de la température et de la lumière sur le développement du gamétophyte de la *Laminaria digitata* (L.) Lam. (Phéophycée, Laminariales). *C. R. Acad. Sc. Paris*, **276**, 973-975.
- Dring M.J., 1985. Action spectra and spectra quantum yield of photosynthesis in marine macroalgae with thin and thick thalli. *Mar Biol.*, **87**, 119-129.
- Hamel G., 1931-1939. Phéophycées de France. Wolf, Paris, 432 p.
- Kain J.M., 1964. *J. mar Biol. Ass. U. K.*, **44**, 415.
- Lüning K., 1981a. Light. In: The biology of seaweeds. Ed. by C.S. Lobban and M.L. Wynne. Blackwell, Oxford, 326-335.
- Lüning K., 1981b. Egg release in gametophytes of *Laminaria saccharina*: induction in darkness and inhibition by blue light and U.V. Br. *Phycologia J.*, **16**, 379-393.
- Lüning K., 1988. Photosynthesis control of sorus formation in the brown algae *Laminaria saccharina*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **45**, 137-144.
- Lüning K., 1980a. Critical level of light and temperature regulating the gametogenesis of three *Laminaria* species (Phaeophyceae). *J. Phycol.*, **16**, 1-16.
- Lüning K., 1980b. Control of algal life-history by daylength and temperature. In: The shore Environment. Vol 2. Ecosystems. Ed. by J.H. Price, D.E.G. Irvine and W.F. Farnham. Academic Press, London, 915-945.
- Lüning K., Dring M.J., 1975. Reproduction, growth and photosynthesis of gametophytes of *Laminaria saccharina* grown in blue and red light. *Mar. Biol.*, **29**, 195-200.
- Lüning, K., 1970. Tauchuntersuchungen zur vertikolverbreitung der sublitoralen Helgoländer Algenvegetation. *Helgoländer wiss. Meeresunters.* **21**, 271-291.
- Pérez R., 1971. Influence de quelques facteurs physiques sur le développement de *Laminaria digitata* (L.) Lamouroux. *Soc. Phycol. France*, **16**, 89.
- Pérez R., 1971. Ecologie, croissance et régénération, teneurs en acide alginique de *Laminaria digitata* (L.) Lamouroux sur les côtes françaises de la Manche. Thèse d'Etat. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **35** (3), 287-346.
- Sauvageau C., 1918. Recherches sur les laminaires des côtes de France. *Mém. Acad. Sci. Inst. FR.* **56**, 1-240.
- Seoane-Camba J. A., 1969. Estudios sobre las algas bentónicas en la costa sur de la Península bérica (litoral de Cádiz). *Invest. Pesq.*, **29**, :3-216.
- Sundene O., 1964. The ecology of *Laminaria digitata* in Norway in view of transplant experiments. *Nytt. Mag. Bot.*, **11**, 83-107.

Deuxième colloque ADEBIO-IFREMER

BIOTECHNOLOGIES MARINES

Ronce Les Bains, 28-30 mai 1991

**L'EXPLOITATION DES MACROALGUES :
ORIGINALITE DE LA FILIERE
FRANCAISE**

Serge MABEAU

CEVA (Centre d'Etude et de Valorisation des Algues)

INTRODUCTION

L'objectif du présent exposé n'est pas de présenter la filière industrielle des algues en France dans son intégralité (1 et 2), mais plutôt de faire le point sur quelques développements économiques spécifiques à notre pays.

Les problèmes de R & D inhérents à ces activités innovantes seront succinctement passés en revue.

1. PRESENTATION GENERALE

La "filière algue" française comporte deux groupes de sociétés très différentes (figure 1).

1.1. L'industrie des colloïdes

Les phycocolloïdes sont des polysaccharides extraits des parois cellulaires de quelques genres d'algue brunes et d'algues rouges.

Ces polymères ont des propriétés physicochimiques (de rétention d'eau, épaississantes, gélifiantes, stabilisantes...) spécifiques. Ils sont utilisés dans de nombreux secteurs industriels, en particulier dans l'Industrie Agroalimentaire pour laquelle ils représentent les E 400 à E 407 du code européen des additifs alimentaires.

Ce secteur est constitué en France de 3 sociétés : Sanofi, Sobalg (Groupe Grinsted) et Sobigel (Groupe Hispanagar). De par leur taille, ces sociétés ont toutes un fort potentiel de R & D. Bien que brièvement abordée dans cet exposé, l'industrie des phycocolloïdes est très active: la France occupe le second rang mondial pour la production de carraghénanes et le cinquième pour les alginates . De nombreux travaux sont menés pour le développement de nouvelles applications ainsi que pour la valorisation des coproduits, liquides et solides.

Le chiffre d'affaire de l'industrie des colloïdes représente près de la moitié du chiffre d'affaire total de la "filière algue" évalué en 1989 à 1 milliard de francs (figure 2).

1.2. Les autres secteurs

Les autres sociétés de la "filiale algue" sont des P.M.E. présentes sur des marchés très variés (figure 1).

Le secteur de la cosmétique représente une part importante du chiffre d'affaire: environ 11 %. Bien qu'utilisant peu de matière première, ces sociétés appuient leur politique de communication sur l'algue et réalisent, pour la plupart, la première transformation (fabrication de "bases" telles que farines pour la thalassothérapie, gelées, crèmes, extraits liquides d'algues etc) et la deuxième transformation (formulation du produit cosmétique). La majorité des "bases algue" sont utilisées pour leurs propriétés mécaniques, épaississantes ou pour leur richesse en minéraux et oligo-éléments. Depuis peu, une molécule algale originale à propriétés antiradicalaires, la "Superphycodismutase" (société SECMA) est proposée aux fabricants de produits cosmétiques .

Le potentiel agricole des algues est principalement représenté par :

- le maërl (*Lithothamnium* sp., algue calcaire). Les 500 000 tonnes extraites chaque année sont valorisées comme amendement calco-magnésien, correcteur d'acidité en alimentation animale...
- l'utilisation d'algues peu transformées qui sont incorporées dans les prémix pour l'alimentation animale,
- la fabrication d'extraits liquides utilisés comme stimulateurs de croissance pour les productions végétales.

L'exploitation du maërl et des fertilisants liquides représentent l'essentiel du chiffre d'affaire du secteur agriculture (qui représente lui-même environ 40 % de celui de la filière).

"L'algue légume" ou "l'algue produit alimentaire intermédiaire" fait son apparition dans notre alimentation quotidienne. Les tonnages exploités sont très inférieurs à ceux utilisés indirectement dans l'alimentation par le biais des colloïdes, mais connaissent une progression intéressante.

Enfin, les macroalgues sont une source potentielle de molécules dites "à haute valeur ajoutée" pour les secteurs de l'industrie pharmaceutique, de l'agriculture (phytosanitaires) de l'agroalimentaire (colorants) etc...

Aujourd'hui, seules quelques molécules, telles que l'acide kainique, acide aminé neuroactif ou certaines lectines, utilisées dans l'étude des spécificités membranaires des erythrocytes humains, font l'objet d'une exploitation. Les quantités d'algues utilisées sont faibles.

2. DES APPLICATIONS ORIGINALES, UNE R & D SPECIFIQUE

Des ressources importantes, jointes à un fort potentiel de R & D, tant public que privé, ont engendré en France une physionomie originale de l'exploitation des algues, sans équivalent dans la majorité des autres pays occidentaux.

En effet, on assiste à l'émergence de nouveaux produits de valeur ajoutée croissante pour lesquels la priorité est donnée à la maîtrise et à la standardisation de la qualité. Le "concept algue" (image), à l'origine du développement commercial de nombreux produits, est progressivement éclipsé.

Les stimulateurs de croissance pour l'agriculture constituent l'un des secteurs les plus dynamiques de notre filière. L'essentiel du marché est aujourd'hui détenu par Goëmar, société malouine fondée dans les années 1970. Aujourd'hui, le chiffre d'affaire de cette activité continue de progresser et a provoqué de nombreuses émules dans le monde industriel.

D'après les revendications, l'utilisation de ces produits permettrait d'augmenter le rendement des cultures et d'accroître la résistance des productions végétales aux stress climatiques ou aux microorganismes pathogènes.

De plus, les fertilisants liquides à base d'algue amélioreraient l'absorption des nutriments et permettraient de réduire les besoins des cultures en engrais inorganiques.

Leur développement, ainsi que celui d'autres produits agricoles tels que les prémix pour la fabrication d'aliments complets destinés aux productions animales classiques ou à celles d'animaux à fourrures, est à l'origine de la reprise de l'exploitation des fucales (*Ascophyllum sp.* et *Fucus sp.*) qui était en constante diminution jusqu'au début des années 1980 (figure 3).

L'activité de ces produits est encore mal expliquée et sa compréhension nécessite des travaux de recherche. Les extraits étant utilisés à de très faibles doses, les recherches se sont tournées vers des molécules de type régulateurs de croissance. La standardisation des produits et leur implantation sur de nouveaux marchés entraîne de multiples problèmes de R & D :

- Identification des molécules responsables des effets observés. Les régulateurs de croissance algaux, par exemple, présentent des particularités biochimiques qui ne permettent pas leur dosage par les méthodes actuellement développées chez les végétaux supérieurs (test Elisa en particulier). Leur analyse nécessite notamment de disposer de tests biologiques rapides, sensibles et reproductibles. Cependant, seule une activité hormonale est mesurée. L'identification et la quantification précise des principes actifs nécessitent une purification préalable réalisée par exemple par chromatographie liquide de haute performance (HPLC).

- Etude des variations saisonnières des molécules actives. Les régulateurs de croissance algaux, en particulier cytokinines et gibberellines, présentent des variations saisonnières très importantes qu'il est fondamental de connaître pour standardiser les produits commerciaux.
- Optimisation des procédés d'extraction respectant l'activité biologique des principes actifs. Connaissant les propriétés biochimiques des molécules que l'on veut extraire, il est possible d'améliorer sensiblement la qualité du produit développé. Ainsi, les gibberellines sont par exemple très instables en cours de conservation. Les cytokinines, au sein de la cellule algale, se lient à des macromolécules. Leurs sites actifs sont masqués. Des traitements physicochimiques appropriés permettent de libérer et donc d' "activer" les cytokinines.
- Mise au point de modèles biologiques pour l'étude des différentes propriétés des produits : propriétés antifongiques , activation de l'absorption racinaire, stimulation du développement racinaire...
- Evaluation agronomique sous serre et au champ de l'efficacité des produits.

"L'algue légume de la mer" constitue également l'une des spécificités de la filière française par rapport à celle des autres pays occidentaux.

Cette activité a démarré au début des années 1970 par l'importation de produits japonais. Des PME bretonnes ont pris le relais ,il y a environ 10 ans, produisant des algues déshydratées en sachets vendues quasi-exclusivement dans les magasins de produits diététiques. Ce secteur, même s'il connaît une progression de l'ordre de 10 % chaque année, ne permet pas d'envisager une augmentation décisive du marché français de l'algue alimentaire (3).

Par ailleurs, depuis peu, des sociétés de l'agroalimentaire s'intéressent à l'algue en tant que nouvel ingrédient ou Produit Alimentaire Intermédiaire. En effet, même si les algues fournissent une matière première agroindustrielle utilisée de longue date pour ses propriétés technologiques (E 400 à E 407), les autres propriétés alimentaires des algues, en particulier nutritionnelles et organoleptiques, n'étaient jusque là pas mises en valeur.

Après une première transformation, l'algue "P.A.I." en poudre, paillettes ou entière, déshydratée, congelée, lactofermentée, salée (...) est incorporée dans des recettes aussi variées que boissons, salades traiteurs, fromages, plats cuisinés appertisés ou surgelés etc.

L' utilisation des algues par les sociétés agroalimentaires entraîne une progression significative des récoltes (voir figure 4, évolution récente des récoltes de 3 algues utilisées exclusivement en alimentation humaine). La taille des marchés concernés, ainsi que la crédibilité des partenaires industriels impliqués laissent envisager pour l'algue aliment un avenir prometteur.

A l'inverse du Japon, où l'algue est consommée depuis des siècles, le développement en France d'un produit alimentaire contenant des algues suppose la maîtrise d'un grand nombre de paramètres dont certains sont liés en eux (figure 5).

Législation

Jusqu' récemment, l'utilisation des algues en alimentation humaine était interdite en France. Au terme d'une démarche menée par le CEVA auprès de l'Administration, l'habilitation des algues en alimentation humaine a été publiée au Bulletin du Ministère des Affaires Sociales, le 28 novembre 1990 (4).

Onze espèces d'algues sont autorisées comme légumes occasionnels ou condiments.

Il s'agit :

d'*Ascophyllum nodosum*, de *Fucus vesiculosus*, d'*Himanthalia elongata* (Spaghetti de mer, haricot de mer), d'*Undaria pinnatifida* (Wakame), de *Palmaria palmata* (Dulse), de *Porphyra umbilicalis* (Nori), de *Chondrus crispus* (pioca, lichen), de *Gracilaria verrucosa* (Ogonori), d'*Ulva* sp. (Laitue de mer), d'*Enteromorpha* sp. (Aonori) et de *Spirulina* sp..

Les critères toxicologiques applicables à ces algues concernent les minéraux toxiques et les teneurs (exprimées par rapport à la matière sèche) suivantes :

- Arsenic minéral	≤ 3 mg/Kg
- Cadmium	≤ 0,5 mg/Kg
- Etain	≤ 5 mg/Kg
- Iode	≤ 5 000 mg/Kg
- Mercure	≤ 0,1 mg/Kg
- Plomb	≤ 5 mg/Kg

A ces derniers sont ajoutés, pour les algues sèches, des critères microbiologiques :

- Germes aérobies mésophiles	≤ 100 000 / gramme
- Coliformes fécaux	≤ 10 / gramme
- <i>Clostridium perfringens</i>	≤ 1 / gramme
- Anaérobies sulfitoréducteurs	≤ 100 / gramme

Outre ces critères normatifs, le texte réglementaire précise qu'aucun effet bénéfique pour la santé ne peut être revendiqué pour la promotion des algues en alimentation humaine.

Une réflexion est actuellement menée par le CEVA et le CNERNA pour établir des recommandations et/ou normes microbiologiques pour les produits non déshydratés.

Science de la consommation

De nombreux produits alimentaires aux algues ont appuyé leur développement sur le "concept algue marine" produit marin, original, "produit santé/bien être". Toutefois, à notre connaissance, l'image de l'algue auprès du consommateur est très variable d'une région à l'autre et ne semble pas constituer un paramètre stable.

Par ailleurs, plusieurs sociétés ont échoué dans le lancement de produits affichant résolument la présence d'algue dans leur formulation.

Aujourd'hui, la transformation et la formulation industrielle visent à "banaliser" cette nouvelle denrée alimentaire et à neutraliser les a-prioris négatifs.

Enfin, en raison des modifications des habitudes alimentaires, il est probable que les algues trouveront une place croissante dans des préparations alimentaires exotiques et/ou "prêtes à consommer".

Caractérisation

La **caractérisation** approfondie des produits intermédiaires à base d'algue est indispensable lors de la mise au point de nouveaux produits alimentaires. Parmi les paramètres concernés, certains tels que la composition chimique ou les propriétés technologiques sont classiquement étudiés (phycocolloïdes); pour d'autres, tels que propriétés organoleptiques ou nutritionnelles, d'importants travaux de recherche doivent être entrepris.

La **garantie de la santé du consommateur** suppose une connaissance précise de la composition chimique des algues et donc la maîtrise des techniques d'analyse, adaptées au nouveau substrat que constitue l'algue. De gros efforts sont consentis par les industriels pour la surveillance des teneurs en métaux lourds. En outre, le développement de l'algue légume suppose également une approche alimentaire de l'écologie microbienne: études des microflore d'altération et pathogènes.

Les **propriétés nutritionnelles des algues** sont mal connues : de nombreuses lacunes subsistent quant à la biodisponibilité des minéraux et oligo-éléments, la digestibilité des protéines, la valeur nutritionnelle de l'abondante fraction glucidique...

En collaboration avec l'INRA (LBTG et LTAN , Nantes), notre laboratoire a mis en place un programme de recherche portant sur l'évaluation des propriétés nutritionnelles des polysaccharides algaux (5, 6) :

- fractionnement des polysaccharides, notamment dans des conditions physicochimiques simulant la digestion;
- analyse de la composition chimique et de la structure des principales fractions;
- évaluation des teneurs et des propriétés physicochimiques des fibres alimentaires algales;
- évaluation physiologique, chez l'homme, des fibres algales. Notre attention s'est focalisée sur le comportement fermentaire de différentes fibres algales au contact de la microflore du colon humain. En effet la majorité des polysaccharides algaux se comportent comme des fibres alimentaires: ils résistent aux enzymes endogènes humaines. Par conséquent, la valeur énergétique de la fraction glucidique des macroalgues marines est donc principalement fonction du devenir fermentaire des fibres algales au cours du transit colique.

Les premiers résultats indiquent une composition en fibres originale : par rapport aux autres végétaux consommés par l'homme, les algues présentent un ratio fibres solubles sur fibres insolubles très élevé. Par ailleurs, à l'inverse de la majorité des fibres solubles végétales, les fibres solubles algales seraient très peu fermentescibles par les bactéries coliques. Ces premières observations, à confirmer, permettent d'envisager des propriétés physiologiques (influence sur le transit intestinal, prévention des maladies métaboliques ...) intéressantes.

L'incorporation d'algue comme produit intermédiaire dans la formulation d'un produit alimentaire nécessite d'approcher son **profil organoleptique** : caractéristiques analytiques et hédoniques, capacité à renforcer l'arôme des autres constituants. Or le potentiel aromatique d'un produit intermédiaire est étroitement lié au produit fini dans lequel il est incorporé. Les travaux actuellement entrepris dans notre laboratoire, en collaboration avec des sociétés de l'agroalimentaire, portent sur des aspects méthodologiques - définition d'un lexique de termes aromatiques et mise en place de témoins aromatiques etc... et sur la recherche de "produits cibles" valorisant au mieux la palette aromatique.

Transformation

L'algue, nouvelle matière première pour les IAA, requiert de nouvelles techniques de transformation ; en particulier, la maîtrise de l'hygiène et la qualité microbiologique deviennent des priorités.

Les traitements unitaires utilisés sont pour la plupart issus de l'industrie agroalimentaire : séchage, réduction, lactofermentation, blanchiment, congélation... Il doivent toutefois tenir compte des spécificités de la matière première : propriétés mécaniques et rhéologiques, spécificité de la microflore, inaptitude à la conservation "en frais". Les techniques utilisées pour la conservation et la transformation influencent considérablement l'ensemble des caractéristiques de l'algue. Notre laboratoire, en collaboration avec trois sociétés de l'agroalimentaire (FROMARSAC, SAUPIQUET, STALAVEN) met au point, dans le cadre du programme Aliment 2002, de nouvelles techniques de fabrication de "produit alimentaires intermédiaires algue" permettant de répondre aux cahiers de charges produits et procédés fixés par les I.A.A.

CONCLUSION

La filière française des algues présente un fort potentiel d'innovation par rapport à celle de la majorité des autres pays occidentaux. Si de nombreux programmes de recherche portent sur le long terme (mise au point de molécules à activité pharmacologique par exemple) , d'autres programmes se sont d'ores et déjà traduits par la mise sur le marché de produits originaux: biostimulants à base d'algues pour l'agriculture, produits alimentaires de grande consommation mettant en valeur propriétés organoleptiques et nutritionnelles de l' "algue légume"...

Ces nouveaux développements impliquent une multitude de travaux, tant dans le domaine du marketing et de la législation que du point de vue scientifique et technique.

La maîtrise de la matière première algue - nouvelles techniques de conservation, de transformation et de caractérisation - , acquise lors de la mise au point d'un produit alimentaire ou agricole, constitue une base précieuse à tout autre projet de développement.

REFERENCES

- (1) MABEAU S., 1989 - La "Filière Algue Française" en 1988 : atouts et points de blocage - Océanis, 15 (5), 673-692.
- (2) MABEAU S., VALLAT O. & BRAULT D., 1990 - Le charme discret des macroalgues. De l'Orient à l'Occident, principaux marchés - Biofutur, 88, 24-29.
- (3) BOUDE J.P., NEGRO Y., FAUCHOUX A & SIMON B., 1988 - Le marché des algues alimentaires dans le monde en 1987 - Place d'Undaria pinnatifida - Publ. du Dpt d'Halieutique, n° 8, ENSAR, RENNES.
- (4) FLEURENCE J., 1991 - L'habilitation des algues en alimentation humaine. Le point sur la réglementation française - Industries Alimentaires et Agricoles. Sous presse.
- (5) MICHEL C., MABEAU S. & LAHAYE M., 1990 - Intérêt nutritionnel des macroalgues marines. Importance de la fraction glucidique. IV ème colloque sur la valorisation des produits de la mer. Nantes & La Baule, Novembre 1990.
- (6) LAHAYE M., FLEURY N., BARRY J.L., MICHEL C. & MABEAU S., 1991 - Seaweeds and dietary fibers. COST 48 Subgroup III Workshop, march 9-14 , Paimpol & St Malo.

Figure 1

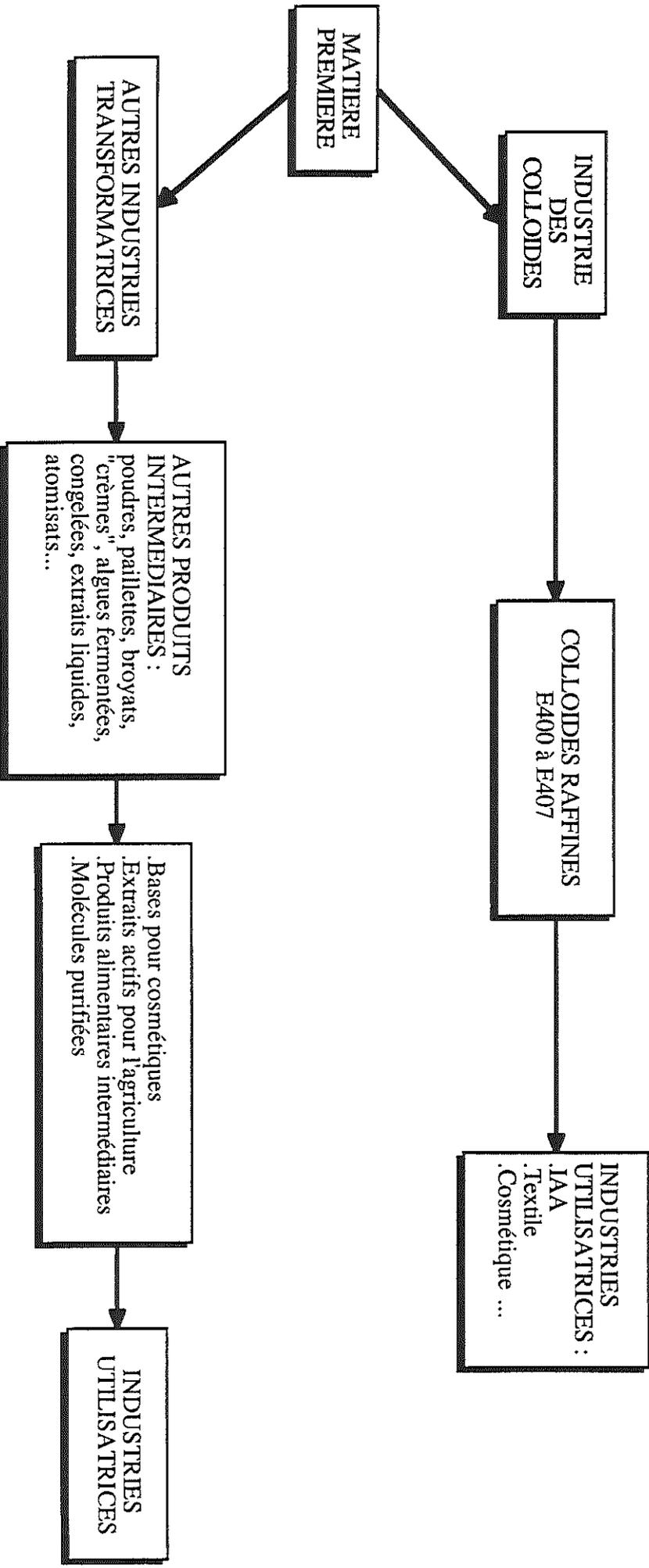


Figure 2 : LA FILIERE ALGUE FRANCAISE : REPARTITION DES CHIFFRES D'AFFAIRE, 1989
(Chiffre d'affaire total : environ 1 milliard de francs)

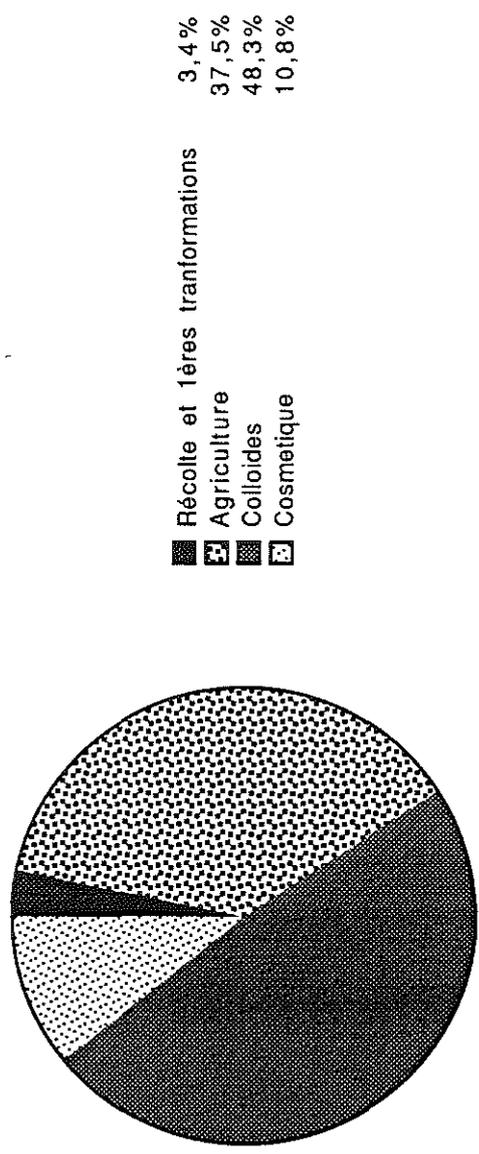


Figure 3 : Evolution des récoltes de *Fucus* et *Ascophyllum*

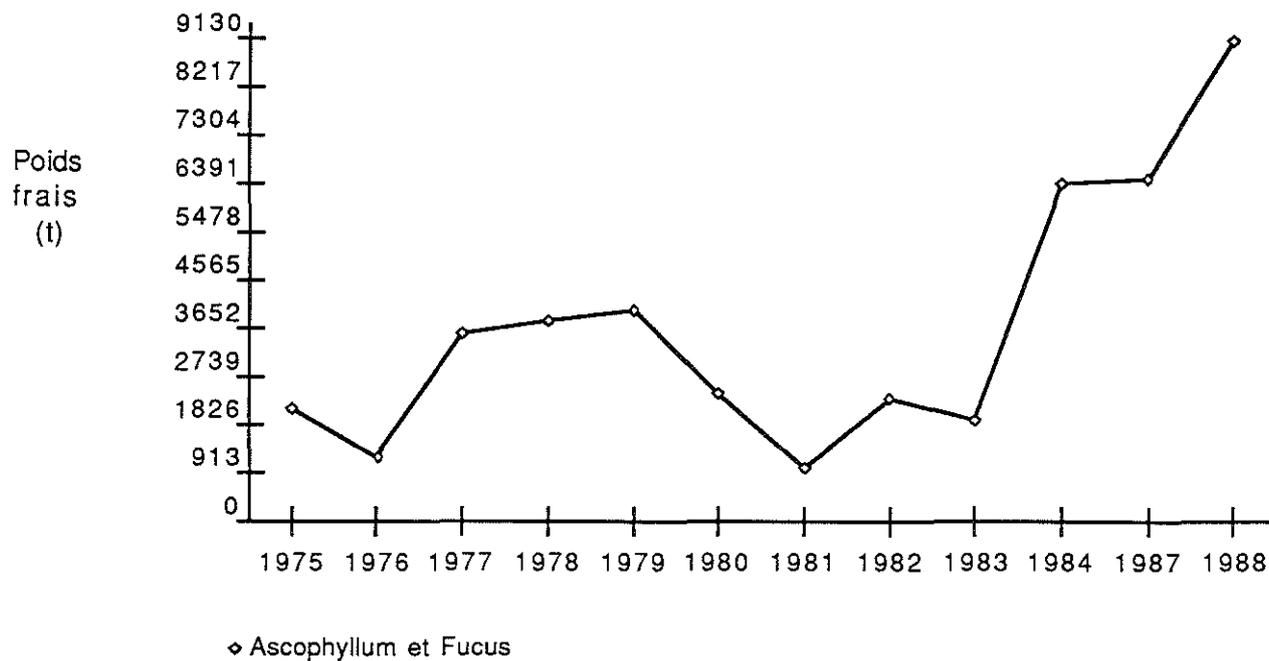
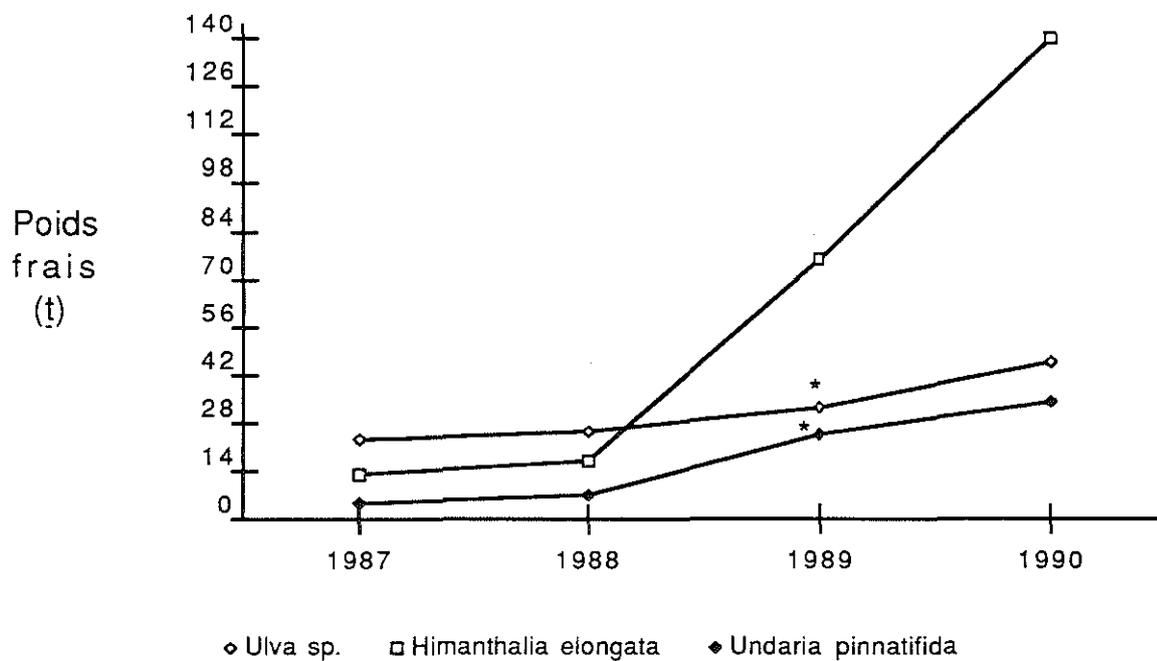


Figure 4 : Evolution récente de la production d'*Ulva*, *Undaria* et *Himanthalia*



(* Estimation)

T H E M E I I I

BACTERIES HYDROTHERMALES

Les micro-organismes des écosystèmes hydrothermaux sous-marins profonds

(intervention de G. BARBIER, Laboratoire de Biotechnologie, DRO/EP, IFREMER Centre de Brest)

L'objet de ce texte qui reprend les grandes lignes de l'exposé effectué lors du second colloque de biotechnologie marine de La Tremblade est de rappeler des données scientifiques générales et de présenter à grands traits le programme d'étude des micro-organismes marins d'origine hydrothermale que l'IFREMER développe dans le cadre d'un réseau de collaborations scientifiques au niveau national.

1) Les spécificités des écosystèmes hydrothermaux sous-marins

Les écosystèmes hydrothermaux sous-marins se développent au voisinage de sources chaudes localisées principalement au niveau des dorsales médio-océaniques et des dorsales des bassins arrière-arc. Ils se caractérisent au plan biologique par de très fortes biomasses animales tout à fait inhabituelles à grande profondeur. Leur première observation remonte à la fin des années 70 et depuis lors, les efforts conjugués de géologues et de biologistes, majoritairement nord-américains et français, ont permis une amélioration croissante de la connaissance de tels milieux.

Ces biotopes sont caractérisés par des conditions physico-chimiques considérées comme extrêmes:

- fortes pressions: les sites étudiés jusqu'à présent se situent à des profondeurs généralement comprises entre - 2000 m et - 4000 m, ce qui à raison d'un bar pour 10 m d'eau, correspond à des pressions de 200 à 400 bars

- absence de lumière, compte tenu de la profondeur

- importants gradients physico-chimiques du fait de la dilution des fluides hydrothermaux dans l'eau de mer ambiante (voir le tableau joint).

Les fluides hydrothermaux qui déterminent ces gradients physico-chimiques apportent les sources d'énergie et de carbone nécessaires à la production primaire bactérienne qui constitue la base trophique de ces écosystèmes (en effet, la chimiosynthèse se substitue à la photosynthèse dans de telles conditions).

L'examen des publications effectuées au cours de la décennie 80 montre que les microbiologistes américains ont produit la majeure partie des résultats pendant cette période. Divers types bactériens (morphologiques, métaboliques,...) ont été mis en évidence dans de tels milieux (JANNASH, 1985; PRIEUR et al., 1987). Après une période de forte polémique quant à l'hypothétique existence de souches susceptibles de croître à des températures d'au moins 250°C (BAROSS et DEMING,

1983), des souches ultra-thermophiles dont l'existence n'est pas contestée ont pu être isolées et décrites (JONES et al., 1983; FIALA et al., 1986; JANNASH et al., 1988; ZHAO et al., 1988; HUBER et al., 1989; PLEDGER et BAROSS, 1989; BURGGRAF et al., 1990; PLEDGER et BAROSS, 1991). Des symbioses très originales entre des animaux de ces milieux et des bactéries ont aussi été mises en évidence et étudiées (FELBECK et DISTEL, à paraître).

Compte tenu des conditions de vie extrêmes supportées par certains des micro-organismes présents dans ces milieux, l'idée de les étudier pour tenter d'en exploiter les spécificités a été avancée, plus particulièrement pour les thermophiles (BERGQUIST et al., 1987; KELLY et DEMING, 1988).

2) Le programme de recherche de l'IFREMER et le réseau de laboratoires associés

Considérant ces informations, l'IFREMER a décidé en 1988 la création d'un Laboratoire de Biotechnologie au sein du Département "Environnement Profond" du Centre de Brest. Son programme porte sur l'étude des micro-organismes des écosystèmes hydrothermaux sous-marins profonds, de leurs constituants et de leurs produits pour la recherche d'applications d'intérêt technologique, industriel et commercial.

Cette décision était motivée par diverses raisons:

- Les missions de recherche pour l'exploitation de la mer l'IFREMER

- La situation du sujet; en effet, l'étude des micro-organismes d'origine hydrothermale pour la recherche d'applications reste un sujet ouvert actuellement parce que l'accès à la ressource constitue un facteur très limitant

- L'existence de sous-marins grande profondeur (Cyana et Nautila) et d'une instrumentation scientifique associée qui permettent d'accéder aux sources hydrothermales profondes et d'effectuer des prélèvements avec une relative aisance; ainsi que la capacité d'innovation technologique de l'IFREMER

- Une expérience antérieure d'une dizaine d'années en géologie et en biologie, dans le cadre de programmes internationaux d'étude des manifestations hydrothermales océaniques (coopérations avec les Etats-Unis et le Japon principalement)

- Des avis d'experts favorables ainsi que des possibilités de partenariat pour le financement d'un tel programme

La décision de l'IFREMER a débouché sur la constitution d'une équipe de recherche d'une dizaine de personnes basée au Centre de Brest qui conduit ses propres travaux tout en

développant un réseau de collaborations scientifiques que nous présentons ci-dessous:

a) Microbiologie:

Il convenait tout d'abord de disposer de micro-organismes et donc de collecter des échantillons lors de campagnes océanographiques afin d'isoler des souches pour constituer une collection qui ensuite est étudiée.

Ces travaux de base associent deux laboratoires:

- Le Laboratoire de Biotechnologie du Département "Environnement Profond", Centre de Brest de l'IFREMER
- Le Laboratoire de Bactériologie Marine (Dr D. PRIEUR) de la Station Biologique de Roscoff, CNRS

Suite aux campagnes océanographiques de 1987 (HYDRONAUT) et 1989 (BIOLAU et STARMER), des collections de travail ont été constituées et sont en cours d'étude. Divers types métaboliques sont étudiés:

- IFREMER-Brest: souches hétérotrophes aérobies ou anaérobies (≈ 700 isolats), mésophiles (2/3) ou sulfotermophiles (1/3, dont plus d'une centaine d'ultra-thermophiles), souches méthanogènes.

- CNRS-Roscoff: souches thermophiles, souches sulfato-réductrices mésophiles, souches mésophiles sulfo-oxydantes, souches hétérotrophes aérobies mésophiles productrices de polysaccharides, résistantes aux métaux lourds, bactéries du cycle de l'azote.

Les souches thermophiles sont pour la plupart des archaebactéries ainsi que l'analyse des lipides membranaires et l'étude de la résistance aux antibiotiques a pu le montrer. Compte tenu de la relative méconnaissance des archaebactéries dont l'existence a été reconnue voici une dizaine d'années (WOESE et FOX, 1977), ces souches présentent un grand intérêt pour le développement de travaux sur la biologie moléculaire des archaebactéries. Des collaborations ont été engagées dans ce sens avec les deux laboratoires suivants:

- l'Unité des Entérobactéries de l'Institut Pasteur de Paris (Dr P. GRIMONT): taxonomie moléculaire et étude phylogénétique des souches thermophiles

- Le Groupe de Recherche sur les Archaebactéries de l'Université de Paris Sud / Orsay (Pr P. FORTERRE): génétique et topologie de l'ADN des archaebactéries (voir à ce sujet l'article du Pr P. FORTERRE dans ce document)

b) Chimie / Biochimie:

*** Polysaccharides:**

L'étude physico-chimique des polysaccharides produits par des souches d'origine hydrothermales regroupe les laboratoires suivants:

- Le Laboratoire de Biotechnologie du Département "Environnement Profond", Centre de Brest de l'IFREMER: analyse élémentaire des polysaccharides

- Le Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) de Grenoble (Pr M. RINAUDO), CNRS: étude rhéologique (voir à ce sujet l'article du Pr M. MILAS dans ce document)

- Le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université de Lille Flandres Artois (Pr B. FOURNET): analyse structurale

Des polysaccharides nouveaux tant du point de vue de leurs caractéristiques chimiques qu'en ce qui concerne leurs propriétés rhéologiques ont été mis en évidence et sont en cours d'étude.

*** Enzymes thermostables:**

La recherche et l'étude d'enzymes produites par les souches thermophiles est engagée dans le cadre d'un contrat du Ministère de la Recherche et de la Technologie au titre du Programme National des Biotechnologies par association des laboratoires suivants:

- Le Laboratoire de Biotechnologie du Département "Environnement Profond", Centre de Brest de l'IFREMER: recherche, étude et mise en oeuvre d'enzymes thermostables (β -galactosidase/ β -glucosidase, Alcool déshydrogénase, lipase)

- Le Laboratoire de Technologie Enzymatique de l'Université de Technologie de Compiègne (Pr D. THOMAS): étude et mise en oeuvre de ces mêmes enzymes thermostables (voir à ce sujet l'article du Pr M. D. LEGOY dans ce document)

- Le Groupe de Recherche sur les Archaeobactéries de l'Université de Paris Sud / Orsay (Pr P. FORTERRE): Biologie moléculaire des archaeobactéries, ADN polymérase

Diverses activités enzymatiques ont été mises en évidence pour les souches thermophiles étudiées au Centre de Brest de l'IFREMER, elles sont actuellement en cours d'étude (les travaux les plus avancés portent sur la β -glucosidase), la mise en oeuvre en technologie enzymatique (en réacteur solide-gaz, en particulier) suivra.

L'IFREMER a donc mis en place un réseau de collaborations scientifiques au niveau national pour l'étude des micro-

organismes des écosystèmes hydrothermaux dans la perspective d'applications biotechnologiques. Ce réseau devrait être étendu prochainement à la recherche de molécules à activités biologiques (activités virucides, antibiotiques, antifongiques et cytotoxiques).

Ce programme bénéficie du soutien financier de la Région Bretagne au titre du contrat de plan Etat-Région 1989-1993 ainsi que par le programme BRITTA de développement des biotechnologies.

Références bibliographiques:

BAROSS J. A. & DEMING J. W., 1983, Growth of "Black smoker" bacteria at temperature of at least 250°C, *Nature*, 303:423-426

BERGQUIST P. L., LOVE D. R., CROFT J. E., STREIFF M. B., DANIEL R. M. & MORGAN W. H., 1987, Genetics and potential biotechnological applications of thermophilic and extremely thermophilic microorganisms, *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 5:199-244

BURGGRAF S., JANNASH H. W., NICOLAUS B. & STETTER K. O., 1990, *Archaeoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria, *System. Appl. Microbiol.*, 13:21-28

FELBECK H. & DISTEL D. L., Prokaryotic symbionts of marine invertebrates, à paraître dans "The Prokaryotes", 2nde édition, Springer-Verlag

FIALA G., STETTER K. O., JANNASH H. W., LANGWORTHY T. A. & MADON J., 1986, *Staphylothermus marinus* sp. nov. represents a novel genus of extremely thermophilic submarine heterotrophic archaeobacteria growing up to 98°C, *System. Appl. Microbiol.*, 8:106-113

HUBER R., KURR M., JANNASH H. W. & STETTER K. O., 1989, A novel group of abyssal methanogenic archaeobacteria (*Methanopyrus*) growing at 110°C, *Nature*, 342:833-834

JANNASH H. W., 1985, Review lecture, the chemosynthetic support of life and the microbial diversity at deep-sea hydrothermal vents, *Proc. R. Soc. Lond.*, B225:277-297

JANNASH H. W., WIRSEN C. O., MOLYNEAUX S. T. & LANGWORTHY T. A., 1988, Extremely thermophilic fermentative archaeobacteria of the genus *Desulfurococcus* from deep-sea hydrothermal vents, *Applied and Environmental Microbiology*, 54(5)1203-1209

JONES W. J., LEIGH J. A., MAYER F., WOESE C. R. & WOLFE R. S., 1983, *Methanococcus jannashii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent, *Arch. Microbiol.*, 136:254-251

KELLY R. M. & DEMING J. W., 1988, Extremely thermophilic archaeobacteria: biological and engineering considerations, *Biotechnology Progress*, 4(2):47-62

PLEDGER R. J. & BAROSS J. A., 1989, Characterization of an extremely thermophilic archaeobacterium isolated from a black smoker polychaete (*Paralvinella* sp.) at the Juan de Fuca Ridge, *System. Appl. Microbiol.*, 12:249-256

PLEDGER R. A. & BAROSS J. A., 1991, Preliminary description and nutritional characterization of a chemoorganotrophic archaeobacterium growing at temperatures of up to 110°C isolated from a submarine hydrothermal vent environment, *Journal of General Microbiology*, 137:203-211

PRIEUR D., JEANTHON C. & JACQ E., 1987, Les communautés bactériennes des sources hydrothermales profondes du Pacifique Oriental, *Vie Milieu*, 37(3/4):149-164

WOESE C. R. & FOX G. E., 1977, Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5088-5090

ZHAO H., WOOD A. G., WIDDEL F. & BRIANT M. P., 1988, An extremely thermophilic *Methanococcus* from a deep sea hydrothermal vent and its plasmid, *Arch. Microbiol.*, 150:178-183

Caractéristiques physico-chimiques comparées de fluides hydrothermaux de la ride Est Pacifique (13°N) et de l'eau de mer:

Caractéristiques physico-chimiques	des fluides hydrothermaux*	de l'eau de mer**
température (°C)	273/350***	2/3
pH	3,1/3,8	7,8
O ₂ (µM)	0	≈110
H ₂ S (mM)	2,9/8,2	0
SO ₄ ²⁻ (mM)	0	28
Fe (µM)	1050/10170	<0,001
Mn (µM)	800/2932	<0,001
Zn (µM)	2/102	<0,01
Al (µM)	13,3/20	0,005
Cd (nM)	55/70	1
Pb (nM)	11/135	0,01

NB: *, données publiées concernant la Ride Est Pacifique (13°N) (MICHARD et al., 1984; EDMOND et al., 1984)

** , eau de mer standard

*** , valeurs maximales mesurées

BIOLOGIE MOLECULAIRE DU GENE CHEZ LES ARCHAEBACTERIES EXTREMOPHILES.

Patrick FORTERRE

INSTITUT DE GENETIQUE ET MICROBIOLOGIE

Les microorganismes thermophiles extrêmes et hyperthermophiles isolés à partir des sources chaudes hydrothermales sous-marines profondes sont tous des procaryotes appartenant au domaine des archaebactéries. Leur métabolisme est basé soit sur la méthanogénèse soit sur la réduction du soufre ou de ses dérivés (sulfothermophiles). Ces microorganismes présentent un potentiel biotechnologique qui ne demande qu'à être exploité; en particulier de nombreux auteurs ont souligné l'intérêt des enzymes thermostables dans différents procédés industriels (1,2). Encore faudrait-il pouvoir appliquer aux archaebactéries extrêmophiles les techniques de manipulation génétique qui se sont révélées si extraordinairement efficaces dans l'étude et l'exploitation des eubactéries. Il est donc indispensable de mettre au point des outils génétiques chez les archaebactéries, ce qui implique au préalable une connaissance approfondie de leur biologie moléculaire.

Le concept d'archaebactérie a été proposé à la fin des années 70 par Woese et ses collaborateurs ; récemment ces auteurs ont proposé de rebaptiser ces procaryotes "archaeotes" afin de bien insister sur ce qui les différencie des bactéries classiques (eubactéries), c'est à dire une distance évolutive considérable (3). Toutefois, le caractère "archaïque" des archaebactéries est encore largement hypothétique, d'autre part, elles ressemblent beaucoup plus aux bactéries "classiques" (eubactéries) qu'aux eucaryotes, aussi bien du point de vue morphologique que du point de vue de leur biologie moléculaire (4) (Tableau 1). Le génome des archaebactéries est constitué d'un seul chromosome circulaire, comme celui de la plupart des eubactéries, et sa petite taille (de 1 à 3 Mb) est du même ordre de grandeur que celle du génome eubactérien. Une carte physique des génomes de *Thermococcus celer* et de *Methanococcus voltae* a récemment été

publiée (5,6). Les gènes codant pour les protéines chez les archaebactéries ne contiennent pas d'intron et sont souvent regroupés en opérons, dont certains sont strictement homologues à des opérons eubactériens (Figure 1). En amont de chaque gène, on peut identifier une séquence de type Shine-Dalgarno qui pourrait servir, comme chez les eubactéries, à la reconnaissance par les ribosomes des sites d'initiation de la synthèse protéique. Une carte génétique a pu être établie chez *Mc. voltae* en localisant par hybridation sur la carte physique la position de nombreux gènes déjà clonés (6) (pour des revues exhaustives sur l'organisation des gènes chez les archaebactéries voir références 4, 7, 8 et 9).

La mise au point récente de systèmes de transcription *in vitro* chez *Sulfolobus shibatei* et *Methanococcus vanielii* a permis de définir les signaux de transcription (promoteurs et terminateurs) chez les archaebactéries (10, 11). Les promoteurs se caractérisent par une boîte riche en AT qui ressemble à la TATA box des eucaryotes et des eubactéries. Un même type de promoteur a été mis en évidence pour les gènes codant pour les ARN ribosomiaux et pour ceux codant pour des protéines, ce qui est en accord avec l'existence d'un seul type d'ARN polymérase chez les archaebactéries.

De nombreux auteurs ont mis en avant la présence de caractères moléculaires "eucaryotes" chez les archaebactéries ; par exemple leurs promoteurs ressemblent plus à ceux utilisés par les ARN polymérase II eucaryotes qu'aux promoteurs classiques de *E. coli* ; d'autre part, des introns ont été découverts dans certains gènes codant pour des ARN stables (ARN de transfert et ARN ribosomiaux) (12) et une "DNA binding protéin" mise en évidence chez *Methanothermus fervidus* présente de grandes similarités de séquences avec les histones eucaryotes (13). Toutefois, il faut noter que certains caractères "eucaryotes" des archaebactéries ont été récemment retrouvés chez les eubactéries ; par exemple des introns dans certains gènes codant pour des ARN de transfert chez les cyanobactéries (14, 15).

Les ressemblances entre les archaebactéries et les eubactéries au niveau moléculaire sont encourageantes dans la perspective du développement de la génétique chez les archaebactéries. Des gènes d'archaebactéries thermophiles extrêmes et hyperthermophiles ont déjà été clonés et exprimés avec succès chez *E. coli*. Les protéines produites sont fonctionnelles et ont conservé leurs propriétés de thermophilie et de thermostabilité (16).

L'étude génétique des archaebactéries a commencé à prendre son essor ; plusieurs plasmides, bactériophages et particules de type viral ont été découverts et analysés en détail chez les méthanogènes (8) et les halophiles (9) (Tableau II). Des systèmes de transfert de gènes par transformation et transduction ainsi que des vecteurs navettes ont été mis au point chez ces deux types d'archaebactéries (Tableau III). Un gène eubactérien codant pour une résistance à un antibiotique (puromycine) a même pu être exprimé chez *Methanococcus voltae* grâce à un vecteur d'intégration (17). Les études génétiques sont beaucoup moins avancées pour les bactéries thermophiles extrêmes et hyperthermophiles. Il n'existe, à l'heure actuelle, aucun système de transfert de gènes et aucun marqueur génétique n'a encore été identifié. Les sulfothermophiles sont en particulier résistants à de très nombreux antibiotiques utilisés pour la mise au point de marqueurs de résistance chez les eubactéries et les eucaryotes (4). La découverte récente d'un plasmide chez une nouvelle archaebactérie thermophile marine (D. Prieur, communication personnelle) pourrait toutefois ouvrir la voie à la mise au point d'outils génétiques chez ces microorganismes.

L'étude des archaebactéries thermophiles extrêmes et hyperthermophiles apporte également des informations décisives sur les mécanismes d'adaptation des êtres vivants à très haute température. Un nouveau type d'ADN topoisomérase, la gyrase reverse, qui introduit des supertours positifs dans l'ADN, a été découvert chez les archaebactéries thermophiles extrêmes et hyperthermophiles (18, 19). L'action de cette enzyme pourrait stabiliser l'ADN à haute température. Récemment la reverse gyrase a été également mise en évidence chez les eubactéries du genre *Thermotoga* (20), en accord avec l'hypothèse selon laquelle tous les procaryotes descendent d'un ancêtre commun thermophile. Enfin, il faut signaler que les archaebactéries thermophiles possèdent une ADN polymérase qui peut être utilisée pour l'amplification de gènes par la méthode PCR (21, 22). Nous avons montré que contrairement à la taq polymérase, les ADN polymérases des archaebactéries thermophiles extrêmes possèdent une activité exonucléase associée 3'-5' de correction d'erreur, ce qui devrait permettre d'améliorer la fidélité de l'amplification (23).

Tous les résultats accumulés ces dernières années sur la biologie moléculaire des archaebactéries thermophiles confirment donc l'intérêt d'étudier ces microorganismes dont

l'origine est encore incertaine mais qui semblent avoir sur la scène scientifique un avenir très prometteur.

REFERENCES

- 1 Rossi, M., Biofutur, Janvier 1987, 39-40
- 2 Kristjanson, J.K. 1989, Tibtech.7, 349-353.
- 3 Woese, C.R., Kandler, O. and Wheelis, M.L., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci 87:4576-4579.
- 4 Forterre, P. "Molecular Genetic of sulfothermophilic archaea (archaeobacteria), Biotechnology Handbook Series, Plenum Press, sous presse.
- 5 Noll, K., 1989, J. Bacteriol.171:6720-6725.
- 6 Sitzmann, J. and Klein, A. 1991, Mol. Microbiol., 5: 505-513.
- 7 Brown J.W., Daniels C.J. and Reeve J.N, 1989, CRC Crit. Rev. Microbiol. 16:287-338
- 8 Possot, O. and Forterre, P. "Molecular biology and genetics of methanogens", Biotechnology Handbook Series, Plenum Press, sous presse.
- 9 Dyall-Smith, M. "Molecular biology of halophilic archaeobacteria". Biotechnology Handbook Series, Plenum Press, sous presse.
- 10 Frey, G., Thomm, M., Brudigam, B., Gohl, H.P. and Hausner, W., 1990, Nucl. Acid. Res. 18:1361-1367.
- 11 Reiter, W.D., Hüdepohl, U. and Zillig, W., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:9509-9513.
- 12 Garrett, R.A., Dalgaard, J., Larsen, N., Kjems, J. and Mankin A.S., 1991 Trends Biochem. Sci. 16:22-26
- 13 Sandman, K., Krzycki J.A., Dobrinski, B., Lurz, R. and Reeve J.N. 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:5788-5791.
- 14 Kuhsel, M., Strickland, R. and Palmer, J.D. 1990, Science, 250: 1570-1572.
- 15 Xu, M.Q., Kathe, S.D., Heidi, G.B., Nierzwicki-Bauer, S.A. and Shub, D.A. 1990, Science, 250: 1566-1570.
- 16 Zwickl, P., Fabry, S., Bogedain, C. Haas, A. and Hensel, R., 1990, of J. Bacteriol. 172:4329-4338.
- 17 Gernhardt, P., Possot, O., Foglino, M., Sibold, L. and Klein, A., 1990, Mol. Gen. Genet. 221:273-279
- 18 Forterre, P., Mirambeau, G., Jaxel, C., Nadal, M. and Duguet, M., 1985, EMBO J. 4:2123-2128

- 19 Boutier de la Tour, C., Portemer, C., Nadal, M., Stetter, K.O., Forterre, P. and Duguet, M, 1990, J. Bacteriol. 172:6803-6808.
- 20 Boutier de la Tour, C., Portemer, C., Huber, R., Forterre, P. and Duguet, M, J. Bacteriol. in press.
- 21 Elie, C., De Recondo, A.M. and Forterre, P., 1989, 178:619-626.
- 22 Salhi, S., Elie, C., Jean-Jean, C., Meunier-Rotival, M., Fortere, P., Rossignol, J.M., and De Recondo A.M., 1990:1341-1347.
- 23 Hamal, A., Forterre, P. and Elie C.1990, Eur. J. Biochem., 190, 517-52.

Tableau III : Systèmes de transfert de gènes disponibles chez les archaebactéries.

	Halophiles	Methanogènes	Sulfothermophiles
Sexualité	+	-	-
Transformation	++	+	-
Transduction	-	++	-
Vecteurs navettes	++	-	-

Tableau II: Outils génétiques actuellement disponibles chez les archaebactéries.

HALOPHILES

Vecteurs navettes basés sur les plasmides

- pHV2 (*Haloferax volcani*, résistance à la Mévinoline),
- pHK (*Haloferax*, phenon K, résistance à la Novobiocine)
- pGRB (*Halobacterium*, GRB).

METHANOGENES

- Bactériophage transducteur Ψ m1 (*Methanobacterium thermoautotrophicum*)
- Particule de type viral VLP-3 transductrice (*Methanococcus voltae*)
- Plasmide PME2001 et résistance à l'acide pseudomonique (*Methanobacterium thermoautotrophicum*)
- Vecteur d'intégration basé sur la résistance à la puromycine (*Methanococcus voltae*).

Tableau I : Caractères communs aux archaebactéries et aux eubactéries

Un seul chromosome circulaire (0,8 -5 Mb)

Absence d'introns dans les gènes codant pour des protéines

Opérons et ARN messagers polycistroniques

ARN messagers non cappés et sans polyA

Des séquences Shine-Dalgarno

Une seule ARN polymérase

Des enzymes de restriction

Des bactériophages avec une structure "tête-queue"

UTILISATION ET POTENTIALITES DES ENZYMES THERMOSTABLES

M.D. LEGOY

Laboratoire de Technologie Enzymatique
Université de Technologie de Compiègne,
60206 Compiègne

Un des problèmes majeurs que pose l'introduction de procédés de biocatalyse en industrie est le manque de stabilité opérationnelle des biocatalyseurs couramment utilisés.

Avec le développement des organismes thermophiles et extrêmophiles, une nouvelle classe de catalyseurs va être disponible pour les applications industrielles. Il ne fait aucun doute que l'utilisation de biocatalyseurs possédant une bonne stabilité dans des conditions d'utilisation drastiques telles que des températures ou des concentrations en sels élevées, des pH extrêmes ou la présence de solvants organiques par exemple permettra le développement de nouveaux procédés où ces propriétés exceptionnelles seront exploitées.

De nombreux organismes thermophiles sont actuellement criblés et des activités enzymatiques thermostables du type amylase, protéase, hemicellulase (xylanase), cellulase, pectinase et lipase ont déjà été trouvées. Il y a donc maintenant une diversité d'enzymes thermostables disponibles et de nouvelles applications utilisant les potentialités de ces enzymes peuvent être envisagées.

Jusqu'à présent la presque totalité des études d'enzymes ont été réalisées en phase liquide et cela bien que de nombreux composés intéressants pour l'industrie soient en phase gazeuse.

La faisabilité de l'utilisation d'enzymes en milieux peu hydratés avec des substrats en phase gazeuse a déjà été démontrée.

Nos travaux ont porté sur l'utilisation de trois enzymes thermostables :

- deux enzymes thermostables isolées, purifiées et caractérisées à partir de *Sulfolobus solfataricus* (une archaebactérie) : une β -galactosidase présentant une activité β -glucosidase et une alcool déshydrogénase (SSADH)
- une cutinase thermostable extraite de *Fusarium solani* présentant une activité lipasique.

Dans tous les cas les résultats obtenus avec les enzymes thermostables ont été comparés à ceux que l'on obtient lorsqu'une enzyme classique est utilisée.

Pour tester les activités des ADH et des lipases nous avons mis au point un nouveau type de bioréacteur solide-gaz.

β -GLUCOSIDASE

La β -galactosidase thermostable à activité β -glucosidase que nous avons étudiée a un temps de demi-vie de 50 heures à 85°C et de 500 heures à 70°C. Cette enzyme a été utilisée pour faire de la synthèse d'oligomères de glucose en milieu concentré en substrat et à température élevée.

La synthèse d'oligosaccharides a été réalisée en réacteurs fermés en présence de β -glucosidase d'amandes (49 IU/ml de milieu réactionnel) et en présence d'enzyme thermostable (7 IU/ml de milieu réactionnel) en présence de glucose 5 M et de sorbitol 4,4 M à 65°C. L'addition de sorbitol est faite de façon à diminuer l'activité de l'eau du système, c'est-à-dire l'eau disponible dans le système. Cela permet de déplacer l'équilibre thermodynamique de la réaction dans le sens de la synthèse. La figure 1 présente la production de disaccharides obtenues avec les deux enzymes. Dans tous les cas c'est le gentiobiose qui est produit préférentiellement. Cependant la productivité de disaccharides est 5 fois plus élevée lorsqu'on utilise l'enzyme thermostable.

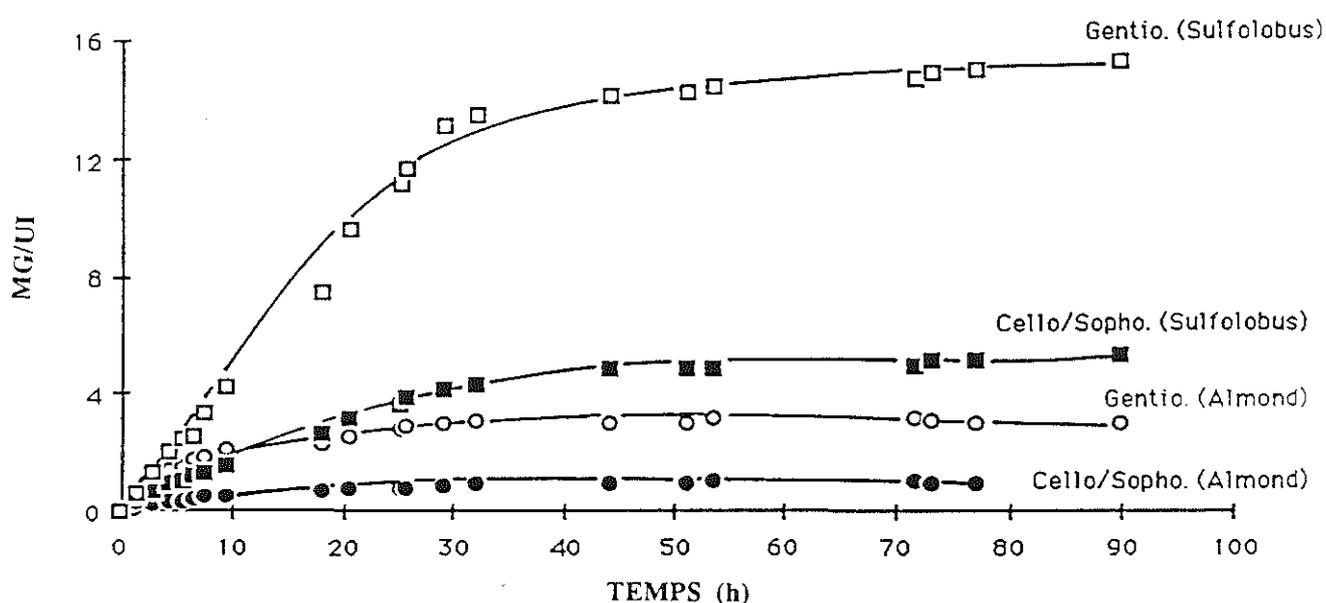


Figure 1 : Production de disaccharides en réacteur fermé par la β -glucosidase d'amandes et par la β -glucosidase thermostable de *Sulfolobus solfataricus*.

Gentic. = gentiobiose, cello = cellobiose, sopho = sophorose.

ADH

La SSADH a une large spécificité et est capable de catalyser des oxydo-réductions

régiospécifiques dans des solvants organiques. Le temps de demi-vie de l'enzyme est de 18,5 heures à 60°C et de 5,5 heures à 70°C. La SSADH a été étudiée en réacteur solide-gaz dans lequel la phase solide est représentée par l'enzyme coimmobilisée avec le cofacteur NAD (par coréticulation en présence d'albumine et de glutaraldéhyde) utilisée sous forme de poudre lyophilisée et où les substrats et produits sont sous forme gazeuse. Un schéma de ce nouveau type de bioréacteur est présenté sur la figure 2. Les substrats gazeux sont amenés jusqu'au réacteur à l'aide d'un gaz vecteur inerte, ils sont transformés en produits gazeux qui quittent le réacteur et sont analysés par chromatographie en phase gazeuse. La réaction modèle que nous avons testée est l'oxydation du butanol en butanal couplée à la réduction de l'isobutanal en isobutanol afin d'assurer la régénération du NAD.

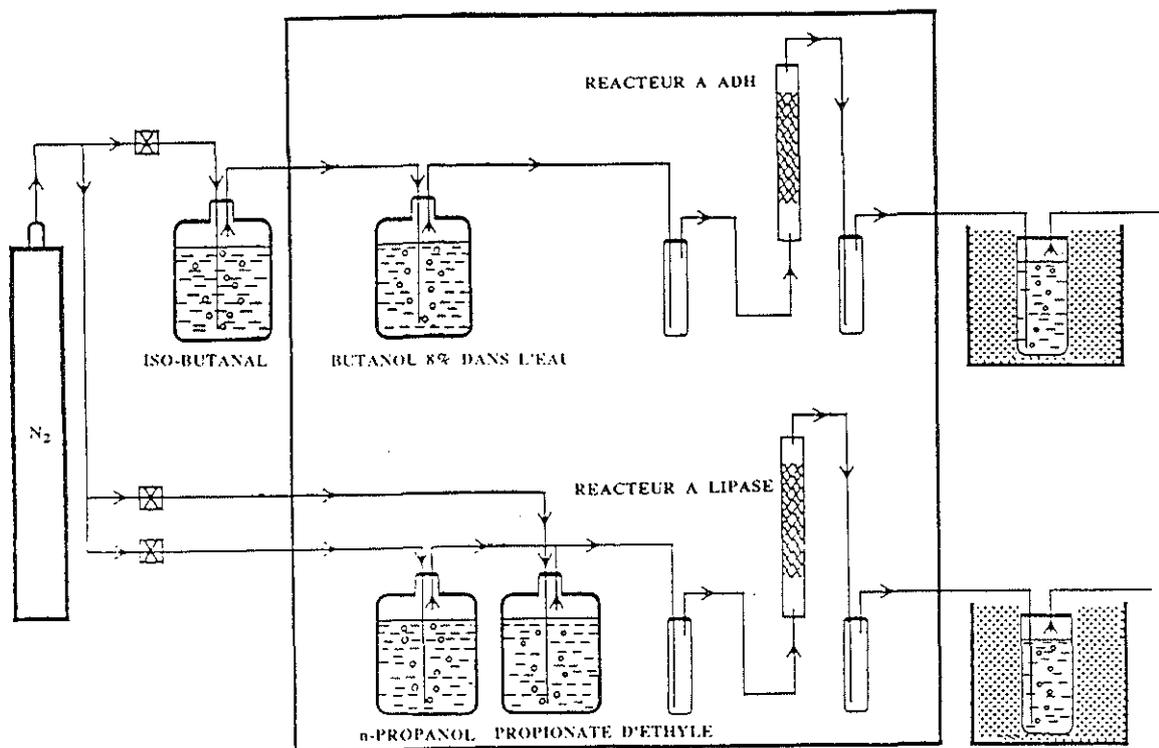


Figure 2 : Bioréacteur solide-gaz. Schéma du dispositif expérimental.

Les résultats obtenus avec la SSADH sont comparés à ceux que l'on obtient par utilisation d'une ADH commerciale de foie de cheval (HLADH) et sont présentés sur la figure 3.

L'état stationnaire est atteint après 5 heures et correspond à une conversion de 33 % de substrat avec une production de 24 μ moles de butanal/mn.unité d'enzyme. Le temps de demi-vie est d'environ 20 heures. L'utilisation des mêmes substrats en présence d'HLADH ne montre pas d'état

stationnaire et donne une production maximale de 2,9 μmoles de butanal/mn.unité d'enzyme pour une conversion de 3,8 % de substrat. L'enzyme thermostable est donc plus stable que l'enzyme classique et donne une productivité de butanal 35 fois plus importante.

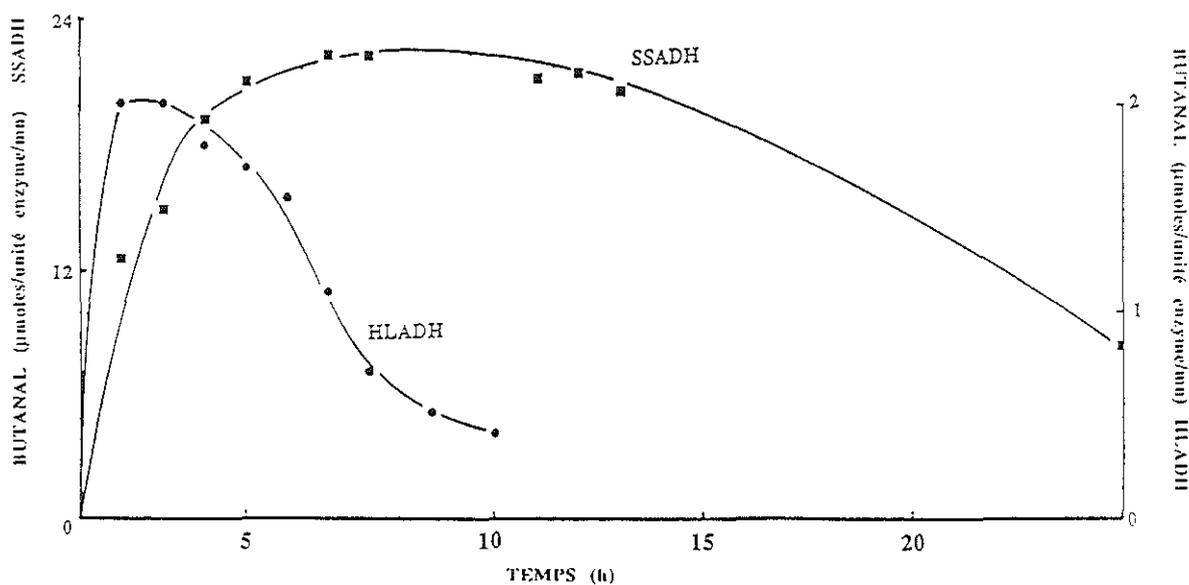


Figure 3 : Production de butanal dans le bioréacteur solide-gaz avec la HLADH (1,14 UI) et avec la SSADH (0,09 UI) à 60°C. La phase solide est représentée par l'ADH et le NAD coimmobilisés et la phase gazeuse par les substrats et produits.

LIPASE

La réaction de transestérification entre le propionate d'éthyle et le *n*-propanol a été étudiée avec l'enzyme thermostable (PGS) et avec une lipase commerciale de pancréas de porc (PPL). Dans ce cas, 100 mg de PPL (96000 UI) ou 20 mg d'enzyme PGS (336000 UI) ont été utilisés sous forme de poudre lyophilisée dans le réacteur solide-gaz (figure 2). La transestérification a été testée à 65°C. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 4. Les flux de substrats sont respectivement de 15,2 et 55 $\mu\text{mol/mn}$ pour le *n*-propanol et pour le propionate de méthyle.

Dans les deux cas l'état stationnaire est obtenu après une heure de réaction. L'activité maximale est de 30,7 10^{-6} $\mu\text{mol/mn.UI}$ pour la lipase pancréatique correspondant à un taux de conversion de 20 % de *n*-propanol et l'activité résiduelle est de 78 % après 150 heures de réaction.

En ce qui concerne l'enzyme thermostable, la meilleure activité observée est de 27,3 10^{-6} $\mu\text{mol/mn.UI}$ correspondant à un taux de conversion de 60 % du *n*-propanol et il n'y a aucune perte d'activité après 150 heures de fonctionnement du réacteur avec cette enzyme à 65°C.

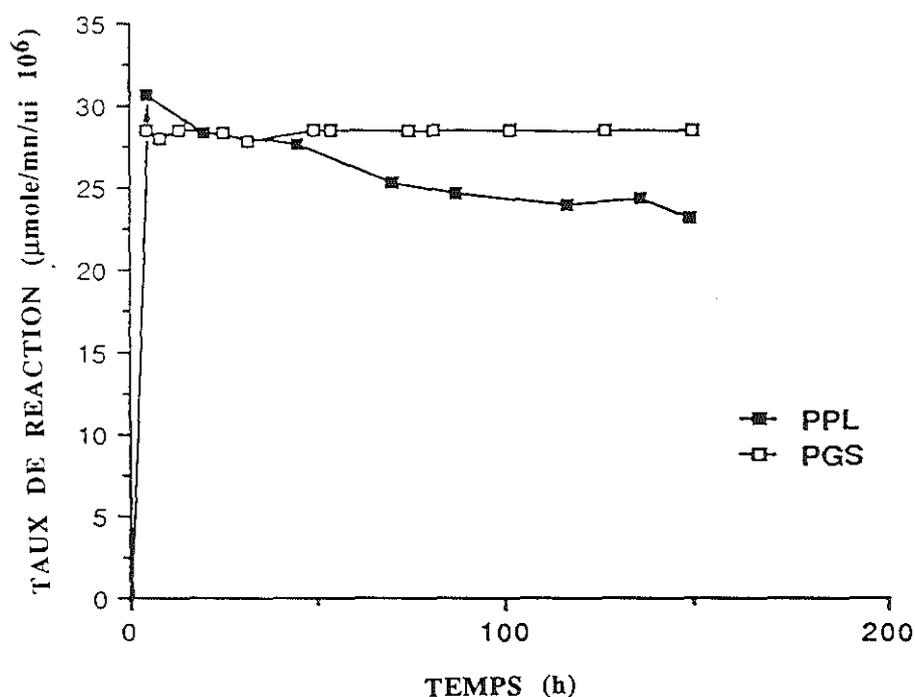


Figure 4 : Taux de transestérification entre le propionate de méthyle et le *n*-propanol à 65°C en fonction du temps pour la lipase de pancréas de porc (PPL) et pour la cutinase (PGS)

Les études réalisées avec ces trois enzymes thermostables montrent les potentialités que présentent l'utilisation de ces nouveaux biocatalyseurs lorsqu'on est amené à travailler dans des conditions inhabituelles : milieux très concentrés, températures élevées...

Par ailleurs s'il est vrai que l'utilisation de ces enzymes est importante dans le domaine des applications, il est également vrai que ces enzymes permettent de faire des recherches beaucoup plus fondamentales afin d'avoir des informations sur le rôle de l'eau dans les réactions enzymatiques à hautes températures ainsi que sur la structure et les changements de conformation qui s'opèrent dans les protéines lorsqu'elles sont testées à des températures élevées.

LES POLYSACCHARIDES BACTERIENS

M. Milas

Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV-CNRS),
B.P. 53 X 38041 Grenoble-cedex (France).

Parallèlement aux polysaccharides d'origine végétale apparurent dans les années 60 les premières études sur les polysaccharides excrétés par les bactéries. L'introduction du xanthane fut le début de ces recherches qui n'ont fait depuis que s'amplifier. L'engouement pour ce type de polysaccharide était et est toujours la possibilité d'obtenir des structures chimiques nouvelles et très variées avec toutes les conséquences que l'on peut espérer comme par exemple :

1°) Une meilleure connaissance des relations entre les structures, les propriétés et les fonctions. En effet, une différence importante entre ce type de polysaccharide et ceux extraits de végétaux est leur pureté et une structure chimique régulière ce qui favorise ces études. Un des objectifs pratiques de ces recherches est de pouvoir effectuer des prévisions de structures ayant des propriétés spécifiques . Pour cela il est nécessaire d'étudier, outre les structures chimiques, :

- les transitions ordre-désordre et les facteurs les affectant ainsi que d'obtenir des informations expérimentales sur le type de structures ordonnées en solution et les relations qui pourraient exister entre ces structures et le comportement de ces polysaccharides en solution (comportement hydrodynamique, rhéologique, propriétés complexantes...)

- les effets de la température et des sels sur la gélification et la fusion du gel lorsqu'un gel est mis en évidence. Les relations qui pourraient exister entre les structures primaire et secondaire et les

propriétés des gels (rigidité, élasticité, adhésivité...) ainsi que le mécanisme de gélification.

L'ensemble de ces recherches expérimentales devrait être corrélé aux résultats de la modélisation moléculaire et vice-versa afin d'avancer vers l'objectif fixé de prévision de structures de polysaccharides aux propriétés spécifiques.

2°) L'obtention d'un polysaccharide pouvant avoir un potentiel d'application industriel intéressant. Dans la deuxième partie de ce travail j'exposerai brièvement les propriétés de polysaccharides bactériens faisant de nos jours l'objet d'applications industrielles. Parmi les propriétés recherchées par les industriels et dont les polysaccharides bactériens sont des candidats potentiels nous pouvons citer :

- Dans l'industrie alimentaire, des agents épaississants ou stabilisants de suspensions (cependant il sera dans ce domaine difficile de supplanter le xanthane), des agents gélifiants (là aussi le gellane et l'utilisation des mélanges gélifiants xanthane/galactomannane sont bien en place). Pour s'imposer dans ce domaine, les nouveaux polysaccharides devront avoir des propriétés améliorées telles une meilleure stabilité en température ou des propriétés spéciales non encore rencontrées par des produits courants, par exemple un agent émulsifiant qui pourrait être lyophilisé ou bien encore qu'ils fournissent une fonctionnalité à un coût réduit. Les remarques sont aussi valables dans les domaines non alimentaires. Je prendrai pour exemple l'acide hyaluronique, produit utilisé actuellement en ophtalmologie et dans les cosmétiques dont le prix de revient est très élevé car ce polysaccharide est extrait des crêtes de coqs ou des cordons ombilicaux. Le hyaluronate bactérien peut être obtenu, à masse moléculaire et degré de pureté identique, pour un prix bien inférieur. Actuellement le hyaluronate d'origine bactérienne est en train de supplanter celui d'origine animale pour certaines applications.

- Les propriétés recherchées dans le domaine non alimentaire, et qui apporteront vraisemblablement les plus sûrs débouchés sont par exemple :

* des agents permettant un relargage contrôlé de diverses substances actives (médicaments, insecticides, herbicides, fongicides...),

* des polysaccharides compatibles avec des polymères synthétiques, non seulement pour faire des plastiques biodégradables, mais aussi pour préparer des composites.

* des polysaccharides hydrosolubles avec des propriétés améliorées par comparaison au xanthane : propriétés épaississantes, viscoélastiques, de suspension en particulier pour l'application , en récupération du pétrole, dans les peintures ou pour la réduction des effets de frottement. En fait l'ensemble de ces propriétés est fonction du paramètre de recouvrement $C[\eta]$, avec C la concentration en polymère et $[\eta]$ la viscosité intrinsèque (1). Par suite, à concentration identique les meilleures propriétés seront obtenues pour des viscosités intrinsèques les plus élevées donc pour des polymères qui présentent une plus grande rigidité et longueur de chaîne donc une plus grande longueur de persistance et masse moléculaire.

* des polysaccharides aux propriétés complexantes.

De plus l'utilisation des polysaccharides en pharmacie et dans les cosmétiques devrait aussi se développer.

En dehors de leurs structures et propriétés, les atouts des polysaccharides bactériens par rapport aux polysaccharides extraits des plantes sont aussi de plusieurs ordres :

- l'approvisionnement et la production contrôlés ne dépendant pas des conditions climatiques, voir politiques.

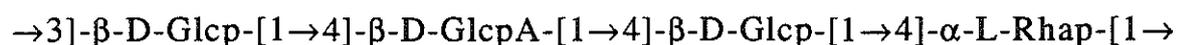
- une structure très régulière et des masses moléculaires pouvant être très élevées (plusieurs millions).

Cependant, par rapport aux polysaccharides courants (alginates, acides pectiques, agars...) leur prix de revient est en général plus élevé. Cela peut être l'inverse dans des cas spécifiques (acide hyaluronique par exemple).

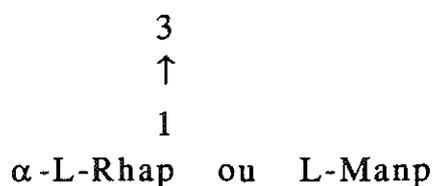
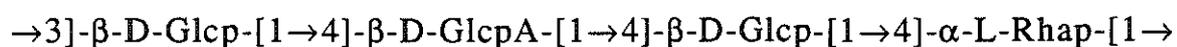
de fermentations bactériennes conduisent aux rendements atteints par les xanthanes (taux de conversion, en général du D-glucose, égal voire supérieur à 70 % et production très faible de biomasse insoluble ou de produits non désirables).

Une autre grande famille de polysaccharides bactériens est celle représentée par le gellane :

gellane :



welane :



Rhamsane :

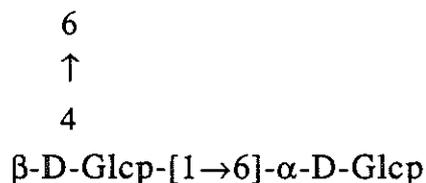
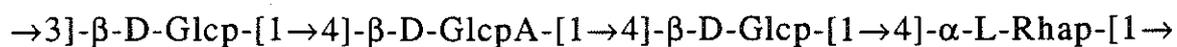


TABLEAU I : Structures envisagées en solution. SC : simple chaîne ; DH : double hélice (10-13). (a) présence d'une transition conformationnelle, mais l'existence d'associations intermoléculaires empêche la caractérisation des structures.

* Obtention d'un gel dans des conditions définies.

	Gellane	Welane	Rhamsane	S 657
Acétylé	*DH,SC(a)	DH	DH	DH
Déacétylé	*DH,SC	DH	*DH,SC	DH

Dans le cas du welane et S 657, les substituants glucidiques ont un effet stabilisant très important qui ne permet pas d'obtenir la fusion de la structure ordonnée dans les conditions habituelles. Comme le mécanisme de gélification implique cette fusion, l'intérêt industriel de ces produits réside dans les propriétés épaississantes et de stabilisation de suspensions. Néanmoins, les associations intermoléculaires sont encore plus nombreuses qu'avec le xanthane, y compris des liaisons polysaccharides-débris cellulaires.

C'est sans doute l'existence de ces nombreuses liaisons intermoléculaires qui est à l'origine de la bonne stabilité apparente de ces polysaccharides en température.

Le welane, pour certaines applications remplace le xanthane (traitement des puits).

Par contre l'intérêt du gellane est exclusivement lié à la formation d'un gel. Il trouve actuellement des débouchés dans l'industrie alimentaire au Japon et très prochainement aux Etats-Unis. Il remplace aussi les agars dans certaines applications, comme par exemple pour les supports gélifiés des cultures microbiennes.

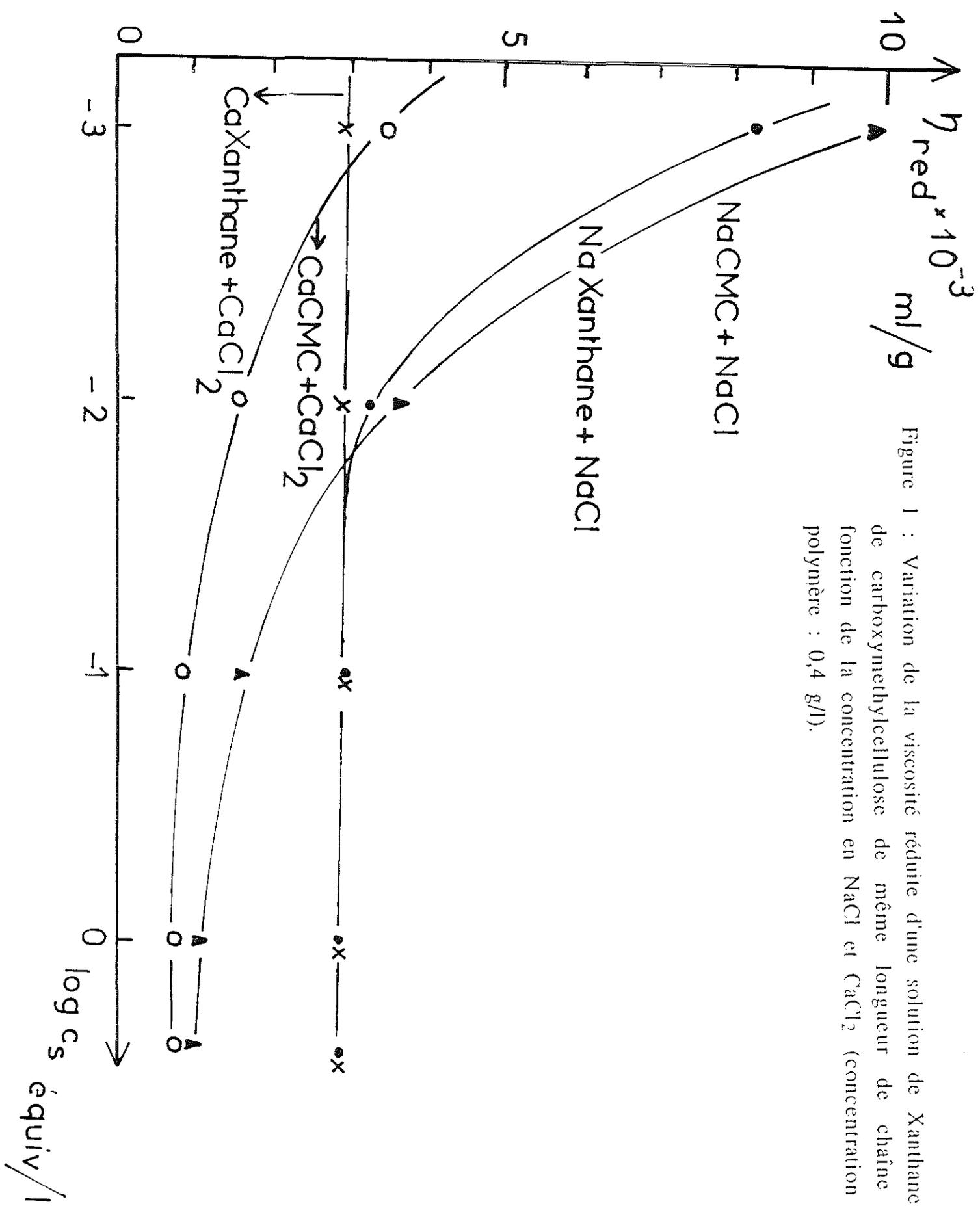
Le rhamsane apparaît comme un cas intermédiaire par rapport aux trois polysaccharides précédents. Les substituants glucidiques de par leur nature et/ou leur position, stabilisent la double hélice, mais à un degré

des fortes masses moléculaires sur les propriétés à impact industriel. En particulier, les propriétés rhéologiques sont directement liées à la viscosité intrinsèque des produits donc à leur masse moléculaire.

REFERENCES

- 1 - Milas, M ; Rinaudo, M ; Knipper, M. ; Schuppiser, J.L. *Macromolecules* (1990) **23**, 2506.
- 2 - Rinaudo, M. ; Milas, M. *Biopolymers* (1978), **17**, 2663.
- 3 - Milas, M. ; Rinaudo, M. *Carbohydr. Res.* (1986) **158**, 191
- 4 - Holzwarth, G. *Carbohydr. Res.* (1978) **66**, 173.
- 5 - Lambert, F. ; Rinaudo, M. *Polymer* (1985) **26**, 1549.
- 6 - Rinaudo, M. ; Milas, M. *Int. J. Biol. Macromol.* (1980) **2**, 45.
- 7 - Dentini, M. ; Coviello, T. ; Burchard, W. ; Crescenzi, V. *Macromolecules* (1988), **21**, 3312.
- 8 - Urbani, R., Brant, D.A. *Carbohydr. Polym.* (1989), **11**, 169.
- 9 - Kang, K. ; Veeder, G.T. ; Mirrasoul, P.J. ; Kaneko, T. ; Cottrel, I.W. *Appl. Env. Microbiol.* (1982), **43**, 1086.
- 10- Campana, S. ; Andrades, C. ; Milas, M. ; Rinaudo, M. *Int. J. Biol. Macromol.* (1990), **12**, 379.
- 11- Campana, S. ; Milas, M. ; Rinaudo, M. à paraître.
- 12- Milas, M ; Shi, X. ; Rinaudo, M. *Biopolymers* (1990) **30**, 451.
- 13- Shi, X. Thèse Université de Grenoble (1990).
- 14- Gravanis, G. ; Milas, M. ; Rinaudo, M. ; Tinland, B. *Carbohydr. Res.* (1987) **160**, 259.
- 15- Gravanis, G. ; Milas, M. ; Rinaudo, M. ; Clarke-Sturman, A.J. *Int. J. Biol. Macromol.* (1990), **12**, 195 et 201.

- 16- Bo, S. ; Milas, M. ; Rinaudo, M. *Int. J. Biol. Macromol.* (1987), **9**, 153.
- 17- Yanaki, T. ; Norisuye, T. ; *Polymer. J.* (1983), **15**, 389.
- 18- Franz, G. ; Hensel, A. ; Kraus, J. ; in "Biomedical and Biotechnological advances in industrial polysaccharides". V. Crescenzi, I.C.M., Dea, S., Paoletti, S.S. Stivala and I.W. Sutherland Eds. Gordon and Breach Science Publishers (1989) 241.
- 19- Taguchi, T. ; Furne, H. ; Kimura, T. *Japan J. Cancer Chemother* (1985), **12**, 366.



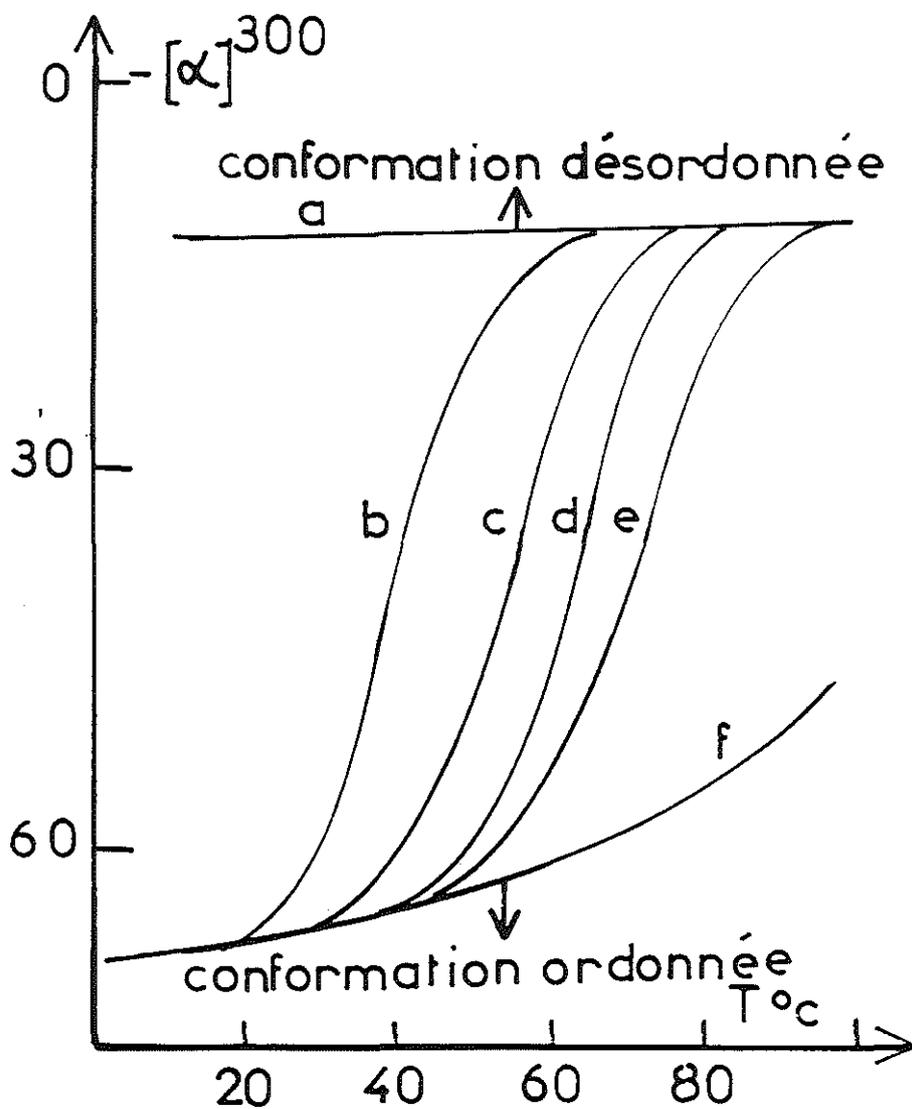


Figure 2 : Variation du pouvoir optique rotatoire spécifique en fonction de la température pour le Na Xanthane ($C_p = 0,66 \text{ g/l}$ dans a : H_2O ; b, 5,6 mM NaCl ; c, 10,8 mM NaCl ; d, 15,8 mM NaCl ; e, 28 mM NaCl ; f, 0,1 M NaCl).

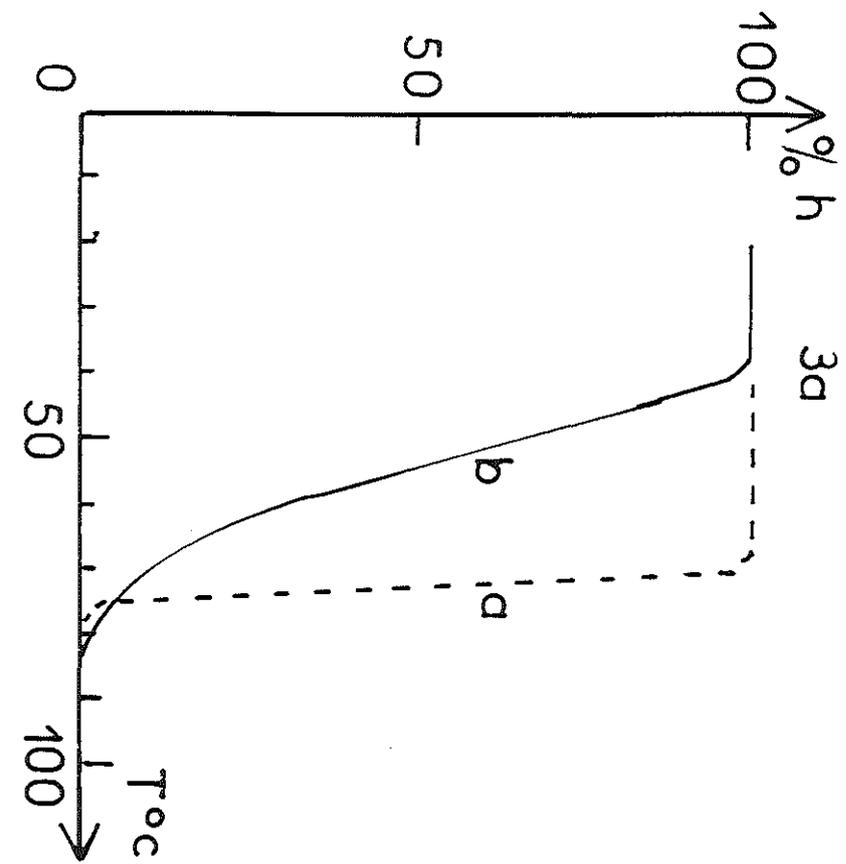
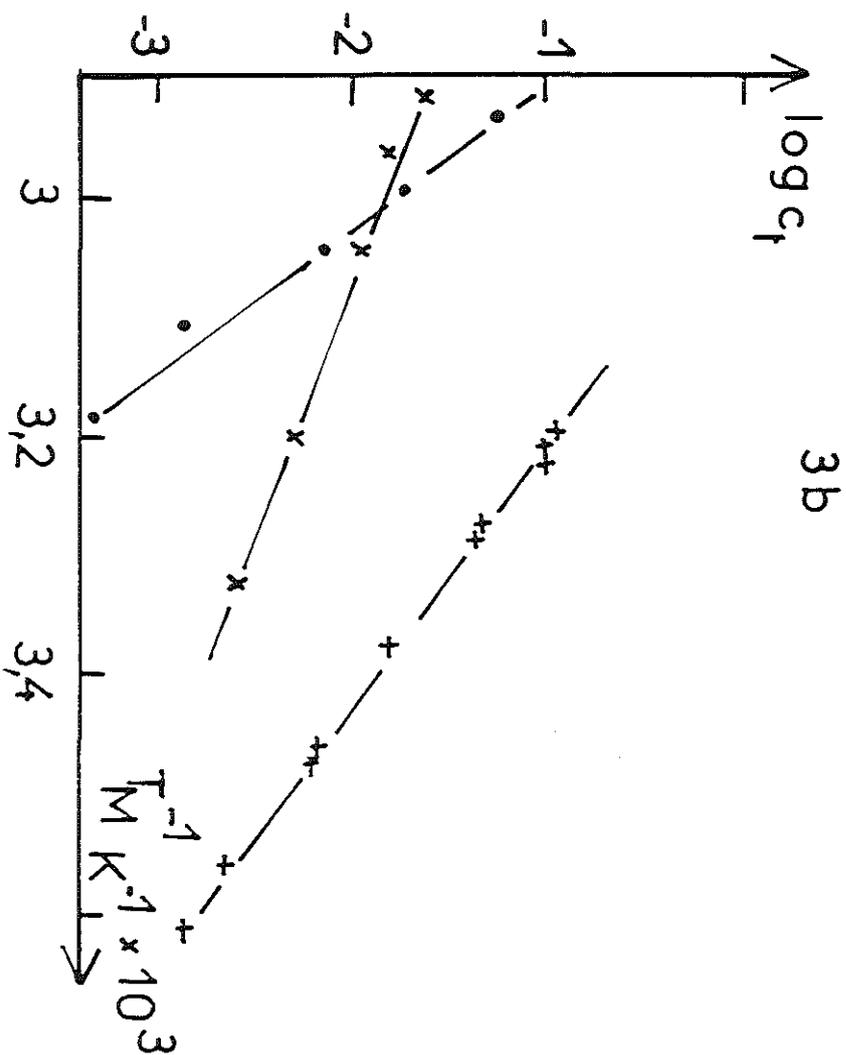


Figure 3a : Comparaison de la variation du degré d'ordre pour a : le succinoglycane, b : le xanthane à 1 g/l, en présence respectivement de NaCl 0,1 et 0,01M.



3b : Variation de la température de transition avec la force ionique pour : (x) le xanthane ; (+) le gellane ; (.) le succinoglycane.

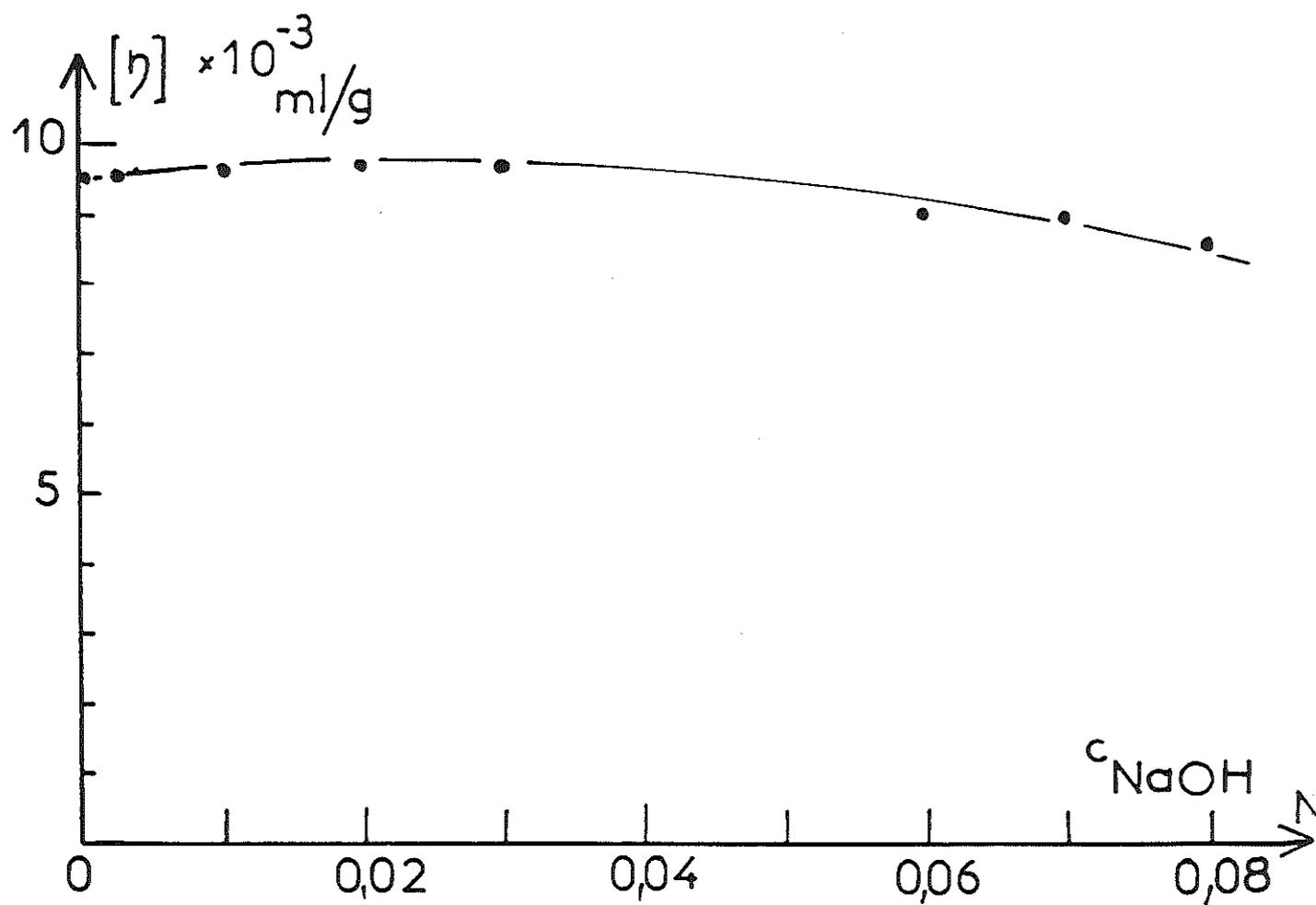


Figure 4 : Variation de la viscosité intrinsèque du scléroglycane en fonction de la concentration en NaOH ($t = 25^\circ\text{C}$).

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : Variation de la viscosité réduite d'une solution de Xanthane et de carboxymethylcellulose de même longueur de chaîne en fonction de la concentration en NaCl et CaCl₂ (concentration en polymère : 0,4 g/l).

Figure 2 : Variation du pouvoir optique rotatoire spécifique en fonction de la température pour le Na Xanthane (C_p = 0,66 g/l dans a : H₂O ; b, 5,6 mM NaCl ; c, 10,8 mM NaCl ; d, 15,8 mM NaCl ; e, 28 mM NaCl ; f, 0,1 M NaCl).

Figure 3a : Comparaison de la variation du degré d'ordre pour a : le succinoglycane, b : le xanthane à 1 g/l, en présence respectivement de NaCl 0,1 et 0,01M.

Figure 3b : Variation de la température de transition avec la force ionique pour : (x) le xanthane ; (+) le gellane ; (.) le succinoglycane.

Figure 4 : Variation de la viscosité intrinsèque du scléroglycane en fonction de la concentration en NaOH (t = 25°C).

T H E M E I V

CHIMIE ET BIOCHIMIE DES

SUBSTANCES NATURELLES

CHIMIE ET BIOCHIMIE

DES SUBSTANCES NATURELLES MARINES

Lionel CHEVOLOT, CNRS.

Laboratoire de Biologie Marine. Université de Nantes
2 rue de la Houssinière 44072 NANTES.

Les organismes marins (plantes ou invertébrés) sont capables de synthétiser des molécules complexes et originales que l'on ne trouve pas dans les organismes terrestres. Ce point est désormais bien établi et résulte probablement de la grande diversité des espèces vivant dans le biotope marin.

Malgré cette extraordinaire richesse, il faut bien reconnaître que relativement peu de "molécules marines" sont effectivement utilisées par les industries pharmaceutiques, agro-alimentaires ou autres. Il en existe cependant quelques unes d'intérêt indéniable. Néanmoins, le problème n'est plus de trouver des molécules originales, mais de découvrir des molécules utiles. Un certain nombre de programmes notamment en Australie, aux USA, au Japon, mais aussi en France ont eu ou ont cette ambition. Le premier exposé présente un tel programme. Pour isoler des substances potentiellement utilisables, très souvent la méthode du criblage (ou screening) a été retenue. Cette démarche nécessite du "temps" pour parvenir à un résultat, contrainte qui n'est pas toujours admise par les organismes publics ou privés finançant ces programmes. D'autre part cette méthode parfois comparée à la "pêche à la ligne" est souvent critiquée car laissant trop de place au "hasard" et ne procédant pas assez d'une "démarche scientifique déductive". Ces critiques sont en grande partie injustes et injustifiées. Car d'une part découverte réellement novatrice implique une grande part de chance, toute l'histoire des sciences témoigne de ce constat; d'autre part ces travaux ont permis d'accumuler des données qui pourront être, pour l'avenir, à la base de recherches moins empiriques. Ces dernières devront aussi être orientées par les observations faites par les biologistes et écologistes marins (comme dans le domaine des relations interspèces, par exemple). De plus l'efficacité de cette démarche sera encore augmentée dans l'avenir en utilisant des tests biologiques plus spécifiques permettant de déterminer très tôt le mode d'action et donc l'intérêt de molécules présentes dans un extrait. Le deuxième exposé est une illustration de cette démarche dans le domaine des anticancéreux.

Si à la période de recherche exploratoire qui était nécessaire et qui a permis de dégager des orientations à prendre succède une véritable recherche pluridisciplinaire qui ne se limite pas à une simple juxtaposition, mais à une réelle symbiose des différentes disciplines concernées, il fait peu de doute qu'un bien plus grand nombre de molécules marines seront utilisées dans l'avenir.

L E P R O G R A M M E S M I B
(Substances Marines d'Intérêt Biologique)

INTRODUCTION

Le programme SMIB, Substances Marines d'Intérêt Biologique, est une opération commune CNRS/ORSTOM. Elle se déroule au Centre ORSTOM de Nouméa, et en Europe en collaboration avec divers partenaires: universitaires, instituts de recherche et industriels.

Son objectif est la mise en évidence de nouvelles molécules à potentiel thérapeutique ou phyto-sanitaire à partir d'organismes marins, en particulier les invertébrés.

Démarré en 1985, il fait suite au programme SNOM (Substances Naturelles d'Origine Marine) initié en 1977, programme également conjoint ORSTOM/CNRS, qui a été réalisé avec difficulté compte tenu du fait que le criblage biologique des échantillons se déroulait aux antipodes du lieu où s'effectuaient les récoltes. Fort de cette expérience le SMIB a mis en place au laboratoire ORSTOM de Nouméa une batterie de tests simples, donc faciles à mettre en oeuvre.

Le champ d'investigations du programme se situe dans le vaste lagon de Nouvelle Calédonie (figure 1) qui recèle des communautés d'invertébrés comparables à celles de la Grande Barrière de Corail, tant par la diversité des espèces (environ 5000) que par leur abondance.

METHODOLOGIE

Les premières questions à se poser dans ce type de recherche sont: quelle espèce récolter et comment l'identifier?

Pour le choix de l'espèce, deux approches sont possibles. L'une est chimio-écologique. Les invertébrés rencontrés peuvent être ou non mobiles. Ceux qui ne le sont pas arrivent à subsister de par leur propre système chimique de défense. C'est ainsi que certaines espèces survivent aux expositions prolongées aux rayonnements solaires à marée basse, d'autres se répandent jusqu'à devenir l'espèce dominante dans certains biotopes récifaux, d'autres encore sont superbement ignorées par les prédateurs. Ces constatations guident les chimistes pour sélectionner leur étude. L'autre approche est pharmacochimique. Elle consiste à retenir les espèces dont l'extrait se sera montré actif au regard de tests biologiques appropriés. C'est cette dernière méthode qui est privilégiée dans le cadre du programme SMIB.

Le problème de l'identification de l'espèce récoltée n'est que partiellement résolu. En effet on estime à 500 000 le nombre total d'espèces marines - dont 80% restent encore inconnues -, d'où un travail parfois très long pour donner à un animal son nom, sa place dans la classification. Il n'est pas rare que l'identification d'une espèce vienne bien après celle des principes actifs qui en sont extraits. De plus - et malheureusement - on a assisté ces dernières années à un désintérêt des jeunes chercheurs vis-à-vis de la taxinomie. La sonnette d'alarme ayant été tirée, on espère que la situation ira en s'améliorant. Cette branche de la Science est pourtant primordiale pour les biochimistes car on peut déjà déceler, parmi les quelques centaines d'organismes étudiés, des relations chimio-taxinomiques liant certains groupes bien connus.

Récoltes

Les premiers dragages en eaux profondes effectués par les biologistes du laboratoire d'Océanographie de Nouméa ont permis une première étude d'échantil-

lons divers et abondants récoltés entre 200 et 2 000 mètres, le plus souvent aux environs de 400 mètres. Etant donné l'intérêt de ces échantillons, le SMIB réalise maintenant ses propres campagnes de dragages profonds sur le navire océanographique de l'ORSTOM, le N.O. "ALIS". L'étude de ces organismes constitue en partie l'originalité du programme SMIB, la plupart des autres équipes étrangères travaillant entre 0 et 30 mètres de profondeur.

Hormis le dragage, qui est une véritable "pêche à la ligne", les récoltes peuvent s'effectuer à pied sur les platiers découvrant à marée basse, mais c'est le plus souvent à partir d'une vedette, le "DAWA", par plongée sous-marine autonome qu'une équipe de trois plongeurs-biologistes de l'ORSTOM effectue les récoltes dans la zone des 40 mètres. Celles-ci interviennent après des prospections sérieuses, qui ont d'ailleurs donné lieu, avec l'aide des biologistes du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris (MNHN), à des inventaires faunistiques publiés (échinodermes), en cours d'édition (ascidies), ou de rédaction (éponges, gorgones). Ces inventaires se poursuivent et s'étendent à la faune profonde de la région (zone économique de la Nouvelle Calédonie).

L'organisme récolté est tout d'abord photographié in situ puis congelé à bord après triage, lavage et pesée. Un échantillonnage zoologique est également effectué pour la conservation et l'identification, soit sans aucun autre traitement que le séchage (gorgones) soit par immersion dans le milieu approprié (formol ou alcool). Les photographies constituent la photothèque, outil de base pour l'identification zoologique et la reconnaissance des organismes lors des récoltes ultérieures.

Traitement au laboratoire

1) Extraction chimique

Les échantillons congelés sont broyés, parfois concassés, puis lyophilisés. La poudre est alors divisée en deux lots qui sont soumis à deux types d'extraction. Les extraits obtenus (après centrifugation et lyophilisation pour l'extrait aqueux; filtration et évaporation sous vide pour les extraits alcool-eau et alcool-chlorure de méthylène) sont sélectionnés en fonction de leur activité biologique.

2) Tests biologiques

Les activités sont recherchées au moyen de plusieurs types d'essais microbiologiques in vitro (figure 2):

- sur bactéries pathogènes pour l'homme: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.
- sur champignons phyto-pathogènes: *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora parasitica*, *Penicillium italicum*.
- antiviraux (virus de l'Herpès cultivé sur cellules Vero)
- cytotoxicité (cellules Kb)
- oeufs embryonnés d'oursins (*Echinometra mathei*)
- larves de crustacé "brine shrimp" (*Artemia salina*)
- phytotoxicité sur blé et amarante
- larves de tiques du bétail (*Boophilus microplus*)
- l'activité antispasmodique recherchée sur iléon isolé de cobaye a été abandonnée car le test n'est pas adapté à l'analyse des extraits bruts.

Ce criblage est complété en France dans les laboratoires de Rhône-Poulenc-Santé (cellules P388 in vitro et in vivo, HIV in vitro) et de Rhône-Poulenc-Agrochimie (diverses souches de champignons et de bactéries in vitro et in vivo).

Avant de quitter le chapitre des tests biologiques, on peut signaler le pourquoi de l'essai insecticide sur tiques à Nouméa. Les tiques représentent en effet un problème important pour les éleveurs néo-calédoniens: elles prolifèrent rapidement et deviennent progressivement résistantes aux traitements utilisés dans les exploitations agricoles. C'est ce qui a motivé la recherche de nouvelles substances acaricides, en collaboration avec le laboratoire d'Entomologie du Centre ORSTOM. Les tiques sont prélevées sur le bétail,

les oeufs des femelles matures recueillis et mis à éclore en étuve dans un tube. Les larves adultes gagnent alors le haut des tubes par tropisme et y sont collectées. Les larves utilisées sont donc de première génération. C'est ce stade qu'il faut cibler car il est le plus favorable pour le traitement du bétail.

Dans tous les cas, lorsqu'un extrait s'est révélé avoir une activité significative, une deuxième récolte est effectuée afin de confirmer les premiers résultats.

Enfin le seuil d'activité est déterminé, puis la DL 50 est calculée, et l'on réalise une étude des réponses en fonction de la quantité d'extrait brut analysée. Ceci permet de classer les différents extraits selon leur intérêt relatif, et par rapport aux témoins de référence. On sélectionne alors les plus intéressants pour les étapes ultérieures.

3) Isolement et détermination des principes actifs

La (les) substance (s) responsable (s) de cette (ces) activité (s) est (sont) par la suite isolée (s), le plus souvent par chromatographie: CCM, colonne, HPLC. Une ébauche d'étude structurale peut alors avoir lieu au laboratoire de Nouméa qui possède les spectrographes (IR, UV, RMN) acquis lors de l'opération SNOM, mais les produits plus ou moins purifiés sont généralement confiés aux collaborateurs du programme SMIB en Europe.

L'ensemble du chapitre "méthodologie" est schématisé sur la figure 2.

RESULTATS

Les tableaux de la figure 3 récapitulent en valeurs absolue et relative le nombre de réponses positives à chaque test données par les 239 organismes criblés regroupés en catégories (éponges, ascidies, échinodermes, gorgones, divers), ainsi que le nombre d'études approfondies qui en ont résulté. On constate que selon les groupes, 50 à 83% des organismes répondent positivement à l'un au moins des tests. On peut également noter l'importante proportion de gorgones et d'éponges retenues pour une étude approfondie. Les organismes présentant des propriétés antibiotiques ou cytotoxiques sont assez fréquents. Plusieurs organismes se sont révélés être cytotoxiques sur cellules Kb. Cette toxicité se traduit en général par une action cytotoxique ou tératogène sur les oeufs embryonnés d'oursin. Ce dernier essai est réalisé, lorsque la saison le permet, sur les extraits qui se sont montrés actifs sur les cellules Kb. L'équipe de Rhône-Poulenc intervient ensuite pour confirmer cette toxicité sur différentes souches de cellules P388 in vitro puis in vivo.

Globalement ce n'est qu'une cinquantaine d'organismes qui a été retenue pour une étude chimique. En effet la confirmation d'activité lors des récoltes suivantes n'est pas toujours effective.

Une nouvelle espèce d'ascidie, *Eudistoma fragum*, a été récoltée à huit reprises, chaque récolte révélant l'existence de substances antibactériennes. La purification des extraits a fourni l'alcaloïde bromo-4 N,N-diméthyl tryptamine (figure 4), alcaloïde antibactérien déjà rencontré chez des éponges. Cette molécule est une constante du contenu des extraits de cette ascidie. Par ailleurs, un nouvel alcaloïde*, minoritaire et en quantité variable selon les extraits, a été isolé de la même ascidie. Il s'agit d'une tétrahydro- β carboline substituée en 1 par un groupement N-méthyltétrahydropyrrollique. Ce dernier alcaloïde est à rapprocher de ceux qui ont été isolés d'une espèce du même genre, *Eudistoma olivaceum*, pour laquelle une activité cytotoxique et antivirale est décrite (figure 5).

* La woodinine

Une autre ascidie, *Polycarpa aurata*, a été sélectionnée pour son activité antibactérienne. Deux principes actifs en ont été isolés, l'un étant du soufre S₈, l'autre étant en cours de détermination structurale. Ceci permet de rappeler l'existence de quelques composés soufrés d'origine marine (figure 6) souvent antibiotiques. L'exemple est bien connu de la néréistoxine, molécule disoufrée isolée au Japon d'un ver marin, *Lumbriconereis heteropoda*, dont un dérivé a été commercialisé sous le nom de Padan (figure 6).

Une éponge du lagon, *Amphimedon viridis*, a été sélectionnée sur l'essai antibiotique et anti-*Candida* pour sa forte activité. Malheureusement, simultanément étaient brevetés pour leur originalité les métabolites actifs de cette même éponge récoltée en mer Rouge. Cela aura au moins permis de valider notre test. Il est toutefois à noter que cette éponge avait été récoltée dans le cadre du programme précédent et qu'il n'y avait pas eu de suite. Ce qui montre une fois de plus l'importance de la réalisation du criblage d'activités biologiques sur place ou avec des partenaires très motivés.

Le premier exemple de porphyrine libre, chlorophylle C mise à part, a été issu d'une éponge fossile du groupe des lithistidés. Cette porphyrine appelée Corallistine A (figure 7), est à la fois cytotoxique et antibiotique. C'est la première fois qu'une telle activité est signalée pour ce genre de molécule.

Dans le cadre du programme SNOM l'éponge *Pseudaxinyssa cantharella* (Demospongiae, Axinellidae), récoltée dans le lagon néo-calédonien, a montré dans des expériences préliminaires une activité cytotoxique in vitro et in vivo. Le fractionnement chimique de l'extrait actif, suivi par contrôle de l'activité biologique, a permis l'isolement du dérivé imidazolique girolline (figure 8), ainsi que d'autres produits inactifs. Par son mécanisme d'action original, la girolline possède une activité antitumorale intéressante sur des lignées cellulaires variées. L'étude de ce composé sur lequel nous avons fondé de grands espoirs, a finalement été abandonnée à la suite d'essais cliniques non satisfaisants.

Les deux exemples suivants ont été étudiés pour leur intérêt possible dans le domaine de l'agrochimie.

L'éponge profonde, *Podospongia loveni*, récoltée au cours de différentes campagnes de dragages, s'est révélée être particulièrement active sur les souches de champignons phytopathogènes, avec un seuil d'activité exceptionnel d'environ 0,5 µg d'extrait brut/disque, et une toxicité également très forte sur les larves de tiques. Cette étude a été réalisée en collaboration avec Rhône-Poulenc-Agrochimie. Le principe antifongique a été identifié à la Latrunculine A (figure 9), molécule déjà isolée d'une éponge d'un genre proche, mais pour laquelle aucune propriété antifongique n'avait été décrite. Le produit acaricide est lui, différent. Son élucidation structurale est en cours.

Une autre éponge a été étudiée pour son activité acaricide: *Stylorella* sp. Un nouvel exemple de terpène portant un groupement isonitrile, la stylorelline, en a été isolé (figure 10). Les isonitriles naturels restent rares et sont décrits pour leurs différentes activités biologiques. L'un d'eux a été isolé d'abord comme étant un métabolite toxique du mucus de défense du nudibranche *Phyllidia varicosa*, jusqu'à ce que celui-ci ait été trouvé en grande quantité dans l'éponge du genre *Hymeniacidon* sur laquelle il se nourrit. Le genre *Stylorella* est d'ailleurs zoologiquement proche du genre *Hymeniacidon*.

Un dernier exemple parmi les plus intéressants. Des ascidies du genre *Lissoclinum* de la famille des didemnidés montrent un nouvel aspect de l'étude des organismes marins. Ces ascidies présentent une très forte toxicité générale sur les organismes eucaryotes. Le principe actif de *Lissoclinum bistratum* a été isolé ainsi que quelques composés voisins. Malheureusement il semble que seule l'analyse aux rayons X permettra de conclure sur la structure des bistramides (figure 11). Cependant l'étude des propriétés du Bistramide A se poursuit. Il a été mis en évidence qu'à des doses de cytotoxicité moindre, cette molécule provoque la différenciation de cellules tumorales humaines (cancer du poumon, leucémie). Ces propriétés intéressantes, ainsi que les difficultés liées à l'approvisionnement en organisme (68 heures de plongée pour 4 kilos frais), ont conduit à rechercher la véritable origine de ces métabolites. En effet ces ascidies vivent en symbiose avec des algues unicellulaires d'un groupe nouveau, les prochlorophytes. Celles-ci se sont révélées contenir 5 fois plus de toxine que l'animal. Il semble que la toxine soit en fait produite par l'algue qui l'accumulerait avec peu ou pas de transfert vers l'ascidie elle-même. Ceci ne pourra toutefois être prouvé que par la production de ces algues par culture in vitro.

On peut signaler pour terminer que certains organismes sont étudiés dans le cadre du programme SMIB en raison de leur intérêt zoologique exceptionnel. C'est en particulier le cas pour le crinoïde "fossile vivant" récemment découvert: *Gymnocrinus richeri*.

L'ensemble des travaux chimiques relatifs aux organismes marins auxquels l'ORSTOM a participé depuis 1977 (figure 12) comprend 1 brevet, 38 publications internationales, 14 communications à des colloques, 1 thèse et 1 DEA.

CONCLUSION

Il est d'abord nécessaire de souligner l'importance du travail de terrain, tant au niveau des récoltes et des observations qu'à celui du criblage d'activité biologique, lequel permet d'orienter efficacement la recherche de nouvelles molécules actives. Le programme SMIB est avant tout un programme pluridisciplinaire regroupant des industriels (Rhône-Poulenc par exemple), des chercheurs de la plupart des instituts de recherche nationaux (CNRS, INSERM, MNHN, ORSTOM), des universitaires français et étrangers. Ces collaborations permettent de tendre vers le développement pharmaceutique des substances ayant révélé une activité biologique concurrentielle de celle des témoins de référence. Etant données leur origine et la limitation de leur source naturelle, ces molécules ne deviendront probablement pas un médicament elles-mêmes. Pourtant elles offrent aux chimistes et aux biochimistes l'intérêt d'être des molécules originales qui, non seulement représentent des modèles intéressants pour l'imagination du chercheur, mais qui peuvent aussi conduire, par la synthèse d'analogues, à l'élaboration de nouveaux médicaments.

Jean-Marie CHANTRAINE

Cécile DEBITUS

BIBLIOGRAPHIE SNOM - SMIB

(1978-1990)

PUBLICATIONS:

1978 - CLASTRES A., AHOND A., POUPAT C., POTIER P., INTES A.,

Invertébrés marins du lagon néo-calédonien I. Etude structurale d'une nouvelle sapogénine extraite d'une holothurie *Bohadschia vitiensis* Semper, *Experientia*, **34**, 973-974

1982 - BHATNAGAR S., AHOND A., DUDOUE T., POUPAT C., POTIER P., CLASTRES A., LAURENT D.,
Saponins and sapogenins from a New Caledonian holothurian: *Actinopyga flammea*,
IVème symposium sur les produits naturels marins, IUPAC, TENERIFE

1982 - RICCIO R., DINI A., MINALE L., PIZZA C., ZOLLO F., SEVENET T.,
Starfish saponins 7. Structure of luzonicoside, a further steroidal cyclic glycoside from the Pacific
starfish *Echinaster luzonicus*,
Experientia, **38**, 68-69

1982 - RICCIO R., MINALE L., PIZZA C., ZOLLO F., PUSSET J.,
Starfish saponins 8. Structure of nodoside, a novel type of steroidal glycoside from the starfish
Protoreaster nodosus,
Tetrahedron Letters **23**(28), 2899-2902

1982 - RICCIO R., MINALE L., PAGONI S.S., PIZZA C., ZOLLO F., PUSSET J.,
A novel group of highly hydroxylated steroids from the starfish *Protoreaster nodosus*,
Tetrahedron, **38**(24), 3615-3622

1984 - CLASTRES A., AHOND A., POUPAT C., POTIER P., KAN S.K.,
Invertébrés marins du lagon néo-calédonien II. Etude structurale de trois nouveaux diterpènes isolés du
pennatulinaire *Pteroiodes laboutei*,
J. Nat. Prod., **47** (1), 155-161

1984 - CLASTRES A., LABOUE P., AHOND A., POUPAT C., POTIER P.,
Invertébrés du lagon néo-calédonien III. Etude structurale de trois nouveaux diterpènes isolés du
pennatulinaire *Cavernularia grandiflora*,
J. Nat. Prod., **47** (1), 162-166

1984 - D'AURIA M.V., FINAMORE E., MINALE L., PIZZA C., RICCIO R., ZOLLO F., PUSSET J., TIRARD P.,
Steroids from the starfish *Euretaster insignis*, a novel group of sulphated 3,21 dihydroxysteroids,
J. Chem. Soc. Perkin Trans., **1**, 2277-2282

1984 - FINAMORE E., IORIZZI M., MINALE L., PIZZA C., RICCIO R., SQUILLACE GRECO O., ZOLLO F.,
PUSSET J., DEBRAY M.-M., LAURENT D.,
Steroidal glycosides from New Caledonian starfishes,
Colloque international "chimie des substances naturelles, état et perspectives", GIF SUR YVETTE

1984 - MINALE L., PIZZA C., RICCIO R., SURRENTINO C., ZOLLO F., PUSSET J., BARGIBANT G.,
Minor polyhydroxylated sterols from the starfish: *Protoreaster nodosus*,
J. Nat. Prod., **47** (5), 790-795

1984 - MINALE L., PIZZA C., RICCIO R., ZOLLO F., PUSSET J., LABOUE P.,
Starfish saponins 13. Occurrence of nodoside in the starfish *Acanthaster planci* and *Linckia laevigata*,
J. Nat. Prod., **47** (3), 558

1984 - MINALE L., PIZZA C., RICCIO R., SQUILLACE GRECO O., ZOLLO F., PUSSET J.,
MENO J.-L.,
New polyhydroxylated sterols from the starfish *Luidia maculata*,
J. Nat. Prod., **47** (5), 784-789

- 1984 - VIDAL J.P., LAURENT D., KABORE S.A., RECHENCQ E., BOUCARD M., GIRARD J.P., ESCALE R., ROSSI J.C.
Caulerpin, caulerpicin, *Caulerpa scapelliformis*: comparative acute toxicity study,
Bot. Mar., 27, 533-536
- 1985 - BHATNAGAR S., DUDOUET B., AHOND A., POUPAT C., THOISON O., CLASTRES A., LAURENT D., POTIER P.,
Invertébrés du lagon néo-calédonien IX. Saponines et sapogénines d'une holothurie, *Actinopyga flammea*,
Bull. Soc. Chim. France, 1, 124-129
- 1985 - DE NANTEUIL G., AHOND A., GUILHEM J., POUPAT C., TRAN HUU DAU E., POTIER P., PUSSET M., PUSSET J., LABOUTE P.,
Invertébrés du lagon Néo-calédonien V. Isolement et identification des métabolites d'une nouvelle espèce de spongiaire *Pseudaxinyssa cantharella*,
Tetrahedron, 41(24), 6019-6033
- 1985 - DE NANTEUIL G., AHOND A., POUPAT C., POTIER P., PUSSET M., PUSSET J., LABOUTE P.,
Invertébrés du lagon Néo-calédonien VI. Isolement et identification des onze stérols de type hydroxyméthyl -3b nor a cholastane du spongiaire *Pseudaxinyssa cantharella*,
Tetrahedron, 41(24), 6035-6039
- 1985 - MINALE L., RICCIO R., SQUILLACE GRECO O., PUSSET J., MENO J.-L.,
Starfish saponins 16. Composition of the steroidal glycoside sulfates from the starfish *Luidia maculata*,
Comp. Biochem. Physiol., 80B(1), 113-118
- 1985 - PIZZA C., MINALE L., LAURENT D., MENO J.-L.,
Starfish saponins 27. Steroidal glycosides from the starfish *Choriaster granulatus*,
Gazz. Chim. Ital., 115, 585-589
- 1985 - PIZZA C., PEZZULO P., MINALE L., BRIETMAIER E., PUSSET J., TIRARD P.,
Starfish saponins 20. Two novel steroidal glycosides from the starfish *Acanthaster planci* L.,
J. Chem. Research, (5), 76-77
- 1985 - RICCIO R., SQUILLACE-GRECO O., MINALE L., PUSSET J., MENO J.-L.,
Starfish saponins 18. Steroidal glycoside sulphates from the starfish *Linckia laevigata*,
J. Nat. Prod., 48 (1), 97-101
- 1985 - RICCIO R., ZOLLO F., FINAMORE E., MINALE L., LAURENT D., BARGIBANT G., PUSSET J.,
Starfish saponins 19. A novel steroidal glycoside sulphate from the starfishes, *Protoreaster nodosus* and *Pentaceraster alveolatus*,
J. Nat. Prod., 48(2), 266-272
- 1985 - RICCIO R., D'AURIA M., IORIZZI M., MINALE L., LAURENT D., DUHET D.,
Starfish saponins 25. Steroidal glycosides from the starfish *Gomophia watsoni*,
Gazz. Chim. Ital., 115, 405-409
- 1985 - RICCIO R., IORIZZI M., SQUILLACE GRECO O., MINALE L., LAURENT D., BARBIN Y.,
Starfish saponins 26. Steroidal glycosides from the starfish *Poraster superbus*,
Gazz. Chim. Ital., 115, 505-509
- 1986 - RICCIO R., SQUILLACE-GRECO O., MINALE L., LAURENT D., DUHET D.,
Highly hydroxylated marine steroids from the starfish: *Archaster typicus*,
J. Chem. Perkin Trans 1, 665-667
- 1986 - RICCIO R., SQUILLACE-GRECO O., MINALE L., DUHET D., LAURENT D., PUSSET J., CHAUVIERE G.,
Starfish saponins 28. Steroidal glycosides from Pacific starfishes of the genus *Nardoa*,
J. Nat. Prod., 49(6), 1141-1142

- 1986 - RICCIO R., IORIZZI M., SQUILLACE-GRECO O., MINALE L., DEBRAY M.-M., MENOU J.-L., Starfish saponins 22. Asterosaponins from the starfish *Halityle regularis* (Fisher). A novel 22, 23 epoxysteroidal glycoside sulfate, *J. Nat. Prod.*, 49(1), 67-78
- 1986 - ZOLLO F., FINAMORE E., MINALE L., LAURENT D., BARGIBANT G., Starfish saponins 29. A novel steroidal glycoside from the starfish *Pentaceraster alveolatus*, *J. Nat. Prod.*, 49(5), 919-921
- 1987 - PAIS M., FONTAINE C., LAURENT D., LA BARRE S., GUITTET E., Stylotelline, a sesquiterpene isocyanide from the sponge *Stylotella sp.*, *Tetrahedron Letters*, 28(13), 1409-1412
- 1988 - AHOND A., BEDOYA ZURITA M., COLIN M., FIZAMES C., LABOUE P., LAVELLE F., LAURENT D., POUPAT C., PUSSET J., PUSSET M., THOISON O., POTIER P., La girolline, nouvelle substance antitumorale extraite de l'éponge, *Pseudaxinyssa cantharella* n. sp. (Axinellidae), *C. R. Acad. Sci. Paris*, 307, série II, 145-148
- 1988 - ALMOURABIT A., AHOND A., CHIARONI A., POUPAT C., RICHE C., POTIER P., LABOUE P., J.-L. MENOU, Invertébrés marins du lagon néo-calédonien, IX. Havannahchlorhydrines, nouveaux métabolites de *Xenia membranacea*: étude structurale et configuration absolue, *J. Nat. Prod.*, 51(2), 275-281
- 1988 - DEBITUS C., PAIS M., LAURENT D., Alcaloïdes d'une ascidie néo-calédonienne, *Eudistoma fragum*. *J. Nat. Prod.*, 51(4), 799-801
- 1988 - GOUIFFES D., MOREAU S., HELBECQUE N., BERNIER J.-L., HENICHART J.-P., BARBIN Y., LAURENT D., VERBIST J.-F., Proton nuclear magnetic study of bistramide A, a new cytotoxic drug isolated from *Lissoclinum bistratum* Sluiter, *Tetrahedron*, 44(2), 451-459
- 1988 - GOUIFFES D., JUGE M., GRIMAUD N., WELIN L., SAUVIAT M.-P., BARBIN Y., LAURENT D., ROUSSAKIS C., HENICHART J.-P., VERBIST J.-F., Bistramide A, a new toxin from the urochordata *Lissoclinum bistratum* Sluiter, *Toxicon*, 26, 1129-1136
- 1988 - RICCIO R., SQUILLACE-GRECO O., MINALE L., LA BARRE S., LAURENT D., Starfish saponins, part 36. Steroidal oligoglycosides from the Pacific starfish *Thromidia catalai*, *J. Nat. Prod.*, 51 (5), 1003-1005
- 1989 - DEBITUS C., CESARIO M., GUILHEM J., PASCARD C., PAIS M., Corallistine, a new polynitrogen compound from the sponge *Corallistes fulvodermis* L. et L., *Tetrahedron Letters*, 30(12), 1535-1538
- 1989 - G.M. KONIG, J.C. COLL, B.F. BOWDEN, J.M. GULBIS, M.F. MAC KAY, S.C. LA BARRE, D. LAURENT, The structure determination of a xenicane diterpene from *Xenia garciae*, *J. Nat. Prod.*, 52(2), 294-299
- 1989 - D'AMBROSIO M., GUERRIERO A., DEBITUS C., RIBES O., RICHER DE FORGES B. et PIETRA F., 161. Corallistin A, a second example of a free porphyrin from a living organism. Isolation from the demosponge *Corallistes sp.* of the Coral Sea and inhibition of abnormal cells. *Helvetica Chimica Acta*, 72, 1451-1454
- 1989 - GUELLA G., MANCINI I., DUHET D., RICHER de FORGES B. et PIETRA F., Ethyl 6-bromo-3-indolecarboxylate and 3-hydroxyacetal-6-bromoindole, novel bromoindoles from the sponge *Pteroma menoui* of the Coral Sea,

Zeitschrift für Naturforschung, 914-916

1990 - C. DEBITUS, C. FONTAINE, M. PAIS et T. SEVENET,
Polynitrogen compounds from the sponge *Agelas novae-caledoniae*,
J. Nat. Prod., à paraître

1990 - OGER J.-M., RICHOMME P., SEVENET T., DEBITUS C., BRUNETON J. et GUINAUDEAU H.,
Steroids from *Neosiphonia superstes* Sollas, a marine fossil sponge (Theonellidae),
Heterocycles, à paraître

BREVET:

1987 - AHOND A., LABOUTE P., LAURENT D., POTIER P., POUPAT C., PUSSET J., PUSSET M., THOISON O.,
Girolline, a new biologically active substance extracted from the sponge *Pseudaxinyssa cantharella*, its
preparation, and antitumor compositions containing it,
Chem. Abstracts 107, 168795q, Patent

THESE:

1988 - GOUIFFES-BARBIN D.,
Contribution à l'identification et à l'étude pharmacologique de cytotoxines d'origine marine.
Thèse de Doctorat, "Sciences de la Vie et de la Santé", Université de NANTES, 7 /11/88

DEA:

1989 - DELAUNEUX J.-M.
Contribution à l'étude chimique de *Podospongia loveni* (porifère),
Diplôme universitaire de chimie thérapeutique option substances naturelles, Université de PARIS XI,
07/89

COMMUNICATIONS A CONGRES:

1985 - BEDOYA ZURITA M., AHOND A., POUPAT C., POTIER P., LABOUTE P.,
Invertébrés marins du lagon néo-calédonien: nouveau saponoside extrait d'une holothurie
Neothyonidium magnum, Vème symposium sur les produits naturels marins, IUPAC, PARIS

1985 - GOUIFFES D., BARBIN Y., DUHET D., DEBITUS C., CHANTRAINE J.-M., BRUN L., LAURENT D.,
Recherche d'activités biologiques d'extrait d'organismes marins du lagon néo-calédonien,
Vème symposium sur les produits naturels marins, IUPAC, PARIS

1985 - LAURENT D., CHANTRAINE J.-M., DUHET D., BARBIN Y., VIDAL J.-P., GIRARD J.-P., ESCALE R.
ROSSI J.-C.,
The isolation of new norlanostene triterpénoïds from the marine alga *Tydemania expeditionis*
(Chlorophyta),
Vème symposium sur les produits naturels marins, IUPAC, PARIS

1985 - LAURENT D., GARRIGUE C., BARGIBANT G., MENO J.-L., TIRARD P.,
Répartition bathymétrique des caulerpes (Chlorophycées) et corrélation avec la présence de caulerpine.
Vème symposium sur les récifs coralliens, PAPEETE.

1985 - LAURENT D., MORETTI C.,
La recherche sur les substances d'intérêt biologique à l'ORSTOM.
Xèmes journées européennes de cosmétologie: la mer et les plantes en thérapeutique et en cosmétologie.
NANTES.

1985 - LELONG H., AHOND A., CHIARONI A., POUPAT C., RICHE C., POTIER P., PUSSET J., PUSSET M.,
LABOUTE P., MENO J.-L.,
Invertébrés du lagon néo-calédonien: métabolites terpéniques de *Xenia membranacea* (alcyonaire),
Vème symposium sur les produits naturels marins, IUPAC, PARIS

1985 - RICCIO R., SQUILLACE GRECO O., MINALE L., LAURENT D., DUHET D.,
Polyhydroxysteroids from the starfish *Archaster typicus*,
Vème symposium sur les produits naturels marins, IUPAC , PARIS

1988 - LA BARRE S., LAURENT D., SAMMARCO P., WILLIAMS W.T., COLL J.,
Comparative ichthyotoxicity of shallow and deep water sponges of New Caledonia,
VIème symposium sur les récifs coralliens, TOWNSVILLE, 8-12/8/88

1989 - DEBITUS C., LA BARRE S., LAURENT D., MINALE L., PAIS M., PIETRA F.,
RICHER DE FORGES B., BRUN L., CARRE J.-B., DUHET D., HOLUE A., MARCILLAUD C., PATISSOU J.,
RIBES O.,
-Etude biologique et chimique de la faune profonde de Nouvelle Calédonie,
VIème symposium IUPAC de chimie des substances naturelles d'origine marine, DAKAR, 2-7/7/89

1989 - LAVELLE F., FIZAMES C., AHOND A., POUPAT C., CURAUDEAU A.,
Experimental properties of RP 49532A, a new antitumor marine compound,
VIth NCI-EORTC symposium on new drugs in cancer therapy, AMSTERDAM, 7-10/3/89

1989 - VERBIST J.-F., GOUIFFES-BARBIN D., ROUSSAKIS C., WELIN L., HENICHART J.-P., MOREAU S.,
LAURENT D., DEBITUS C., SAUVIAT M.-P., DIACONO J., MONNIOT F.,
Le bistramide A, toxine de *Lissoclinum bistratum* Sluiter (Urochordes): état actuel des études,
VIème symposium IUPAC de chimie des substances naturelles d'origine marine, DAKAR, 2-7/7/89

1989 - BIARD J.-F., BOUMARD M.-C., GRIVOIS C., VERBIST J.-F., DEBITUS C., CARRE J.-B.,
Teneur en Bistramide A dans l'ascidie *Lissoclinum bistratum* Sluiter et ses prochlorons symbiontes,
22ème rencontres internationales de Biochimie Marine, Nantes, 8-10 novembre 1989

DOCUMENTS INTERNES:

1986 - BRUN L., DEBITUS C., MARCILLAUD C., DUHET D., LAURENT D.,
Etude de l'activité acaricide des extraits d'organismes marins de Nouvelle Calédonie sur *Boophilus microplus*,
Document interne, ORSTOM

1987 - LAURENT D.,
Etudes chimiques et pharmacologiques des étoiles de mer de Nouvelle Calédonie,
Document interne, ORSTOM

Figure 1

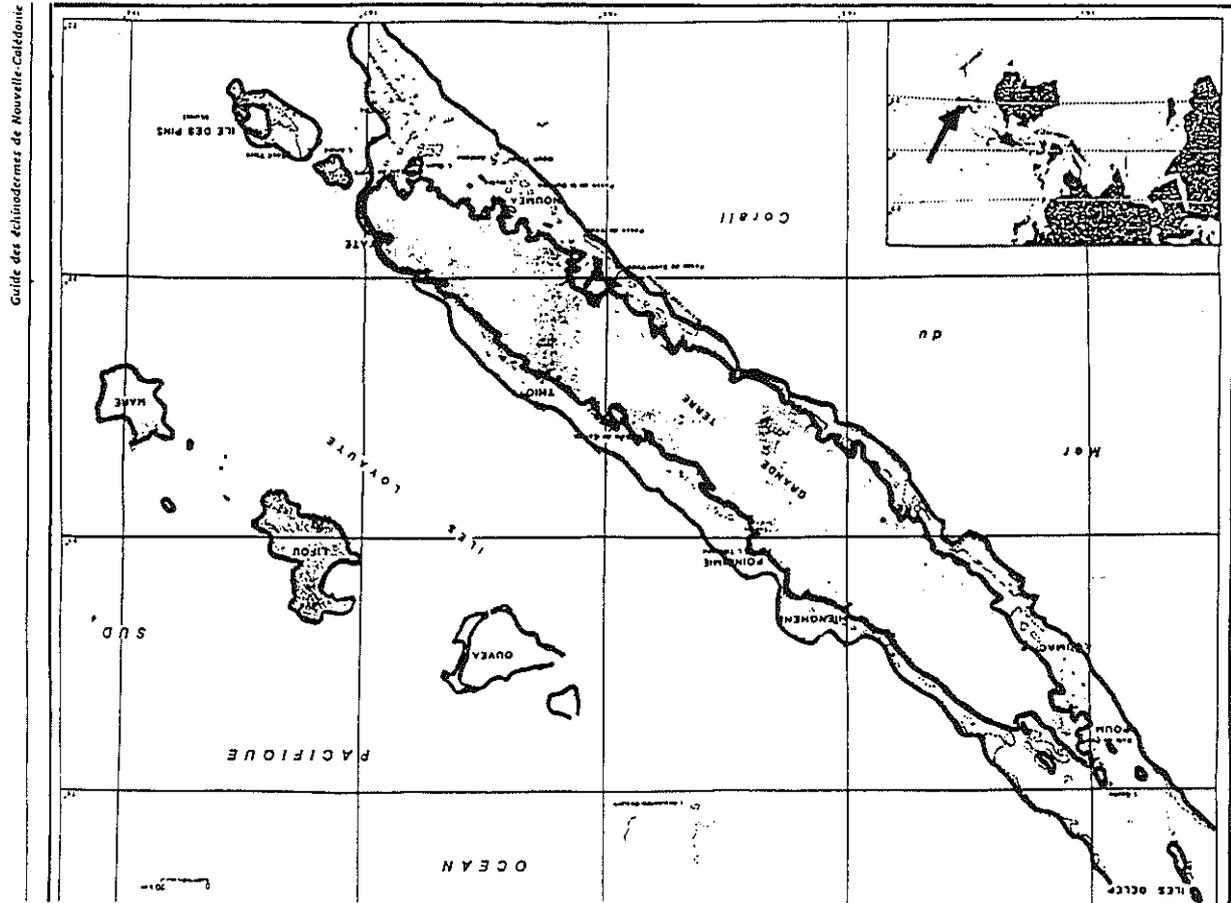
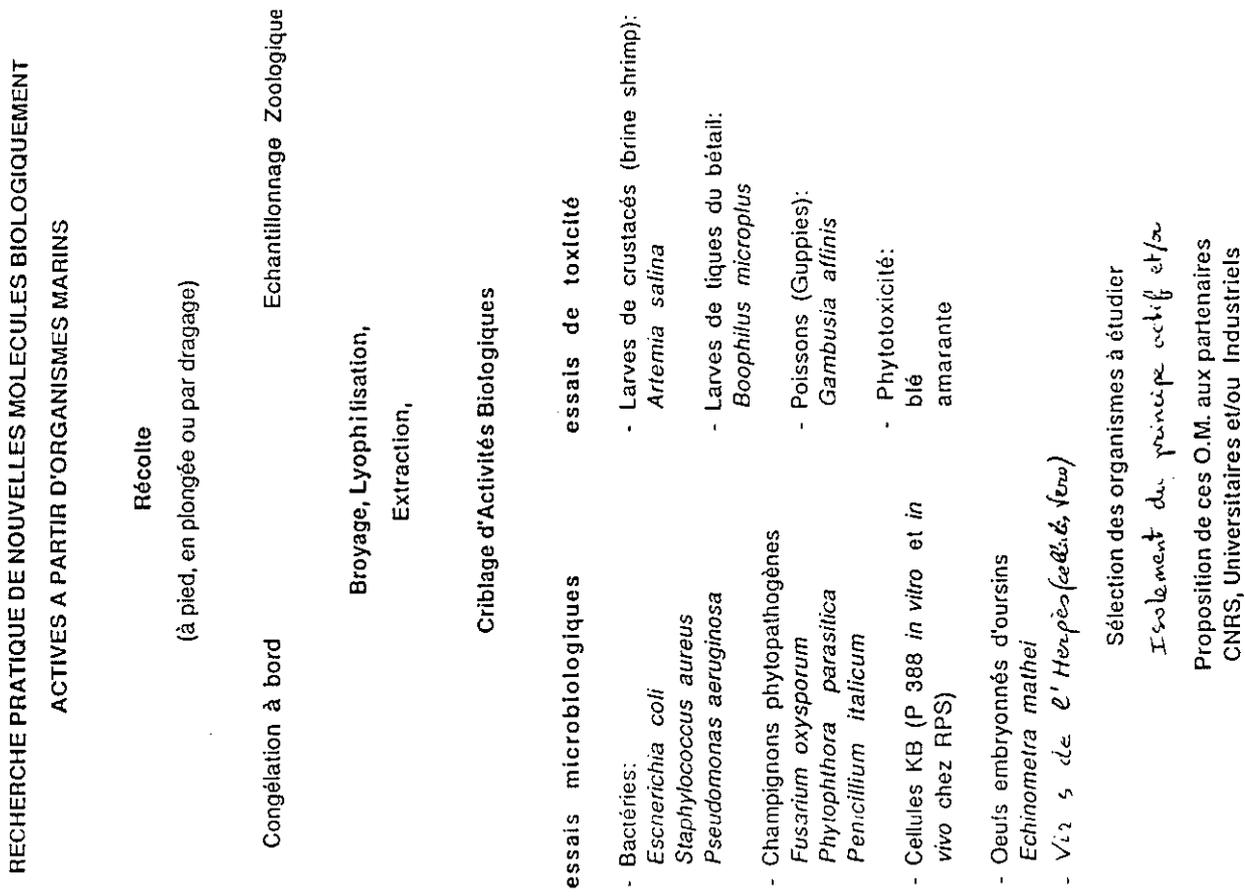


Figure 2



Etude chimique et pharmacologique des Principes Actifs et développement des résultats

Figure 3

RECAPITULATION DU PROGRAMME SMIB

années	EFONGES	ASCIDIES	ECHINODERMES	GORGONES	DIVERS*	TOTAL
1985-1989	144	29	20	12	34	239
nombre d'organismes	50	8	1	0	6	65
antibiotiques	20	0	0	0	0	20
anti-candida	51	12	1	3	9	76
cytotoxiques	53	13	3	0	3	72
antifongiques	78	10	8	3	10	109
toxicité générale	25	9	7	3	17	61
pas d'activité	38	2	6	3	3	52
étude approfondie						

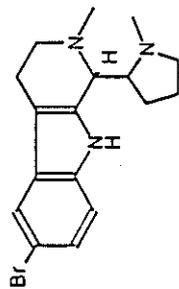
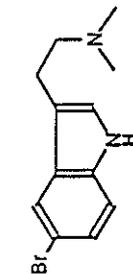
années	EFONGES	ASCIDIES	ECHINODERMES	GORGONES	DIVERS*	TOTAL
1985-1989	60,2%	12,1%	8,5%	5%	14,2%	100%
% d'organismes	34,7%	27,6%	5%	0%	17,6%	27,2%
antibiotiques	14%	0%	0%	0%	0%	8,4%
anti-candida	35,4%	41,4%	5%	25%	26,5%	31,8%
cytotoxiques	36,4%	44,8%	15%	0%	8,8%	30,1%
antifongiques	54,2%	34,5%	40%	25%	29,4%	45,6%
toxicité générale	17,4%	31%	35%	25%	50%	25,5%
pas d'activité	26,4%	6,9%	0%	25%	8,8%	21,7%
étude approfondie						

* divers= alcyonnaires (4), algues (2), antipathaires (3), bryozoaires (3), hydraires (1), madrépores (15), mollusques (4), zoanthaires (2)

Figure 4

Alcaloïdes antibiotiques et/ou cytotoxiques d'Ascidiés du genre *Eudistoma*

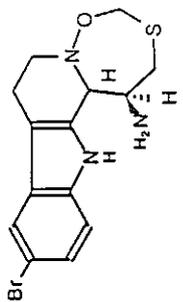
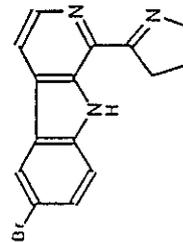
Alcaloïdes de *Eudistoma* sp., Ascidie néo-calédonienne



4-Bromo N,N-diméthyl tryptamine Woodinine

C. DEBITUS, M. PAIS et D. LAURENT, publication en cours

Alcaloïdes isolés de l'Ascidie des Caraïbes, l'*Eudistoma olivaceum*



Eudistomine H

Produit synthétisé

Eudistomine L

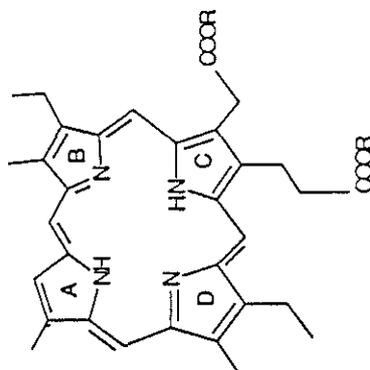
K. L. RINEHART, Jr et Coll., J. Am. Chem. Soc., 106, 1524 (1984)

idem, p. 1526

idem, J. Am. Chem. Soc., 109, 3378 (1987)

Figure 5

Figure 7



R=H: Corallistine A

1989 - D'AMBROSIO M., GUERRIERO A., DEBITUS C., RIBES O., RICHER DE FORGES B. et PIETRA F.,

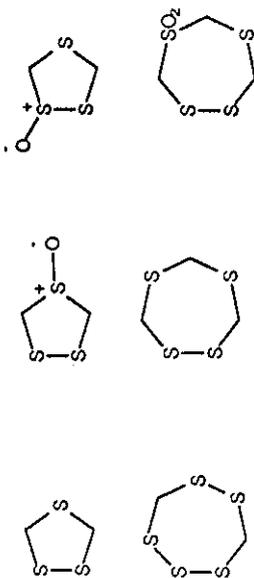
161. Corallistin A, a secon example of a free porphyrin from a living organism. Isolation from the demosponge *Corallistes* sp. of the Coral See and inhibition of abnormal cells.

Helvetica Chimica Acta, 72, 1451-1454

Figure 6

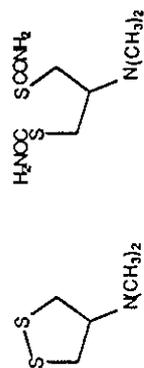
Exemples de produits sulfurés isolés d'Organismes Marins

Produits polysulfurés antibiotiques isolés de l'Algue Rouge *Chondria californica*



S.J. WRATTEN et D.J. FAULKNER, J. Org. Chem., 41, 2465 (1976)

Amine disulfurée insecticide du Ver Marin *Lumbriconereis heteropoda*

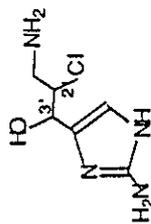


Nereistoxine

PADAN®

Y. HASHIMOTO, M. SAKAI et K. KONISHI, Food-Drugs from the Sea Proceedings, p. 129, Mar. Tech. Soc. (1972)

Figure 8

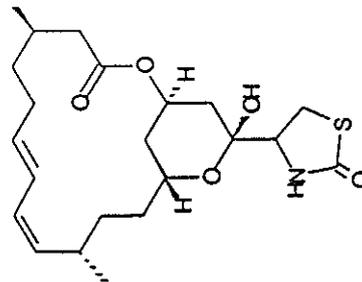


GIROLLINE

1987 - AHOND A., LABOUTE P., LAURENT D., POTIER P., POUPAT C., PUSSET J., PUSSET M., THOISON O.,
Girolline, a new biologically active substance extracted from the sponge *Pseudaxinyssa cantharella*, its preparation, and antitumor compositions containing it,
Chem. Abstracts 107, 168795q, Patent

1988 - AHOND A., BEDOYA ZURITA M., COLIN M., FIZAMES C., LABOUTE P., LAVELLE F., LAURENT D., POUPAT C., PUSSET J., PUSSET M., THOISON O., POTIER P.,
La girolline, nouvelle substance antitumorale extraite de l'éponge, *Pseudaxinyssa cantharella* n. sp. (Axinellidae),
C. R. Acad. Sci. Paris, 307, série II, 145-148

Figure 9



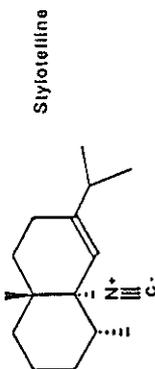
LATRUNCULINE A

Métabolite antifongique isolé des éponges *Latrunculia magnifica* et *Podospongia aff. loveni*.

Figure 10

Exemples d'isonitriles isolés d'invertébrés Marins

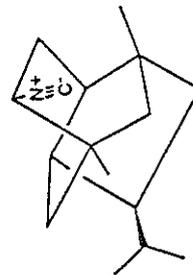
Isonitrile terpénique nouveau isolé d'une Eponge Benthique de Nouvelle Calédonie, *Stylolella* sp.



Stylotetiline

M. PAIS, C. FONTAINE, D. LAURENT, S. LA BARRE et E. GUITTET,
Tetrahedron Letters, 28, 1409 (1987)

Isonitrile isolé d'un Nudibranche, le *Phyllidia varicosa* et de l'Eponge dont il se nourrit, *Hymeniacidon* sp.



B.J. BURRESON, P.J. SCHEUER, J. FINER et J. CLARDY, J. Am. Chem. Soc., 97, 4763 (1965)

TRAVAUX S.N.O.M + S.M.I.B. : 1977-1990

BREVET : 1

PUBLICATIONS INTERNATIONALES : 38

- J. Nat. Prod. (15)
- Tetrahedron (4)
- Tetrahedron Letters (3)
- Gazz. Chim. Ital. (3)
- Experientia (2)
- J. Chem. Soc. Perkin Trans. (2)
- Botanica Marina (1)
- Bull. Soc. Chim. Fr. (1)
- Comp. Biochem. Physiol. (1)
- C.R. Acad. Sci. Paris (1)
- Helv. Chim. Acta (1)
- Heterocycles (1)
- J. Chem. Res. (1)
- Toxicon (1)
- Zeitschrift für Naturforschung (1)

COMMUNICATIONS A DES COLLOQUES : 14

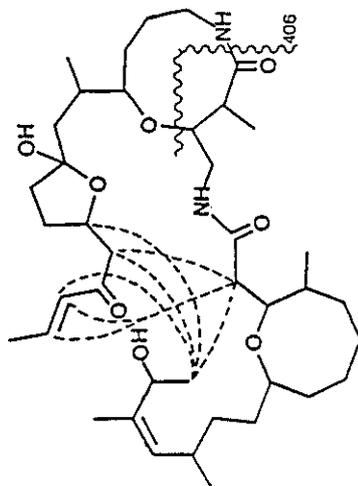
THESE : 1

D.E.A. : 1

DOCUMENTS INTERNES : 2

Figure 11

Structure cyclisée proposée pour le bistramide A



1988 - GOUJFFES-BARBIN D.,
Contribution à l'identification et à l'étude pharmacologique de cytotoxines d'origine marine.
Thèse de Doctorat, "Sciences de la Vie et de la Santé", Université de NANTES, 7/11/88

LES ANTIBIOTIQUES D'ORIGINE MARINE

Marie-Lise BOURGUET-KONDRACKI

MNHN, PARIS

On ne peut pas parler d'antibiotiques d'origine marine sans rappeler que les premières céphalosporines furent isolées d'un champignon marin *Cephalosporum Acremonium*, prélevé au large des côtes de Sicile. Le développement de ces céphalosporines a été considérable puisque le spectre d'activité de cette famille d'antibiotiques est plus large que celui des pénicillines et présente l'avantage d'être moins sensibles aux β lactamases.

Depuis, de nombreuses substances présentant une activité antibiotique ont pu être extraites d'organismes marins et identifiées. La littérature offre des modèles structuraux originaux et variés. Notre but n'est pas d'en dresser une liste exhaustive mais de présenter les principaux composés antibiotiques (antibactériens et/ou antifongiques) extraits des éponges. Il convient, à ce titre de souligner la diversité des substances nouvelles actives, isolées de ces animaux. Il est possible, en fait, de déterminer quatre grands types de composés antibiotiques: des terpènes, des composés indoliques et pyrroliques, des dérivés de la dibromotyrosine, des dérivés quinoniques, bien que d'autres substances aient montré une activité antibiotique tels que des alcaloïdes stéroïdiens, des peptides...

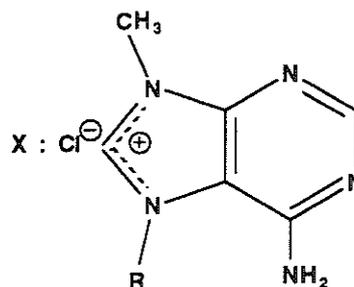
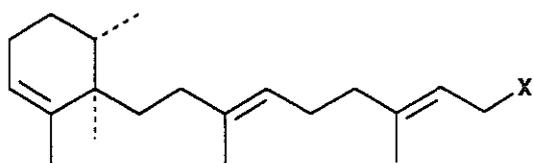
Les quelques exemples choisis illustrent l'originalité de ces substances antibiotiques isolées d'éponges.

La mise en évidence d'une activité antibiotique est déterminée par le calcul des CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) en milieu liquide ou par la méthode des disques en milieu gélosé.

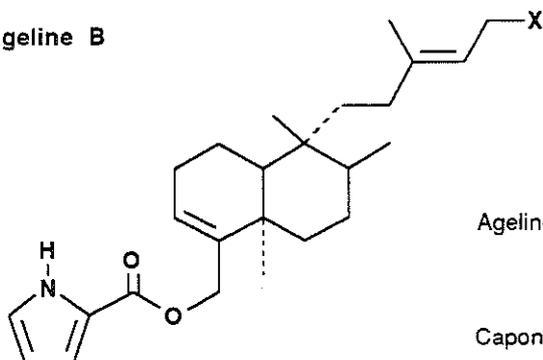
Chaque extrait est testé vis-à-vis d'un échantillon de bactéries Gram+ et Gram- et vis-à-vis de champignons dermatophytes, levures et moisissures.

Le rôle de ces composés pour l'organisme qui les secrète est très mal connu et se borne à quelques hypothèses. Ces métabolites pourraient être des substances de défense chimique, biosynthétisées par l'éponge pour lutter contre les prédateurs auxquels elle est exposée ou pour prévenir l'envahissement par des microorganismes indésirables. Cependant, le fait que nombre d'entre elles vivent en symbiose avec d'autres microorganismes, suppose que ces substances antibactériennes ou antifongiques doivent avoir une bonne spécificité. Ces substances pourraient également être des kairomones induisant la fixation ou la métamorphose de diverses larves.

Ageline A



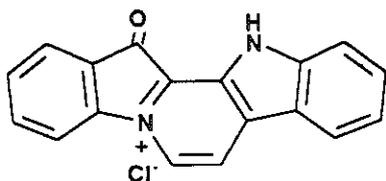
Ageline B



Ageline A: *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. albicans*
 5µg/ disque
 Ichtyotoxique à 25 µg/ml (*Carassius auratus*)

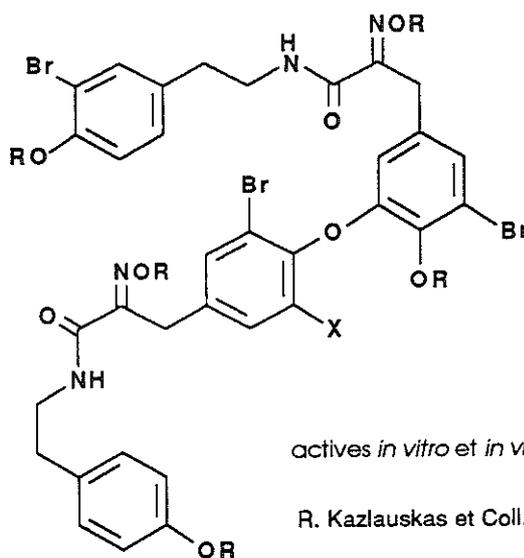
Capon et Coll., *J.A.C.S.*, 1984, 106, 1819-1822

Fascaplysin



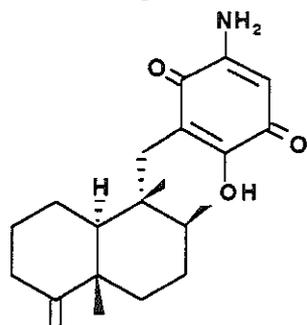
S. aureus: ø inhibition 15 mm, dépôt 0,1µg/disque
E. Coli: ø inhibition 8 mm, dépôt 5µg/disque
C. Albicans: ø inhibition 11 mm, dépôt 1µg/disque
S. Cerevisiae: ø inhibition 20 mm, dépôt 0,1µg/disque
 cytotoxique: ID₅₀: 0,2 µg/ml L1210
 D. M. Roll et Coll., *J.O.C.*, 1988, 53, 3276-3278

Bastadin-1, R=X=H
Bastadin-2, R=H, X=Br



actives *in vitro* et *in vivo* sur bactéries Gram +
 R. Kazlauskas et Coll., *Tet. Lett.*, 1980, 21, 2277-2280

Smenospongine

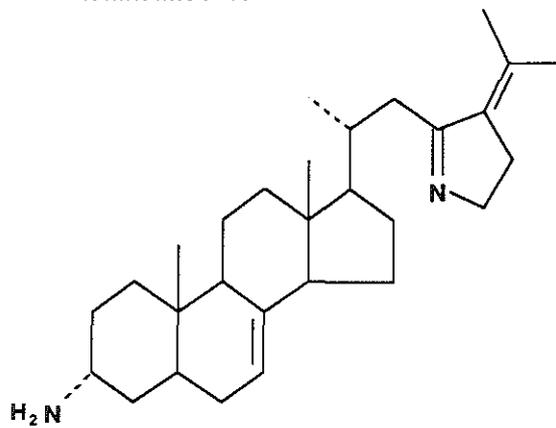


S. aureus, CMI: 7 µg/ml

Cytotoxique ID₅₀:1,5 µg/ml L1210

M.L. Kondracki et M. Guyot, *Tetrahedron*, 1989, 45, 7, 1995-2004

Plakinamide A

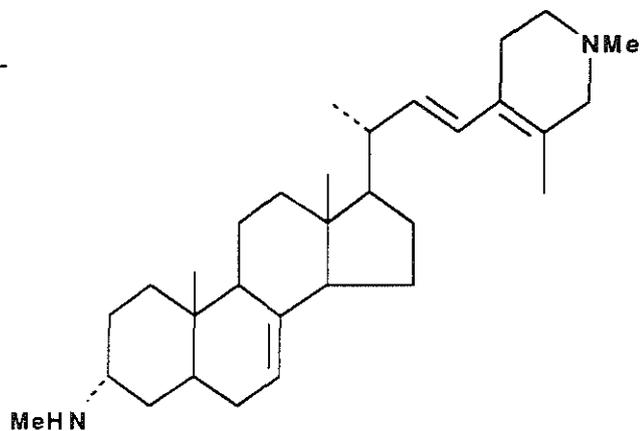


S. aureus: conc.: 25 µg/ disque

C. albicans: conc.: 10 µg/ disque

Rosser et Coll., *J.O.C.*, 1984, 49, 5157-5160

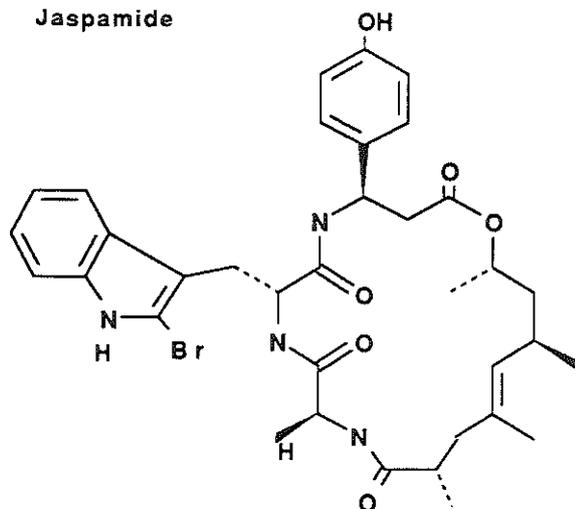
Plakinamide B



10 µg/ disque

2 µg/ disque

Jaspamide



C. albicans ø inhibition 11mm, dépôt de 1 µg/disque
insecticide (*Heliothis virescens*)

T.M. Zabriskie, *J.A.C.S.*, 1986, 108, 3123-3124

ACTIVITES ANTIBACTERIENNES ET ANTIFONGIQUES CHEZ DES ALGUES MARINES

D. PESANDO, N. BOUAICHA, S. PUISEUX-DAO

Unité INSERM 303 - BP 3 - 06230 - Villefranche-sur-Mer, France.

INTRODUCTION

60 % des médicaments sont d'origine naturelle, mais ce sont principalement des organismes terrestres, surtout végétaux, qui ont permis de les obtenir. En raison d'un accès plus difficile, peu de substances actives proviennent de la mer ; cependant des médicaments tels que l'Ara-C sont issus de synthèses réalisées à partir de modèles moléculaires produits par des Invertébrés marins.

La grande diversité des Etres vivants dans la mer permet d'espérer l'obtention de molécules originales si bien que les recherches, longtemps peu développées, s'amplifient, en particulier en vue d'obtenir des antifongiques, antiviraux et anticancéreux.

RECHERCHE D'ACTIVITES ANTIBACTERIENNES ET ANTIFONGIQUES

Une même méthodologie permet de mettre en évidence des activités antibactériennes ou antifongiques à partir de fragments d'algues ou d'homogénats, d'extraits aqueux ou dissous dans des solvants organiques : antibiogrammes sur milieu solide, mesure de concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide. Ces mêmes tests sont utilisés pour suivre les fractions actives au cours de la purification. Deux techniques un peu plus originales sont utilisées au laboratoire : 1) la réalisation d'antibiogrammes directement avec des cellules de microalgues ; 2) la réalisation d'antibiogrammes avec les bandes de support chromatographique après migration des composés ce qui permet de repérer rapidement les taches actives (Bioautographie).

Les bactéries le plus souvent étudiées sont pour les Gram+, *Staphylococcus aureus*, pour les Gram -, *Escherichia coli* ainsi que *Proteus mirabilis* ; des bactéries marines telles que *Flavobacterium* et *Vibrio* sp. sont aussi considérées. Pour les champignons, la levure *Candida albicans* et la moisissure *Aspergillus fumigatus* sont employées ainsi que le dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*. Le petit nombre de souches généralement employé conduit à un criblage limité. C'est pourquoi nous avons effectué les recherches préliminaires d'activité avec un grand

nombre de souches : une quinzaine de bactéries, une quinzaine de champignons (Pesando et Caram 1984 ; Moreau et coll. 1984, 1987 ; Viso et coll. 1987).

LES PRINCIPAUX PRODUCTEURS DE SUBSTANCES ACTIVES (Voir Pesando, 1990)

De nombreuses **microalgues** (Tab. 1) fournissent des extraits à activité antibactérienne. Elles appartiennent à des classes variées : Cyanophyta (ou cyanobactéries), Rhodophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Haptophyta, Chrysophyta, Phaeophyta, Chlorophyta. Ce sont les Chrysophyta, spécialement les Bacillariophyceae qui ont été le plus souvent rapportées comme producteurs de substances nocives pour les bactéries. Cyanophyta et Dinophyta semblent en deuxième position dans ce domaine.

Les recherches sur les propriétés antifongiques sont plus rares. Au cours d'une étude comprenant 50 espèces planctoniques (Pesando et coll., 1979a), des extraits aqueux de *Chaetoceros* se sont révélés les plus efficaces, en particulier contre divers parasites de plantes cultivées tels certains *Fusarium*. L'espèce *Asterionella glacialis* a également montré une activité antifongique remarquable (Tab. 1). Un programme expérimental consacré à la recherche d'antifongiques réalisé par Kellam et coll. (1988) a confirmé les potentialités des microalgues et mis en évidence que les extraits les plus lipophiles sont souvent les plus actifs (Tab. 1).

Les **macroalgues** dont certaines espèces font l'objet d'une exploitation industrielle pour la production par exemple de substances gélifiantes (alginates, carraghénanes) ou bien simplement comme engrais, peuvent posséder des propriétés antibactériennes ou antifongiques. Pour ce qui concerne les potentialités antibactériennes ; il est possible de se reporter à des revues concernant des algues de différentes parties du monde (Zajik et Knetting, 1970 ; Hoppe, 1979 ; Biard, 1980).

De nombreuses espèces, souvent très communes, ont été testées pour leurs activités antibactériennes, appartenant aussi bien aux Chlorophyta (Ulvales et Codiales) qu'aux Phaeophyta (Dictyotales, Laminariales, Fucales) ou Rhodophyta (Gigartinales et Cérariales). Les algues les mieux étudiées de ce point de vue sont : parmi les Chlorophyta, *Codium fragile*, *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca* ; parmi les Phaeophyta, *Colpomenia sinuosa*, *Dictyota dichotoma*, *Fucus vesiculosus* et *Laminaria digitata* ; parmi les Rhodophyta, *Ceramium rubrum*, *Hypnea musciformis* et *Laurencia obtusa* (Tab. 2)

Les propriétés antifongiques ont été peu recherchées (Tab. 2). Diverses Codiales et Caulerpales (Chlorophyta), Dictyotales et Fucales (Phaeophyta), Gigartinales, Bonnemaisoniales et Cérariales (Rhodophyta) en possèdent contre des levures

Candida albicans, *Cryptococcus neoformans* ou simplement *Saccharomyces cerevisiae*, ou bien contre des moisissures *Aspergillus glaucus* ou *niger* et aussi des dermatophytes tels que *Microsporium audouini* ou *Trichophyton mentagrophytes*. Dans la région méditerranéenne, des substances actives contre des parasites de plantes cultivées (*Phoma tracheiphila* des agrumes, *Fusarium* de l'oeillet ou de la tomate...) ont été mises en évidence chez des *Codium* ou quelques Rhodophyta (Caccamese et coll., 1981) ou des Dictyotales (Pesando et Caram, 1984 ; Moreau et coll., 1984, 1988).

LA VARIABILITE DE LA PRODUCTION DE PRODUITS ACTIFS

Des divergences entre les résultats de différents auteurs ont posé le problème d'une variabilité possible de l'activité antibiotique des algues. Trois causes ont été décelées.

La **localisation géographique** ce qui suggère soit l'influence des conditions écologiques, soit l'existence d'écotypes, les deux phénomènes ne s'excluant pas. Le fait est parfaitement illustré dans le tableau 2 par exemple pour *Codium fragile* ou *Enteromorpha intestinalis*. On ne peut toutefois exclure une influence des épiphytes, spécialement pour *Codium*, dont la présence et l'abondance varient en fonction des écosystèmes.

La **saison** en relation avec la **physiologie** de l'algue. C'est ainsi que Moreau et coll. (1988) ont montré des périodes de l'année plus intéressantes pour la production de substances actives chez certaines Dictyotales. Les thalles fertiles pourraient être les plus producteurs.

LES MOLECULES ACTIVES ET LEUR EFFICACITE THERAPEUTIQUE OU AGROCHIMIQUE

La diversité et l'originalité caractérisent les molécules synthétisées par les organismes marins et méritent l'attention et des efforts de la part de la Communauté Scientifique.

En raison de l'obtention plus aisée d'une biomasse importante, les substances dont la structure est bien déterminée appartiennent principalement aux **macroalgues** où l'on retrouve souvent l'acide acrylique, des terpènes, des phénols et/ ou des tannins (Tab. 3). Certaines espèces chimiques semblent plus spécifiques de phylums. L'acide acrylique par exemple a été plus fréquemment décrit, peut être est-ce un hasard, chez les Chlorophyta (Ulvales, Acrosiphoniales, Siphonocladales,

Codiales), mais on en rencontre aussi chez des Laminariales, Gigartinales et Cérariales. Les terpènes et tannins pourraient surtout caractériser les Phaeophyta (Fig. 1), mais aussi les Caulerpes. Les molécules halogénées sont particulières aux Rhodophyta (Tab. 3).

Pour les microalgues (Tab. 1), les Cyanophycées et les Dinoflagellés ont été les plus étudiées à cause des phénomènes toxiques dont elles peuvent être responsables. En particulier les polyéthers cycliques des Dinophyta tels l'acide okadaïque (Diarrhetic Shellfish Poisoning) ou la ciguatoxine (ciguatera) sont maintenant bien connus (Yasumoto, 1990), ainsi que la saxitoxine et les gonyautoxines, dérivés de la guanine, impliqués dans l'intoxication "Paralytic Shellfish Poisoning" liée le plus fréquemment au *Gonyaulax tamarensis* (Shimizu et coll., 1990 ; Cembella et coll., 1990). Polysaccharides et lipides paraissent plus souvent signalés chez les microalgues par rapport aux macroalgues (Tab. 1 et 3).

S'il est intéressant à la fois pour chimistes et algologues de connaître les spécificités chimiques des différentes algues dont moins de 10% ont été analysées, en vue d'un développement thérapeutique ou agrochimique, il est nécessaire d'apprécier rapidement leurs possibilités. Entre autres l'élimination des substances les plus dangereuses doit être envisagée très précocement. C'est en particulier l'objet des méthodes alternatives *in vitro*. Celles-ci permettent de déterminer des cibles cellulaires et d'orienter les investigations, mais aussi d'évaluer un niveau de potentiel toxique par des tests rapides, indicateurs d'un stress toxique. Pour la recherche de molécules antibiotiques ou antifongiques, la conduite parallèle de tests d'activité et de toxicité est réalisée à l'Unité INSERM 303 et aboutit très tôt à la détermination d'un indice d'efficacité.

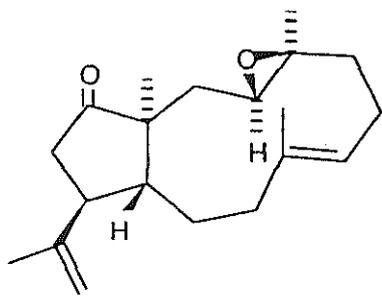
CONCLUSION

Encore peu exploitées, les potentialités des algues en molécules actives sont intéressantes. Les molécules variées et souvent originales peuvent servir de modèles pour la synthèse de produits actifs, mais également en s'appuyant sur le développement des biotechnologies de culture, on peut envisager la production de substances ou d'extraits aussi bien pour la pharmacie, la cosmétologie, l'agrochimie, l'aquaculture.

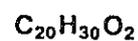
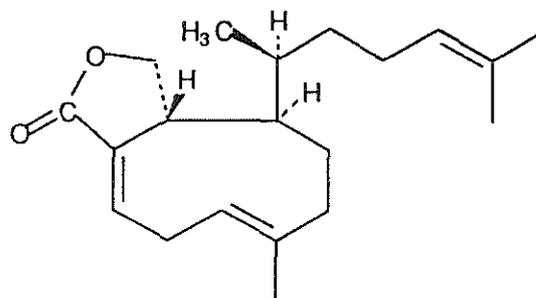
L'attention doit être attirée sur la variabilité de la présence d'une molécule ou de sa concentration dans une espèce d'algue. Jouent un rôle des facteurs écologiques, telle la saison, des facteurs physiologiques comme la période de reproduction ou de

croissance active, la localisation géographique qui évidemment influence les facteurs précédents, mais a pu aussi provoquer la sélection d'écotypes.

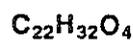
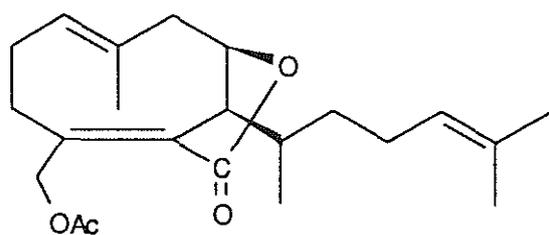
Plusieurs centaines de produits naturels ont été isolés à partir d'algues marines. Souvent originales, ces molécules présentent la plupart du temps une ou des activités biologiques ; cependant leur rôle dans la nature est en général peu connu. En tous cas, il est certain que des ressources nouvelles encore très insuffisamment exploitées existent potentiellement chez les algues.



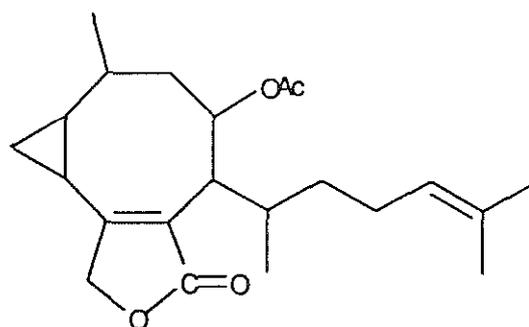
dolabellane diterpène (1)



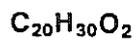
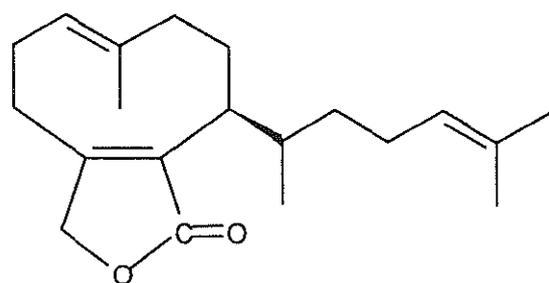
dictyolactone (2)



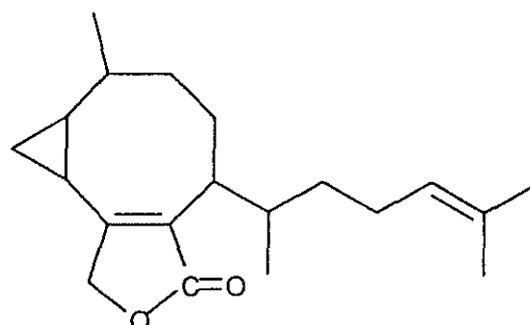
dictyotalide B (3)



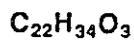
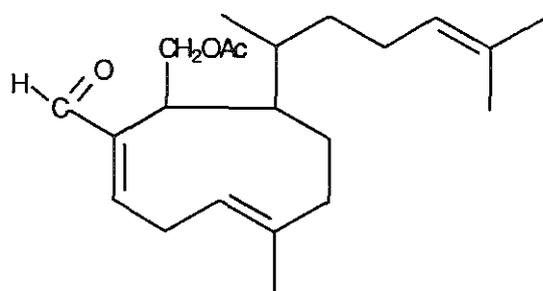
isoacetoxycrenulatin (4)



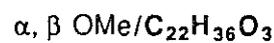
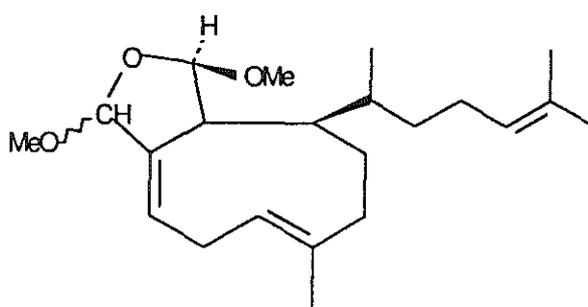
neodictyolactone (5)



pachylactone (6)



acetyldictyolal (7)



acetals (8)

Figure 1 : Diterpènes antifongiques isolés à partir de Dictyotales et présents dans *Dilophus ligulatus* (N. Bouaicha : comm. personnelle)

Tableau 1. Microalgues à propriétés antibactériennes et antifongiques

Microalgues	Composé(s)	Activités Antibactérienne	Antifongique	Auteurs
Cyanophyta				
<i>Bachytrichia balani</i>	?	+		Kobbia & Zaki 1976
<i>Calothrix brevisisima</i>	Bromophénol	+		Pedersen & Da Silva, 1973
<i>Chroococcus humicolaum</i>	?	+	+	Pande & Gupta, 1977
<i>Gomphosphaeria apoinha</i>	Apoïnine,			Moon & Martin, 1981
<i>Hydrocoleus sp.</i>	Terpènes et carbohydrates	+		Ranamurthy, 1970 ; Moikheha & Chu, 1971 ; Cardlina et al., 1979
<i>Lyngbia sp.</i>	?	+		Burkholder et al., 1960 ; Aubert et al., 1968
<i>Lyngbia sp.</i>	?	+	+	Reichelt & Borowitzka, 1984
<i>Lyngbia majuscula</i>	Malvingolide-Malvingamide	+	+	Grauer, 1959 ; Welch, 1962
<i>Lyngbia lutea</i>	Acides gras méthoxylés	+	+	Mynderse & Moore, 1978 ; Reichelt & Borowitzka, 1984
<i>Mastigocoleus testarum</i>	?	+		Kobbia & Zaki, 1976
<i>Oscillatoria bonnemaissoni</i>	?	+		Reichelt & Borowitzka, 1984
<i>Ribularia firma</i>	?	+		Gupta & Shrivastava, 1965
<i>Trichodesmium erythraeum</i>	?	+		Ranamurthy, 1970
Rhodophyta				
<i>Porphyridium purpureum</i>	?	+	+	Kellam et al., 1988
<i>Audouinella parvula</i>	?		+	Kellam et al., 1988
Cryptophyta				
<i>Cryptomonas sp.</i>	?	+		Duff et al., 1966
<i>Hemiseimnis utrescens</i>	?	+		Duff et al., 1966
<i>Rhodomonas lens</i>	?	+		Duff et al., 1966
<i>Cryptomonas calceiformis</i>	?	+		Kellam (Pers. Commun)
Dinophyta				
<i>Amphidinium carterae</i>	Acryloyl-choline	+	+	Duff et al., 1966 ; Taylor et al., 1974 ; Reichelt & Borowitzka, 1984 ; Kellam et al., 1988
<i>Amphidinium klebsii</i>	?	+	+	Kellam et al., 1988
<i>Cochlodinium sp.</i>	?	+		Sharma et al., 1968
<i>Gambierdiscus toxicus</i>	Neurotoxines	+		Durand, 1984
<i>Goniodoma sp.</i>	Goniodomine	+	+	Sharma et al., 1968
<i>Gonyaulax tamarensis</i>	Goniatoxine, Saxitoxine	+	+	Needler, 1949 ; Burkholder et al., 1960 ; Burkholder, 1963 Prakash, 1967

"Tableau 1 (suite)"

Microalgues	Composé (s)	Activités		Auteurs
		Antibactérienne	Antifongique	
<i>Gymnodinium breve</i>	Toxines lipidiques	?	?	Stevens, 1969 ; Martin & Chatterjee, 1970
<i>Gyrodinium sp.</i>	? β dicétone	+	+	Sharma et al., 1968 Burkholder et al., 1960 ; Trick et al., 1981, 1984
<i>Prorocentrum micans</i>	β dicétone	+	+	Trick et al., 1984 Burkholder et al., 1960 ; Kodama & Ogata 1983
<i>Prorocentrum minimum</i>	β dicétone	+	+	Sharma et al., 1968
<i>Protogonyaulax</i>	β dicétone, acide acrylique	+	+	Welch, 1962
<i>Zoanthella sp.</i>	Lactones terpéniques	+	+	
<i>Zoanthus</i>	? Lactones terpéniques	+	+	
Haptophyta				
<i>Coccolithus sp.</i>	Terpène et carbohydre	+	+	Duff et al., 1966
<i>Coccolithus pelagicus</i>	? Terpène et carbohydre	+	+	Kellam Pers. Commun. Kellam Pers. Commun.
<i>Hymenomonas elongata</i> (<i>Cricosphaera elongata</i>)	? Terpènes et carbohydre	+	+	Duff et al., 1966 Duff et al., 1966
<i>Isochrysis sp.</i>	? Terpènes et carbohydre	+	+	Hansen, 1973
<i>Monochrysis lutheri</i>	? Terpènes et carbohydre	+	+	Berland et al., 1972
<i>Ochromonas malhamensis</i>	? Acide acrylique	+	+	Kellam (Pers. Commun.) Steburth, 1960
<i>Pavlova gytrans</i>	? Glycolipide et lipoprotéine	+	+	Duff et al., 1966 ; Aubert et al., 1968 ; Paster, 1973
<i>Phaeocystis pouchetti</i>		+	+	
<i>Pyramnesium parvum</i>		+	+	
Chrysophyta				
<i>Amphiprora hyalina</i>	? Acides gras, glycolipide	+	+	Kellam (Pers. Commun.) Aubert et al., 1968 ; Pesando et al., 1979a ; Pesando, 1985 ; Viso et al., 1987
<i>Asterionella japonica</i>		+	+	
<i>Asterionella notata</i>	? Acides gras, glycolipide	+	+	Gauthier, 1969, Pesando et al., 1979a Gauthier, 1980
<i>Bacillaria paradoxa</i>	? Acides gras, glycolipide	+	+	Gauthier, 1980 Aubert et al., 1968
<i>Bacteriastum elegans</i>	? Acides gras, glycolipide	+	+	Gauthier, 1980
<i>Bidulphia sinensis</i>	? Acides gras, glycolipide	+	+	Berland et al., 1972 ; Gauthier, 1980
<i>Chaetoceros affinis</i>	? Acides gras, glycolipide	+	+	Pesando, 1985 ; Viso et al., 1987
<i>Chaetoceros brevis</i>	? Acides gras, glycolipide	+	+	Pesando, 1985 ; Viso et al., 1987
<i>Chaetoceros curvisetum</i>	? Acides gras, glycolipide	+	+	Pesando, 1985 ; Viso et al., 1987
<i>Chaetoceros danicus</i>	? Acides gras, glycolipide	+	+	Pesando, 1985 ; Viso et al., 1987
<i>Chaetoceros didymus</i>	? Acides gras, glycolipide	+	+	Pesando, 1985 ; Viso et al., 1987

"Tableau 1. (suite)"

Microalgues	Composé (s)	Activités	Autheurs	
		Antibactérienne	Antifongique	
<i>Chaetoceros laudert</i>	Polysaccharide	+	+	Aubert & Gauthier, 1966 ; Gueho et al., 1977 ; Gauthier et al., 1978
<i>Chaetoceros peruvianum</i>	?	+	+	Pesando et al., 1979a, 1979b ; Viso et al., 1987 Pesando et al., 1979a ; Viso et al., 1987
<i>Chaetoceros protuberans</i>	?	+	+	Pesando 1985 ; Viso et al., 1987
<i>Chaetoceros pseudocurvisetum</i>	?	+	+	Pesando et al., 1979a ; Viso et al., 1987
<i>Chaetoceros simplex</i>	?	+	+	Pesando et al., 1979a ; Viso et al., 1987
<i>Coscinodiscus gigas</i>	?	+	+	Gauthier, 1980
<i>Cyclotella nana</i>	?	+	+	Duff et al., 1966 ; Antta & Kalmakoff, 1965
<i>Fragilaria pinnata</i>	Peptides	+	+	Berland et al., 1972 ; Pesando et al., 1979a ; Viso et al., 1987 Gauthier, 1980
<i>Gaunardina flaccida</i>	?	+	+	Pesando et al., 1979a
<i>Gyrosigma fasciola</i>	?	+	+	Gauthier 1980, Kellam (Pers. Commun.)
<i>Gyrosigma spenceri</i>	?	+	+	Aubert et al., 1968
<i>Leptocylindrus denticus</i>	?	+	+	Aubert et al., 1968
<i>Lithophora abbreviata</i>	?	+	+	Aubert et al., 1968
<i>Lithodesmium undulatum</i>	?	+	+	Halvorson et al., 1984
<i>Nannochloris sp.</i>	Aponine	+	+	Kellam et al 1988
<i>Nannochloris sp.</i>	?	+	+	Kellam (Pers. Commun.)
<i>Nannochloris maculata</i>	?	+	+	Kellam (Pers. Commun.)
<i>Nannochloris oculata</i>	?	+	+	Reichelt & Borowitzka, 1984
<i>Nauclia sp.</i>	?	+	+	Findlay & Patil, 1984
<i>Nauclia delognei</i>	Acides gras	+	+	Fabregas & Velga, 1984
<i>Nauclia laevisstima</i>	?	+	+	Jorgensen, 1962
<i>Nitzschia sp.</i>	Chlorophyllides	+	+	Aubert et al., 1968
<i>Nitzschia acicularis</i>	?	+	+	Viso et al., 1987
<i>Nitzschia closterium</i>	?	+	+	Viso et al., 1968
<i>Nitzschia longissima</i>	?	+	+	Aubert et al., 1968
<i>Nitzschia serata</i>	?	+	+	Cooper et al., 1983 ; Kellam (Pers. Commun.)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Acides gras	+	+	Gauthier, 1980
<i>Pleurosigma sp.</i>	?	+	+	Aubert et al., 1968
<i>Rhizosolenia alata</i>	?	+	+	Gauthier, 1980
<i>Rhizosolenia stalteri</i>	?	+	+	Aubert et al., 1968 Gauthier, 1980

"Tableau 1. (suite)"

Microalgues	Composé (s)	Activités		Auteurs
		Antibactérienne	Antifongique	
<i>Thalassiostra decipiens</i>	Acides gras	+		Steemann-Nielsen, 1955
<i>Thalassiostra pseudonana</i>	Acides gras	+		Steemann-Nielsen, 1955
<i>Thalassiostra</i> sp.	?	+	+	Pesando et al., 1979a
<i>Thalassiothrix frauenfeldii</i>	?	+		Aubert et al., 1968
<i>Sketionema costatum</i>	Acide acrylique	+	+	Sieburth, 1964 ; Ackman et al., 1968 ; Pesando et al., 1979a ; Kogure et al., 1979, Kellam et al., 1988
<i>Syncrypta glomerifera</i>	?	+	+	Kellam (Pers. Commun.)
Phaeophyta				
<i>Streblonema</i> sp.	?	+	+	Kellam (Pers. Commun.)
Chlorophyta				
<i>Ankistrodesmus martinus</i>	?	+		Kellam et al., 1988
<i>Brachydomonas submarina</i>	?	+	+	Kellam et al., 1988
<i>Chlamydomonas plethora</i>	?	+		Kellam et al., 1988
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Acides gras	+		Mautner et al., 1953
<i>Chlamydomonas vectensis</i>	?	+		Kellam (Pers. Commun.)
<i>Chlorella stigmatophora</i>	?	+		Kellam (Pers. Commun.)
<i>Chlorella</i> sp. indet.	?	+		Kellam (Pers. Commun.)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	?	+		Baker, 1984
<i>Pandorina morum</i>	?	+		Harris, 1973
<i>Protosyphon botryoides</i>	Acides gras	+		Harder & Opperman, 1953
<i>Stichococcus mirabilis</i>	Acides gras	+		Harder & Opperman, 1953
<i>Tetraselmis chui</i>	?	+		Kellam (Pers. Commun.)
<i>Tetraselmis convolutae</i>	?	+		Kellam (Pers. Commun.)
<i>Tetraselmis hazeni</i>	?	+		Kellam (Pers. Commun.)
<i>Tetraselmis empelagicus</i>	?	+		Kellam (Pers. Commun.)
<i>Tetraselmis marina</i>	?	+		Kellam (Pers. Commun.)
<i>Tetraselmis striata</i>	?	+		Kellam (Pers. Commun.)
<i>Tetraselmis suecica</i>	?	+		Kellam (Pers. Commun.)
<i>Tetraselmis tetrathale</i>	?	+	+	Kellam et al., 1988

Tableau 2. Comparaison des activités antimicrobiennes des algues les plus fréquemment testées

Algues	Localités	Saison (s)	Activité antibactérienne		Activité antifongique	Auteurs
			<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>		
Chlorophyta <i>Codium fragile</i>	Atlantique (France)	?	-	-	-	Blard, 1980
	Baltique (Allemagne) Méditerranée (France) Mer du Nord (Angleterre) Pacifique (Japon) Pacifique (Australie)	Automne Automne maximum d'activité au Printemps Hiver ?	+ - + non testée -	+ - + + -	non testée - non testée non testée -	Blombliza, 1970 Pesando & Caram, 1984 Hornsey & Hide, 1974 Kamimoto, 1955 Reichelt & Borowitzka, 1984
Enteromorpha intestinalis	Baltique (Allemagne)	?	-	-	-	Bocker & Thrum, 1966
	Océan Indien (Inde)	Hiver	-	-	+	Nagy et al., 1980
	Océan Indien (Inde)	?	+	non testée	non testée	Rao & Parekh, 1981
	Méditerranée (Egypte)	?	non testée	non testée	-	Khaleafa et al., 1975
	Mer du Nord (Allemagne) Mer du Nord (Angleterre)	Printemps toutes saisons Hiver	+ - -	+ - -	non testée non testée non testée	Blombliza, 1969 ; 1970 Hornsey & Hide, 1974 Maurer, 1965
	Pacifique (Chili)	Été	-	-	non testée	Ma & Tang, 1984
	Pacifique (Chine)	?	non testée	-	non testée	Henriquez et al., 1979
	Pacifique (Chili)	Hiver	-	-	non testée	Ma & Tang, 1984
	Adriatique (Italie)	Printemps, Été	+	-	non testé	Fassina & Bertl, 1962
	Atlantique (Puerto Rico)	?	non testée	non testée	-	Welch, 1962
Ulva lactuca	Baltique (Allemagne)	?	-	+	non testée	Roes, 1957
	Mer du Nord (Allemagne)	Printemps	+	+	non testée	Blombliza, 1969 ; 1970
	Pacifique (Chili)	Hiver, Été	+	+	non testée	Maurer, 1965
	Pacifique (Chili)	Hiver	-	non testée	non testée	Henriquez et al., 1979
	Atlantique (France)	?	+	+	-	Blard, 1980

"Tableau 2. (suite)"

	Localités	Saison(s)	Activité antibactérienne		Activité antifongique	Auteurs
			S. aureus	E. coli		
Phaeophyta						
<i>Colpomenia sinuosa</i>						
	Méditerranée (Egypte)	toutes saisons	non testée	non testée	-	Khalefa et al., 1975
	Méditerranée (France)	Eté	-	-	-	Pesando & Caram, 1984
	Méditerranée (Sicile)	Eté	non testée	-	-	Caccamese & Azzollina, 1979
	Pacifique (Chili)	Eté	+	+	non testée	Maurer, 1965
	Pacifique (Chili)	Eté	+	non testée	non testée	Henriquez et al., 1979
	Pacifique (Hawaï)	Eté	-	-	non testée	Starr et al., 1962
<i>Dichyota dichotoma</i>						
	Atlantique (France)	?	-	-	-	Blard et al., 1980
	Adriatique (Italie)	Printemps, Eté	+	-	-	Fassina & Bertl, 1962
	Méditerranée (Egypte)	toutes saisons	non testée	non testée	-	Khalefa et al., 1975
	Méditerranée (France)	Printemps, Eté	-	-	+	Pesando & Caram, 1984
	Méditerranée (Sicile)	Eté	non testée	+	+	Caccamese & Azzollina, 1979
	Mer du Nord (Angleterre)	Actif en Eté	+	+	non testée	Hornsey & Hide, 1974
	Pacifique (Australie)	?	+	+	+	Reichelt & Borowitzka, 1984
	Océan Indien (Inde)	?	+	non testée	non testée	Rao & Parekh, 1981
<i>Laminaria digitata</i>						
	Atlantique (France)	?	-	-	+	Blard et al., 1980
	Baltique (Allemagne)	?	+	-	non testée	Roos, 1957
	Mer du Nord (Allemagne)	Printemps	+	+	non testée	Glombitza, 1969
	Mer du Nord (Angleterre)	Printemps	+	-	non testée	Chesters & Stott, 1956
	Mer du Nord (Angleterre)	toutes saisons	+	+	non testée	Hornsey & Hide, 1974 ; 1976
	Mer du Nord (Suède)	?	-	-	non testée	Andersson et al., 1983

	Localités	Saison (s)	Activité antibactérienne		Activité antifongique	Auteurs
			<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>		
Algues						
<i>Rucus vesiculosus</i>	Atlantique (France) Baltique (Allemagne) Baltique (Allemagne) Mer du Nord (Allemagne) Mer du Nord (Angleterre)	? ? ? Printemps Printemps	- + + - -	- - - - -	- non testée + non testée non testée	Blard et al., 1980 Roos, 1957 Bocker & Thrum, 1969 Glombitza, 1969 Chesters & Stott, 1956; Hornsey & Hide, 1974
Rhodophyta						
<i>Ceramium rubrum</i>	Atlantique (France) Baltique (Allemagne) Océan Indien (Inde) Méditerranée (Sicile)	? toutes saisons Été	- + - non testée	- - non testée non testée	- non testée non testée -	Blard, 1980 Roos, 1957 ; Bocker & Thrum, 1966 Rao & Parekh, 1981 Caccamese & Azzolina, 1979
<i>Hypnea musciformis</i>	Mer du Nord (Allemagne) Mer du Nord (Allemagne) Mer du Nord (Angleterre) Pacifique (Chili)	Printemps ? toutes saisons Printemps	- + - -	- - - non testée	non testée - - non testée	Glombitza, 1969 Glombitza, 1970 Hornsey & Hide, 1974 Henriquez et al., 1979
<i>Laurencia obtusa</i>	Adriatique (Italie) Océan Indien (Inde) Océan Indien (Inde) Océan Indien (Inde) Méditerranée (Egypte) Méditerranée (France)	Printemps Hiver ? ? ? Printemps	- + - - non testée -	- - non testée - non testée -	+ non testée non testée - non testée +	Fassina & Bertl, 1962 Nagy et al., 1980 Rao & Parekh, 1981 Padmakumar & Ayyakkannu, 1986 Khaleefa et al., 1975 Pesando & Caram, 1984
	Atlantique (Puerto Rico) Atlantique (Puerto Rico) Atlantique (Puerto Rico) Atlantique (Puerto Rico) Méditerranée (France) Méditerranée (Sicile)	Été Hiver Été ? ? Printemps Été	+ - non testée + + - non testée	- + non testé + - + -	- - + non testée + non testée +	Burkholder et al., 1960 Welch, 1962 Alnodovar, 1964 Olesen et al., 1964 Pesando & Caram, 1984 Caccamese & Azzolina, 1979
	Mer du Nord (Angleterre)	toutes saisons	+	-	non testée	Caccamese et al., 1981 Hornsey & Hide, 1974.

Phylum order espèces	Composé (s)	Activités Antibactérienne Antifongique	Auteurs
Cryptonemiales <i>Amphiroa zonata</i> <i>Corallina pilufera</i> <i>Marginisporum aberrans</i>	Monoterpènes polyhalogénés	+	Stierle and Sims, 1979
	Composé isoprénique	+	Reichelt and Borowitzka, 1984
	Composé isoprénique	+	Reichelt and Borowitzka, 1984
	Composé isoprénique	+	Baker, 1984
Bonnemaisoniales <i>Asparagopsis armata</i> <i>Asparagopsis taxiformis</i> <i>Bonnemaisonia hamifera</i> <i>Delisea fimbriata</i> <i>Ptilonota magellanica</i>	Acide acrylique		Glombitza, 1970
	Laurintérol et iso laurintérol	+	Ohta and Takagi, 1977b
	Laurintérol et iso laurintérol	+	Ohta and Takagi, 1977b
	p hydroxy benzaldéhyde + 3.5-dinitroguaiacol	+	Ohta and Takagi, 1977b
Ceramales <i>Chondria opposicioda</i>	Laurintérol et iso laurintérol	+	Ohta and Takagi, 1977b
	Cétone halogénée	+	Codominer <i>et al.</i> , 1977
	Cétone halogénée	+	Codominer <i>et al.</i> , 1977
	Tetrabromohéptanones Fimbrolidés	+	Studa <i>et al.</i> , 1975
	Acétoxy 4 dibromo 1 heptanol	+	Reichelt and Borowitzka, 1984
	Cyclooudesmol	+	Nicod <i>et al.</i> , 1987

Tableau 3 : Composés antimicrobiens isolés des macroalgues marines.

Phylum ordre espèces	Composé (s)	Activités		Auteurs
		Antibactérienne	Antifongique	
Chlorophyta				
Ulvales				
<i>Enteromorpha linza</i>	Acide acrylique	+		Glombitza, 1970
<i>Monostroma undulatum</i>	Acide acrylique			Glombitza, 1970
<i>Ulva lactuca</i>	Acide acrylique	+		Glombitza, 1970
Acrosiphonales				
<i>Acrosiphonta arcta</i>	Acide acrylique	+		Glombitza, 1970
<i>Acrosiphonta sonderi</i>	Acide acrylique	+		Glombitza, 1970
Siphonocladales				
<i>Cladophora rupestris</i>	Acide acrylique	+		Glombitza, 1970
Codiales				
<i>Avrainvillea nigricans</i>	5'hydroxy iso avrainvilleol	+	+	Colon et al., 1987
<i>Codium fragile</i>	Acide acrylique	+		Glombitza, 1970
Dasycladales				
<i>Cymopolia barbata</i>	Sarganine	+	+	Martinez-Nadal et al., 1966
Caulerpales				
<i>Halimeda copiosa</i>	Diterpène	+	+	Fencal & Paul, 1984
<i>Halimeda cylindracea</i>	Diterpène	+	+	Fencal & Paul, 1984
<i>Halimeda discolda</i>	Diterpène	+	+	Fencal & Paul, 1984
<i>Halimeda gigas</i>	Diterpène	+	+	Fencal & Paul, 1984
<i>Halimeda incrassata</i>	Diterpène	+	+	Fencal & Paul, 1984
<i>Halimeda macroloba</i>	Diterpène	+	+	Fencal & Paul, 1984
<i>Halimeda manille</i>	Diterpène	+	+	Fencal & Paul, 1984
<i>Halimeda opuntia</i>	Diterpène	+	+	Fencal & Paul, 1984
<i>Halimeda scabra</i>	Diterpène	+	+	Fencal & Paul, 1984
<i>Halimeda simulans</i>	Diterpène	+	+	Fencal & Paul, 1984
<i>Halimeda tuna</i>	Diterpène	+	+	Fencal & Paul, 1984
<i>Udotea conglutinata</i>	Flésiline	+	+	Fencal & Paul, 1984
<i>Udotea cyathiformis</i>	Adéidéhyde	+	+	Fencal & Paul, 1984
<i>Udotea flabellatum</i>	Diterpène	+	+	Fencal & Paul, 1984
Phaeophyta				
Scytosiphonales				
<i>Scytosiphon lomentaria</i>	Acide acrylique	+		Glombitza, 1970
Dictyotales				
<i>Dictyopteris zonarioides</i>	Zonarol and iso Zonarol	+		Fencal et al., 1973
<i>Dictyota sp.</i>	Dolabellane diterpénoides	+	+	Tringali et al., 1986
<i>Dictyota crenulata</i>	Dictyodiol	+	+	Flner et al., 1979
<i>Dictyota dichotoma</i>	Diterpène alcool	+	+	Enold et al., 1983
<i>Lobophora papenfussii</i>	Dictyol F and épidyctyol F Lipide phénolique	+		Gerwick & Fencal, 1982

"Tableau 3.(suite)"

Phylum ordre espèces	Composé (s)	Activités Antibactérienne Antifongique	Auteurs
Pachydietyon cortaceum Zonaria farlowii Zonaria deshayana	Pachydietylol A	+	Hirschfeld et al., 1973
	Lipide phénolique	+	Gerwick & Fenical, 1982
	Lipide phénolique	+	Gerwick & Fenical, 1982
Laminariales Laminaria digitata Laminaria hyperborea Laminaria saccharina	Acide acrylique	+	Glombitza, 1970
	Acide acrylique	+	Glombitza, 1970
	Acide acrylique	+	Glombitza, 1970
Fucales Cystoseira elegans Fucus serratus Fucus vesiculosus	Eleganolone	+	Caccamese & Azzolina, 1979
	Diterpénoides	+	Banaigs et al, 1983
	Acide acrylique Phlorotannins	+	Glombitza, 1970
Himantothalia elongata Pelvetia canaliculata	Phlorotannins Phlorotannins	+	Glombitza, & Lentz 1981
	Phlorotannins	+	Grosse -Danhues et al., 1983 Glombitza & Klapperth, 1985
Rhodophyta			
Gelidiales			
Beckerella subcostata	Bromo et Chloro beckerellides	+	Ohta, 1977
Gigartinales			
Chondrus crispus	Acide acrylique	+	Glombitza, 1970
Cystochlorum purpureum	Acide acrylique	+	Glombitza, 1970
Plocamium angustum	Composé isoprénique	+	Reichelt and Borowitzka, 1984
Plocamium cartilagineum	Monoterpènes polyhalogénés	+	Sterle and Sims, 1979
Plocamium costatum	Composé isoprénique	+	Reichelt and Borowitzka, 1984
Plocamium mertensi	Composé isoprénique	+	Reichelt and Borowitzka, 1984
Plocamium vulgare	Composé isoprénique Acide acrylique	+	Baker, 1984 Glombitza, 1970
Cryptonématales			
Amphiroa zonata	Laurintérol et Iso laurintérol	+	Ohta and Takagi, 1977b
Corallina pilulifera	Laurintérol et Iso laurintérol	+	Ohta and Takagi, 1977b
Marginitisporum aberrans	p hydroxy benzaldéhyde + 3,5-dinitroguanaicol Laurintérol et Iso laurintérol	+	Ohta and Takagi, 1977b
Bonnemaisoniales			
Asparagopsis armata	Cétone halogénée	+	Codornier et al., 1977
Asparagopsis taxiformis	Cétone halogénée	+	Codornier et al., 1977
Bonnemaisonia hamifera	Tetrabromohéptanones	+	Shuda et al., 1975
Delisea fibrata	Fimbrilides	+	Reichelt and Borowitzka, 1984
Ptilonia magellanica	Acétoxy 4 dibromo 1 heptanol	+	Nicod et al., 1987
Céramiales			
Chondria oppositoda	Cycloeu-desmol	+	Fenical, 1974

"Tableau 3. (suite)"

Phylum ordre espèces	Composé (s)	Activités		Auteurs
		Antibacterienne	Antifongique	
<i>Chondria californica</i>	Polysulfures	+		Wratten and Faulkner, 1976
<i>Dasysia pedicellata</i>	p-hydroxybenzaldehyde	+	+	Fenical and McConnel, 1976
<i>Delessertia sanguinea</i>	Acide acrylique	+		Glombitza, 1970
<i>Laurencia brongniartii</i>	Bromolindole	+	+	Carter <i>et al.</i> , 1978
<i>Laurencia filiformis</i>	Laurène	+	+	Baker, 1984
<i>Laurencia heterocladia</i>	Laurène	+	+	Baker, 1984
<i>Laurencia nidifica</i>	Laurintérol	+		Waraszkiewicz and Erickson, 1974
<i>Laurencia obtusa</i>	Laurényénine	+		Caccamese <i>et al.</i> , 1980
<i>Laurencia subopposita</i>	7 hydroxy laurène	+		Wratten and Faulkner, 1977
<i>Polysiphonia urceolata</i>	Acide acrylique	+		Glombitza, 1970
<i>Rhodomela confervoides</i>	Acide acrylique	+		Glombitza, 1970

Références

- Ackman, R.G., C.S. Tocher and J. McLachlan, 1968. Marine phytoplankton fatty acids. J. Fish. Res. Bd. Can. 25 : 1603-1620.
- Almodovar, L.R., 1964. Ecological aspect of some antibacterial algae in Puerto-Rico. Bot. Mar. 6 : 143-146.
- Andersson, L., G. Lidgren, L. Bohlin, L. Magni, S. Ogren and L. Afzelius, 1983. Studies of Swedish marine organisms. I. Screening of biological activity. Acta Pharm. Suec.-S. 20 : 401-414.
- Antia, N.J. and J. Kalmakoff, 1965. Growth rates and yields from axenic mass culture of fourteen species of marine phytoplankters. Fish. Res. Bd. Can. Manusc. Rep. Ser. Oceanogr. Limnol., 203 : 47-52
- Aubert, M., J. Aubert and M. Gauthier, 1968. Pouvoir auto-épurateur de l'eau de mer et substances antibiotiques produites par les organismes marins. Rev. Int. Océanogr. Méd. 10 : 137-207.
- Aubert, M. and M. Gauthier, 1966. Origine et nature des substances antibiotiques presentes dans le milieu marin. 7e Partie. Note sur l'activité antibactérienne d'une diatomée marine, *Chaetoceros teres* (Cleve). Rev.Int. Océanogr. M^od. 4 : 33-38.
- Baker, J.T., 1984. Seaweeds in pharmaceutical studies and applications. Hydrobiologia 116-117 : 29-40.
- Banaigs, 1983. Défense chimique des algues brunes (Cystoseiraceae). Etude de nouveaux phénols diterpéniques chez *Cystoseira elegans*. Ph. D. Thesis, University of Perpignan, Perpignan, France, pp. 69.
- Banaigs, B., C. Francisco, E. Gonzales and W. Fenical, 1983. Diterpenoid metabolites from the marine algae *Cystoseira elegans*. Tetrahedron 39 : 629-638.
- Berland, B.R., D.J. Bonin and A.L. Cornu, 1972. The antibacterial substances of the marine alga *Stichochrysis immobilis* (Chrysophyta). J. Phycol. 8 : 383-392.
- Biard, J.F., 1980. Recherche et étude de substances antimicrobiennes et antinéoplasiques dans les algues benthiques des côtes Atlantiques Françaises. Ph.D. Thesis, University of Nantes (France), 292 pp.
- Biard, J.F., J.F. Verbist, R. Floch and Y. Letourneux, 1980. Diterpene ketols with antimicrobial activity from *Bifurcaria bifurcata*. Pl. Med. 40 : 288-294.
- Bocker, H. and H. Thrum, 1966. Über antibiotischen Eigenschaften von Meeresalgen aus den Küstengewässern der Insel Hiddensee (Ostsee). Monatsber. Dtsch. Akad. Wiss. Berl. 8 : 816-819.
- Bocker, H. and H. Thrum, 1969. Beitrag zur Untersuchung antibiotischer Inhaltstoffe mariner Pflanzen. Limnologia 7 : 215-223.
- Burkholder, P.R., 1963. Drugs from the sea. Armed Forces Chem. J. 27 : 1-8.
- Burkholder, P.R., L.M. Burkholder and L. Almodovar, 1960. Antibiotic activity of some marine algae of Puerto-Rico. Bot. Mar. 2 : 149-156.
- Caccamese, S. and R. Azzolina, 1979. Screening for antimicrobial activities in marine algae from eastern Sicily. Pl. Med. 37 : 333-339

- Caccamese, S., R. Azzolina, E.N. Duesler, I.C. Paul and K.L. Rinehart Jr., 1980. Laurencienyne, a new acetylenic cyclic ether from the marine red alga *Laurencia obtusa*. *Tetrahedron Lett.* 21 : 2299-2302.
- Caccamese, S., R. Azzolina, F. Furnani, M. Carmacci and S. Grasso, 1981. Antimicrobial and antiviral activities of some marine algae from eastern Sicily. *Bot. Mar.* 24 : 365-367.
- Caccamese, S., R.M. Toscano, G. Furnari and M. Cormaci, 1985. Antimicrobial activities of red and brown algae from southern Italy Coast. *Bot. Mar.* 28 : 505-507.
- Cardllina, J.H., R.E. Moore, E.V. Arnold and J. Clardy, 1979. Structure and absolute configuration of malyngolide, an antibiotic from the marine blue-green alga *Lyngbia majuscula* Gomont. *J. Org. Chem.* 44 : 4039-4042.
- Carter, G.T., X.L. Rinehart, L.H. Li, S.L. Kuentzel and J.L. Connor, 1978. Brominated indoles from *Laurencia brongniartii*. *Tetrahedron Lett.* 46 : 4479-4482.
- Cembella A.D., C. Destombe and J. Turgeon, 1990. Toxin composition of alternative life history stages of *Alexandrium*, as determined by high performance liquid chromatography. In *Toxic Marine Phytoplankton*. E. Granéli et al. Editors. Elsevier Sciences Publishing Co., Inc. NY, Amsterdam, Londres: 333-338.
- Chesters, C.G.C. and J.A. Stott, 1956. Production of antibiotic substances by seaweeds. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 2 : 49-54.
- Codomier, L., Y. Bruneau, G. Combaut and J. Teste, 1977. Etude biologique et chimique d'*Asparagopsis armata* et de *Falkenbergia rufolanosa* (Rhodophycées bonnemaisoniales). *C.r. Acad. Sci. Paris.* 284 D : 1163-1165.
- Colon, M., P. Guevara, W.H. Gerwick and B. Ballantine, 1987. 5'-Hydroxyiso avrainvilleol, a new diphenyl methane derivative from the tropical green alga *Avrainvillea nigricans*. *J. Nat. Prod.* 50 :368-374.
- Cooper, S., A. Battat, P. Marsot and M. Sylvestre; 1983. Production of antibacterial activities by two bacillariophyceae grown in dialysis culture. *Can. J. Microbiol.* 29 : 338-341.
- Duff, D.C.B., b.L. Bruce and N.J. Antia, 1966. The antibacterial activity of marine planktonic algae. *Can. J. Microbiol.* 12 : 877-884.
- Durand, M., 1984. Etude biologique, cytologique et toxicologique de *Gambierdiscus* en culture, dinoflagellé responsable de la ciguatera. Ph. D. Thesis, University of Paris VII, France, 120 pp.
- Enoki, N., X. Tsuzuki, S. Omura, R. Ishida and T. Matsumoto, 1983. New antimicrobial diterpenes, dictyol F, anti-epidictyol F, from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *Chem. Lett.* 1627-1630.
- Fabregas, J. and M. Veiga, 1984. Effect of extracellular and endocellular products from the marine microalgae *Tetraselmis suecica* and *Navicula laevissima* on the growth of four marine bacteria. *Rev. Int. Oceanogr. Med.* 75-76 : 59-63.
- Fassina, G. and T. Berti, 1962. Ricerche sulle proprieta antibiotiche di alghe della costa Veneziana. *Arch.Ital. Sci. Farmacol.*, 12 : 238-246.
- Fenical, W., J.J. Sims, D. Squatrito, R.N. Wing and P. Radlick, 1973. Zonarol and isozonarol. Fungitoxic hydroquinones from the brown seaweed *Dictyopteris zonarioides*. *J. Org. Chem.* 38 : 2383.

- Fenical, W., 1974. Cyclooudesmol, antibiotic cyclopropane containing sesquiterpene from the marine alga, *Chondria opposicioda*. Dawson Tetrahedron Lett. 13 : 1137-1140.
- Fenical, W. and O. Mc Connell, 1976. Simple antibiotic from the red seaweed *Dasya pedicellata* var. *stanfordiana*. Phytochemistry 15 : 435-436.
- Fenical, W. and V.J. Paul, 1984. Antimicrobial and cytotoxic terpenoids from tropical green algae of the faunic Udoteaceae. Hydrobiologia 116-117 : 137-140
- Findlay, J.A. and A.D. Patil, 1984. Antibacterial constituents of the diatom *Navicula delognei*. J. Nat. Prod., 47-5 : 815-818.
- Finer, J., J. Clardy, S. Fenical, L. Minale, R. Riccio, J. Battaile, M. Kirkup and R.E. Moore, 1979. Structure of dictyodial and dictyolactone, unusual marine diterpenoid. J. Org. Chem. 44 : 2044-2047.
- Gauthier, M.J., 1969. Activité antibactérienne d'une diatomée marine *Asterionella notata* (Grun.). Rev.Int. Océanogr. Méd., 25-26 : 103-165.
- Gauthier, M.J., 1980. Note sur la fréquence de la production d'antibiotiques lipidiques chez les algues planctoniques. Rev. Int. Océanogr. Méd. 58 : 41-44.
- Gauthier, M.J., P. Bernard and M. Aubert, 1978. Modification de la fonction antibiotique de deux diatomées marines *Asterionella japonica* (Cleve) et *Chaetoceros lauderi* (Ralfs) par le dinoflagellé *Prorocentrum micans* (Ehrenb.). J.Exp. Mar. Biol. Ecol. 33 : 37-50.
- Gerwick, W. and W. Fenical, 1982. Phenolic lipids from related marine algae of the order Dictyotales. Phytochemistry 21 : 633-637.
- Gerwick, W.H., S. Reyes & B. Alvarado, 1986. Two malyngamides from the Caribbean cyanobacterium *Lyngbia majuscula*. Phytochemistry 26 : 1701-1704.
- Glombitza, K.W., 1969. Antibakterielle Inhaltstoffe in Algen. I : Mitteilung Helgol. wiss. Meeresunters. 19 : 376-384.
- Glombitza, K.W., 1970. Antimicrobial constituents in algae. Quantitative determination of acrylic acid in sea-algae. Pl. Med. 18 : 210-221.
- Glombitza, K.W. and K. Klapperich, 1985. Antibiotics from algae XXXIV. Cleavage of the high molecular weight methylated phlorotannin fraction from the brown alga *Pelvetia canaliculata*. Bot. Mar. 139-144.
- Grauer, F.H., 1959. Dermatitis escharotica caused by a marine alga. Hawaii Med. J. 19 : 32-34.
- Grosse-Damhues, J., K.W. Glombitza and H.R. Schulten, 1983. Antibiotics from algae XXXIX. An eight-ring phlorotannin from the brown alga *Himanthalia elongata*. Phytochemistry 22 : 2043-2046.
- Gueho, E., D. Pesando and M. Barelli, 1977. Propriétés antifongiques d'une diatomée *Chaetoceros lauderi* (Ralfs). Mycopathologia 60 : 105-107.
- Gupta, A.B. and G.C. Shrivastava, 1965. On antibiotic properties of some fresh water algae. Hydrobiologia 25 : 285-288.
- Halvorson, M.J., D. Testrake and D.F. Martin, 1984. Effect of aponin, substance from a green alga *Nannochloris* species, on the spore germination of two fungi. Microbios 41 : 105-113.

- Hansen, 1973. Antibiotic activity of the Chrysophyte *Ochromonas malhamensis*. *Physiol. Pl.* 29 : 234-238.
- Harder, R. and A. Oppermann, 1953. Über antibiotische stoffe bei den Grün-Algen *Stichococcus baccularis* und *Protosiphon bomyoides*. *Arch. Microbiol.* 19 : 398-401.
- Harris, D.O., 1973. A study of water-soluble inhibitory compounds (algicides) produced by fresh-water algae. NTIS Pub., Washington, DC, 229 : 831
- Henriquez, P., R. Candia, P. Norambuena, M. Silva and R. Zelman, 1979. Antibiotic properties of marine algae II. Screening of Chilean marine algae for antimicrobial activity. *Bot. Mar.* 22 : 451-453.
- Hirschfeld, B.R., W. Fenical, G.H.Y. Lin, R.M. Wing, P. Radlick and J.J. Sims, 1973. Pachydictyol A, an exceptional diterpene alcohol from the brown alga *Pachydictyon coriaceum*. *J. Am. Chem. Soc.* 95 : 4049-4050.
- Hoppe, H.A., 1979. Marine algae and their products and constituents in pharmacy. In *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. H.R. Hoppe, R. Levring & Y. Tanaka, Walter de Gruyter, Berlin : 25-119.
- Hornsey, I.S. and Hide, 1974. The production of antimicrobial compounds by british marine algae. I. Antibiotic marine algae. *Br. Phycol. J.* 11 : 63-67.
- Hornsey, I.S. and D. Hide, 1976. The production of antimicrobial compounds by british marine algae. II. Seasonal variation in production of antibiotics. *Br. Phycol. J.* 20 : 21-25.
- Jorgensen, E.G. 1962. Antibiotic substances from the cells and culture solutions of unicellular algae with special references to some chlorophyll derivates. *Physiol. Pl.* : 15 : 530-545.
- Kamimoto, K. 1955. Studies on the antibacterial substances extracted from seaweeds on the growth of some pathogenic bacteria. *Jap. J. Bacteriol.* 10 : 897-902 (in Japanese).
- Kellam, S.J., R.P.J. Cannel, A.M. Owsianka, and J.M. Walter, 1988. Results of a large scale screening programme to detect antifungal activity from marine and freshwater microalgae in laboratory culture. *Br. Phycol. J.* : 45-47.
- Khaleafa, A.F., A.M. Kharboush, A. Metwalli, A.F. Mohsen and A. Serwi, 1975. Antibiotic fungicidal action from extracts of some seaweeds. *Bot. Mar.* 18 : 163-165.
- Kobbia, I.A. and D. Zaki, 1976. Biological evaluation of algal filtrates. *Pl. Med.* 30-: 90-92.
- Kodama, M. and T. Ogata, 1983. Acrylic acid as an antibacterial substance in scallop. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 49 : 1103-1107.
- Kogure, K., U. Simidu, and N. Taga, 1979. Effect of *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve on the growth of marine bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 36 : 201-215.
- Ma, J.W. and W.C. Tang, 1984. Screening for antimicrobial activities in marine algae from the Qingdao coast, China. *Hydrobiologia* 116/117 : 517-520.
- Martin, D.F. and A.B. Chatterjee, 1971. Some chemical and physical properties of two toxins from the red tide organism *Gymnodinium breve*. *Fish. Bull.* 68 : 433-443
- Martinez-Nadal, N.G., C.M. Casillas-Chapel, L.V. Rodriguez, J.R. Rodriguez- Perazza and L. Torres-Vera, 1966. Antibiotic properties of marine algae. III : *Cymopolia barbata*. *Bot. Mar.* 9 : 21-26.

- Maurer, C.C., 1965. Investigacion de sustancias antibacterianas en algas marinas chilenas. An. Fac. Quim. Farm. Univ. Chile 16 : 114-121.
- Mautner, H.G., G.M. Gardner and R. Pratt, 1953. Antibiotic activity of seaweeds extracts. J. Am. Pharm. Ass. Scient. Ed. 43 : 294-296.
- Moikeha, S.N. and G.W. Chu, 1971. Dermatitis-producing alga *Lyngbia majuscula* Gomont in Hawaii. II. Biological properties of the toxic factor. J. Phycol. 7 : 8-13
- Moon, R.E. and D.F. Martin, 1981. Assay of diverse biological activities of materials elaborated by a marine blue-green alga, *Gomphosphaeria aponina*. Microbios Lett. 18 : 103-110.
- Moreau, J., D. Pesando and B. Caram, 1984. Antifungal and antibacterial screening of Dictyotales from the French Mediterranean coast. Hydrobiologia 116/117: 521-524.
- Moreau, J., D. Pesando, P. Bernard, B. Caram and J.C. Pionnat, 1988. Seasonal variations in the production of antifungal substances by some Dictyotales (brown algae) from the French Mediterranean coast. Hydrobiologia. 162 : 157-162.
- Mynderse, J.S. and R.E. Moore, 1978. Toxins from blue-green algae structures of oscillatoxin A and three related bromine containing toxins. J. Org. Chem. 43 : 2310-2303.
- Naqvi, S.W.A., Solimabi, S.Y. Kamat, L. Fernandes, C.V.G. Reddy, D.S. Bhakuni and B.N. Dhawan, 1980. Screening of some marine plants from the Indian coast for biological activity. Bot. Mar. 24 : 51-55.
- Needler, A.B., 1949. Paralytic shellfish poisoning and *Gonyaulax tamarensis*. J. Fish. Res. Bd. Can. 7 : 490-504.
- Nicod, F., F. Tillequin and J. Vaquette, 1987. Métabolite halogéné nouveau, substance majoritaire de *Ptilonia magellanica*, algue Rhodophycée. J. Nat. Prod. 50 : 259-260.
- Ohta, K., 1977. Antimicrobial compounds in the marine red alga *Beckerella subcostatum*. Agric. Biol. Chem. 41 : 2105-2106.
- Ohta, X. and Takagi M., 1977a. Antimicrobial compounds of the marine red alga *Marginisporum aberrans*. Phytochemistry 16 : 1085-1086.
- Ohta, K. and Takagi M., 1977b. Halogenated sesquiterpenes from the marine red alga *Marginisporum abberans*. Phytochemistry 16 : 1062-1063.
- Olesen, P.E., A. Marezki and L.A. Almodovar, 1964. An investigation of antimicrobial substances from marine algae. Bot. Mar. 6 : 224-232.
- Padmakumar, K. and K. Ayyakkannu, 1986. Antimicrobial activity of some algae of Porto Novo and Pondicherry waters, east coast of India. Indian J. of Mar. Sci. 15 : 187-188.
- Pande, B.N. and A.B. Gupta, 1977. Antibiotic properties of *Chlorococcum humicolum* (Naeg) Rabeuh (Chlorophyceae). Phycologia 16 : 439-441.
- Paster, Z., 1973. Pharmacology and mode of action of prymnesin. In D. Martin & G. Padilla (eds), Marine Pharmacognosy. Academic Press., N.Y. : 241-263.
- Pedersen, M., and E.J. Da Silva, 1973. Simple brominated phenols in the blue-green alga *Calothrix brevissima* West. Planta 115 : 83-86.

- Pesando, D. 1985. Etude des propriétés antifongiques et antibactériennes d'algues marines. Isolement, étude chimique et activité d'un polysaccharide et d'un glycolipide extraits de deux diatomées *Chaetoceros lauderi* Ralfs et *Asterionella japonica* Cleve. Ph. D. Thesis. University of Paris VI. 136 pp.
- Pesando, D. and B. Caram, 1984. Screening of marine algae from the French Mediterranean coast for antibacterial and antifungal activity. Bot. Mar. 27 : 3281-3286.
- Pesando, D., M. Gnassia-Barelli and E. Gueho, 1979a. Antifungal properties of some marine algae. In Marine Algae in Pharmaceutical Science. T. Levring & Y. Tanaka (eds), Walter de Gruyter Berlin : 461-472.
- Pesando, D., M. Gnassia-Barelli and E. Gueho, 1979b. Partial characterization of a specific antibiotic, antifungal substance isolated from the marine diatom *Chaetoceros lauderi* Ralfs. In Marine Algae in Pharmaceutical Science. H.A. Hoppe, T. Levring & Y. Tanaka (eds) Walter de Gruyter, Berlin : 447-459.
- Pesando, D., M. Gnassia-Barelli, E. Gueho, M. Rinaudo and J. Defaye, 1980. Isolement, étude structurale et propriétés antibiotiques et antifongiques d'un composant polysaccharidique de la diatomée marine *Chaetoceros lauderi* Ralfs. Oceanis. Fasc. Hors-Sér. : 561-568.
- Pesando, D; 1990. Antibacterial and antifungal activities of marine algae. in Introduction to Applied Phycology. Akatzuka I. (ed) SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands : 3-26.
- Prakash, A., 1967. Growth and toxicity of a marine dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*. J. Fish. Res. Bd. Can., 24 : 1589-1606.
- Ramamurthy, V.D., 1970. Antibacterial activity of the marine blue-green algae *Trichodesmium erythreum* in the gastro-intestinal contents of the sea gull *Larus brumicephalus*. Mar. Biol. 6 : 74-76.
- Rao, P. and K.S. Parekh, 1981. Antibacterial activity of Indian seaweed extracts. Bot. Mar. 24 : 577-582.
- Reichelt, J.L. and M.A. Borowitzka, 1984. Antimicrobial activity from marine algae : results of a large scale screening programm. Hydrobiologia 116- 117 : 29-40.
- Roos, H., 1957. Untersuchungen über das Vorkommen antimikrobieller Substanzen in Meeresalgen. Kieler Meeresforsch. 13 : 41-58.
- Sharma, G.M., L. Michaels and P.R. Burkholder, 1968. Goniiodomin, a new antibiotic from a dinoflagellate. J. Antibiot. 21 : 659-664.
- Shimizu Y., S. Gupta and A.V. Krishna Prasad, 1990. Biosynthesis of dinoflagellate toxins. In Toxic Marine Phytoplankton. E. Granéli et al. Editors. Elsevier Sciences Publishing Co., Inc. N.Y., Amsterdam, Londres: 62-73.
- Sieburth, J. McN., 1960. Acrylic acid, an "antibiotic" principle in *Phaeocystis* blooms in antarctic waters. Science 132 : 676-677.
- Sieburth, J. McN., 1964. Antibacterial substances produced by marine algae. Dev.Ind. Microbiol. 5 : 124-134 .
- Sievers, R.M., 1969. Comparative toxicity of *Gonyaulax monilata* and *Gymnodinium breve* to annelids, crustaceans, molluscs and a fish. J. Protozool. 16 : 401-404.

- Siuda, J.F., G.R. Van Blaricom, P.D. Shaw, R.D. Johnson, R.H. White, L.P. Hager and K.L. Rinehart, 1975. 1-iodo-3,3-dibromo-2-heptanone and related compounds from the red alga *Bonnemaisonia hamifera*. J. Am. Chem. Soc. 97 : 937-938.
- Starr, T.J., E.F. Deig, K.K. Church & M.B. Allen, 1962. Antibacterial and antiviral activities of algal extracts studied by acridine orange staining. Texas Rep. Biol. Med. 20 : 271-278.
- Stemann-Nielsen, E., 1955. The production of antibiotics by planktonic algae and its effects upon bacterial activities in the sea. Deep Sea Res. 3 : 281-286.
- Stierle, D.B. and J.J. Sims, 1979. Polyhalogenated cyclic monoterpenes from the red alga *Plocamium cartilagineum* of Antarctica. Tetrahedron 35 : 1261-1267.
- Taylor, R.F., M. Ikawa, J.J. Sasner, F.P. Thurberg and K.K. Andersen, 1974. Occurrence of choline esters in the marine dinoflagellate *Amphidinium carteri*. J. Phycol. 10 : 279-283.
- Trick, C.G., R.J. Andersen and P.J. Harrison, 1984. Environmental factors influencing the production of an antibacterial metabolite from a marine dinoflagellate, *Prorocentrum minimum*, Can. J. Fish Aquat. Sci. 41 : 423-432.
- Trick, C.G., P.J. Harrison and R.J. Andersen, 1981. Extracellular secondary metabolite production by the marine dinoflagellate *Prorocentrum minimum* in culture. Can. J. Fish Aquat. Sci. 38 : 864-867.
- Tringali, C., M. Piatelli, G. Nicolosi and K. Hostettmann, 1986. Molluscicidal and antifungal activity of Diterpenoids from brown algae of the family Dictyotaceae. Pl. Med. 5 : 404-405.
- Viso, R.C., D. Pesando and C. Baby, 1987. Antibacterial and antifungal properties of some marine diatoms in culture. Bot. Mar. 30 : 41-45.
- Waraszkiewicz, S.M. and K.L. Erickson, 1974. Halogenated sesquiterpenoids from the Hawaiian marine alga *Laurencia nidifica* : nidificene and nidifidiene. Tetrahedron Lett. 23 : 2003-2006.
- Welch, A.M., 1962. Preliminary survey of fungistatic properties of marine algae. J. Bacteriol. 83 : 97-99.
- Wratten, S.J. and D.J. Faulkner, 1976. Cyclic polysulfides from the red alga *Chondria californica*. J. Org. Chem. 41 : 2465-2467.
- Wratten, S.J. and Faulkner D.J., 1977. Metabolites of the red alga *Laurencia subopposita*. J. Org. Chem. 42 : 3343-3349.
- Yasumoto T. 1990. Marine microorganisms toxins - an overview. In Toxic Marine Phytoplankton. E. Granéli et al. Editors. Elsevier Sciences Publishing Co., Inc. N.Y., Amsterdam, Londres.: 3-8.
- Zajic J.E. and E. Knetting, 1970. Antibiotic and medicinal uses. In , Properties and products of algae. Proceedings of the Symposium on the culture of algae, J.E. Zajic (ed.) N.Y. City, Sept. 7-12., 1969. Plenum press N.Y. : 154 pp.

UTILISATION DES SUBSTANCES NATURELLES MARINES

Lionel CHEVOLOT, CNRS.

Laboratoire de Biologie Marine. Université de Nantes
2 rue de la Houssinière 44072 NANTES.

Jusqu'à présent, relativement peu de substances naturelles extraites d'organismes marins sont réellement utilisées. Cette situation est le résultat d'une exploration tardive du milieu marin qui reste, malgré les progrès récents, difficile d'accès. De plus, pendant longtemps, les seules études menées l'ont été en vue d'une utilisation en médecine humaine, ce qui limite de beaucoup le champ des applications potentielles qui sont beaucoup plus nombreuses.

Je souhaite qu'au fil des différents "Colloques de Biotechnologies Marines" soient passés en revue les différents domaines où les molécules marines sont susceptibles de connaître des développements futurs. Présentement, quatre communications sont faites faisant le point sur les antibiotiques, les anticancéreux et les antioxydants. Historiquement la recherche des deux premiers types d'activité est la plus ancienne et a fait l'objet du plus de travaux, le bilan est maintenant significatif et mérite d'être présenté. Il existe une demande forte de la part des industries agro-alimentaires et cosmétiques pour des antioxydants naturels ce qui fait du troisième exposé un sujet d'actualité.

PROPRIETES ANTIOXYDANTES D'EXTRAITS D'ALGUES.

Bernard LE TUTOUR
Laboratoire de Génie des Procédés
I.U.T. de Saint-Nazaire
B.P. 420
44606 SAINT-NAZAIRE Cedex

RESUME

Des extraits de 7 espèces d'algues alimentaires sont préparés et incorporés séparément dans une huile de tournesol commerciale. Leurs propriétés antioxydantes sont évaluées en suivant l'évolution de l'indice de peroxyde de cette huile.

Une étude cinétique détaillée de l'oxydation induite par l'AIBN de linoléate de méthyle en solution dans l'heptanol et de son inhibition par deux extraits d'algues est ensuite décrite. Aux concentrations égales ou supérieures à 1% du substrat, ces extraits présentent des périodes d'inhibition relativement longues, mais une efficacité très faible.

Par contre, lorsqu'ils sont associés à la vitamine E (α -tocophérol), ils agissent en synergie avec elle, l'effet de synergie augmentant avec la concentration initiale en vitamine E. Pendant la période d'inhibition, l'efficacité est celle de la vitamine E, y compris pendant l'extension due à l'effet de synergie.

Mots - clés :

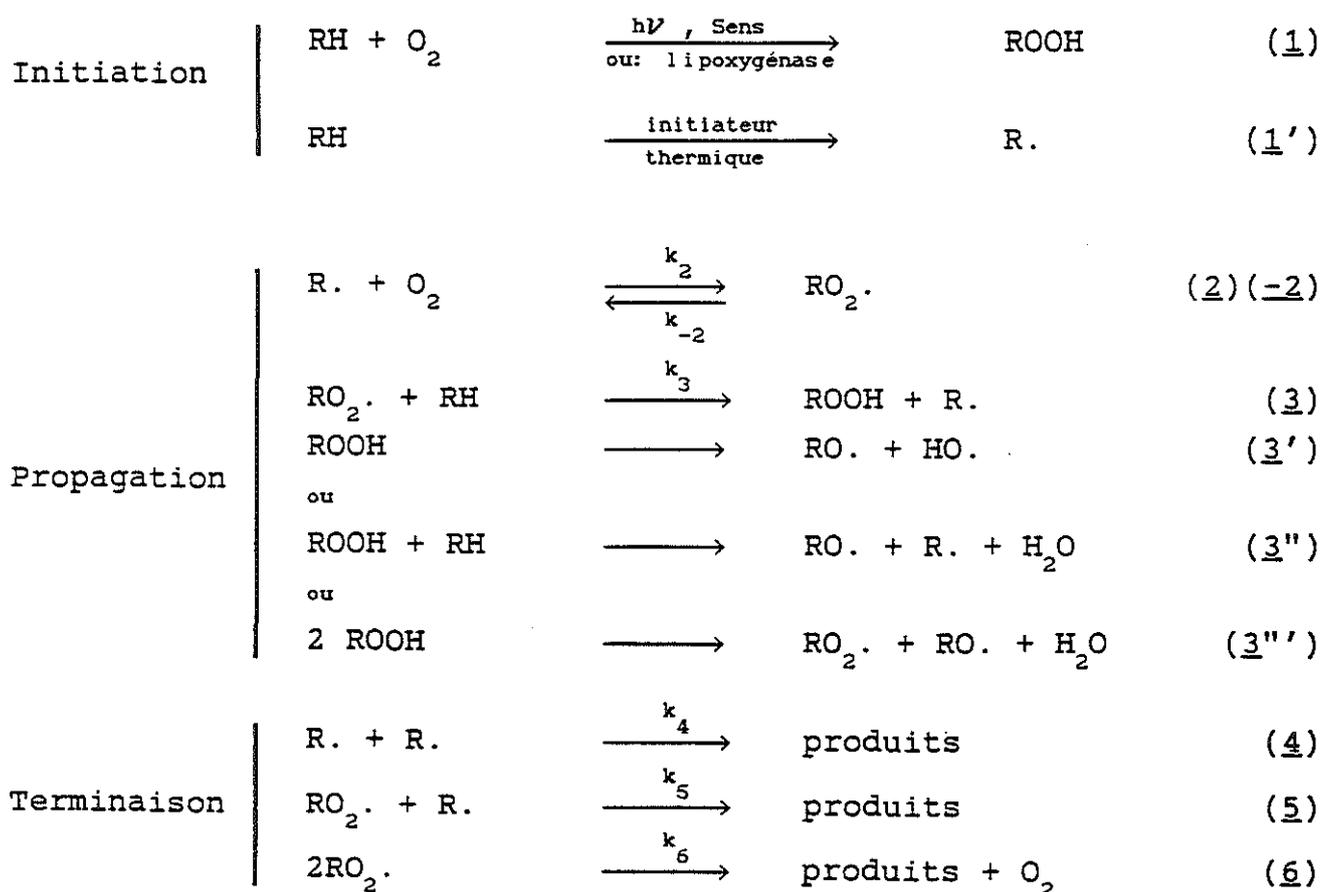
algues - antioxydant - oxydation - synergie - vitamine E -
Linoléate de méthyle - huile de tournesol - docosahexaénoate
d'éthyle - eicosapentaénoate d'éthyle.

INTRODUCTION

L'oxydation lente des acides gras polyinsaturés présente de nombreux inconvénients, tant dans le domaine alimentaire par le rancissement des lipides [1-3] qu'en biologie où elle induit des modifications du métabolisme et le vieillissement cellulaire [4,5].

1.1. Réactions d'oxydation des acides gras insaturés en phase liquide

Pour des températures inférieures à 100°C, cette oxydation relève d'un mécanisme radicalaire en chaîne qui implique généralement les processus suivants [1,6-12] :



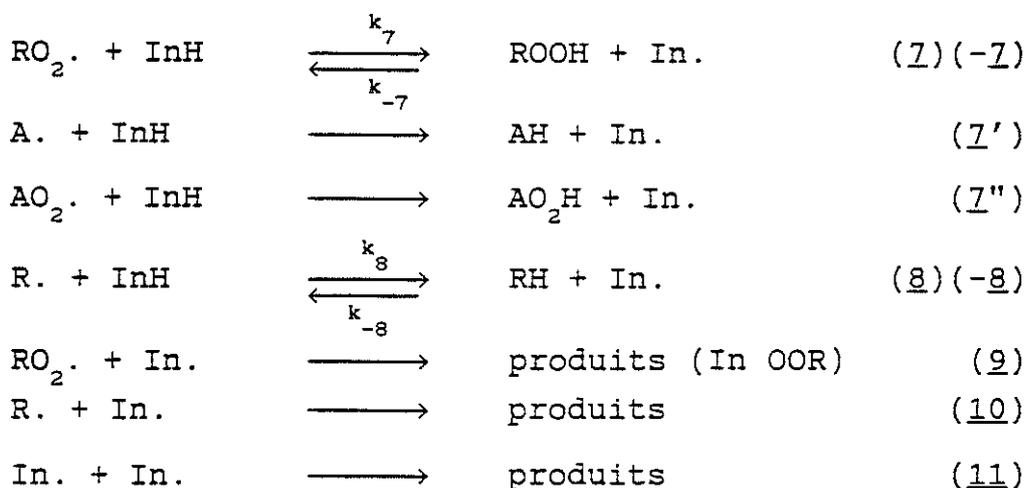
La réaction peut être amorcée soit par voie photochimique, souvent en présence d'un photosensibilisateur, soit par voie enzymatique, soit par décomposition thermique d'un initiateur.

Les radicaux alkyles R. obtenus sont extrêmement réactifs vis à vis de l'oxygène ($k_2 \approx 10^7 - 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [7]), conduisant aux radicaux peroxy qui propagent la chaîne par le processus (3). L'hydroperoxyde formé peut également réamorcer la chaîne après décomposition en espèces réactives ROO., RO. et HO. .

Les terminaisons de chaînes se font principalement par couplage de radicaux.

1.2. Mécanismes d'action des antioxydants in vitro

En présence d'un inhibiteur InH, si l'on admet que celui-ci ne s'oxyde pas, le schéma cinétique s'enrichit des étapes élémentaires suivantes :



Les antioxydants peuvent retarder l'oxydation des lipides par différents mécanismes :

mécanisme_1 : par réaction avec les radicaux peroxy selon les processus (7) et (9). Il s'agit habituellement de phénols (BHA, BHT, TBHQ, tocophérols, gallates...) ou d'amines aromatiques.

mécanisme_2 : par réaction avec les radicaux alkyles selon les processus (8) et (10). Ces inhibiteurs, tels que les quinones et méthylènequinones sont actifs quand la $[O_2]$ est faible dans le milieu.

mécanisme_3 : par réaction avec l'oxygène. Les plus connus de ces antioxydants sont la vitamine C et ses dérivés.

mécanisme_4 : par décomposition des hydroperoxydes sans régénération de radicaux libres (suppression des processus (3'), (3'') et (3''')) : acide thiodipropoïque, thiophosphates,...

mécanisme_5 : par complexation des ions métalliques tels que Fe^{2+} , Cu^{2+} ,..... En effet, ces ions métalliques catalysent la décomposition des hydroperoxydes [12] :



On remarque que les ions métalliques sont actifs quelque soit leur degré d'oxydation, si bien que des traces suffisent à générer des radicaux et amorcer la réaction en chaîne.

Des agents complexants tels que l'acide citrique ou l'E.D.T.A. détruisent l'activité catalytique de ces ions métalliques .

mécanisme_6 : par réaction enzymatique. Ces antioxydants consomment l'oxygène présent (ex : la glucose oxydase) ou détruisent l'anion superoxyde O_2^- (ex : la superoxyde dismutase).

1.3. Antioxydants naturels et synthétiques

Les molécules de synthèse (BHA, BHT, esters de l'acide gallique,...) sont couramment utilisées dans l'industrie alimentaire du fait de leur grande efficacité et de leurs prix très bas, mais les risques potentiels de toxicité qu'entraîne leur ingestion ne sont pas toujours bien connus [12,13].

Les deux principaux antioxydants d'origine naturelle actuellement utilisés sont les tocophérols (mélanges d'isomères α , γ et δ) et la vitamine C.

On peut également mentionner les extraits de soja et de romarin [12].

Il existe par ailleurs un nombre incalculable de travaux rapportant les propriétés antioxydantes de substances naturelles. Celles-ci sont généralement des dérivés polyhydroxylés de flavones, de chalcones, ou des acides phénoliques [12,14].

Curieusement le pouvoir antioxydant d'extraits d'algues alimentaires a été peu étudié [15-23]. La plupart des travaux se rapportent à des algues des côtes japonaises.

Parmi 21 espèces d'algues étudiées par KANEDA et coll.[16], 12 (60 %) présentaient un pouvoir antioxydant plus ou moins puissant.

Les principes actifs identifiés étaient soit des phospholipides extraits de *Porphyra tenera* [15] et de *Eisenia bicyclis* [16], soit des monophénols et ortho-diphénols substitués extraits de *Polysiphonia urceolata* [17-18]. Les tentatives pour isoler les principes actifs de *Undaria pinnatifida* n'aboutissaient pas et les auteurs concluaient à un effet probable de synergie entre plusieurs substances [16].

Dernièrement OYAIZU [21] estimait que l'activité antioxydante de certains extraits d'algues provenait des pigments lipophiles et NISHIBORI et coll. [19,20] identifiaient dans un extrait d'aonori la phéophytine a comme antioxydant le plus actif.

Dans notre laboratoire nous nous sommes intéressés aux algues alimentaires des côtes françaises.

RESULTATS ET DISCUSSION

Sept espèces d'algues alimentaires commerciales étaient testées : 3 algues brunes (*Himanthalia élongata*, *Laminaria digitata*, *Undaria pinnatifida*), 2 algues vertes (*Ulva lactuca*, *Entéromorpha*) et 2 algues rouges (*Porphyra sauvage*, *Rhodymenia palmata*).

Tous les extraits obtenus étaient d'un vert noirâtre. Les rendements d'extraction sont consignés dans le tableau I.

Dans un premier temps, nous avons mesuré l'évolution de l'indice de peroxyde [24] d'une huile de tournesol commerciale à 75°C en présence des extraits. La figure 1 illustre cette évolution et le tableau I présente les pouvoirs antioxydants des différents extraits testés et du BHT. Le facteur de protection FP_n est défini par l'équation $FP_n = T_n / T_n^0$. Dans cette équation, T_n est le temps mis par l'échantillon pour atteindre un indice de peroxyde de valeur n (méq/Kg), et T_n^0 est le T_n du témoin.

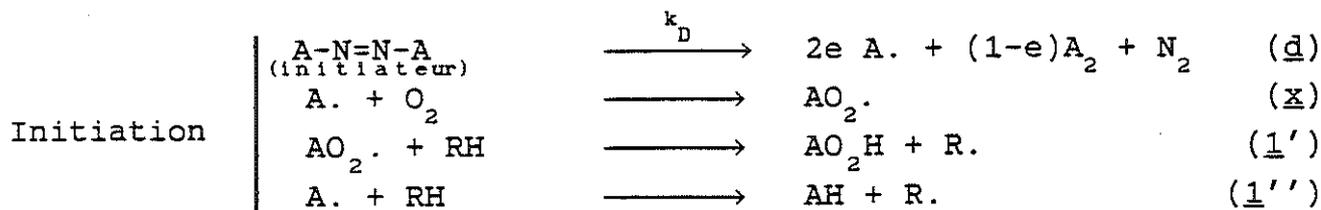
La plupart des extraits étaient testés à la concentration de 1 % identique à celle choisie par FUJIMOTO et coll. [16-18]. Cette valeur est élevée, comparée à la concentration de 500 mg/kg utilisée pour le BHT (la législation tolère habituellement 0-100 ou 0-200 mg/Kg pour les antioxydants de synthèse). Il faut cependant noter que les extraits d'algues ne sont évidemment pas des substances chimiquement pures et que seuls quelques constituants peuvent présenter une action antioxygène.

Les extraits d'*Himanthalia élongata* et *Laminaria digitata* présentaient les meilleurs facteurs de protection à 75°C, et plus particulièrement au départ où FP_{20} était supérieur à 4.

Il semblait donc bien que des antioxydants pouvaient être isolés de ces deux extraits.

Pour obtenir une meilleure reproductibilité des résultats, nous avons dans un deuxième temps, mesuré les pouvoirs antioxydants de ces deux extraits dans un système modèle [11].

L'oxydation du linoléate de méthyle RH en solution dans l'heptanol est amorcée par la décomposition thermique de l'AIBN (2,2' - Azo-bis-iso-butyrionitrile).



Cette technique permet de connaître la vitesse d'initiation R_i [25-27] :

$$R_i = 2e k_d [\text{AIBN}]_0 \exp(-k_d \cdot t) \quad (\text{I})$$

où $[\text{AIBN}]_0$ est la concentration initiale en amorceur.

En absence d'inhibiteur, on observe une absorption régulière d'oxygène R_{ref} :

$$-\frac{d[\text{O}_2]}{dt} = R_{\text{ref}} = k_3 (2 k_6)^{-1/2} R_i^{1/2} [\text{RH}] \quad (\text{II})$$

La présence d'un antioxydant réduit la vitesse d'absorption d'oxygène R_{inh} pendant la période d'inhibition t_{inh} :

$$R_{\text{inh}} = \frac{k_3 R_i [\text{RH}]}{f k_7 [\text{InH}]} \quad (\text{III})$$

Le coefficient stoechiométrique d'inhibition f représente le nombre de chaînes terminées par une molécule d'inhibiteur entrant dans la réaction (7).

Lorsque la période d'inhibition t_{inh} est écoulée, la vitesse de propagation R_p devient sensiblement égale à R_{ref} .

Pour situer t_{inh} nous avons choisi la méthode graphique proposée par TSEPALOV et coll. [28, et 11].

Nous avons examiné successivement l'influence des concentrations initiales des extraits d'*Himanthalia elongata* et de *Laminaria digitata* sur les périodes d'inhibition t_{inh} et sur les vitesses initiales de consommation d'oxygène R_{inh} dans l'heptanol, sous 500 torr d'oxygène, à 60°C. Les résultats expérimentaux sont rassemblés dans le tableau II.

L'effet inhibiteur est nettement visible à la concentration de 1 % du substrat et augmente ensuite avec $[InH]_0$ (fig. 2 et 3).

Cependant l'efficacité des extraits n'est pas comparable à celle de la vitamine E, la consommation d'oxygène restant importante pendant la période d'inhibition.

Nous avons tracé les rapports d'inhibition R_{inh} / R_{ref} en fonction du rapport $[InH]_0 / [RH]_0$ pour le BHT, la vitamine E (TH) et nos deux extraits (fig. 4). Les concentrations $[InH]_0$ et $[RH]_0$ sont exprimées en g/l. Ce graphe illustre bien la différence d'efficacité au départ entre les extraits bruts d'une part et les deux substances pures d'autre part.

En admettant $k_3 = 189 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 60°C dans l'heptanol [29,30], l'éq. (III) nous donne ($[RH]$ en mole.L⁻¹ et $[INH]$ en g.L⁻¹):

pour la vitamine E	:	$fk_7 = 182000 \text{ g}^{-1} \cdot \text{litre} \cdot \text{s}^{-1}$
pour le BHT	:	$fk_7 = 37250 \text{ g}^{-1} \cdot \text{litre} \cdot \text{s}^{-1}$
pour <i>Laminaria digitata</i>	:	$fk_7 = 440 \text{ g}^{-1} \cdot \text{litre} \cdot \text{s}^{-1}$
pour <i>Himanthalia élongata</i>	:	$fk_7 = 300 \text{ g}^{-1} \cdot \text{litre} \cdot \text{s}^{-1}$

Ces deux dernières valeurs sont calculées à partir des résultats obtenus à la concentration de 1 % du substrat. Cette valeur a été choisie car le rapport d'inhibition enregistre une chute sensible entre 0 et 1 % d'inhibiteur (cf. fig.4).

Une autre caractéristique du pouvoir antioxydant est la durée d'inhibition t_{inh} . Pour la déterminer avec précision, il faut une cassure nette dans le tracé de la courbe d'absorption d'oxygène ($R_p \gg R_{inh}$), ce qui n'est pas le cas lorsque les cinétiques sont réalisées en présence des extraits de *L. digitata* ou *H. élongata*.

D'autre part, à la fin de la période d'inhibition la courbe devient généralement parallèle à celle du témoin traduisant des vitesses de consommation d'oxygène égales ($R_p = R_{ref}$ comme pour la courbe correspondant à la vitamine E sur les fig. 2 et 3). Or si c'est pratiquement le cas en présence de nos extraits à la concentration de 1 % du substrat, on n'observe plus un tel parallélisme à la concentration de 3 %. En présence d'extraits de *Laminaria digitata* la période d'inhibition est évaluée à 3060 s à 60°C mais la vitesse de consommation d'oxygène après cette période ne représente que 60 % de celle du témoin. En présence d'*Himanthalia élongata*, ces valeurs sont de 1500 s et 52 %. Les valeurs de t_{inh} rapportées dans le tableau II sont donc sans doute sous-évaluées pour des concentrations en extraits égales à 3 % du substrat.

La figure 5 présente les courbes de disparition, mesurée par CPG, du linoléate de méthyle à la température de 60°C, en présence ou non d'extrait de *Laminaria digitata* (0 ou 3 % du substrat). Par cette méthode, la durée de la réaction peut être nettement prolongée. Or on remarque bien que même après 8 heures d'expérimentation les deux courbes ne sont pas parallèles : la vitesse de consommation du substrat est réduite en présence de l'extrait d'algue.

Les deux extraits testés présentent donc une action antioxydante aux concentrations égales ou supérieures à 1 % du substrat. L'effet inhibiteur augmente ensuite avec $[InH]_0$, mais cette augmentation se traduit surtout par une prolongation de la période d'inhibition plutôt que par une amélioration de l'efficacité qui reste faible.

Si l'on fait le rapport des valeurs du produit fk_7 , les extraits d'algues semblent disposer d'une efficacité égale à $\approx 0,2$ % de celle de la vitamine E.

Cependant, les Fig. 2 et 3 montrent clairement que les extraits d'algues ajoutés à raison de 3 % du substrat inhibent aussi bien l'oxydation du linoléate de méthyle que la vitamine E utilisée à 0,06 %, ce qui situe le pouvoir antioxydant des extraits à 2 % de celui de la vitamine E. Les deux résultats qui diffèrent d'un facteur 10, ne sont pas incompatibles puisque le dernier intègre la plus longue durée d'inhibition assurée par les extraits d'algues.

Quoiqu'il en soit, ces valeurs ne confirmaient pas les résultats obtenus par la mesure de l'indice de peroxyde dans notre première étude.

Aussi nous avons repris le travail réalisé dans le système modèle en utilisant comme substrat une huile de tournesol commerciale au lieu du linoléate de méthyle de qualité pour analyse.

Nous avons examiné successivement l'influence des concentrations initiales des deux extraits d'algues sur les périodes d'inhibition t_{inh} et sur les vitesses initiales de consommation d'oxygène R_{inh} dans l'heptanol, sous 500 torr d'oxygène à 60°C et 75°C.

L'huile de tournesol contenait naturellement 430 mg/Kg de tocophérols ce qui, compte tenu de la concentration en substrat utilisée dans l'expérimentation, portait à $2,7 \cdot 10^{-4}$ M la concentration en vitamine E dans le milieu réactionnel.

Les fig. 6 à 9 montrent que l'effet inhibiteur apparaît aux concentrations en extraits d'algues égales ou supérieures à 1 % d'huile. Il se traduit par une augmentation de t_{inh} .

Pendant la période d'inhibition, la vitesse de consommation d'oxygène R_{inh} est sensiblement la même quelle que soit $[Algues]_0$. Le mélange vitamine E + extraits d'algues conserve donc la même efficacité que la vitamine E seule, et la période d'inhibition augmente avec $[Algues]_0$.

Nous avons réalisé la même expérimentation à 60°C en utilisant l'ACTIVEPA 50 E comme substrat.

L'ACTIVEPA 50 E est un mélange d'esters éthyliques préparés à partir d'huile de poisson enrichie en acides eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA). Il est stabilisé par l'addition d' α - tocophérol évaluée dans notre cas à 385 mg/Kg [31] ce qui, compte tenu de la concentration en substrat utilisée dans l'expérimentation, situait la concentration en vitamine E à $1,8 \cdot 10^{-4}$ M dans le milieu réactionnel.

L'effet inhibiteur des extraits d'algues apparaît à la concentration de 0,5 % du substrat et est très sensible à 1 % (fig. 10 et 11). Il se traduit par une augmentation de t_{inh} , et le mélange vitamine E + extraits d'algues conserve la même efficacité que la vitamine E seule, confirmant en cela les résultats obtenus avec l'huile de tournesol.

Finalement nous avons cherché s'il existait un effet de synergie entre les propriétés antioxydantes des extraits et celles de la vitamine E.

L'oxydation induite par l'AIBN du linoléate de méthyle en présence de mélanges TH,LD et TH,HE a été étudiée à 60°C sous 500 torr d'oxygène.

Nous avons déterminé l'influence des concentrations initiales $[TH]_0$, $[LD]_0$ et $[HE]_0$ sur les périodes d'inhibition $t_{inh}^{TH,LD}$ et $t_{inh}^{TH,HE}$ relatives à l'oxydation du linoléate de méthyle en présence des mélanges TH,LD et TH,HE. Les résultats sont consignés dans le tableau III. Lorsque l'on augmente $[LD]_0$ ou $[HE]_0$ pour une concentration initiale $[TH]_0 = 1 \cdot 10^{-4}$ M, la différence entre le temps d'inhibition observé et la somme des effets individuels est pratiquement nulle, aux incertitudes expérimentales près.

Par contre, cette différence augmente nettement avec $[TH]_0$: on observe un effet de synergie entre les extraits d'algues et la vitamine E d'autant plus fort que la concentration initiale en cette dernière est élevée. Pour $[TH]_0 = 4 \cdot 10^{-4}$ M, l'addition de l'un ou l'autre extrait à raison de 1 % du substrat, prolonge de 40 % l'action de la vitamine E.

Les fig. 12 et 13 montrent que l'efficacité des mélanges vitamine E + extraits d'algues est celle de la vitamine E quelque soit la concentration initiale en extrait.

De plus la figure 14 indique que pendant la prolongation de l'inhibition obtenue par effet de synergie, l'efficacité des mélanges est aussi celle de la vitamine E.

Ces derniers résultats confirment l'activité antioxydante relevée dans la toute première étude (mesure de l'indice de peroxyde) puisque la vitamine E se trouvait à la concentration de $9 \cdot 10^{-4}$ M dans l'huile de tournesol.

Nous pensons que l'intérêt des extraits de *L. digitata* et *H. elongata* comme agents antioxydants réside dans cette synergie d'action avec la vitamine E qui à notre connaissance n'avait pas encore été signalée.

De nombreuses substances sont connues pour agir en synergie avec la vitamine E : la vitamine C [11,32,35], certains phénols [7,11], les composés aminés [7,11], les phospholipides [36-39].

La vitamine C était présente dans nos extraits à l'état de traces: 27 µg/g d'extrait de *L. digitata* et 33 µg/g d'extrait de *H. elongata*.

Des phospholipides ont été détectés par CCM dans l'extrait de *L. digitata* mais pas dans celui d'*H. elongata*.

La vitamine E est un antioxydant extrêmement efficace, spécialement aux faibles concentrations [11,33,37,40]. Elle bloque la propagation de la chaîne d'oxydation par réaction avec les radicaux peroxy (mécanisme 1). on peut raisonnablement penser que des substances qui agissent par des mécanismes différents peuvent présenter un effet de synergie avec la vitamine E.

Cependant celle-ci perd son pouvoir antioxydant aux fortes concentrations pour devenir prooxydante [41,42]. Ceci a lieu quand les radicaux α -tocophéroxyl α -T. produits à partir de la vitamine E réinitient la propagation en chaîne par les processus (-7) et (-8), c. à d. quand la concentration en radicaux α -T. dans le milieu réactionnel devient assez élevée. Il a été démontré que de nombreux synergistes réagissent avec les radicaux α -T. pour régénérer la vitamine E, diminuant ainsi les vitesses des processus (-7) et (-8) et prolongeant la durée d'action de la vitamine E [7,11].

Nous pensons élucider prochainement le mécanisme de la synergie entre la vitamine E et les extraits de *L. digitata* et *H. elongata*.

PARTIE EXPERIMENTALE.

Les algues séchées, conditionnées par NATURE ALGUES nous étaient fournies par le Centre d'Etudes et de Valorisation des Algues CEVA de Pleubian (22610).

L'ACTIVEPA 50 E est produit par JOMAR, Bergen (Norvège).

La préparation des extraits et le suivi des cinétiques d'oxydation ont été précédemment décrits [43].

Remerciements.

Cette étude a été en partie financée par IFREMER, département Utilisation et Valorisation des Produits de la Mer, Nantes, dans le cadre d'un contrat universitaire.

REFERENCES.

- 1 - FRANKEL E.N.
Prog. Lipid Res. (1985), 23 (4), 197-221.
- 2 - ADDIS P.B.
Fd Chem. Toxic. (1986), 24 (10-11), 1021-1030.
- 3 - FINLEY J-W. ; GIVEN P.Jr.
Fd Chem. Toxic. (1986), 24 (10-11), 999-1006.
- 4 - PRYOR W.A. (éditeurs)
Free radicals in biology. Academic Press, NY.
Vol I et II (1976), III (1977), IV (1980), V (1982), VI (1984)
- 5 - SWARTZ H.M.
Free Radicals in Molecular Biology, Aging and Disease
(ARMSTRONG D., SOHAL R.S., CUTLER R.G. and SLATER T.F. éd.)
vol. 27, p. 275-292. Raven Press, New York.
- 6 - MAHONEY L.R.
Angew. Chem. Internat. Edit. (1969), 8 (8), 547-555.
- 7 - DENISOV E.T., KHUDYAKOV I.V.
Chem. Rev. (1987), 87, 1313-1357.
- 8 - TAUB I.A
J. Chem. Educ. (1984), 61 (4), 313-324.
- 9 - YAMAMOTO Y., NIKI E., KAMIYA Y.
Lipids (1982), 17 (12), 870-877.
- 10 - PORTER N.A., WUJEK D.G.
J. Am. Chem. Soc. (1984), 106 (9), 2626-2629.
- 11 - RICHARD C.
Inhibition de l'oxydation induite du linoléate de méthyle
par des dérivés phénoliques ou par les vitamines E ou C.
Thèse Sciences Nancy I. (1986).
- 12 - HUDSON B.J.F. éditeur
Food Antioxidants (1990), Elsevier Applied Science, London.
- 13 - 30^{ème} Rapport FAO/OMS (1987), Genève.
Evaluation de certains additifs alimentaires et contaminants.
- 14 - NAMIKI M.
Crit. Rev. Food Sci. Nutr. (1990), 29 (4), 273-300.
- 15 - KANEDA T., ANDO H.
Proc. Int. Seaweed Symp. (1971), 7, 553-557.
- 16 - FUJIMOTO K., KANEDA T.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. (1980), 46 (9), 1125-1130.
- 17 - FUJIMOTO K., KANEDA T.
Hydrobiologia (1984), 116-117, 111-113.

- 18 - FUJIMOTO K., OHMURA H., KANEDA T.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. (1985), 51 (7), 1139-1143.
- 19 - NISHIBORI S., NAMIKI K.
Kaseigaku Zasshi (1985), 36 (11), 845-850 (japonais).
- 20 - NISHIBORI S., NAMIKI K.
Nippon Kaseigaku Kashi (1988), 39(11), 1173-1178.
- 21 - OYAIZU M.
J. Jap. Soc. for Cold Preservation of Food- Nippon
Shokukin Teion Hozogaku Kaishi (1989), 15(1), 18-21.
- 22 - ALBECK M., GROSSMAN S.
Eur. Pat. Appl. EP 27 1133 A1 (1988)
de Chem. Abs. 109 : 134963u.
- 23 - GROSSMAN S., ALBECK M.
Eur. Pat. Appl. EP 269 545 A1 (1988)
de Chem. Abs. 109 : 109172c.
- 24 - AOCS (1973) "Official and tentative methods", 3rd edition.
American Oil Chemists' Society - Chicago.
- 25 - BOOZER C.E, HAMMOND G.S., HAMILTON C.E., SEN J.N.
J. Am. Chem. Soc. (1955), 77, 3233-3237.
- 26 - VAN HOOK J.P., TOBOLSKY A.V.
J. Am. Chem. Soc. (1958), 80, 779-782.
- 27 - BARCLAY L.R.C., INGOLD K.U.
J. Am. Chem. Soc. (1981), 103 (21), 6478-6485.
- 28 - TSEPALOV V.F., KHARITONOVA A.A., GLADYSHEV G.P., EMANUEL'
N.M.
Kinet. Catal. (1977), 18 (5), 1034-1039.
- 29 - HOWARD J.A., INGOLD K.U.
Can. J. Chem. (1967), 45, 793-802.
- 30 - KORSEK S., CHENIER J.H.B., HOWARD J.A. INGOLD K.U.
Can. J. Chem. (1972), 50, 2285-2297.
- 31 - SPEEK A.J., SCHRIJVER J., SCHREURS W.H.P.
J. Food Science (1985), 50, 121-124.
- 32 - BARCLAY L.R.C., LOCKE S.J., MACNEIL J.M.
Can. J. Chem. (1983), 61, 1288-1290.
- 33 - NIKI E., SAITO T., KAWAKAMI A., KAMIYA Y.
J. Biol. Chem. (1984), 259 (7), 4177-4182.
- 34 - CILLARD J., CILLARD P.
Rev. Franç. Corps Gras (1987), 34(5-6), 271-274.
- 35 - NIKI E.
Vitamins (1988), 62(11), 601-619.

- 36 - HUDSON B.J.F., GHAVAMI M.
Lebensm.-Wiss. u.-Technol. (1984), 17, 191-194.
- 37 - AOYAMA M., MARUYAMA T., KANEMATSU H., NIIYA I.,
TSUKAMOTO M., TOKAIRIN S., MATSUMOTO T.
Yukagaku (1989), 38(5), 427-431.
- 38 - POKORNY J., DAVIDEK J., VIERECKLOVA M., RANNY M., SEDLACEK J.
Die Nahrung (1990), 34(8), 719-725.
- 39 - HAMZAWI L.F.
Milchwissenschaft (1990), 45(2), 95-97.
- 40 - BURTON G.W., INGOLD K.U.
J. Am. Chem. Soc. (1981), 103, 6472-6477.
- 41 - CILLARD J., CILLARD P., CORMIER M.
J. Am. Oil Chem. Soc. (1980), 57(8), 255-261.
- 42 - KOSKAS J.P., CILLARD J., CILLARD P.
J. Am. Oil Chem. Soc. (1984) 61(9), 1466-1469.
- 43 - LE TUTOUR B.
Phytochemistry (1990), 29(12), 3759-3765.

Tableau I. Facteurs de protection des différents extraits testés et du BHT dans l'huile de tournesol à 75°C.

Algue	Rdt (%) ^a	Ajout(%) ^b	FP ₂₀ ^c	FP ₇₀	FP ₁₂₀
<i>Himanthalia elongata</i>	7.4	1	4.2	2.1	1.6
<i>Enteromorpha</i>	3.9	1	1.7	1.5	1.4
<i>Undaria pinnatifida</i>	3	1	1.4	1.2	1.1
<i>Ulva lactuca</i>	2	1	1.8	1.9	1.5
<i>Lam. digitata</i> (Kombu)	1.8	1	4.4	2.2	1.9
<i>Porphyra</i> (Nori)	0.8	0.45	1.8	2	1.5
<i>Rhodomenia palmata</i> (Dulcé)	0.7	0.24	0.9	1	1.3
BHT		0.05	2	1.5	1.2

^a Rendement en extrait: % matière sèche.

^b concentration utilisée : % (m/m) huile.

^c Facteur de Protection : $FP_n = T_n/T_n^\circ$. T_n et T_n° sont les temps nécessaires pour que l'indice de peroxyde atteigne la valeur n(méq/Kg). Pour le témoin: $T_{20}^\circ=40$, $T_{70}^\circ=140$, $T_{120}^\circ=220$ heures.

Tableau II. Oxydation induite par l'AIBN du linoléate de méthyle RH en présence d'extraits d'algues, à 60°C dans l'heptanol.

algue	[RH] ₀	[AIBN] ₀	[extraits] ₀	t _{inh}	R _i	R _p	R _{inh}
		x 10 ³			x 10 ⁸	x 10 ⁶	x 10 ⁶
	M	M	%RH	s	Ms ⁻¹	Ms ⁻¹	Ms ⁻¹
LD (a)	0.50	6.3	0	-	5.4	4.9 ^(c)	-
	0.51	6.3	0.01	180	5.5	4.7	4.0
	0.51	6.4	0.10	0	5.5	5.3	-
	0.53	6.4	0.50	60	5.5	5.0	4.4
	0.50	6.3	1	840	5.5	4.4	2.4
	0.51	6.4	3.10	3060	5.5	3.1	1.5
HE (b)	0.50	6.3	0.10	0	5.5	5.0	-
	0.52	6.4	0.50	0	5.5	4.9	-
	0.51	6.4	1.00	390	5.5	4.2	3.4
	0.50	6.3	3.00	1500	5.5	2.5	1.6

(a) *Laminaria digitata*. (b) *Himanthalia élongata*.

(c) absorption d'oxygène par le témoin au départ R_{ref}.

Tableau III. Oxydation induite du linoléate de méthyle RH à 60°C dans l'heptanol, en présence de vitamine E (TH) et d'extraits d'algues (EXT). Influence de $[TH]_0$ et $[EXT]_0$ sur les périodes d'inhibition.

$[RH]_0 = 0.5 \text{ M}$; $[AIBN]_0 = 0.0063 \text{ M}$; pression initiale d' O_2 : 500 torr.

algue	$[TH]_0$ $\times 10^4$	$[EXT]_0$ (c)	t_{inh}^{TH} (d)	t_{inh}^{EXT} (e)	$t_{inh}^{TH, EXT}$ (f)	$t_{inh}^{TH, EXT}$ $-(t_{inh}^{TH} + t_{inh}^{EXT})$	
	M	% RH	s	s	s	s	
-	1	0	3120				
	2	0	5300				
	4	0	9970				
LD (a)	1	0.5	3120	60	3660	480	
	1	1	3120	840	4140	180	
	1	3	3120	3060	6480	300	
	1	1	3120	840	4140	180	
	2	1	5300	840	7620	1480 (g)	
	4	1	9970	840	14820	4010 (g)	
	HE (b)	1	0.5	3120	0	3420	300
		1	1	3120	390	4020	510
		1	3	3120	1500	4440	-180
		1	1	3120	390	4020	510
2		1	5300	390	7320	1630 (g)	
4		1	9970	390	14700	4340 (g)	

(a) *Laminaria digitata*. (b) *Himanthalia elongata*.

(c) concentration initiale en extrait d'algue. (d) période d'induction assurée par la vitamine E seule. (e) période d'induction assurée par l'extrait seul; EXT= LD ou HE. (f) vitamine E et extraits d'algues combinés; EXT= LD ou HE. (g) effet de synergie significatif.

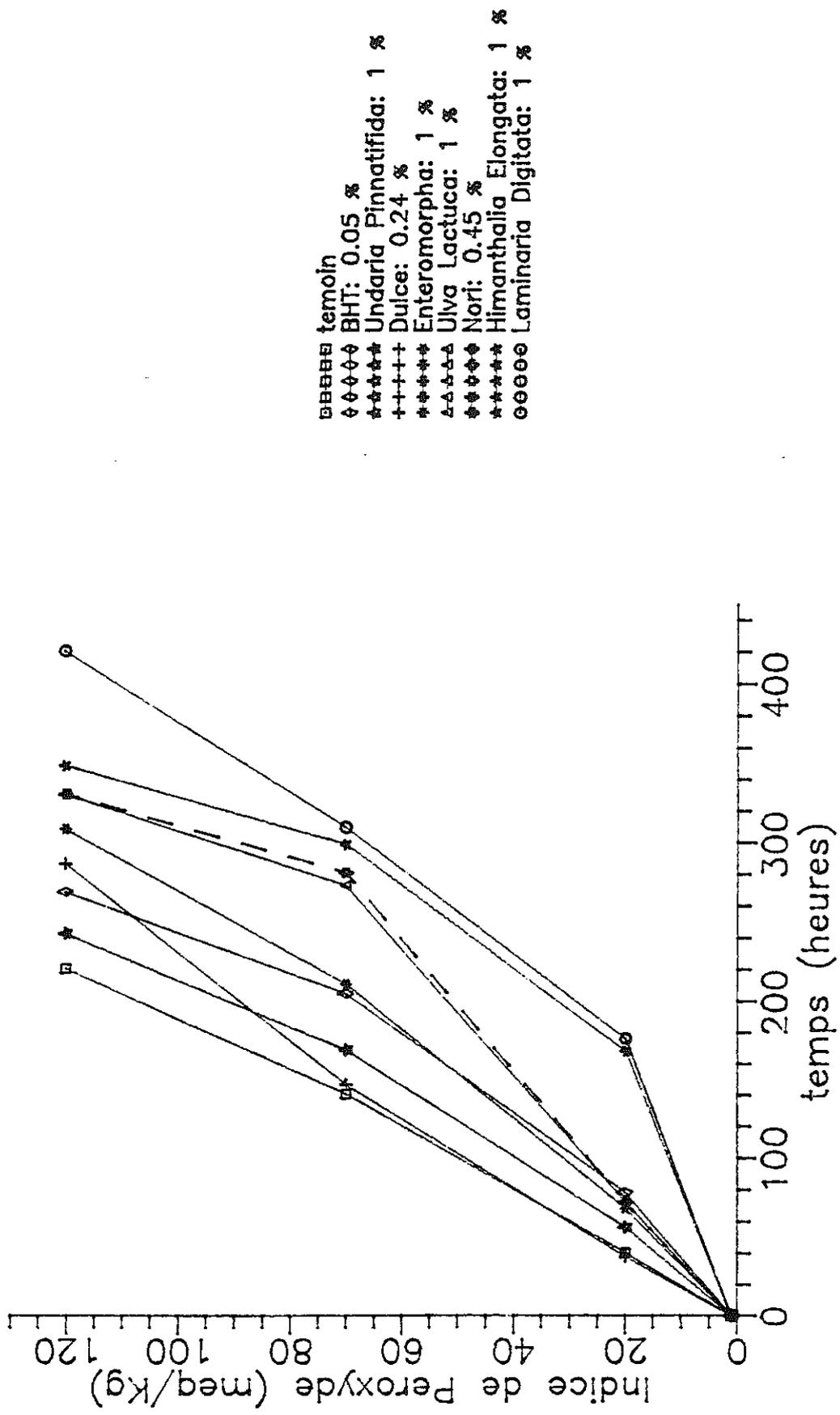


FIGURE 1. Evolution a 75° C de l'indice de peroxyde d'une huile de tournesol commerciale en presence de BHT ou d'extraits d'algues (concentrations exprimees en pourcentage (m/m) d'huile).

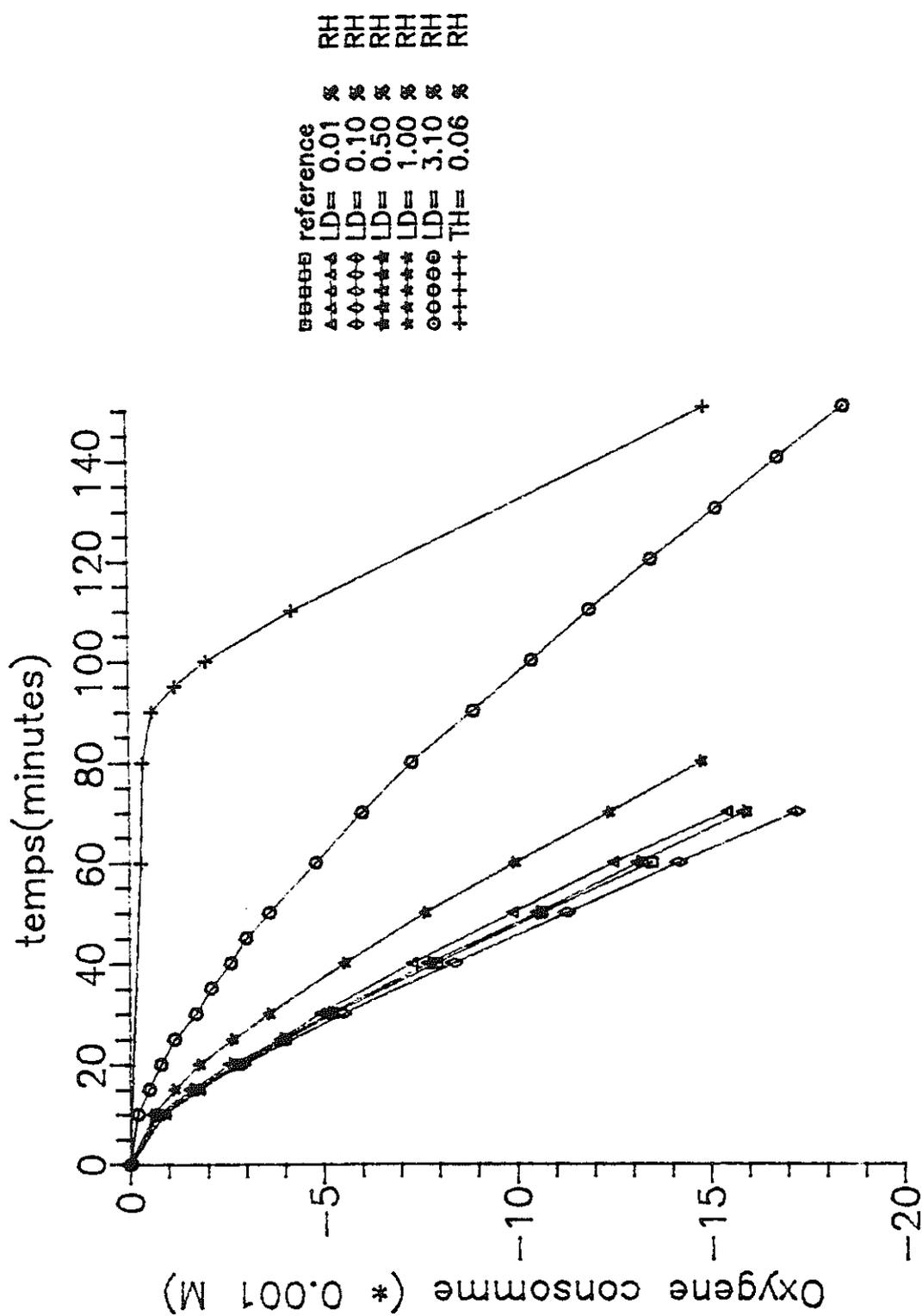


FIGURE 2. Oxydation induite a 60° C par l'AIBN du linoleate de methyle RH en presence d'extraits de Laminaria Digitata (LD) ou de vitamine E (TH). (RH):0.5 M; (AIBN):0.0063 M; solvant: heptanol.

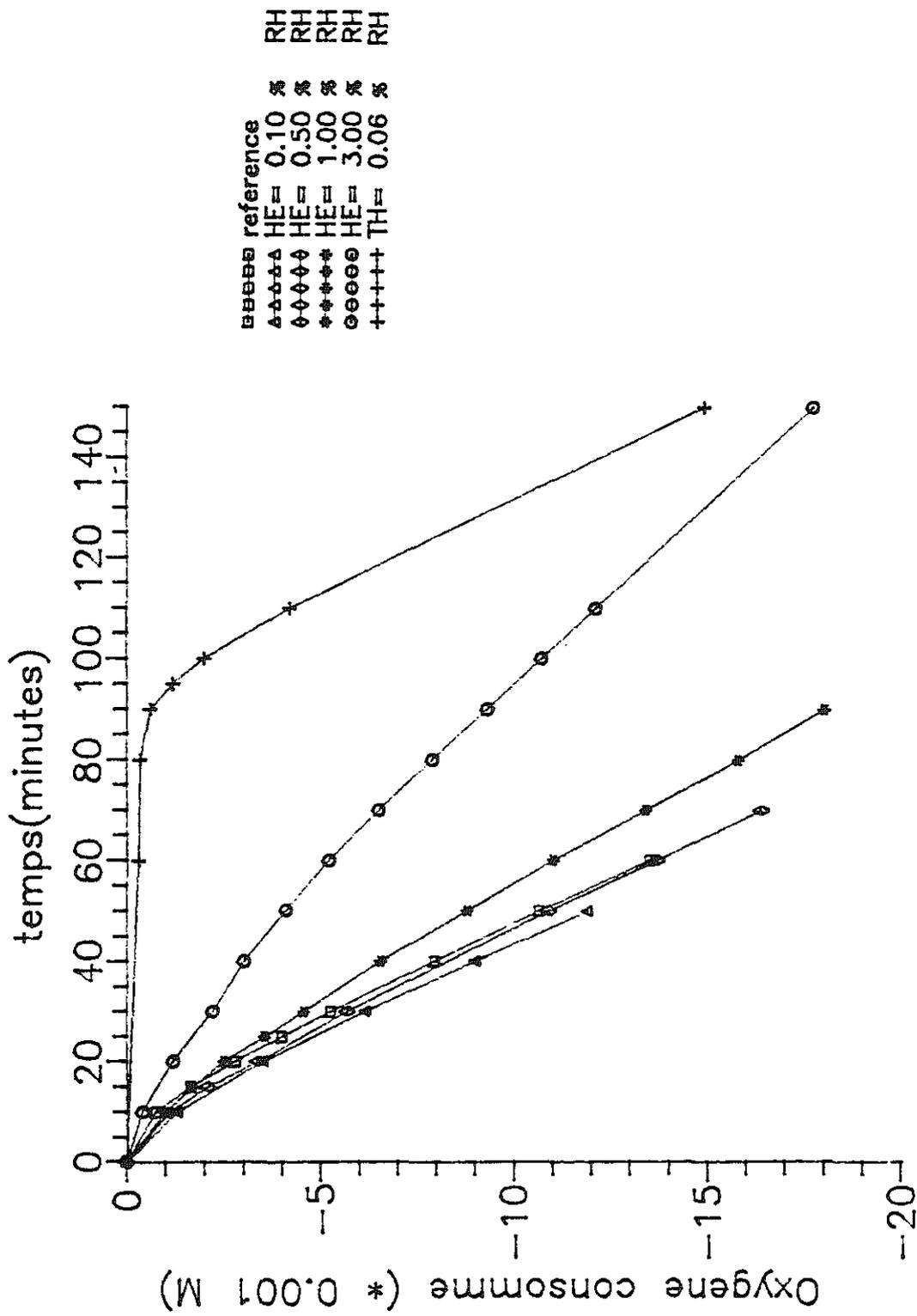


FIGURE 3. Oxydation induite a 60° C par l'AIBN du linoleate de methyle RH en presence d'extraits d'Himanthalia Elongata(HE) ou de vitamine E (TH). (RH):0.5 M; (AIBN):0.0063 M; solvant: heptanol.

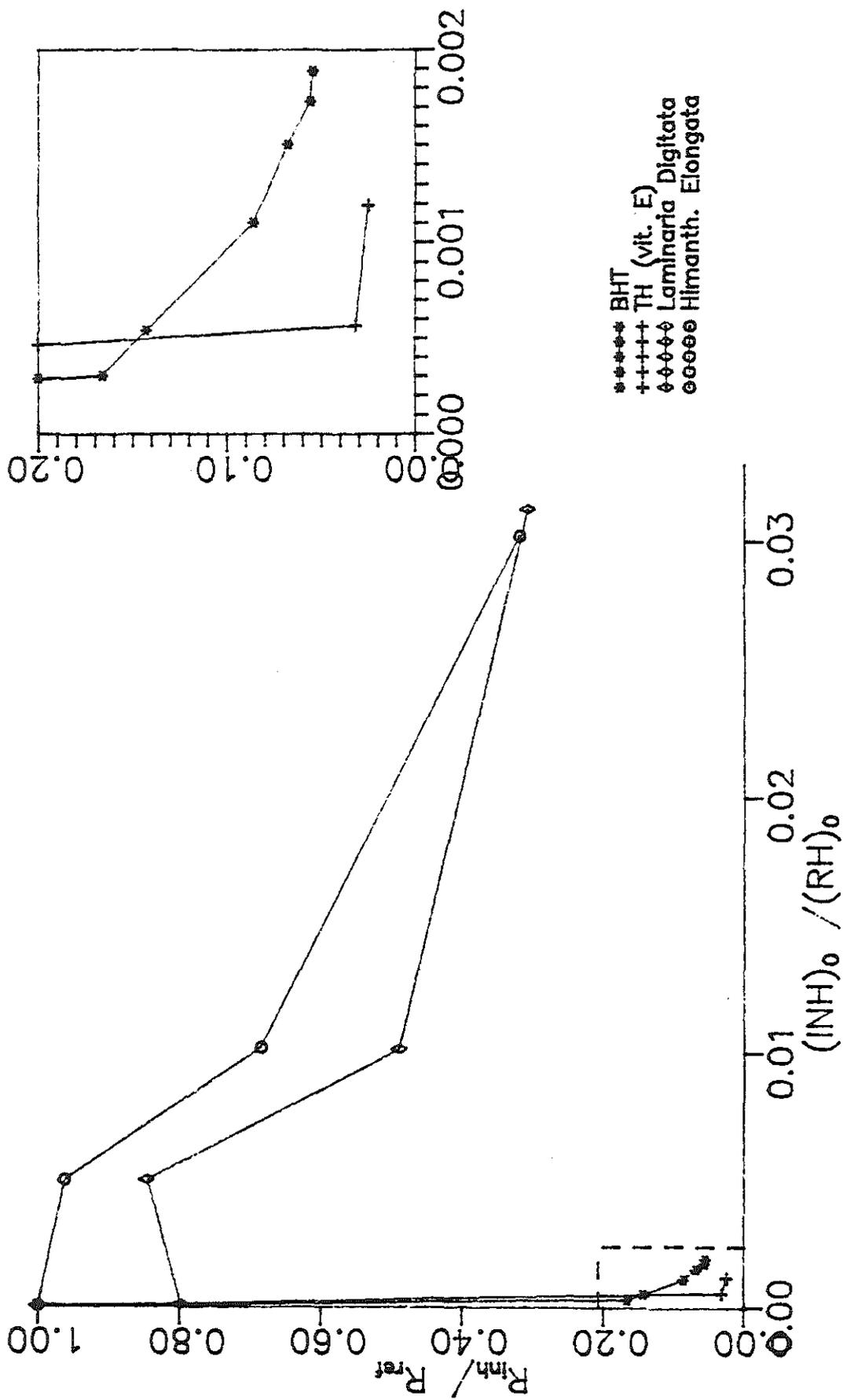


FIGURE 4. Oxydation induite a 60° C par l'AIBN du linoleate de methyle RH en presence de differents inhibiteurs. Influence de $(INH)_0 / (RH)_0$ sur le rapport d'inhibition R_{inh} / R_{ref} . $(RH)_0$: 0.5 M; $(AIBN)_0$: 0.0063 M; $(P_{O_2})_0$: 500 torr; solv: Heptanol.

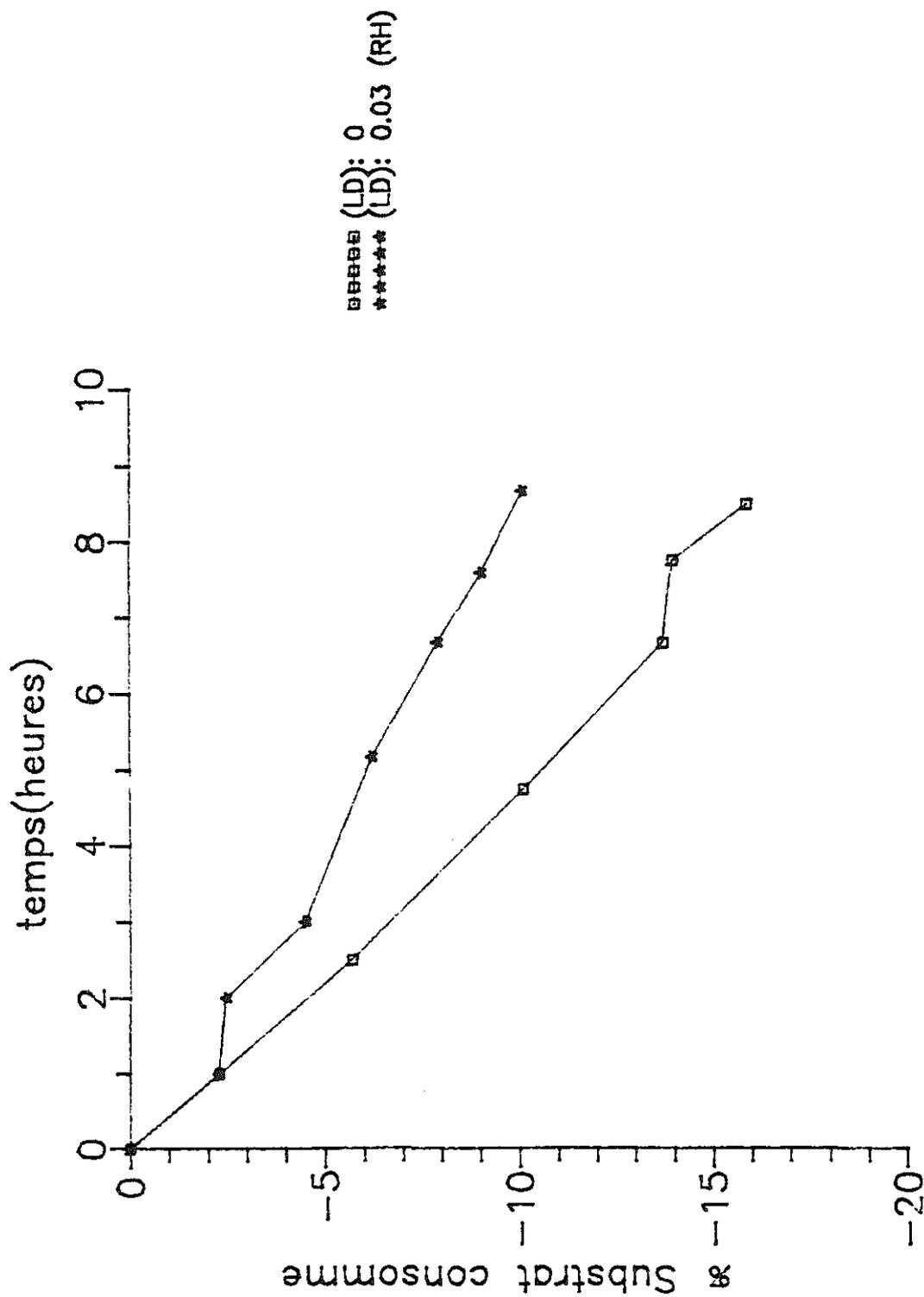


FIGURE 5. Oxydation induite a 60° C par l'AIBN du linoleate de methyle RH en presence d'extraits de Laminaria Digitata (LD). Dosage par CPG.(RH):0.5 M; (AIBN):0.0063 M; solvant: heptanol.

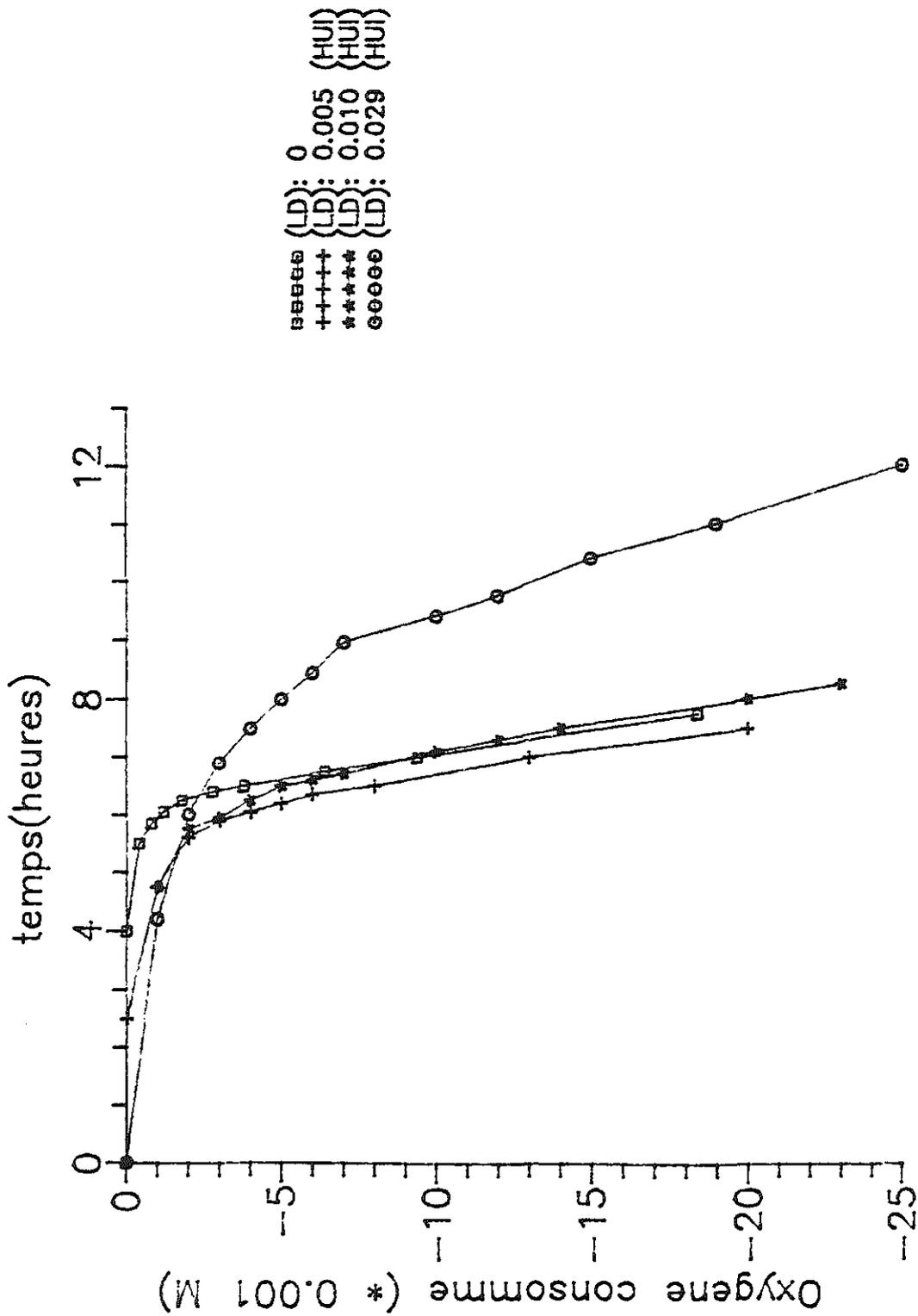


FIGURE 6. Oxydation induite a 60° C par l'AIBN d'une huile de tournesol commerciale (HUI) en presence d'extraits de Laminaria Digitata (LD). (HUI):270 g/L; (AIBN):0.0063 M; solvant: heptanol.

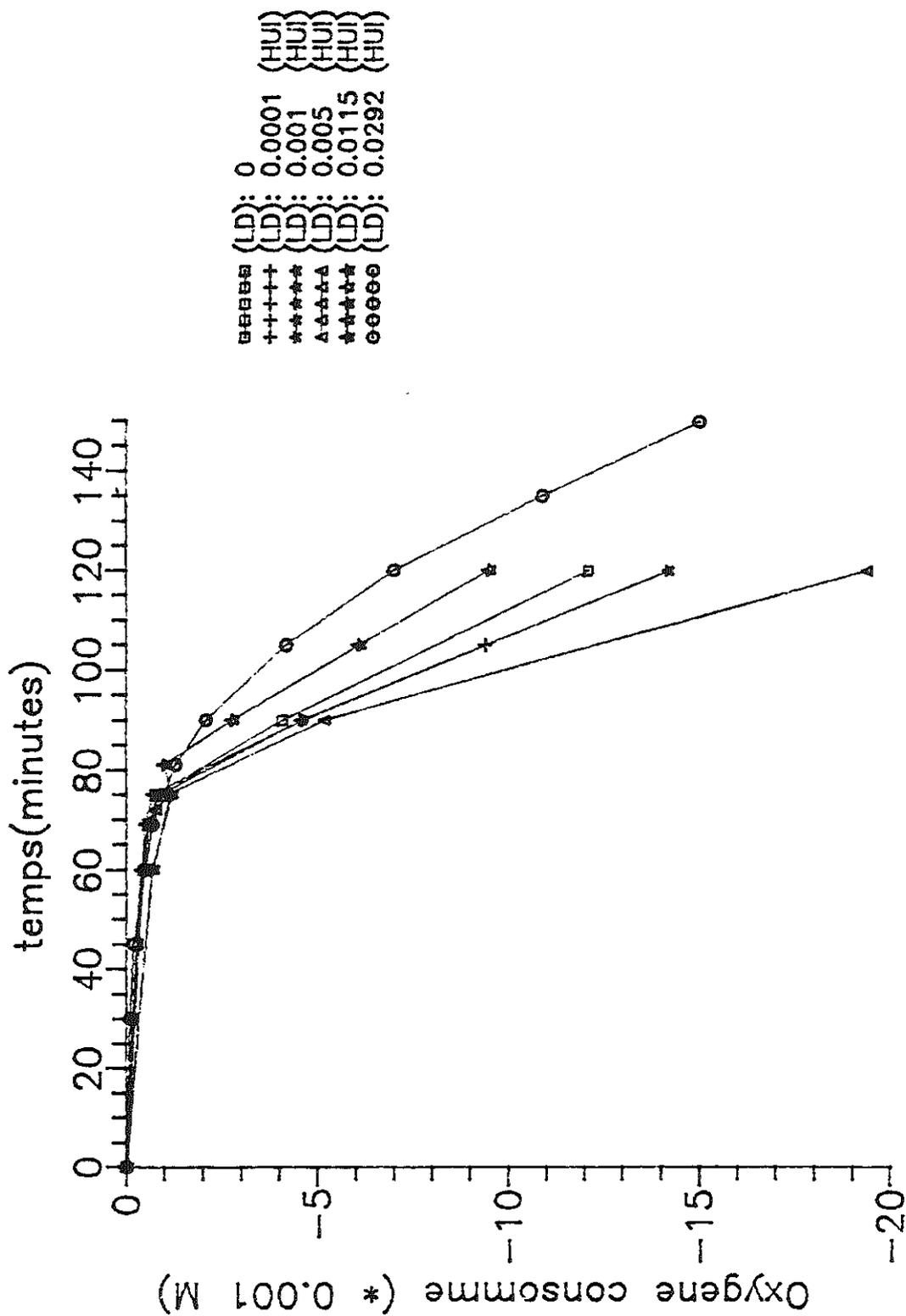


FIGURE 7. Oxydation induite a 75° C par l'AIBN d'une huile de tournesol commerciale (HUI) en presence d'extraits de Laminaria Digitata (LD). (HUI):270 g/L; (AIBN):0.003 M; solvant: heptanol.

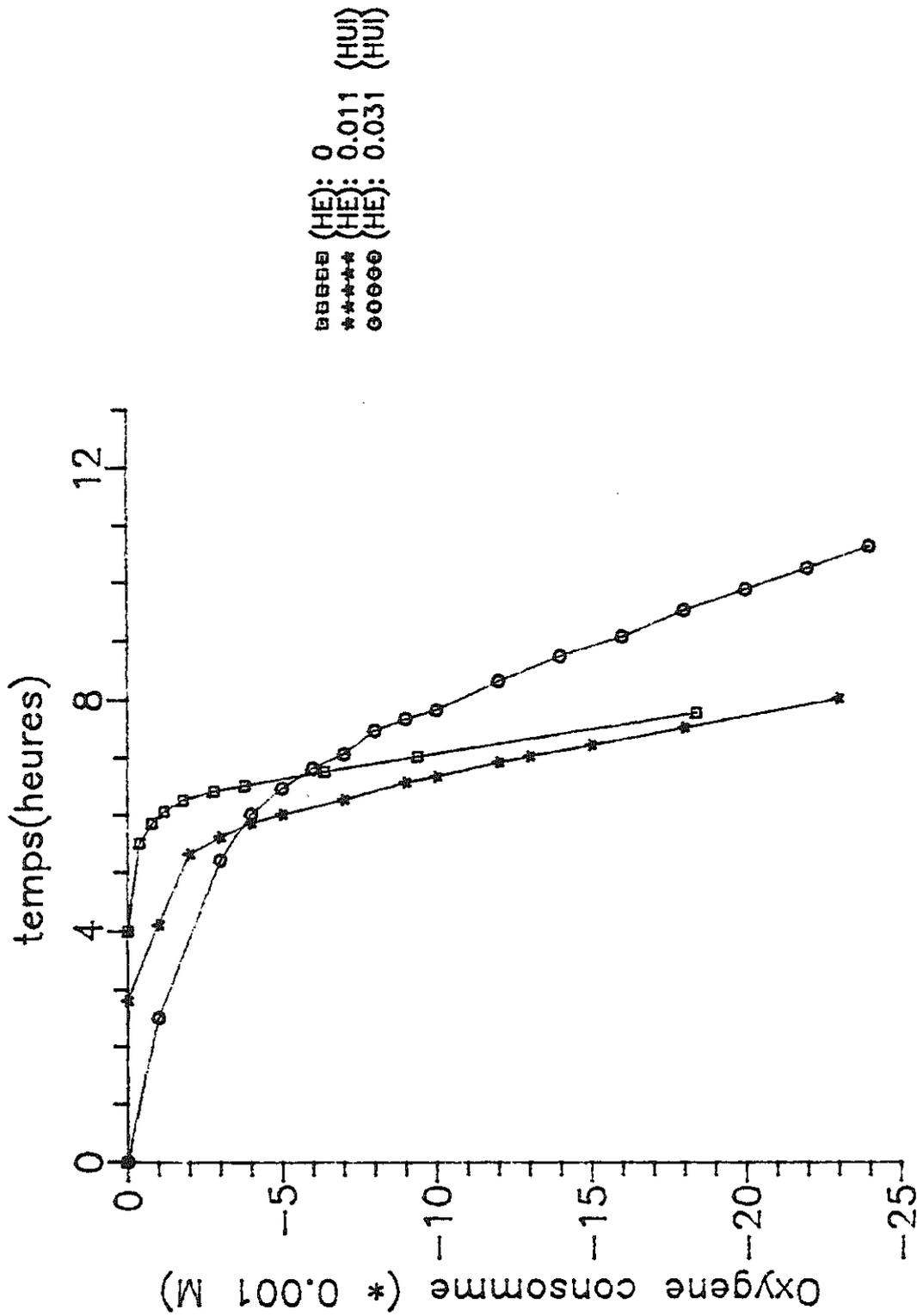


FIGURE 8. Oxydation induite a 60° C par l'AIBN d'une huile de tournesol commerciale (HUI) en presence d'extraits d'Himanthalia elongata(HE). (HUI):270 g/L; (AIBN):0.0063 M; solvant: heptanol.

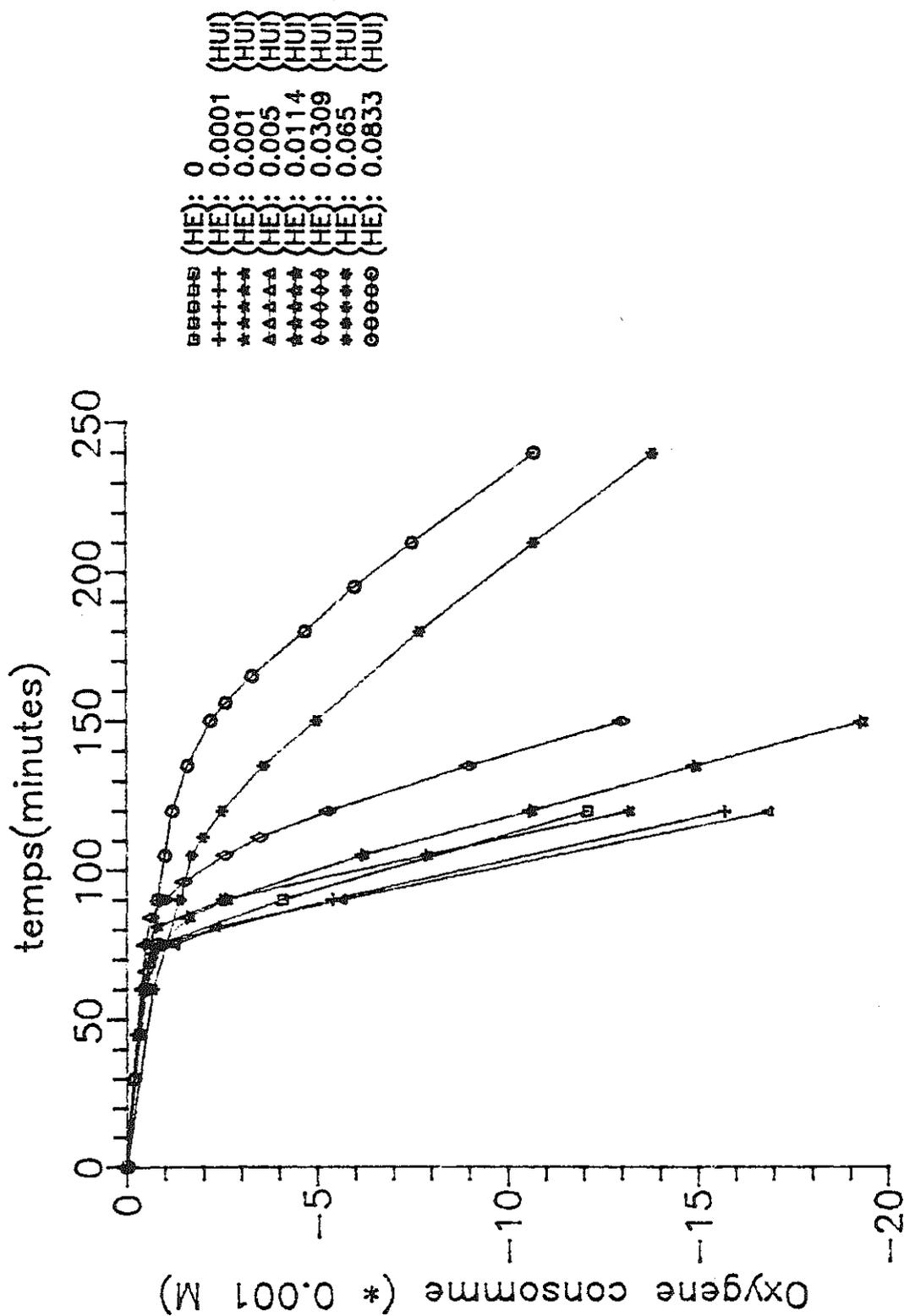


FIGURE 9. Oxydation induite a 75° C par l'AIBN d'une huile de tournesol commerciale (HUI) en presence d'extraits d'Himanthalia elongata (HE). (HUI):270 g/L; (AIBN):0.003 M; solvant: heptanol.

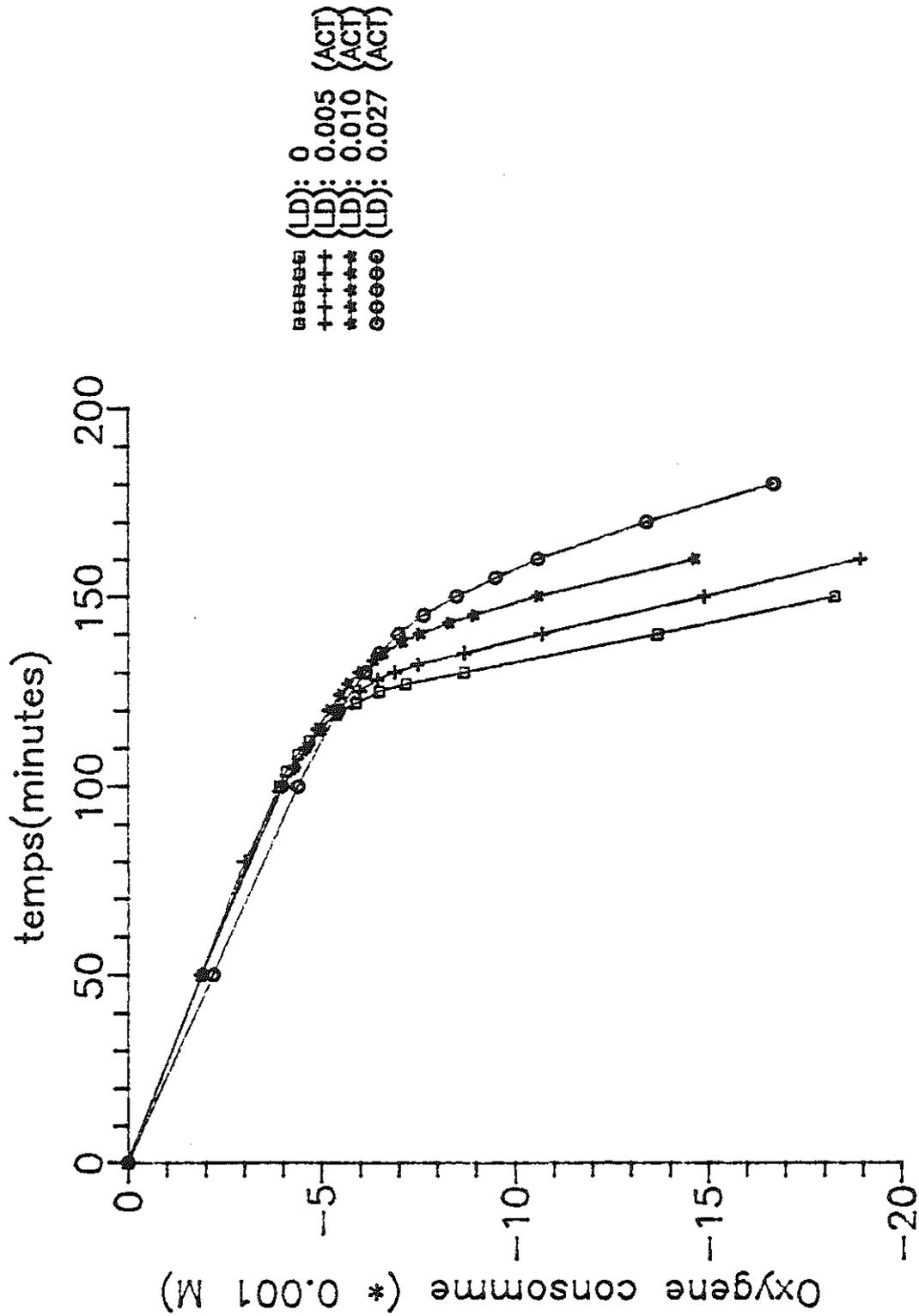


FIGURE 10. Oxydation induite a 60° C par l'AIBN d'ACTIVEPEA 50 E en presence de vitamine E (TH) et d'extraits de Laminaria Digitata (LD). (ACT):200 g/L; (AIBN):0.0063 M; (TH):0.00018 M; (LD):0.00018 M; solvant: heptanol.

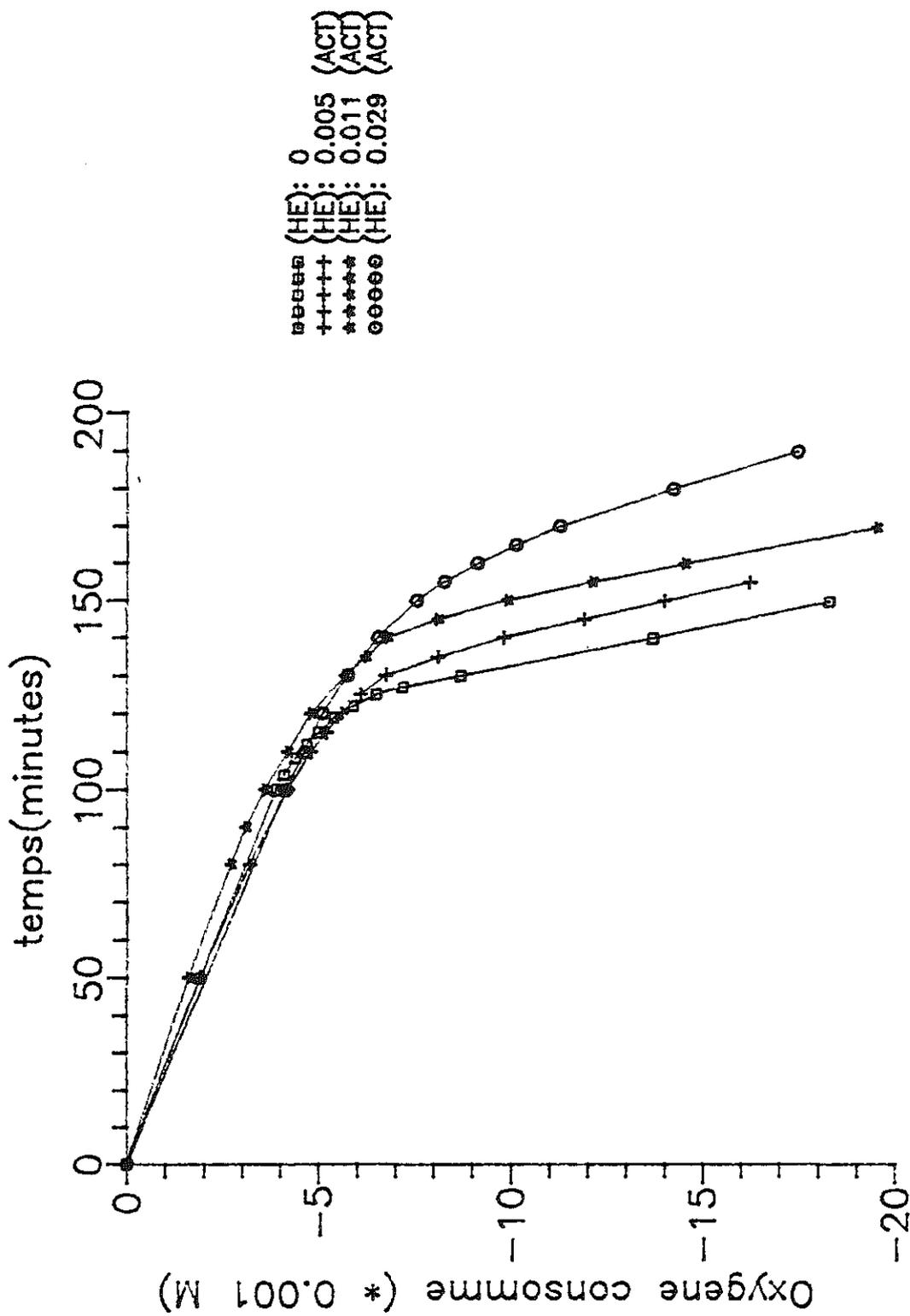


FIGURE 11. Oxydation induite a 60° C par l'AIBN d'ACTIVEPA 50 E en presence de vitamine E (TH) et d'extraits d'Himanthalia Elongata (HE). (ACT):200 g/L; (AIBN):0.0063 M; (TH):0.00018 M; solvant: heptanol.

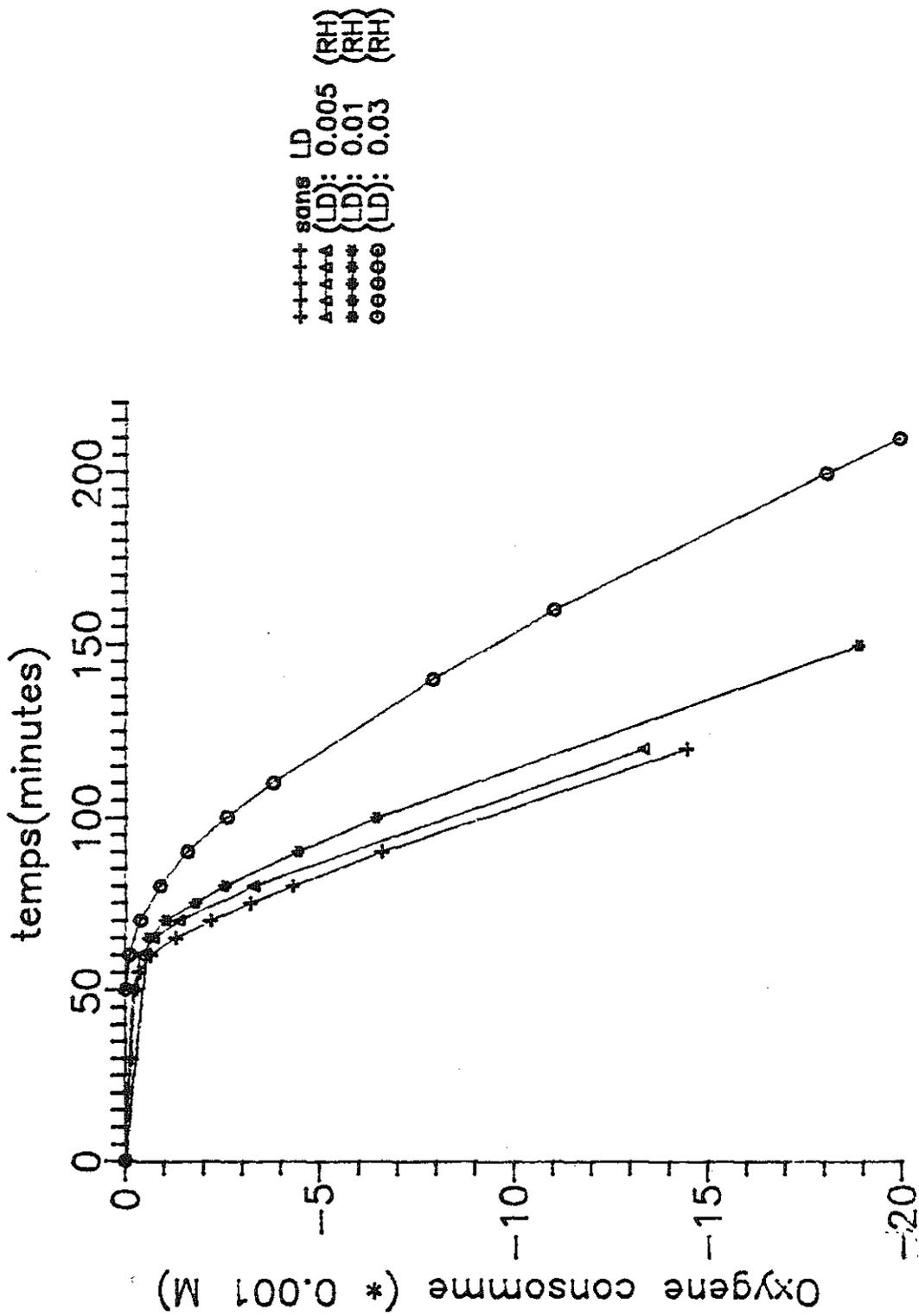


FIGURE 12. Oxydation induite a 60° C par l'AIBN du linoleate de methyle RH en presence de vitamine E (TH) et d'extraits de Lamin. Digitata (LD). (RH):0.5 M; (AIBN):0.0063 M; (TH):0.0001 M; solvant: heptanol.

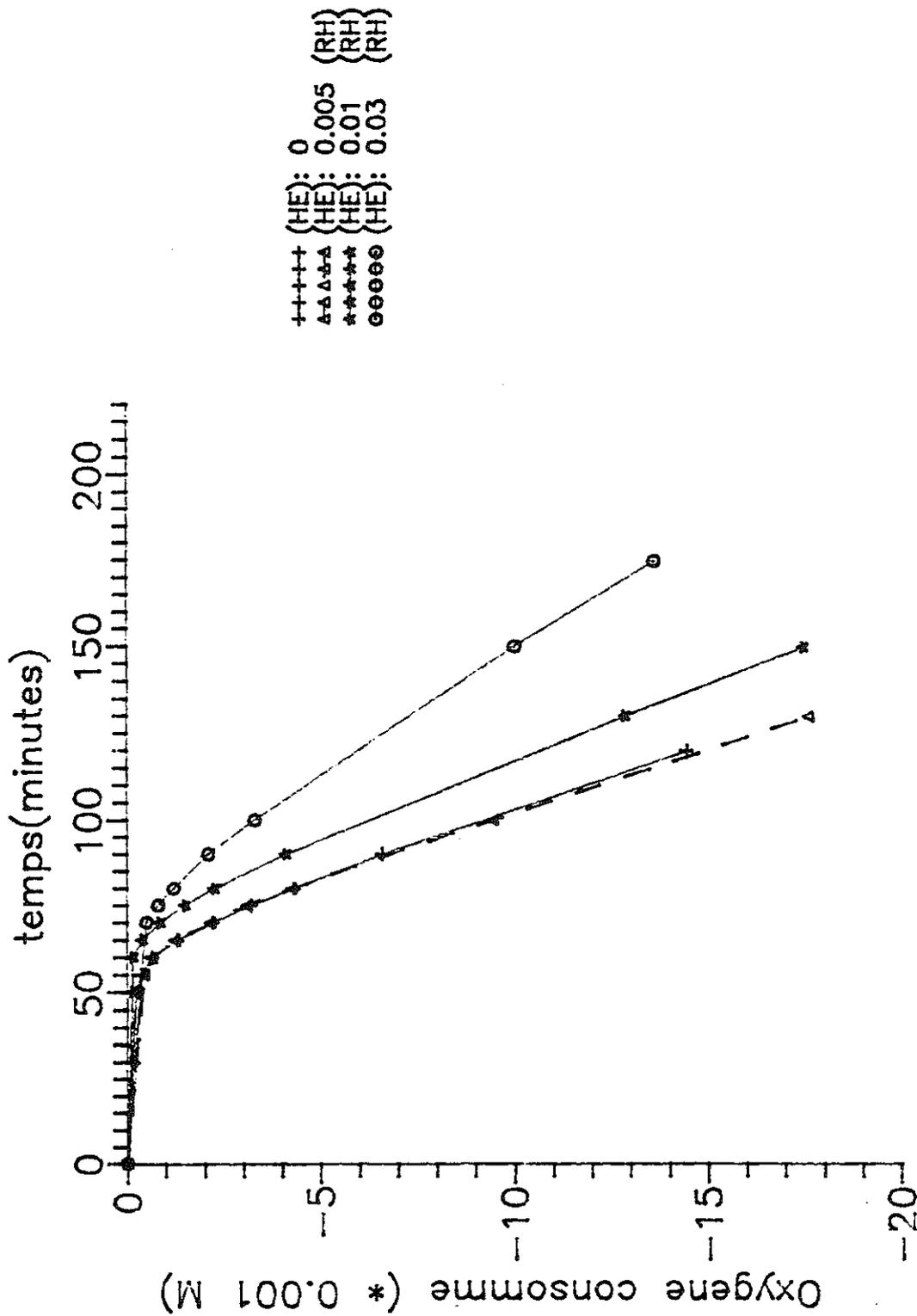


FIGURE 13. Oxydation induite a 60° C par l'AIBN du linoleate de methyle RH en presence de vitamine E (TH) et d'extraits d'Himanth. elongata(HE). (RH):0.5 M; (AIBN):0.0063 M; (TH):0.0001 M; solvant: heptanol.

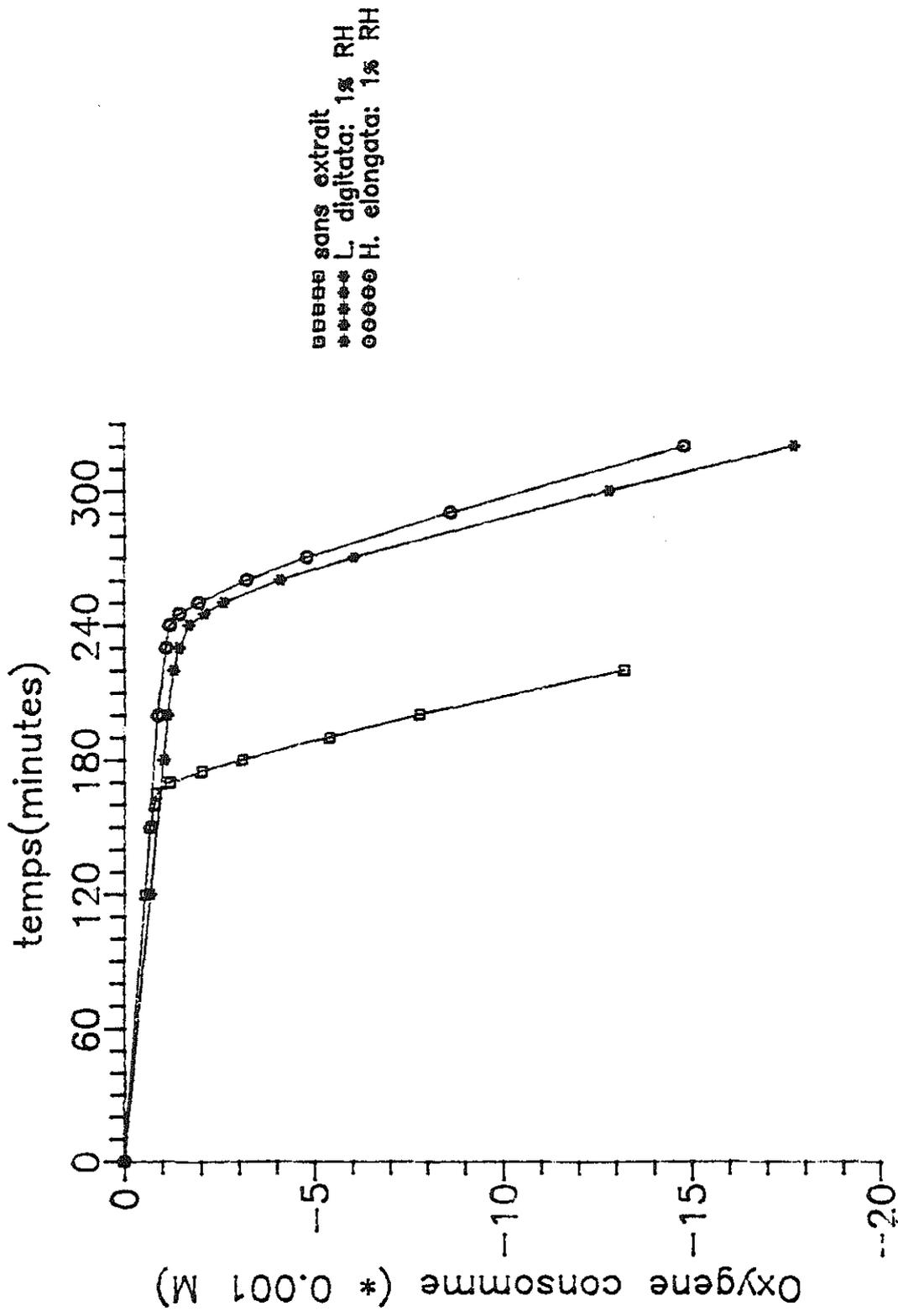


FIGURE 14. Oxydation induite a 60° C par l'AIBN du linoleate de methyle
 RH en presence de vitamine E (TH) et d'extraits d'algues.
 (RH):0.5 M; (AIBN):0.0063 M; (TH):0.0004 M; solvant: heptanol.

SCREENING ET METHODOLOGIE DE RECHERCHE DE PRODUITS
POTENTIELLEMENT ANTICANCEREUX

ROUSSAKIS Christos

SMAB

Groupe de recherche SUBSTANCES MARINES A ACTIVITE BIOLOGIQUE
Université de Nantes - Faculté de Pharmacie
1, rue Gaston Veil, BP 1024, 44035 NANTES CEDEX 01

La recherche des produits potentiellement anticancéreux dans le milieu marin est une idée qui est née dans les années 1979 avec SIGEL sur des espèces d'invertébrés marins tropicaux.

Depuis cette date, un très grand nombre de chercheurs et groupes de recherche travaillent dans le même but d'identifier des nouvelles molécules, possédant une activité antitumorale. Parallèlement au screening, réalisé sur les plantes, qui a débuté dans les années 1950, s'ajoute un nouveau screening sur les produits marins.

Comme il est logique, ce screening est réalisé de la même façon que celui sur les plantes, c'est-à-dire que nous avons recherché des produits cytotoxiques sur des systèmes expérimentaux proposés par le N.C.I., telle que la lignée leucémique murine P 388 et les cellules cancéreuses humaines KB.

Les premiers résultats se révèlent très encourageants : sur 2 252 espèces marines tropicales et subtropicales, 10,9 % des espèces montrent une activité cytotoxique sur les cellules KB et P 388, contre 3 % observés chez les végétaux.

Pratiquement la moitié des familles des ascidies fournissent des substances cytotoxiques. Dans ce cas-là, il est évident que nous devons orienter le screening des produits d'origine marine de telle façon qu'il nous permette d'éliminer les faux positifs dès le stade primaire du screening.

Depuis une quarantaine d'années, nous avons conduit le screening des produits potentiellement anticancéreux à partir d'une réponse cytotoxique exprimée par une DI_{50} sur différentes lignées cellulaires tumorales d'origine humaine ou murine.

Nous avons essayé de trouver des DI_{50} de plus en plus intéressantes, en cherchant des produits de plus en plus toxiques, sans nous préoccuper de la valeur réelle que représente la DI_{50} ni des paramètres qui sont susceptibles de l'influencer.

Une DI_{50} représentant l'inhibition de 50 % de la croissance cellulaire, il serait donc intéressant de connaître, plus que sa valeur arithmétique, la façon dont agissent ces drogues cytotoxiques dans le temps, pour réaliser cette inhibition.

A ce propos, nous allons observer sur les figures ci-dessous quatre profils différents :

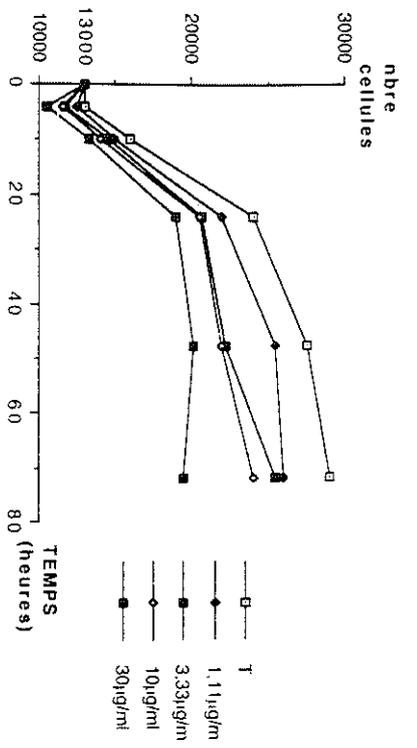


Fig. 1 : produit sans spécificité agissant comme un cytotoxique pur (poison) en détruisant au départ un très grand nombre de cellules cancéreuses, puis la croissance est similaire à celle des cellules témoins.

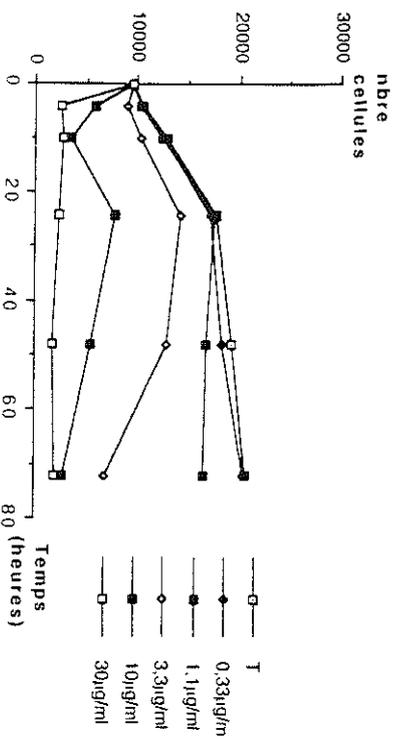


Fig. 2 : produit avec spécificité au niveau du cycle cellulaire agissant comme un alkylant en détruisant immédiatement à forte dose les cellules cancéreuses et avec un effet retard à faible dose par action sur le génome.

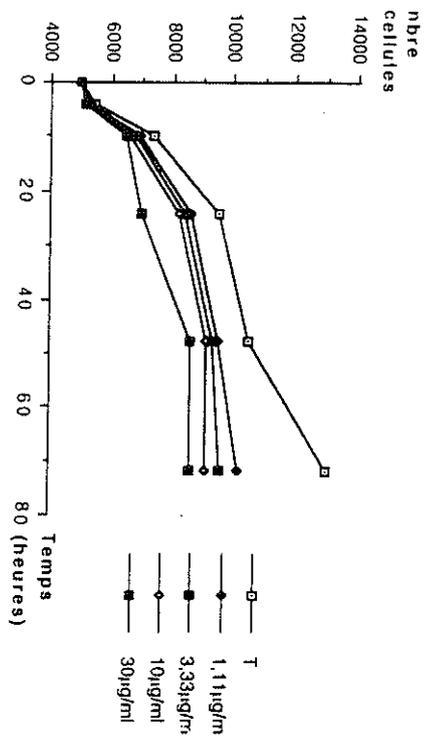


Fig. 3 : produit antiprolifératif agissant par inhibition des facteurs indispensables pour la croissance des cellules cancéreuses.

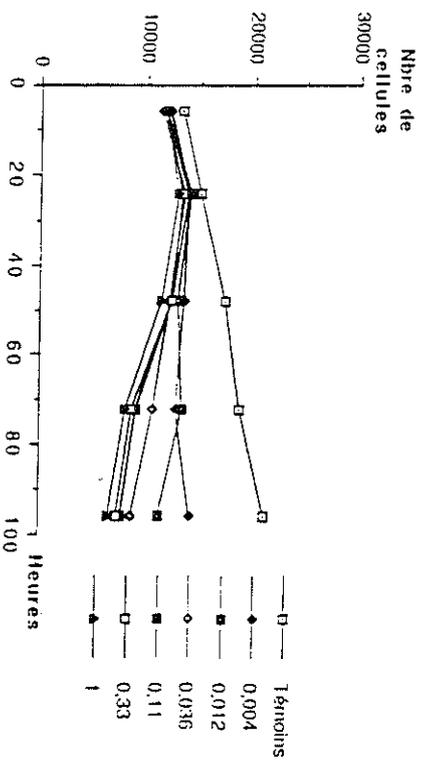


Fig. 4 : produit inducteur de différenciation terminale agissant par l'arrêt de la multiplication cellulaire induisant un blocage des cellules en phase G₁.

La détermination des concentrations inhibitrices 50, qui fournissent des indices sensibles et reproductibles lors des études de croissance cellulaire, n'est pas suffisante pour sélectionner des produits potentiellement anticancéreux. C'est pourquoi l'étude cinétique prend de l'importance puisqu'elle permet de relativiser la DI_{50} avec la croissance cellulaire et de comprendre le point de vue pharmacologique, le mécanisme d'action des substances antitumorales.

Il est alors possible de distinguer les substances ayant :

- un effet cytotoxique pur (poison)
- un effet cytotoxique au niveau du cycle cellulaire
- un effet antiprolifératif
- un effet inducteur de la différenciation terminale.

Conclusion :

Cet exposé permet de constater, d'une part, l'importance de l'étude du profil cinétique (dose effet temps) pour chaque nouvel extrait marin sélectionné par son activité cytotoxique et, d'autre part, la nécessité de l'utilisation des modèles expérimentaux les mieux adaptés du point de vue phénotypique (temps de doublement cellulaire) pour déterminer la dose inhibitrice 50 dans des temps de contact bien déterminés.

SUBSTANCES ANTITUMORALES D'ORIGINE MARINE : BILAN ET PERSPECTIVES.

Michèle Guyot, Laboratoire de Chimie, URA 401 CNRS, M.N.H.N., 63 rue Buffon, 75231 PARIS Cedex 05.

Depuis une vingtaine d'années un nombre sans cesse croissant de publications apparaissent concernant les substances actives d'origine marine : substances antitumorales, antivirales et même actives contre le virus HIV, antibiotiques, antifongiques, inhibiteurs enzymatiques, substances agissant au niveau du SNC et du SNP...

La question qui peut se poser est: quel est l'impact des produits marins dans la pharmacopée actuelle et comment peut-on envisager l'avenir?

Actuellement il existe trois médicaments commercialisés d'origine marine ; les céphalosporines antibiotiques, l'Ara-A ou Vidarabine, antiviral et l'Ara-C ou Cytarabine, antitumoral. Marginalement la découverte d'une prostagladine dans une espèce de corail *Plexaura homomalia* avait suscité un certain enthousiasme; cependant l'intérêt des prostaglandines en tant que médicaments a beaucoup diminué.

Bien qu'un grand nombre de substances présentant une activité biologique aient été mises en évidence, peu de médicaments sont disponibles actuellement. Ceci est dû tout d'abord au fait que les organismes marins n'ont été étudiés systématiquement que depuis une trentaine d'années. Etant donné le long cheminement nécessaire pour aboutir, à partir d'une substance biologiquement active à un médicament, il n'est pas possible à l'heure actuelle de dresser un bilan. D'autre part les organismes marins , à part quelques cas anecdotiques, n'ont pas été utilisés en pharmacopée traditionnelle à l'instar des organismes terrestres, privant les chercheurs de données ethnopharmacologiques souvent précieuses.

En l'absence et même en présence de ces données, la recherche d'une substance active puis d'un médicament requiert de nombreuses étapes que je vais présenter en prenant l'exemple d'une substance antitumorale.

Pour accéder au stade de médicament anticancéreux une molécule doit satisfaire à un grand nombre de critères:

- activité
- absence (relative) de toxicité
- accessibilité à la cible
- disponibilité.

Dans la première étape de recherche d'activité, le procédé le plus simple consiste à rechercher une activité cytotoxique vis-à-vis de cellules tumorales en culture, les cellules utilisées provenant soit de souches humaines soit de souches expérimentales.

Une substance est dite cytotoxique.

Une alternative à ce procédé, assez récente, consiste à rechercher directement l'effet sur l'ADN isolé (par électrophorèse ou HPLC) ou sur des enzymes importantes dans les processus cellulaires (kinase par exemple).

Il faut ensuite procéder à l'évaluation de l'activité *in vivo*. Pour cela la toxicité vis-à-vis de souris saines est d'abord estimée. Ensuite le produit est injecté à des souris dans lesquelles ont été greffées des tumeurs (P 388, L1210, KB). Lorsque la substance entraîne une survie par rapport aux animaux témoins (ayant reçu la tumeur mais non la substance) cette substance est dite antitumorale. Il faut noter que nombre de substances cytotoxiques n'exercent pas d'activité *in vivo* dans les modèles animaux.

Le mécanisme d'action est ensuite étudié, souvent guidé par la structure chimique. Il est important de savoir si une molécule agit au niveau de l'ADN, de la tubuline, de la synthèse des protéines, au niveau des produits des oncogènes ou autre mécanisme.

Suivent ensuite les essais cliniques : phase I : le produit est essayé sur des volontaires sains afin d'évaluer ses effets secondaires éventuels; phase II : la substance est testée chez des sujets malades afin d'évaluer l'effet anticancéreux proprement dit. Si les résultats sont positifs la substance est dite anticancéreuse.

Cependant à ce stade il n'est pas encore certain que le développement de la molécule en tant que médicament soit réalisable car intervient un élément important : la disponibilité du produit et la comparaison de ses propriétés avec les autres molécules existantes.

En ce qui concerne la disponibilité trois possibilités sont offertes:

-la synthèse

-l'extraction

-l'hémisynthèse. (qui est en fait un compromis entre les deux voies précédentes et largement utilisée).

La synthèse semble de prime abord le moyen de production le plus efficace.. Cependant la synthèse de molécules complexes n'est pas toujours d'une faisabilité compatible avec les objectifs économiques (c'est le cas de l'halichondrine ou des bryostatines par exemple, dont la formule est donnée en annexe).

L'extraction et l'hémisynthèse, (qui préimpose l'extraction de la molécule de départ) offrent donc d'intéressantes possibilités pour lesquelles l'apport des biotechnologies marines pourrait être important. En effet s'il paraît contraire aux normes écologiques d'exploiter des espèces peu abondantes, la culture de ces espèces ou la culture d'organes ou de cellules individualisées pourraient constituer une alternative rentable économiquement.

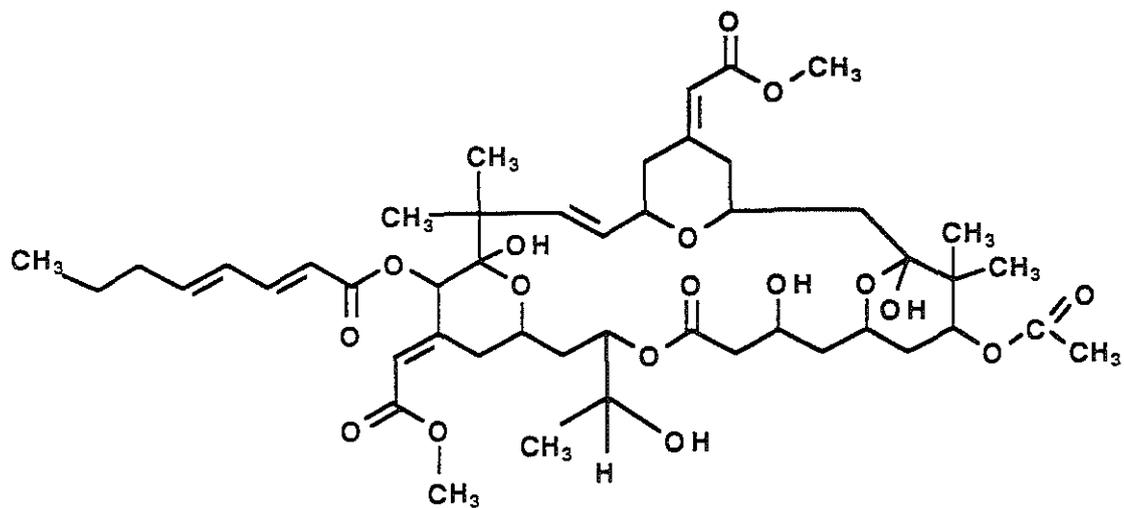
Cependant, si la culture de microorganismes marins connaît à l'heure actuelle un réel succès, la culture des invertébrés ou de cellules d'invertébrés marins, à l'étude dans plusieurs équipes n'est encore, à ma connaissance, qu'à un stade pré-exploratoire. C'est cependant un programme d'avenir pour le développement des substances d'origine marine.

ANNEXE I

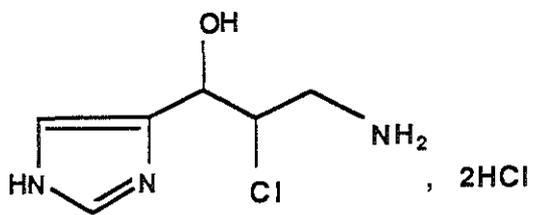
25 MOLECULES D'ORIGINE MARINE SONT A DES STADES VARIES DE DEVELOPPEMENT:
PARMI LESQUELLES UN CERTAIN NOMBRE DE SUBSTANCES ANTITUMORALES :

-BRYOSTATINES	ANTICANCER-IMMUNOSTIMULANT (NCI)
-DIDEMNINE B	ANTICANCER-IMMUNODEPRESSEUR (NCI)
-GIROLLINE	ANTICANCEREUX (GIF/RPS)
-HALICHONDRINE	ANTICANCEREUX
-DOLASTATINES	ANTICANCEREUX
-AUTRES	ANTICANCEREUX

Il faut souligner que lorsqu'une molécule est en cours de développement les informations sont généralement difficiles à obtenir en raison des règles de confidentialité.

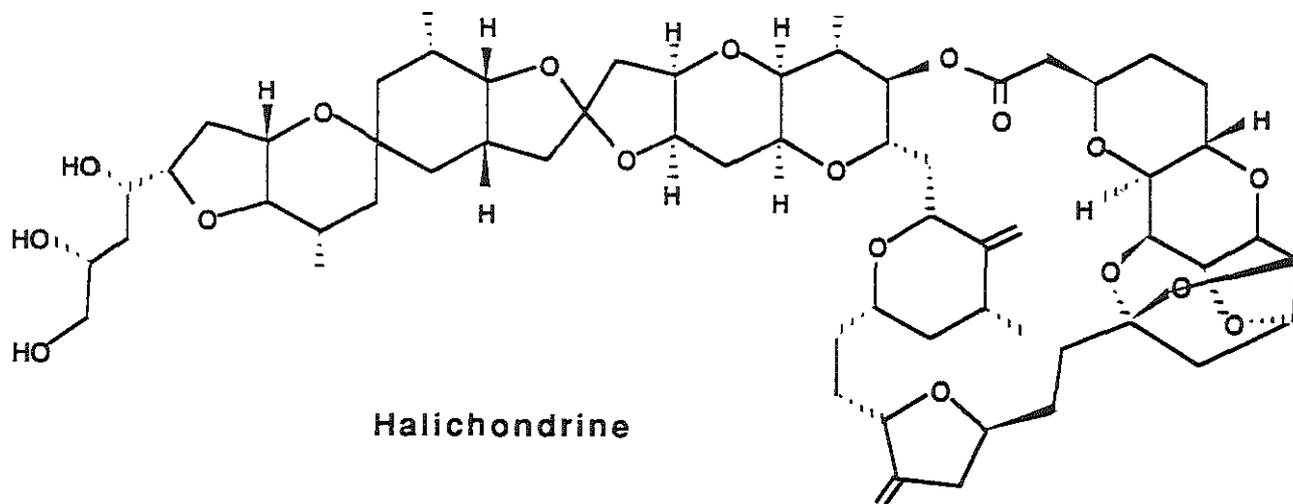
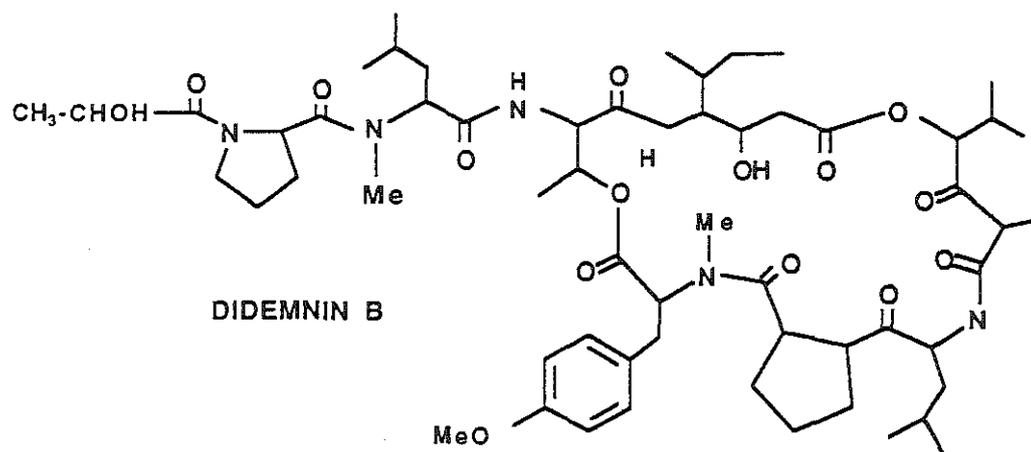


Bryostatin 1



Girolline

ANNEXE



T H E M E V

VALORISATION DES PRODUITS DE LA MER

Animateur : Patrick DURAND – IFREMER DRV/VP/BM – Centre de Nantes

Suite à la session consacrée à la chimie et biochimie des substances naturelles et pour terminer cette journée très dense, nous allons entamer le débat sur le thème "Valorisation des Produits de la Mer".

Compte tenu des modifications de dernières heures intervenues dans la programmation et du temps trop limité réservé à cette session nous avons organisé celle-ci autour de quatre interventions centrées autour de deux thèmes ; d'une part la notion de gisement de matières premières et de co-produits issus des pêches et cultures marines et d'autre part l'extraction de substances (extraites/ ou susceptibles de l'être) considérées comme relevant du domaine des biotechnologies.

La première intervention faite par G. MARCO, Ingénieur R. et D. d'IDMER (Institut de Développements des produits de la Mer), concernera la valorisation industrielle des déchets des activités de la filière poisson. La pêche rejette en effet une quantité importante de biomasse (by catch, espèces sans valeur commerciale, prises abimées lors de la capture ou de l'entreposage) et génère un fort tonnage de déchets issus de la transformation et du traitement. Une première démarche de valorisation consiste donc à mieux gérer ces ressources et dégager des voies nouvelles d'utilisation plus complète de celles-ci.

Ensuite nous aborderons le thème transformation-extraction. Lors du 1er Colloque de Martigues nous avons précisé le contexte d'une meilleure exploitation des ressources (cf. I.M. Mackie 1990) en illustrant certaines possibilités d'extraction et de mise en oeuvre d'enzymes (cf. Y. LE GAL et P. DURAND 1990). En complément de ce volet nous considérons des applications potentielles dans le domaine de la génèse enzymatique de substances d'arômes. la recherche d'activités enzymatiques spécifiques, susceptibles d'être extraites et purifiées à partir de différents sous-produits des pêches et de l'aquaculture (viscères de poissons, hépatopancreas de crustacés et mollusques...) fait actuellement l'objet de nombreux travaux à caractère finalisé. En dehors des activités de type protéolytique dont certaines font l'objet d'applications, en particulier comme additif technologique dans des opérations de traitements de produits de la pêche comme par exemple : le pelage de filet de poisson l'attendrissement de céphalopodes ou la préparation de caviar de poisson, d'autres activités sont étudiées. C'est le cas notamment des lipoxygénases J.M. BELIN de l'ENSBANA de DIJON.

Pour poursuivre sur ce thème transformation-extraction un point sera fait sur la chitine, molécule abondamment étudiée (cf. Biofutur septembre 88 pp 40-48 et juin 91 51-53) qui fait actuellement l'objet d'un début de développement industriel en France. A. DOMARD,

Directeur du Laboratoire d'Etudes des Matériaux Plastiques et des Biomatériaux du CNRS de Villeurbanne, Conseiller technologique de la Société ABER Technologies précisera l'état actuel de la production de chitine et de son produit en déacétylation le chitosane, ainsi que les applications à attendre de ce(s) produit(s) à très large spectre d'utilisation. Enfin pour clore cette série d'exposés Y. BATREL du CRITT Biotechnologies, Chimie Fine et Environnement de Rennes, CRITT ayant eu un rôle décisif dans l'implantation en Bretagne de l'activité industrielle d'extraction de chitine sus-mentionnée, précisera un certain nombre d'éléments clefs en matière de stratégie de valorisation de co-produits. La région Bretagne fortement active dans le domaine des Biotechnologies en particulier par la mise en place du programme Britta, considère en effet le domaine marin comme l'un des points d'ancrage important de sa politique de Recherche et Développement.

Gisement : Bilan des Matières premières exploitables.

G. MARCO

Nos Réf. : GM91018

Lorient,
le 27 mai 1991

VALORISATION INDUSTRIELLE DES
DECHETS DES ACTIVITES DE LA
FILIERE POISSON

I - INTRODUCTION

L'ensemble des pêches industrielles de la CEE dans les zones Européennes représente annuellement environ $3,5 \times 10^6$ tonnes de poissons, crustacés, mollusques (pêches minotières exclues).

Seulement 50 % font l'objet d'une consommation réelle par l'homme, les autres 50 % restants, constitués essentiellement de viscères, des parties osseuses et, pour les crustacés, des carapaces sont actuellement peu ou mal valorisés (farines ou fish solubles par exemple).

Ces déchets d'organismes marins ainsi débarqués dans l'ensemble des ports Européens constituent une importante source potentielle de molécules biologiques à forte ou très forte valeur ajoutée.

L'intérêt des recherches dans ce domaine est donc d'élargir le champ des produits biotechnologiques actuellement disponibles.

II - LA DEMARCHE VALORISATION

Le principe de récupération de ces produits devra obéir à un certain nombre de contraintes :

- la matière de base devra être disponible industriellement.
- les process mis en oeuvre au laboratoire devront être extrapolables industriellement (1).
- Les prix de marché du produit à obtenir devra être supérieur au prix de revient industriel déterminé par les essais pilotes.

(1) : on devra s'interroger sur la rentabilité des opérations d'extraction purification mises en oeuvre par rapport à celles qui feraient appel à la production par génie microbiologique.

L'aspect technique de ce programme peut être résolu par une association de plusieurs centres de recherches spécialisés ayant une expérience dans le domaine de la valorisation des produits de la mer, de la biochimie des protéines et des peptides, des lipides ainsi que du génie génétique.

Cette Association devra être coordonnée par ces Centres Techniques qui auront un rôle déterminant dans l'analyse de la faisabilité industrielle du projet mais aussi et surtout dans l'analyse des potentiels industriels de déchets. (Planche 1).

III - REALITES ECONOMIQUES

L'analyse quantitative théorique (quantités pêchées/rendements techniques) est souvent favorable au développement de tels projets, il n'en est plus de même pour l'analyse logistique (possibilités et coûts des collectes, qualité, traitement et stockage des produits) qui impose le calcul d'une valeur économique du produit prenant en compte tous les gestes permettant d'obtenir un produit conforme au cahier des charges technique et qualitatif.

L'analyse des coûts de production ne devra donc plus tenir compte de la valeur du produit dans les circuits de collecte actuels (traitement de sous-produits) mais bien du coût matière tel que nous l'avons défini précédemment dans les circuits organisés (on parlera alors de traitement de coproduits)

IV - CONCLUSION

La gestion de la ressource en "sous-produits" permettra de mettre à disposition des industriels des quantités significatives de "coproduits" utilisables dans les projets de valorisation. Démarche indispensable pour la réussite d'une politique de valorisation.

En effet, si l'on analyse l'avance des pays innovateurs en terme de valorisation des produits de la mer (NORVEGE - JAPON) on constate qu'ils disposent d'un avantage, non pas scientifique (nous avons en FRANCE un réseau de centres de recherche tout aussi performant) mais économique.

Leur filière pêche, culturellement organisée en structure verticale leur a permis de mettre en place une logistique efficace dans la gestion des sous-produits. La démarche "coproduits" devient dans ces conditions plus rapide, plus facile et plus rentable (limitation considérable des points de collecte).

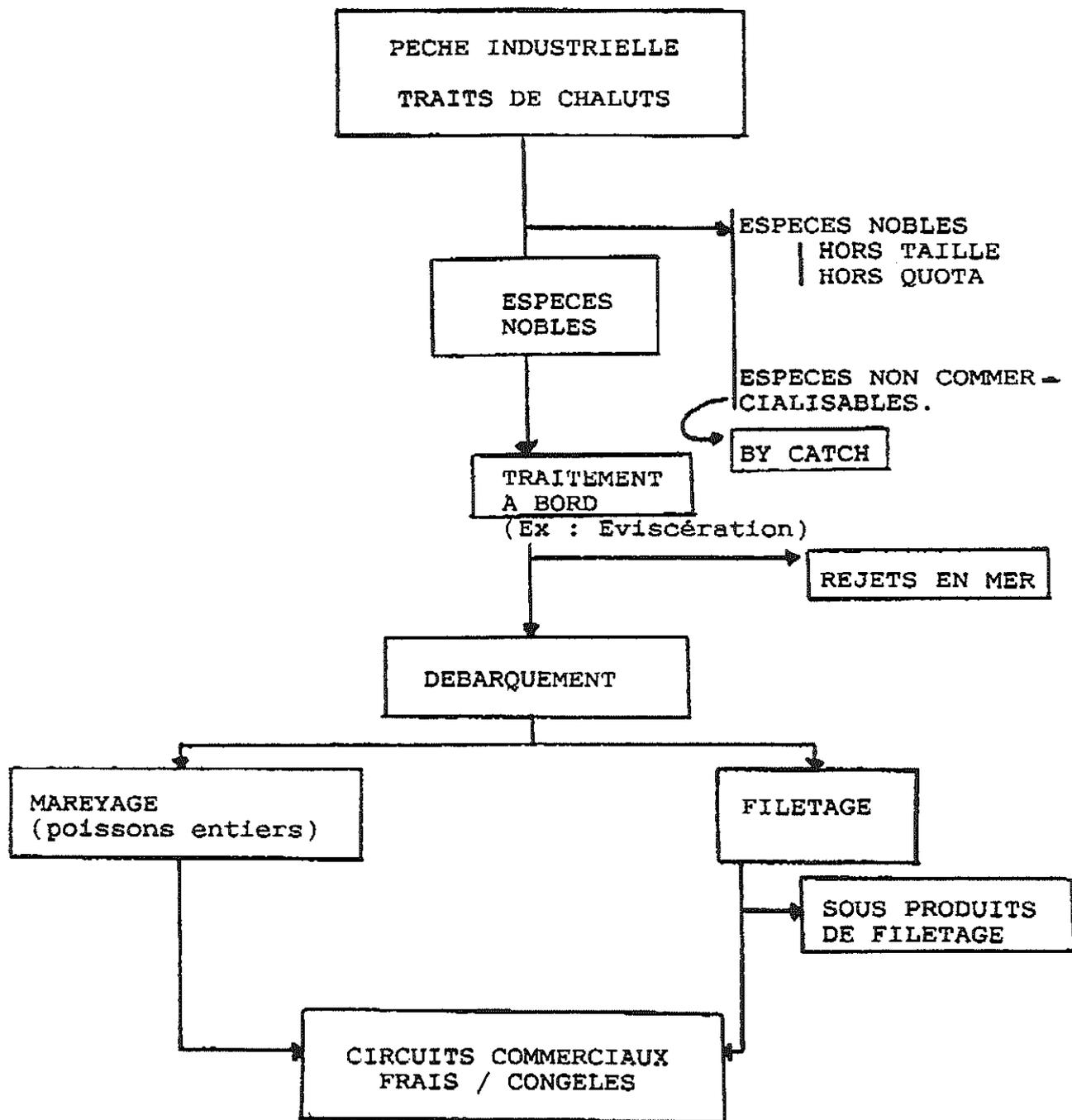


PLANCHE 1 : ANALYSE DU FLUX GLOBAL DE MATIERES

BIOTECHNOLOGIES MARINES

GENESE ENZYMATIQUE DE SUBSTANCES D'AROMES

J.M. BELIN

ENS.BANA, Université de Bourgogne,

Laboratoire de Biotechnologie, 21000 Dijon.

INTRODUCTION

L'arôme des produits de la mer (poissons, crustacés, coquillages) a déjà fait l'objet de nombreux travaux notamment au niveau des poissons (1, 2). Il a été ainsi mis en évidence le rôle olfactif important d'un certain nombre de composés tels que les amines, les composés soufrés et les dérivés des acides gras polyinsaturés.

Parmi les amines, les diméthyl- et triméthylamines ont des odeurs ammoniacales et sont à l'origine des arômes dégagés lors de la cuisson en bouillon des poissons ou crustacés.

Les composés soufrés sont constitués essentiellement par le diméthylsulfure et le diméthyltrisulfure et sont surtout rencontrés chez les huitres. D'origine enzymatique ils ont chez les poissons, un rôle néfaste au niveau de l'arôme où ils traduisent des problèmes technologiques.

Les dérivés des acides gras polyinsaturés ont surtout été étudiés sous l'angle de leur importance dans la perception de l'oxydation des lipides. Il ne faut cependant pas oublier que certains de ces dérivés ont un rôle primordial dans la note "fraîcheur" de l'arôme.

La biogenèse des molécules impliquées dans la note "fraîcheur" n'a fait l'objet que de peu de travaux et les connaissances que l'on peut en avoir sont récentes et dérivent, en ce qui concerne les poissons, des modèles étudiés au niveau des végétaux. Ce résultat peut surprendre lorsque l'on connaît l'importance que le consommateur accorde à cette note aromatique au sein des qualités organoleptiques d'un aliment (3).

Ainsi l'arôme apprécié par le consommateur doit résulter d'un bon équilibre entre ses constituants. Equilibre qui ne doit pas être perturbé par la perte de certaines fractions aromatiques lors de traitements technologiques ou par la formation d'autres constituants conduisant à des défauts d'arôme.

LES SUBSTANCES D'AROMES DERIVEES DES LIPIDES

Si l'on sait que l'oxydation des acides gras polyinsaturés, tels que les acides arachidonique (C 20:4, n-6), eicosapentaénoïque (C 20:5, n-3) et docosahéxaénoïque (C 22:6, n-3), conduit à des odeurs de rance, de peinture et d'huile de foie de morue, on oublie souvent que certains produits de dégradation de ces acides gras sont responsables des arômes caractéristiques des poissons fraîchement pêchés qui rappellent des notes de plantes vertes et d'algues (1). A l'origine de ces notes aromatiques se trouvent des aldéhydes, des alcools et des cétones.

Plusieurs travaux signalent la présence de ces substances d'arômes chez des poissons, des crustacés et des coquillages (4-10). Les aldéhydes et les cétones procurent aux poissons des notes aromatiques fortes malgré des seuils de perception très bas (0,001 ppb - 0,08 ppb) alors que les alcools ont souvent un seuil de perception plus élevé (10 ppb) et amènent des notes plus douces (tableau 1).

La dégradation des acides gras insaturés à chaînes longues sous l'action d'enzymes conduit à la formation de molécules volatiles dont les plus petites sont en C5 et souvent difficiles à conserver lors de l'extraction de la fraction aromatique (1-pentène-3-ol).

Le groupe des composés en C6 est surtout rencontré chez les poissons d'eau douce et plus rarement chez les animaux marins. Ce groupe comprend des molécules telles que hexanal, (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexène-1-ol dont l'odeur rappelle celle de l'herbe fraîchement coupée, à quelques nuances près ; odeurs qui se manifestent très rapidement après la mort des poissons.

Les composés carbonylés et alcools en C8 sont très importants et rencontrés chez tous les animaux marins (poissons, crustacés, coquillages). Ils apportent une note champignon, fruitée, florale. Le plus représentatif de ces composés est le 1-octène-3-ol à odeur de champignon, trouvé d'ailleurs en abondance dans le champignon de Paris. La cétone correspondante, à odeur plus florale, a d'ailleurs un seuil de perception très bas (0,005 ppb) et une teneur chez les poissons comprise entre 0,1 et 10 ppb. Il faut souligner que les alcools en C8 sont en quantité plus importante que les cétones (11).

Les composés en C9 ont été identifiés chez un certain nombre de poissons et de coquillages (huitres) et notamment chez le Saumon (1). Leur odeur rappelle celle du concombre et du melon. Les aldéhydes sont en quantité plus importante que les alcools.

Il faut enfin préciser que les aldéhydes en C7 et C10 proviennent de la dégradation auto-oxydative des acides gras ou des hydroperoxydes formés par la lipoxigénase. Parmi ces substances d'arôme le 4-hepténal et le 2,4-décadiénal ont des notes crémeuses et grasses alors que le 2,4-heptadiénal et le 2,4,7-décatriénal ont des notes de rance ou d'huile oxydée. Des travaux ont montré que la teneur en ces aldéhydes augmente au cours de la conservation du poisson sur la glace (12).

L'équilibre entre les divers aldéhydes conduisant à la note "fraîcheur" de l'arôme des poissons, crustacés et coquillages est sous la dépendance des activités enzymatiques impliquées dans leur biogénèse et donc lié aux conditions technologiques permettant l'expression de ces activités.

LA BIOGENESE ENZYMATIQUE DES SUBSTANCES D'AROMES IMPLIQUEES DANS LA NOTE "FRAICHEUR"

La formation des composés d'arôme impliqués dans la note "fraîcheur" met en jeu la dégradation des acides gras à chaînes longues par oxydation enzymatique par le biais de la lipoxigénase, puis scission des hydroperoxydes obtenus par l'hydroperoxyde-lyase et isomérisation enzymatique ou, conversion en alcools sous l'action d'une activité deshydrogénase.

Les systèmes enzymatiques

La lipoxigénase catalyse l'hydroperoxydation d'acides gras polyinsaturés. La dioxygénation exercée par l'enzyme est spécifique et stéréospécifique ce qui permet de définir, à l'heure actuelle, chez les animaux marins, trois classes de lipoxigénases. Sur la base des réactions avec l'acide arachidonique, leur dénomination est fonction de la position du carbone hydroperoxydé, on distingue ainsi les 5-, 12- et 15- lipoxigénases (7,13-15).

L'activité lipoxygénasique apparait essentiellement localisée dans les branchies et la peau des poissons et , au niveau subcellulaire, dans la fraction microsomale (13). Contrairement aux lipoxygénases végétales les lipoxygénases animales semblent rapidement inactivées par les produits de la réaction.

La présence dans la fraction aromatique d'aldéhydes en C6 et C9 laisse supposer l'existence chez les poissons d'une activité hydroperoxydolyase qui n'a pas encore été clairement mise en évidence. Cette activité est, par contre, bien connue chez les végétaux au niveau des feuilles et des fruits (16). Par clivage des 12-hydroperoxydes ces enzymes conduisent, par exemple, au (Z,Z)-3,6-nonadiénal et avec les 15-hydroperoxydes au (Z)-3-hexénal (1). L'examen précis des molécules obtenues montre que dans le cas des 12-hydroperoxydes de l'acide eicosapentaénoïque on obtient le 3,6-nonadiénal mais aussi les radicaux 1,5-octadiène et 2,5-octadiène. Dans le cas de l'acide arachidonique le 3-nonénal et les radicaux 1-octène et 2-octène sont détectés (17) (figure 1).

Chez les poissons, comme chez les végétaux, les aldéhydes peuvent être enzymatiquement isomérisés ainsi le (Z)-3-nonénal donne le (E)-2-nonénal et le (Z,Z)-3,6-nonadiénal le (E,Z)-2,6-nonadiénal (1,18). Il faut préciser ici que les deux isomères d'une même substance d'arôme ne sont pas olfactivement perçus de la même manière : à titre d'exemple le (Z)-3-hexénal a une note tomate/vert/ frais alors que le (E)-2-hexénal a une note gras/vert (3) (tableau 2).

Il semble exister également chez les poissons une activité deshydrogénase pouvant conduire à la formation d'alcools tels que le 3,6-nonadiène-1-ol ou le 3-hexène-1-ol à partir des aldéhydes correspondants.

Les radicaux obtenus par l'action de l'hydroperoxydolyase peuvent accepter des radicaux hydrogène ou hydroxyle et former, par exemple, le 1-octène ou le 1-octène-3-ol ou bien le 1,5-octadiène ou le 1,5-octadiène-3-ol (17). Il peut également se produire une oxydation enzymatique des alcools secondaires obtenus générant ainsi les cétones correspondantes (par exemple 1,5-octadiène-3-one) (1).

Il apparaît donc clairement que les substances d'arômes en C5 et C6 sont liées à la présence d'une 15-lipoxygénase et que celles en C8 et C9 dépendent de la 12-lipoxygénase. Il faut cependant rester prudent dans ces affirmations car il semble, avec les lipoxygénases végétales, que le microenvironnement ait une influence déterminante sur la configuration des hydroperoxydes obtenus.

Le modèle enzymatique végétal

L'activité lipoxygénase la plus utilisée provient du Soja. Il s'agit d'une 9- ou 13-lipoxygénase qui est spécifique de l'acide linoléique (C18:2, n-6) et à un degré moindre de l'acide linolénique (C18:3, n-6). Le Soja renferme également des activités hydroperoxyde-lyase et isomérase (figure 2). Le clivage des 9-hydroperoxydes des acides linoléique et linolénique conduit à des aldéhydes en C9 c'est à dire respectivement au (Z)-3-nonanal et au (Z,Z)-3,6-nonadienal alors que par clivage des 13-hydroperoxydes on obtient des aldéhydes en C6 dont respectivement l'hexanal et le (Z)-3-hexanal (19). On retrouve ici des substances d'arômes identifiées dans la note "fraîcheur" de l'arôme des poissons.

Parallèlement à la genèse de ces aldéhydes il y a, suite à des réactions de β -scission et de clivage homolytique des hydroperoxydes de l'acide linoléique, formation d'aldéhydes en C10, comme le 2,4-décadienal à partir des 9-hydroperoxydes, et en C6 comme l'hexanal à partir des 13-hydroperoxydes.

Nous avons pu montrer lors de travaux avec la farine de Soja qu'il était possible de maîtriser, à l'aide des paramètres physico-chimiques du milieu réactionnel, la production d'hexanal et de 2,4-décadienal (20). La figure 3 illustre la production de ces aldéhydes dans des conditions favorables à la formation d'hexanal.

On sait par ailleurs que les radicaux oxy- et peroxy- issus de l'homolyse des hydroperoxydes sont à l'origine de réactions de co-oxydation des polyènes dont le β -carotène est l'exemple le plus connu (21). Les produits

qui résultent de cette co-oxydation sont la β -ionone, l'époxy- β -ionone. et le dihydroactinidiolide.

Ces molécules à odeur de violette et boisée sont présentes dans des fruits rouges (framboise, mûre). Des auteurs ont montré que par la formation de telles molécules les réactions de co-oxydation peuvent être à l'origine de l'arôme particulier du Saumon cuit qui est riche en pigments caroténoïdes (2, 22).

Dans l'optique de la production de ces molécules nous avons déterminé les conditions optimales de co-oxydation par les produits de l'acide linoléique générés par la lipoxigénase de Soja (23). La figure 4 montre un exemple de cinétique de production de ces trois molécules.

CONCLUSION

La biogenèse de substances d'arômes dérivées des lipides occupe une place importante dans la formation de l'arôme des poissons, crustacés et coquillages. La note "fraîcheur" ainsi produite doit pouvoir être mieux maîtrisée par une meilleure connaissance des divers systèmes enzymatiques impliqués et de leur régulation. Les connaissances acquises dans ce domaine, au niveau du Règne Végétal, permettent d'envisager des progrès assez rapides dans le contrôle des notes aromatiques issues de l'oxydation des acides gras polyinsaturés chez les animaux marins.

REFERENCES

- 1 JOSEPHSON D.B. and LINDSAY R.C., In "Biogenesis of Aromas" Parliment T.H., Croteau R., Eds, ACS Symposium Series 317, Washington, p. 201, (1986).
- 2 KARAHADIAN C. and LINDSAY R.C., In "Flavor Chemistry Trends and Developments", Teranishi R., Buttery R.G., Shahidi F., Eds, ACS Symposium Series 388, Washington, p. 60, (1989).
- 3 BADINGS H.T., In "Flavour Science and Technology", Bessière Y., Thomas A.F., Eds, John Wiley & Sons, Chichester, p. 171, (1990).
- 4 JOSEPHSON D.B., LINDSAY R.C. and STUIBER D.A., J. Agric. Food Chem., 31:326-330, (1983).
- 5 JOSEPHSON D.B., LINDSAY R.C. and STUIBER D.A., J.Agric.Food Chem.,

- 32:1344-1347, (1984).
- 6 JOSEPHSON D.B., LINDSAY R.C., and STUIBER D.A., *J. Agric. Food Chem.*, 32:1347-1352, (1984).
 - 7 JOSEPHSON D.B., LINDSAY R.C. and STUIBER D.A., *J. Agric. Food Sci.*, 50:5-9, (1985).
 - 8 WHITFIELD F.B. and FREEMAN D.J., *Wat. Sci. Tech.*, 15:85-95, (1983).
 - 9 WHITFIELD F.B., FREEMAN D.J., LAST J.H., BANNISTER P.A. and KENNETT B.H. *Aust. J. Chem.*, 35:373-383, (1982).
 - 10 TRANCHOTIKUL V. and HSIEH T.C.Y. *J. Food Sci.*, 54:1515-1520, (1989).
 - 11 TRESSL R., BAHRI D. and ENGEL K.H., *J. Agric. Food Chem.*, 30:89-93, (1982).
 - 12 MCGILL A.S., HARDY R. and GUNSTONE F.D. *J. Sci. Food Agric.*, 28:200-205, (1977).
 - 13 HSIEH R.J., GERMAN J.B. and KINSELLA J.E., *J. Agric. Food Chem.*, 36:680-685, (1988).
 - 14 GERMAN J.B. and CREVELING R.K., *J. Agric. Food Chem.*, 38:2144-2147, (1990).
 - 15 HAGAR A.F., HWANG H. and DIETZ T.H., *Biochim. Biophys. Acta*, 1005:162-169, (1989).
 - 16 HATANAKA A., KAJIWARA T., and SEKIYA J., In "Biogeneration of Aromas", Parliment T.H., Croteau R., Eds. ACS Symposium Series 317, Washington, p.167, (1986).
 - 17 HSIEH R.J. and KINSELLA J.E., *J. Agric. Food Chem.*, 37:279-286, (1989).
 - 18 HSIEH R.J. and KINSELLA J.E., *Adv. Food Nut. Res.*, 33:233-241, (1989).
 - 19 GARDNER H.W., In "Flavour Chemistry of Fats and Oils", Min D.B., Smouse T.H., Eds. American Oil Chemists' Society, p. 189, (1985).
 - 20 BENSOUSSAN M., ENDRIZZI A. and J.M. BELIN., 2ème colloque Biotechnologies Marines, Ronce-les-Bains, 28-30 Mai, (1991).
 - 21 GROSCH W., WEBER F. and FISCHER K.H. , *Ann. Technol. Agric.*, 26:133-137, (1977).
 - 22 JOSEPHSON D.B., Ph D. Thesis, University of Wisconsin-Madison, (1977).
 - 23 LAFOSSE F., Thèse Doctorat Université de Bourgogne, (Nouvelle Thèse), Dijon, (1988).

Tableau 1 : Exemples de substances d'arômes dérivées des lipides et isolées de poissons

Substance d'arôme	Concentration (ppb)	Seuil perception (ppb)	Note aromatique
C5 1-pentène-3-ol	3-30	400	fruité
C6 hexanal	10-100	5	vert/fruit non mûr
(E)-2-hexénal	1-10	17	vert/gras
(Z)-3-hexène-1-ol	1-10	-	vert/herbe
C7 (Z)-4-heptéнал	1-10	1	crèmeux
(E,E)-2,4-heptadiéнал	1-10	10	noisette rance
C8 (Z)-2-octéнал	0,1-5	-	noix gras
1-octène-3-one	0,1-10	0,005	-
1,5-octadiène-3-one	0,1-5	0,001	champignon
1-octène-3-ol	10-100	10	champignon/melon
1,5-octadiène-3-ol	10-100	10	champignon/algue
2,5-octadiène-1-ol	1-20	-	champignon/aigue
C9 (Z)-3-nonéнал	0-25	0,08	concombre
(E,Z)-2,6-nonadiéнал	0-35	0,01	concombre/suif
3,6-nonadiène-1-ol	0-15	10	-
C10 (E,E)-2,4-décadiéнал	1-5	-	gras/frit
2,4,7-décatriéнал	1-10	150	huile oxydée

D'après les références 1,3,4,5,18

Tableau 2 : Variation de la note aromatique des aldéhydes en fonction de leur configuration isomérique

Aldéhydes "primaires" (a)		Aldéhydes après isomérisation	
Aldéhyde	Note aromatique	Aldéhyde	Note aromatique
(Z)-3-hexéнал	vert frais/tomate	(E)-2-hexéнал	vert gras
(Z)-4-heptéнал	crémeux	(E)-4-heptéнал	mastic
(E,Z)-2,4-heptadiéнал	pomme pourrie	(E,E)-2,4-heptadiéнал	noisette rance
(Z)-2-octéнал	noix/gras	(E)-2-octéнал	gras
(Z)-3-nonéнал	concombre	(E)-2-nonéнал	suif
(Z,Z)-3,6-nonadiéнал	concombre frais	(E,Z)-2,6-nonadiéнал	concombre/ suif
(E,Z)-2,4-décadiéнал	frais/frit	(E,E)-2,4-décadiéнал	gras/frit

(a) aldéhydes directement issus des hydroperoxydes

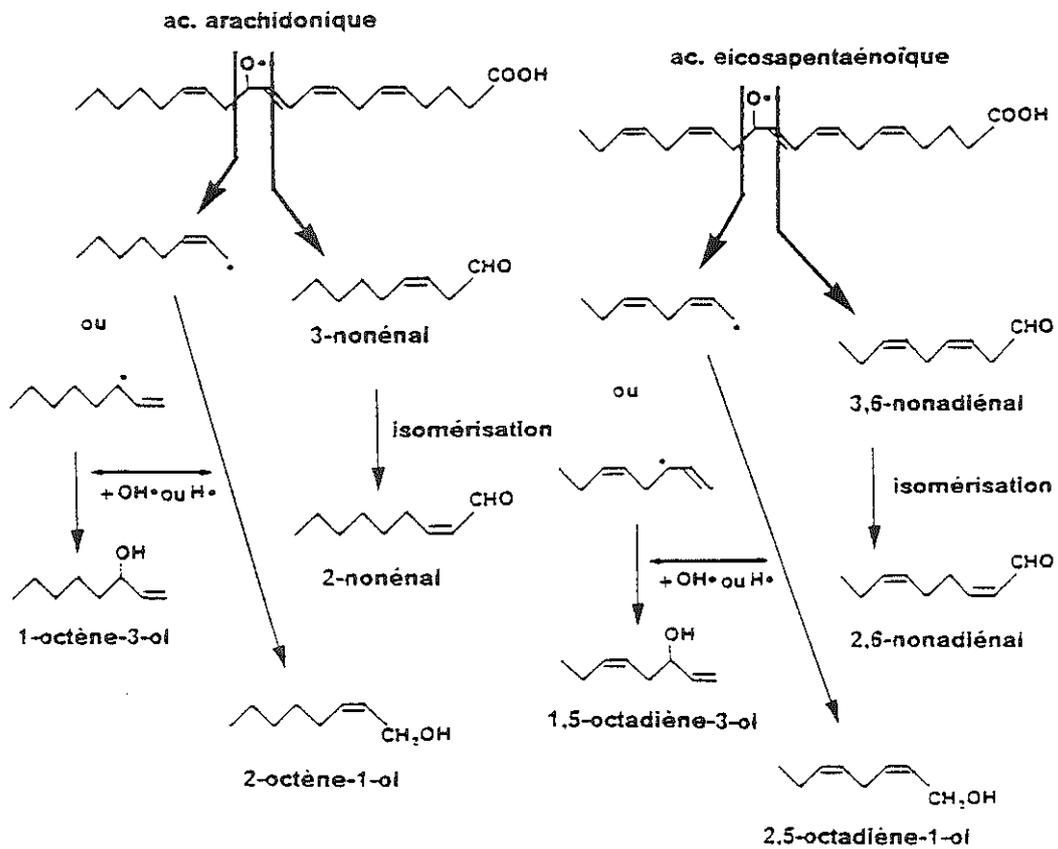


Figure 1 : Substances d'arômes dérivées des 12-hydroperoxydes de l'acide arachidonique et de l'acide eicosapentaénoïque (D'après réf. 17)

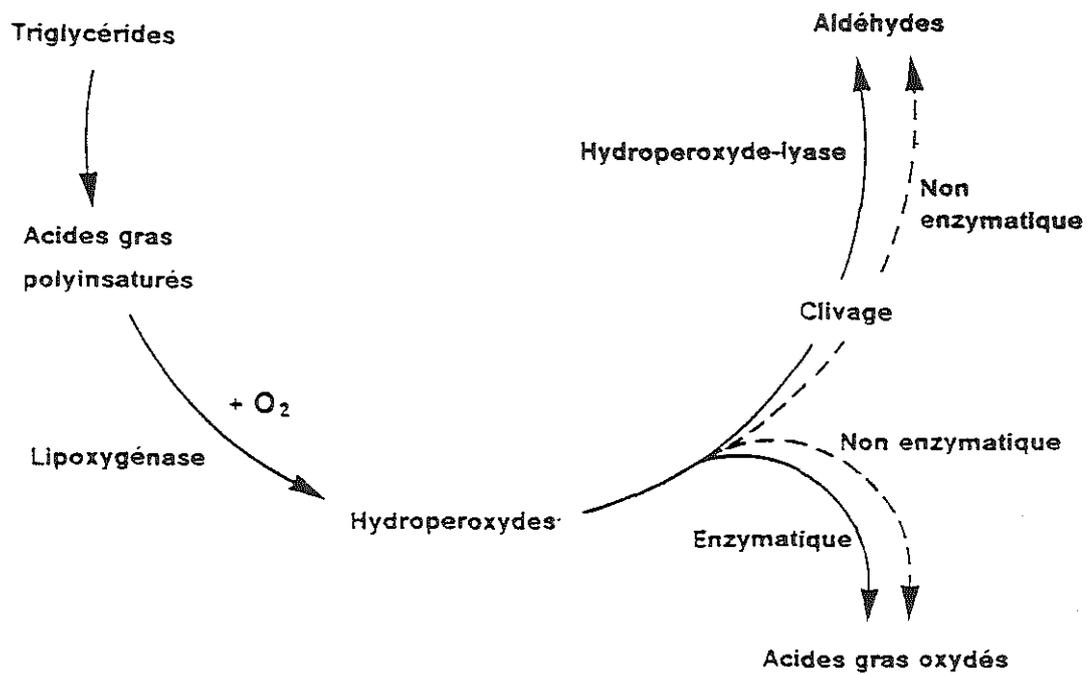


Figure 2 : Schéma de dégradation enzymatique oxydative des lipides.(D'après réf. 19).

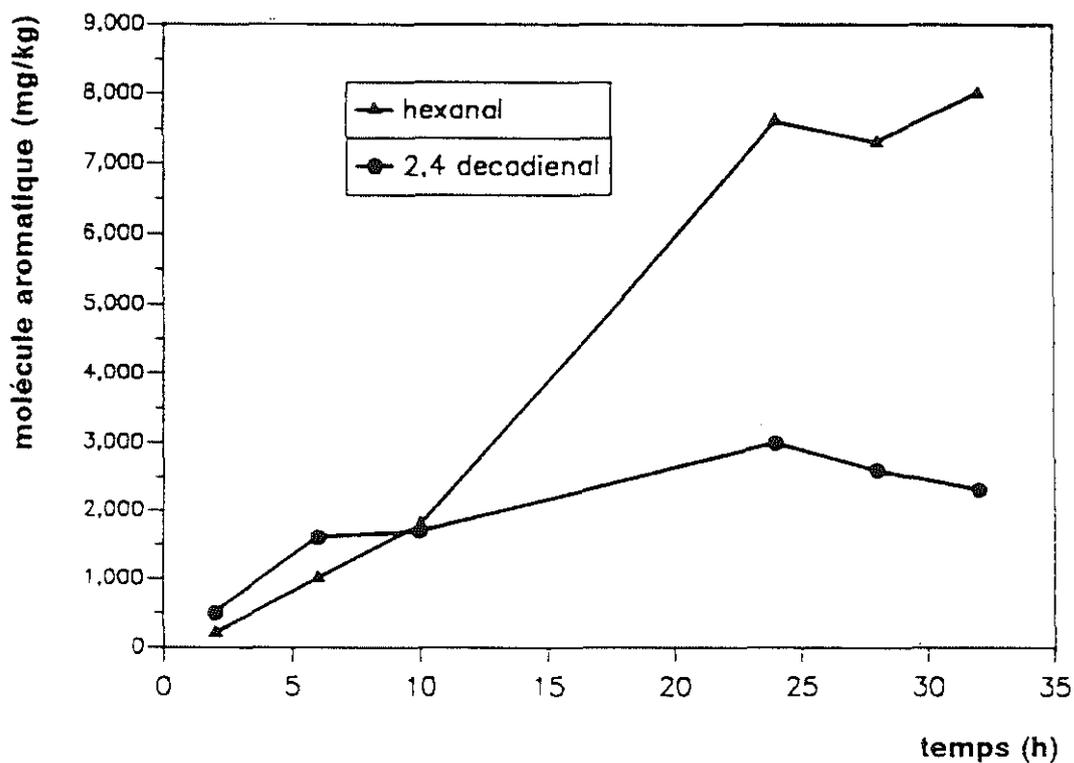


Figure 3 : Production d'aldéhydes par la lipoxygénase et l'hydroperoxydase de Soja à partir d'huile végétale hydrolysée

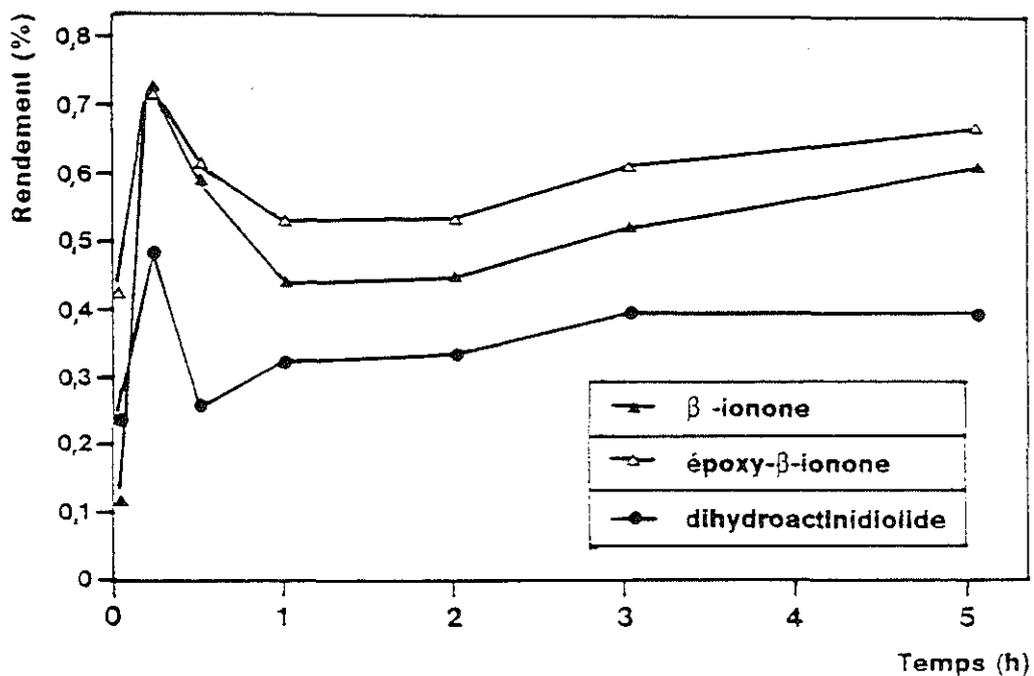


Figure 4 : Cinétique de production de β -ionone et de dihydroactinidiolide à partir de β -carotène par des réactions de co-oxydation enzymatique (D'après réf. 23)

CHITINE, CHITOSANE, PRODUCTION, PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET APPLICATIONS

Alain DOMARD

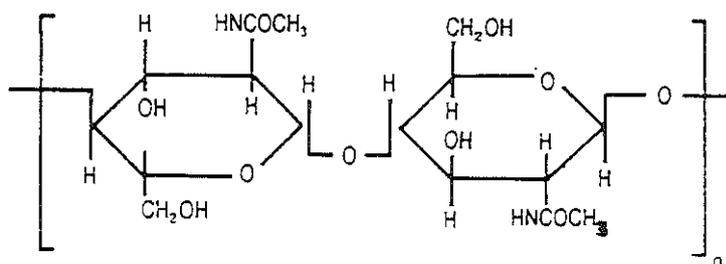
Laboratoire d'Etudes des Matériaux Plastiques et des Biomatériaux
URA CNRS 507

43 Boulevard du 11 Novembre 1918
69622 Villeurbanne Cédex

Aber Technologies
Pratméan
29880 Plouguerneau

I - Introduction

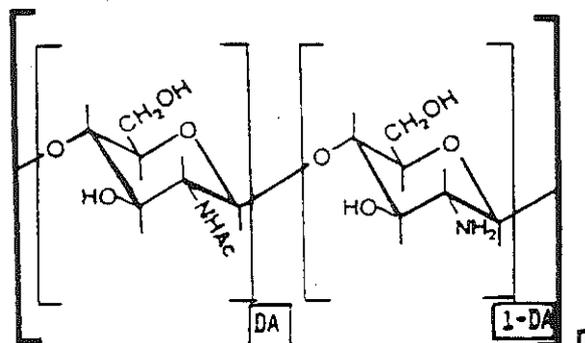
La chitine ou poly (N-acétyl-D-glucosamine) est le polysaccharide le plus abondant sur terre avec la cellulose.



POLY(N-ACÉTYL, D-GLUCOSAMINE)

C'est le polymère de structure des exosquelettes de tous les arthropodes. On la rencontre dans la paroi des cellules de la plupart des champignons, dans certaines bactéries, levures ou algues.

On appelle chitosane, toute chitine suffisamment N-désacétylée pour permettre sa solubilisation dans les acides dilués. Ceci est généralement atteint pour des degrés d'acétylation résiduels, DA, ≤ 30 %. Lorsque la désacétylation est totale, on obtient alors de la polyglucosamine.



CHITOSANE

II - Production

Actuellement, la chitine est essentiellement produite à partir de carapaces de crustacés, principalement de crabes et de crevettes ayant subi une déminéralisation en milieu acide suivie d'une déprotéinisation par la soude. Après un tel traitement, le taux d'acétylation n'est plus de 100 % mais reste néanmoins supérieur à 90 %.

Le chitosane est obtenu en désacétylant cette chitine à des températures voisines de 100°C, en milieu alcalin très concentré et cela pendant un temps supérieur à 1 heure. Ces conditions particulièrement drastiques conduisent, parallèlement à la désacétylation, à une dégradation du polymère qui se traduit par une diminution des masses moléculaires. On obtient ainsi des produits ayant des DA résiduels compris entre 10 et 25 % avec des masses molaires situées entre 10^5 et 10^6 g/mole. La masse moléculaire du motif de répétition de la chaîne de chitosane dépendant de la nature du groupe fonctionnel amine porté par le carbone 2 et, dans le cas de la forme $-NH_3^+$, de l'acide conjugué, il est préférable de parler de degré de polymérisation (DP), indépendant de ces paramètres, variant entre 10^3 et 10^4 .

La chitine et le chitosane sont actuellement produits au Japon, aux Etats-Unis, en Inde, en France et en Chine. La chitine n'ayant quasiment pour seule application que la production de chitosane, on ne cite généralement que les chiffres de la capacité annuelle de production de chitosane que l'on peut évaluer, dans le monde, à environ 1200 tonnes.

Le prix de vente de ce polysaccharide dépend de trois paramètres : son taux d'acétylation résiduel, sa masse moléculaire et son grade. Il est inversement proportionnel à son DA, proportionnel à sa masse moléculaire sauf pour les valeurs les plus faibles, en particulier pour les oligomères de $DP < 100$ et croit, pour le grade, dans l'ordre technique, pharmaceutique, cosmétique et médical. La gamme de prix se situe alors dans une fourchette très étendue qui va de 150 F à 60 000 F par kg. Le chitosane est un produit cher, qui le restera avec un contexte de production tel qu'il est actuellement. Ceci fait que bien que supérieur à des matières concurrentes moins onéreuses, il lui est plus difficile de pénétrer le marché de la gamme technique que celui des applications cosmétiques et médicales où il est à la fois supérieur et moins coûteux que la plupart des produits à même finalités.

La diversité des produits, en particulier au niveau des degrés d'acétylation résiduels et des masses molaires est à relier aux problèmes rencontrés par les industriels. Il est en effet difficile pour eux de produire de façon reproductible, un chitosane ayant à la fois un DA et un DP donnés ou, de le désacétyler totalement tout en lui conservant un degré de polymérisation supérieur à 3 000.

En Europe, il existe une seule unité de production ayant su répondre à ce cahier des charges très sévère, il s'agit de la société Aber Technologies située non loin de Brest. Celle-ci dont la capacité de production vient d'atteindre 2 tonnes par mois prépare de façon reproductible des polymères dont la désacétylation va de 75 % à plus de 99 % avec des DP couvrant une gamme de 500 à 5 000 voire 10 000 pour les plus acétylés. Une production des oligomères est aussi prévue à moyen terme.

De nombreuses formes physiques sont disponibles comme les flocons, les poudres, les éponges, les films, les gels, les solutions etc... De plus, dans chaque cas, les diverses formes correspondant à la fonction amine sous forme $-NH_2$ ou $-NH_3^+$ sont possibles.

Cette dernière structure offre une gamme très étendue de produits de par la grande variété des contre-ions que l'on peut lui associer (chlorures, acétates, ascorbates, lactates, glutamates, sorbates, gluconates etc...

V.2 - Autres domaines d'application du chitosane

En dehors des domaines d'application précédents où le chitosane trouve des marchés importants, il en existe certains autres où il semble pénétrer de façon durable.

a - Agro-alimentaire

Il est utilisé en enrobages protecteurs des fruits et légumes, obtenus par spray, ce qui dans certains cas comme celui des pommes permet d'exhausser la brillance. Il est utilisé pour diminuer l'acidité des jus de fruits et du café soluble ou encore comme éclaircissant dans les jus de fruits et légumes où il intervient comme flocculant.

b - Agriculture

Il trouve dans ce domaine des applications dans l'enrobage protecteur des semences. Il est biostimulant et favorise, de ce fait, la germination et la croissance tout en améliorant le rendement des récoltes.

c - Traitement des eaux usées

Son pouvoir chélatant élevé permet au chitosane d'éliminer la présence des métaux lourds, même à l'état de trace, dans les effluents industriels. Ses excellentes propriétés flocculantes à la fois des matières minérales et organiques mais aussi des micro-organismes en font un matériau de choix pour le traitement des eaux usées ou des piscines.

d - Papèterie

C'est un domaine d'application où le chitosane paraît très prometteur. Il apporte en effet une bonne rétention des charges facilitant ainsi le recyclage des eaux blanches. Lorsqu'il est désacétylé à plus de 95 %, il permet de multiplier par quatre la résistance du papier à l'état humide. L'impression est plus facile et le papier ainsi préparé est recyclable à 100 %. Toutefois, la capacité mondiale de production de chitosane étant insuffisante par rapport à ce que nécessiterait la seule consommation d'une industrie du papier de grande diffusion comme celle du papier blanc, seules quelques applications techniques sont actuellement opérées.

e - Textile

L'industrie textile est aussi un domaine d'application où le chitosane devrait pénétrer de façon durable. Il peut être utilisé comme fibre technique biodégradable (sutures) en association avec d'autres fibres ou encore en ensimage pour améliorer la montée des couleurs, la résistance à la putréfaction et l'ennoblissement textile.

VI - Conclusion

Le chitosane, grâce aux propriétés très intéressantes décrites ci-dessus, est en train de pénétrer de nombreux marchés industriels. Comme tout produit nouveau, il donne lieu à un comportement, à son égard, que l'on peut qualifier de "chitosanomanie". C'est la raison pour laquelle nous avons limité sa présentation aux seules propriétés et applications déjà largement éprouvées. L'obstacle majeur à son développement est son mode de production actuel qui limite la quantité disponible, bien que les réserves en chitine de la biosphère soient considérables (équivalentes à la cellulose). Ce polysaccharide, qui n'en est qu'à ses débuts, reste néanmoins promis à un très grand avenir.

Références

- [1] A. DOMARD, *Int. J. Biol. Macromol.* (1987) **9**, 98-104.
- [2] H. KAUSS, W. JEBLICK and A. DOMARD, *Planta* (1989) **178**, 385-398.
- [3] Y. LIENART, C. GAUTIER and A. DOMARD, *Planta* (1991) sous presse.
- [4] "Chitin in Nature and Technology" Edité par R. Muzzarelli, C. Jeuniaux et G. Gooday, 1986, Plenum Press.
- [5] "Chitin and Chitosan" Edité par G. Skjåk-Braek, T. Anthonsen et P. Sandford, 1989, Elsevier Applied Sciences.
- [6] C. COLLOMBEL, O. DAMOUR, C. GAGNEU, F. POINSIGNON, C. ECHINARD et J. MORICHY, *Eur. Pat. Appl.* EP 296.078.



9, rue du Clos Courtel
35700 RENNES
Tél. : 99.38.33.30
Fax : 99.63.76.88

STRATEGIE DE VALORISATION DE CO-PRODUITS :

UN DEFI POUR LA FILIERE MER EN BRETAGNE

I - ESSAIS DE DEFINITION ET EVOLUTION DU CONCEPT CO-PRODUIT

Historiquement, il est possible d'affirmer que toutes les productions humaines ont généré des déchets. Mais, jusqu'à ces dernières années ceux-ci n'ont pas été considérés comme un souci majeur des unités de production. En effet, le stockage en décharge, le rejet dans le milieu naturel ou l'auto-épuration permettaient de résoudre aisément ce problème.

Cependant, dans les années cinquante, la notion de *protection de l'environnement* se développant de plus en plus et les volumes des rejets étant toujours croissants, il a fallu ajouter une activité supplémentaire à la chaîne de transformation : le **traitement** et la **gestion** des déchets. Toutefois, à cette époque, la rentabilité des autres transformations permettait, le plus souvent, de financer cette opération, qui pour l'entreprise est toujours déficitaire, puisque le traitement des déchets ne vise qu'à les modifier et les conditionner afin de mieux protéger l'environnement.

Lors du premier choc pétrolier, la rentabilité des entreprises ayant chuté, et parfois de beaucoup, les postes les moins rentables ont été soit abandonnés, soit restructurés en vue de les rendre plus productifs. C'est à cette période qu'est née la notion de **valorisation** des déchets. Certes, pendant les premières années, il n'a été question que de transformation modeste : soit recyclage au sein même de l'entreprise, soit production à très faible valeur ajoutée, pour l'alimentation animale par exemple.

Mais très rapidement, on en est arrivé à mieux définir et connaître la nature et la composition des sous-produits, et par là-même, à pouvoir en extraire des composés à très haute valeur ajoutée (HVA), ce qui permet, dans une seconde étape, de financer le traitement des composants moins nobles.

C'est ainsi qu'est apparue la notion de **co-produit**. Un co-produit est une production spécifique à l'entreprise. Toutefois, elle se réalise en parallèle ou en complément de l'activité principale. Si cette notion a été appliquée dans un premier temps aux déchets et aux sous produits, aujourd'hui elle peut, dans certains cas, s'appliquer à la matière première elle-même.

On peut donc distinguer plusieurs classes de co-produits en fonction de leur origine :

- *Récupération et valorisation d'un sous-produit* : viscères, écailles, carapaces, arêtes.

- *Extraction* d'un principe actif (*échinodermes*) ou d'un élément avant la transformation du produit principal : arômes et acides gras des poissons, iode des algues...

II - LES POSSIBILITES POUR LA REGION BRETAGNE

Aujourd'hui, nombreux sont ceux qui s'interrogent sur :

- 1) Le devenir de la politique communautaire (effort de pêche, quotas) ;
- 2) La gestion de l'espace littoral confronté à de multiples activités pas toujours conciliables (tourisme, aménagement foncier, activités portuaires, cultures marines).

Il est, à ce sujet, important de souligner combien est essentiel la mise en place des *Schémas de Mise en Valeur de la Mer (S.M.V.M.)*

Parmi les alternatives possibles à l'exploitation actuelle des ressources marines, **deux voies** nous semblent particulièrement prometteuses :

- **L'utilisation d'importants stocks d'organismes marins** (*poissons essentiellement mais aussi mollusques et crustacés*) **actuellement sans valeur commerciale déclarée** ; ces organismes constitués également de protéines, matières grasses, fibres, arômes peuvent, par transformation, entrer dans la composition de nouvelles recettes alimentaires. La percée spectaculaire et récente de la charcuterie des produits de la mer est, à cet égard, révélatrice des opportunités certaines de marchés.
- **Les invendus sous criée et les sous-produits générés dans les ateliers de marée** (plusieurs dizaines de milliers de tonnes en région Bretagne), sont destinés, actuellement, à la fabrication de **farines** (*alimentation animale*) et d'**huiles** (*margarines, lubrifiants*). Le cours de ces produits transformés (3 à 4000 F la tonne) d'origine française ayant tendance à fléchir devant les principaux producteurs mondiaux (Pérou, URSS...), la recette d'une plus forte valeur ajoutée à ces sous-produits doit être fortement soutenue.

Le tableau suivant rassemble quelques exemples de valorisation obtenue à partir de co-produits issus des activités agricoles, agro-alimentaires et marines en région Bretagne.

CO-PRODUIT	PRODUCTION
Biomasse algale.....	Iode, fucanes
Plumes de volailles.....	Acides aminés
Racines d'endives.....	Sucres, alcaloïdes
Coeur d'animaux.....	Cytochrome C
Vert de poireau	
Carottes, oignons	Arômes
Marc de pommes	
Carapaces de crabes.....	Chitine
Végétaux divers.....	Huiles aromatiques
Cuir et peaux.....	Collagène
Graisses de poissons.....	Acides gras essentiels
Lupin, féverole, pois.....	Concentrats protéiques
Laitance de poissons.....	Acide désoxyribonucléique

Ces différents exemples permettent de constater que cette démarche est possible. Cependant, elle est le plus souvent très difficile et il nous faut absolument éviter de générer, chez notre interlocuteur, des espoirs qui pourraient ne pas être suivis des effets attendus. Car la mise en application pose de nombreux problèmes.

III - LES FACTEURS LIMITANTS

Lorsqu'on imagine un nouveau procédé ou un produit pour une meilleure valorisation des productions agricoles, il est très important d'intégrer dans son raisonnement les facteurs *extratechnologiques* qui peuvent conduire à l'échec.

Le premier facteur est l'absence d'une réelle culture d'entreprise, indispensable pour toute diversification.

En effet, la production de composés HVA à partir des productions marines ou des sous-produits, est un métier spécifique, beaucoup plus proche de la chimie que du mareyage ou de la conserverie. Ce manque de culture d'entreprise se retrouve à trois niveaux :

- 1) L'acteur principal (pêcheur ou entreprise agro-alimentaire) qui prend tous les risques techniques et financiers, est le plus souvent le moins bien informé, sur les potentialités de ses co-produits.
- 2) Par ailleurs, les technologies de production de molécules à haute valeur ajoutée, sont très souvent éloignées des techniques propres et pré-existantes dans l'entreprise qui possède la matière première.
- 3) Enfin, les secteurs économiques et les techniques de commercialisation entre les produits traditionnels (*agro-alimentaire*) et les nouveaux (*chimique ou parachimique*) sont radicalement différents.

Le second facteur concerne les difficultés que pose la R & D.

En effet, dans ce domaine, s'il est aisé de trouver des idées ou des procédés à expérimenter, il faut savoir que les recherches sont longues et coûteuses. En outre, à terme, les investissements tant en matériel qu'en matière grise sont très élevés. Pour arriver à l'industrialisation d'un nouveau procédé ou d'un nouveau produit, les étapes successives de *bibliographie, d'analyse qualitative et quantitative, de mise au point des techniques d'extraction et de purification* à l'échelle pilote (d'abord de laboratoire puis de pré-industrialisation) sont autant d'écueils qui remettent chaque fois en cause le résultat final. C'est peut-être une des raisons pour lesquelles peu sont enclins à prendre de tels risques.

Le troisième facteur est l'aspect économique et concerne plus particulièrement la taille des marchés.

Si les composés, dont il est question ici, ont un prix de vente élevé, cela vient du fait qu'ils sont produits en faible quantité et correspondent à un marché limité. Par ailleurs, il est presque toujours nécessaire de disposer immédiatement d'un réseau de distribution à l'échelle internationale, avec un double risque : *premièrement* les marchés sont très fluctuants, tant en quantité demandée qu'en chiffre d'affaires, et *deuxièmement*, ils sont très fragiles.

En effet, pour tout principe actif nouveau, ou produit de substitution, il est toujours possible, soit qu'il existe un effet de mode, soit que le même composé soit obtenu avec un coût moindre par une autre technologie (synthèse chimique ou biotechnologies), soit qu'il soit découvert un produit plus actif. Il est donc nécessaire de s'aménager une "niche" sur un micromarché, en répondant parfaitement à une attente de la clientèle, tant par le produit lui-même que par sa forme galénique.

Enfin, le dernier facteur limitant reste le problème des déchets car si l'on raisonne, comme il se doit, sur l'ensemble du devenir d'une matière première donnée, il nous faut admettre que si l'extraction et la purification d'une molécule spécifique d'un co-produit en très faible quantité résoud les problèmes de valorisation, les problèmes pondéraux subsistent. En effet, une tonne de déchets moins quelques kilogrammes de matière, génère toujours une tonne de déchets pour laquelle il faut trouver une destination finale.

Ainsi donc, toute nouvelle idée (de production ou de procédé) aussi pertinente et intéressante puisse-t-elle paraître du laboratoire ou du bureau d'étude, peut se heurter, lors de son transfert dans l'entreprise, à des facteurs de culture d'entreprise, de persévérance en R & D, de taille des marchés et de relations technico-économiques. Cependant, les régions se sont dotées récemment, de structures spécialisées dans ces techniques d'analyse du transfert de technologies, afin d'aider les industriels locaux à mieux intégrer ces nouvelles données dans leurs projets d'entreprises, et ainsi, augmenter leur rentabilité tout en protégeant l'environnement.

IV - ROLE DES CENTRES DE TRANSFERTS

Dans le contexte que nous venons de présenter, il est évident que pour réussir une nouvelle orientation de sa production vers de nouveaux créneaux, le porteur de projet est obligé de s'associer avec de nouveaux partenaires (industriels et/ou commerciaux) dont la dynamique et le discours ne lui sont pas familiers. En outre, ces partenaires ont une approche des problèmes très différente de celle, aujourd'hui, pratiquée par les milieux maritimes.

C'est ici que s'inscrit toute la mission des Centres de Transfert. En effet, pour une bonne valorisation des co-produits, il est nécessaire d'aborder l'ensemble des problèmes : *technico-industriels et économiques*. Il est indispensable de pouvoir, par produit, donner des indications précises concernant les potentialités des marchés, l'amortissement des investissements, mais aussi les exigences de qualité des clients potentiels.

Regrouper de nombreuses compétences, rapprocher des acteurs de milieux industriels très différents, intensifier les relations entre les producteurs, les chercheurs, les industriels, en résumé **coordonner** les transferts de technologies entre des secteurs publics et des secteurs privés, telle est la méthodologie que propose le CRITT Biotechnologies, Chimie Fine et Environnement en Bretagne.

TRANSFERT DE TECHNOLOGIES

LES ETAPES DU TRANSFERT

1 VEILLE TECHNOLOGIQUE PERMANENTE & MULTI DISCIPLINAIRE

PROSPECTER

la recherche fondamentale

la recherche appliquée

LA RECHERCHE FINALISEE

Ainsi naît l' **Idée**

2 INGENIEURIE DE PROJET

- * Préanalyse du marché
- * Recherche des antériorités
- * Analyse technologique (en intégrant la notion de coûts)

Ainsi naît le **Projet**

3 FAISABILITE INDUSTRIELLE

- * Technique (prototype)
- * Economique (marché & marketing)
- * Financière (plan de financement)

Ainsi naît la **Nouvelle Activité**

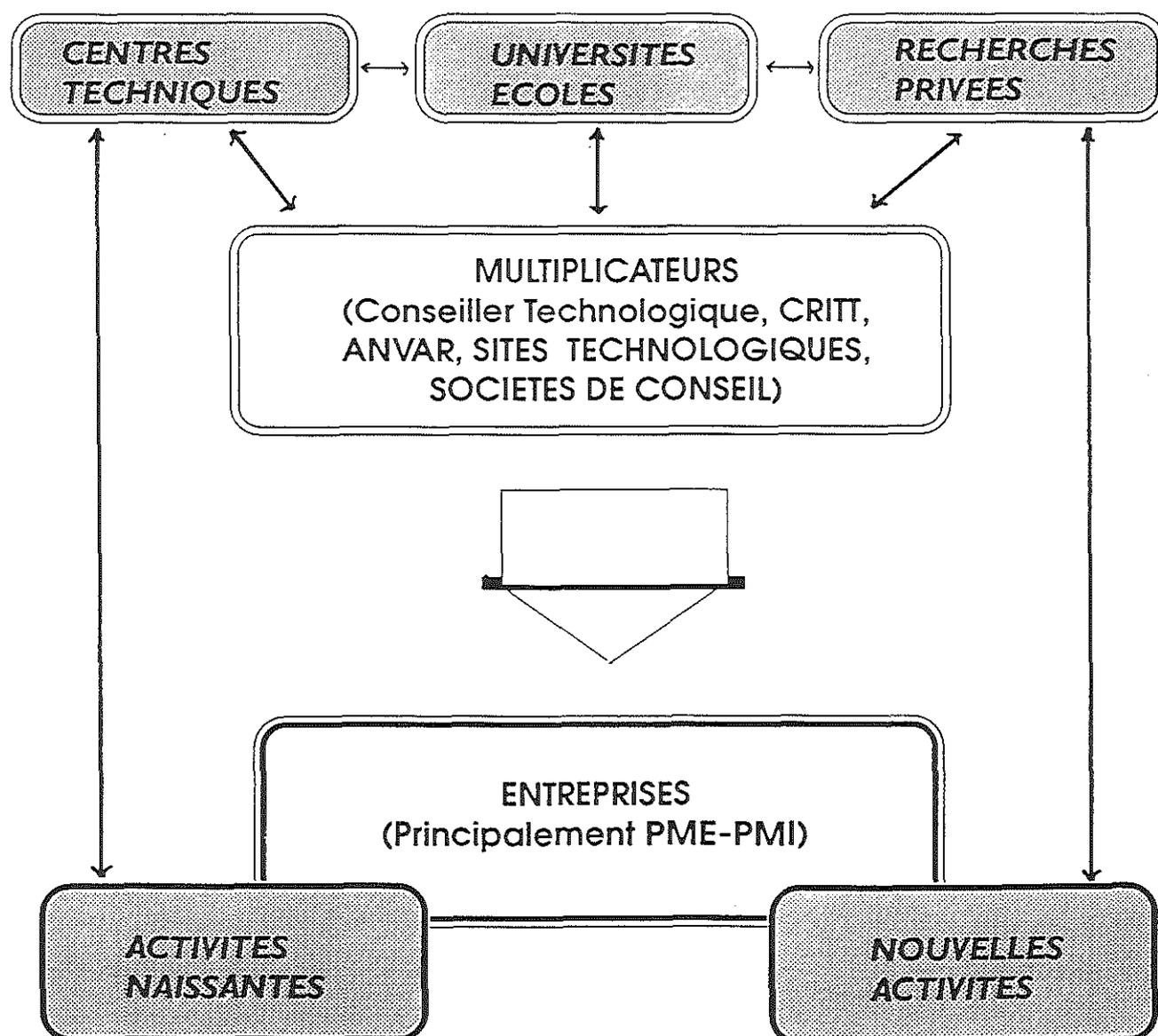
TRANSFERT DE TECHNOLOGIES

TROIS NOTIONS :

■ LE MOUVEMENT

■ LA SYNERGIE

■ LE MULTIPLICATEUR



VERROUS ET FACTEURS LIMITANTS

1 - UN METIER DIFFERENT

- * La **TECHNOLOGIE** de production des HVA est souvent très éloignée de la **CULTURE DE L'ENTREPRISE**
- * Le **SECTEUR ECONOMIQUE** et les **TECHNIQUES DE COMMERCIALISATION** sont très différentes entre les produits traditionnels et les nouveaux (HVA)

2 - UNE R&D LONGUE ET COUTEUSE

- * Pour les phases successives d'analyse, de mise au point, et d'industrialisation des process et des produits

3 - DES MARCHES MONDIAUX

- * Les faibles **VOLUMES** produits imposent rapidement la **DIMENSION INTERNATIONALE**
- * Les marchés sont souvent très **FLUCTUANTS**

4 - RESTE LE PROBLEME DES DECHETS

- * L'**extraction** et la valorisation de **FAIBLES QUANTITES** ne résolvent pas les problèmes **PONDERAUX**

L'IODE ET LA BIOMASSE ALGALE

1. — EFFLUENTS D'UNE SOCIÉTÉ BRETONNE PRODUISANT DES ALGINATES

Partenaires : 2 industriels + CEVA + CRITT
Non faisabilité technologique

2. — BIOMASSE ALGALE EN AMONT DE LA FILIÈRE ALGINATIERE SANS RETOUR

Partenaires : 2 industriels + CEVA + CRITT
Non faisabilité technologique et économique

SOLDE DU DOSSIER

3. — BIOMASSE ALGALE EN AMONT DE LA FILIÈRE ALGINATIERE AVEC RETOUR

Partenaires : 2 industriels + CRITT
- Phase laboratoire
- Phase pré-pilote

BILAN :

DIMENSIONNEMENT INDUSTRIEL
PROTECTION INDUSTRIELLE

CONCLUSION :

NE JAMAIS FERMER UN DOSSIER DÉFINITIVEMENT

CONCLUSION :

pour clore cette trop courte session consacrée à la valorisation des produits et apporter quelques données complémentaires à ce qui vient d'être exposé on peut préciser les éléments suivants.

Tout d'abord en terme de potentiel de valorisation et d'exploitation des ressources, le milieu marin constitue un réservoir considérable de ressources renouvelables. L'activité de pêche, tout en restant une activité de cueillette connaissant un taux élevé de gaspillage, n'en exploite qu'une faible partie. Plus des 2/3 de la biomasse animale pêchée sont en effet constitués par seulement 70 espèces de poisson, crustacés et mollusques. Cette utilisation limitée mais très ciblée peut paradoxalement aussi conduire à une surexploitation de certaines espèces.

L'apport des biotechnologies dans le domaine des pêches et cultures marines bien qu'encore limité actuellement est potentiellement important en particulier en terme de meilleure gestion des ressources exploitées.

On peut distinguer trois niveaux d'application des biotechnologies pouvant contribuer à la réalisation de cet objectif. Premièrement, celui de l'amélioration et du contrôle de la qualité des produits, sujet que nous n'avons pu aborder aujourd'hui. Rappelons simplement tout l'intérêt de disposer d'outils type biocapteurs, immuno ou enzymotests permettant d'accroître le suivi des produits dans les différentes phases allant de la pêche au stockage et à la transformation.

Un deuxième niveau d'application des biotechnologies concerne la transformation des produits. Parmi celles-ci citons les lactofermentations permettant d'augmenter la durée de vie de certains produits par un effet de flore barrière, l'obtention de nouveaux produits, la production d'ensilage pour l'alimentation animale ou encore les traitements enzymatiques de produits marins facilitants les opérations de pelage, décorticage ou séparation de constituants.

Enfin, le troisième niveau d'application, à la frontière de la chimie fine et des biotechnologies, vise à l'exploitation de ressources marines disponibles quantitativement pour en extraire des substances d'intérêt industriel dans des secteurs aussi divers que l'agroalimentaire, la diététique, la cosmétique ou la pharmacie. Une bonne illustration en a été donnée par l'extraction purification de la chitine et de ses dérivés.

Les différents niveaux d'application et les nombreux développements qui en découlent conduisent à l'émergence d'un concept nouveau de valorisation industrielle des ressources exploitées. Ce dernier est illustré dans le tableau ci-dessous. Cette stratégie de valorisation plus complète des ressources exploitées commence à être mise en oeuvre dans des pays, tels le Japon, la Norvège et l'Islande où le poids économique des pêches et cultures marines est important. Les formes nouvelles de valorisation à la frontière de la chimie fine impliquent une approche pluridisciplinaire particulièrement caractéristique des biotechnologies.

PRODUITS TRANSFORMES	MATIERES PREMIERES	SOUS-PRODUITS	COPRODUITS PRODUITS HVA
<ul style="list-style-type: none"> - Filets poissons - Pulpe/Surimi - Farine/Hydrolysat 	<u>Industrie des Pêches</u> Poissons	<ul style="list-style-type: none"> -> Viscères -> Laitance -> Peau/arêtes 	<ul style="list-style-type: none"> -> Peptones/enzymes ----->enzymes purifiées -> Protamine ----->nucléotides ADN -> Peptones Protéines ----->collagène protéines purifiées
<ul style="list-style-type: none"> - Crevettes décortiquées - Puipe/miettes crabes 	Crustacés	<ul style="list-style-type: none"> ->Carapaces -> Viscères 	<ul style="list-style-type: none"> -> Chitine -----> Chitosan -----> Pigments -> Peptones/enzymes ----->Protéines purifiées, enzymes arômes.
<ul style="list-style-type: none"> - Mollusques décortiqués Noix de St-Jacques, Moules...) 	Mollusques	<ul style="list-style-type: none"> -> Viscères/ gonades 	<ul style="list-style-type: none"> -----> arômes, enzymes glycoprotéines
<ul style="list-style-type: none"> - Blanc de seiche/Calmar 	Céphalopodes	<ul style="list-style-type: none"> -> Viscères 	<ul style="list-style-type: none"> -> Chitine -> Protéines/Peptides -----> enzymes purifiées Inhibiteur d'enzymes
<ul style="list-style-type: none"> - Phycocolloïdes -Algues alimentaires 	<u>Industries des Algues</u> <ul style="list-style-type: none"> - Algues récoltées - Algues cultivées/ récoltées 	<ul style="list-style-type: none"> ->résidus de traitement (jus de lixiviation) -> sous-produits d'algues alimentaires 	<ul style="list-style-type: none"> polysaccharides-----> polysaccharides purifiés (fucanes) sucres alcool/ Extraits Fibres alimentaires Hormones...

T H E M E V I

TRANSFERT DE GENES

STRATEGIE DE RECHERCHES SUR LA TRANSGENOSE CHEZ LES INVERTEBRES MARINS EN VUE DE L'OBTENTION DE SOUCHES RESISTANTES AUX MALADIES.

E. Mialhe, J.P. Cadoret, S. Gendreau, J. M. Delecheneau,
C. Rousseau, E. Bachère, V. Boulo, D. Noël, T. Noël,
J. Rodriguez, M. Ohresser, R. M. Le Deuff et R. S. Lee.

Unité de Recherches en Pathologie, Immunologie et
Génétique Moléculaire
IFREMER, BP 133, 17390 La TREMBLADE

Les maladies infectieuses des mollusques et des crustacés d'intérêt aquacole limitent généralement et annihilent parfois leur production. De plus, de nouveaux agents pathogènes de divers types sont régulièrement identifiés (protozoaires et procaryotes intracellulaires, bactéries, virus), ce qui a conduit à considérer les recherches en pathologie dans une optique prophylactique et essentiellement "méthodologique". En effet, l'objectif est de pouvoir appliquer le plus largement possible à différentes maladies les résultats acquis pour une pathologie particulière.

Cette stratégie de recherches a été initiée par la mise au point de méthodes d'isolement et de purification des agents pathogènes qui, exceptées les bactéries, ne peuvent être cultivés *in vitro* compte tenu de l'absence de lignées cellulaires de ces animaux et de la nature intracellulaire de la majorité des agents. Les protocoles ont été ainsi établis pour des protozoaires tels que *Marteilia* (1) et *Bonamia* (2), puis progressivement adaptés à d'autres parasites (3, 4).

Le premier domaine d'application de ces méthodes de purification a été la préparation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux et de sondes nucléiques (5, 6, 7, 8, 9), qui constituent des réactifs particulièrement bien adaptés à divers types de techniques de diagnostic (10), mieux adaptées que l'histologie pour effectuer des contrôles zoosanitaires efficaces à l'échelle internationale. Pour plusieurs pathologies à caractère pan-endémique, ces méthodes de diagnostic sont développées dans le cadre de collaborations internationales afin d'essayer de standardiser les techniques.

La possibilité d'isoler et de purifier des agents pathogènes a ouvert la voie à des travaux de pathologie expérimentale à l'échelle de l'animal. L'injection de suspensions purifiées et quantifiées de parasites a subséquentement conduit à la reproduction de la maladie et à la détermination de doses infectieuses 50% (11). La sensibilité à un agent infectieux peut donc être analysée et des comparaisons objectives peuvent être établies entre individus ou entre souches. La sélection d'individus résistants a été ainsi entreprise pour la bonamiose de l'huître plate. Une telle sélection, qui relève d'une approche quantitative de la génétique, est cependant

relativement empirique dans la mesure où les bases génétiques de la résistance au parasite sont indéterminées. Par ailleurs, la sélection d'un caractère de résistance risque d'être complexe du fait d'une possible liaison avec d'autres critères génétiques qui peuvent être désavantageux.

Ces progrès méthodologiques de pathologie expérimentale ont été transposés *in vitro* et ont modifié profondément les travaux pionniers d'immunologie anti-infectieuse des invertébrés marins puisque la réponse immunitaire est maintenant étudiée vis-à-vis d'agents pathogènes spécifiques. Diverses méthodes d'immunologie ont été adaptées à ces animaux (séparation et culture des hémocytes, chimioluminescence, etc.) (12, 13) et des tests biologiques ont été établis pour analyser les effecteurs immunitaires cellulaires et humoraux et leur implication dans la destruction de différents types de pathogènes. Ces travaux ont pour objectif d'identifier des gènes codant pour des protéines antimicrobiennes et des cytokines. Parallèlement, des molécules recombinantes hétérologues, notamment d'insectes (cecropines, attacines, etc.), sont prises en considération, soit pour étudier leurs effets sur les agents pathogènes d'invertébrés marins, soit pour rechercher des gènes homologues chez ces animaux.

Ces travaux d'immunologie reposent largement sur des techniques de biologie moléculaire et devraient déboucher sur des applications en biotechnologie par le biais des méthodes de transfert de gènes. En effet, les exemples d'application du transfert de gènes à l'obtention de souches résistantes à des maladies infectieuses sont de plus en plus nombreux chez les plantes (14) et concernent depuis peu les animaux supérieurs. Cette résistance est consécutive à l'expression de gènes codant pour des protéines à fonction immunitaire plus ou moins spécifique (15, 16, 17) ou, alternativement, à l'expression de séquences virales, en particulier de protéines qui perturbent la décapsidation du virus ou d'ARN antisens qui perturbent la traduction de protéines virales (18, 19).

Face aux problèmes de pathologie infectieuse chez les invertébrés marins, pour lesquels la vaccination et les traitements sont par ailleurs inconcevables, la transgénèse apparaît donc particulièrement prometteuse. Cet axe de recherches est d'ailleurs connexe avec les programmes développés en entomologie pour créer des souches d'insectes résistants aux maladies ou aux insecticides dans les cas d'insectes utiles telles que les abeilles. En entomologie médicale, il s'agit de créer des souches non-vectrices qui résistent ou soient réfractaires aux parasites transmis à l'homme et aux animaux domestiques (20, 21, 22, 23). A cet égard, il est certain que la transgénèse des mollusques et des crustacés se situe davantage dans le domaine général de la biologie et de la génétique moléculaire que dans celui des biotechnologies marines. Ainsi la stratégie de recherches sur la transgénèse établie pour ces invertébrés marins apparaît très similaire à celles retenues pour d'autres invertébrés (Fig. 1).

De nombreuses et excellentes publications de synthèse (24, 25) ont fait le point sur les méthodologies de transfert de gènes dont certaines pouvaient être adaptées aux bivalves et aux crevettes pénéides qui représentent la quasi-majorité des espèces marines élevées.

Initialement, les travaux ont été focalisés sur les méthodes d'introduction d'ADN dans les ovocytes ou les embryons.

Les traitements électriques des ovocytes ou des embryons ont été expérimentés chez la moule et l'huître et, après une phase de mise au point d'un milieu et de détermination des paramètres des champs électriques (durée, intensité et nombre de pulses), ils se sont révélés efficaces pour provoquer des phénomènes d'électroporation et d'électrofusion de blastomères induisant notamment des individus polyploïdes (26). Cette technique présente l'avantage de pouvoir traiter un grand nombre d'embryons mais l'introduction d'ADN n'est pas assurée et peut être très variable. L'électroporation sera donc reconsidérée ultérieurement, quand des marqueurs de sélection sous contrôle de promoteurs efficaces auront été identifiés, ce qui permettra d'associer un test de criblage des embryons transformés à la simplicité de l'électroporation.

La microinjection est une technique classique de transfert de gènes particulièrement fiable en ce qui concerne l'introduction effective d'ADN qui est directement contrôlée sous le microscope. Par contre, cette technique est relativement sophistiquée et a nécessité de nombreuses expérimentations pour la conception et l'optimisation des microinstruments ainsi que pour l'acquisition d'un savoir faire permettant de microinjecter plusieurs dizaines d'embryons de mollusques ou de crevettes (27). Compte tenu des taux de transformation très faibles qui sont généralement observés consécutivement à l'injection de construits dépourvus de capacités d'intégration particulières (rétrovirus, transposons), la microinjection est à court terme plus utile pour tester l'efficacité de promoteurs que pour tenter d'obtenir des individus transgéniques. Des résultats à caractère préliminaire ont indiqué que le promoteur viral du CMV serait susceptible d'induire l'expression transitoire d'un gène marqueur (*lac-Z*). D'autres promoteurs hétérologues, notamment d'insectes et de virus, sont actuellement étudiés parallèlement à la recherche de promoteurs homologues de gènes qui ont été caractérisés dans plusieurs groupes zoologiques et présentent de fortes homologies (protéines "heat shock", actine, etc.), ce qui facilite grandement leur identification et leur caractérisation (oligonucléotides correspondant à des séquences consensus, criblage de banque de cADN, PCR, PCR inverse)

Par référence aux travaux réalisés chez la souris (24) sur l'obtention, à des taux élevés, d'individus transgéniques en "mosaïque" résultant de l'implantation au stade blastula de blastomères préalablement transformés *in vitro*, des travaux ont été initiés, d'une part sur la

"macroinjection" dans l'embryon de cellules de petite taille (spermatozoïdes) et, d'autre part sur la dissociation et la lipotransfection de blastomères de mollusques et de crustacé. La disponibilité de cet ensemble de méthodes serait particulièrement utile car l'identification de rares cellules transformées et leur implantation sélective pourrait compenser l'absence de vecteur d'intégration. Cependant, cette approche est rendue aléatoire par le manque de connaissances relatives à la culture *in vitro* des cellules d'invertébrés marins (28).

La transgénèse chez les mollusques et les crustacés dispose donc à ce jour de méthodologies de base similaires à celles acquises chez les insectes autres que les drosophiles. En effet, chez ces dernières, l'existence de transposons (élément P) a contribué à la banalisation des travaux sur la transgénèse au même titre que les rétrovirus chez certains vertébrés. Malheureusement, ce transposon s'est avéré inexploitable chez d'autres espèces d'insectes, en raison probablement de l'absence de production de transposase (22, 23). Dans ce contexte, il apparaît urgent de développer, comme cela est le cas pour plusieurs groupes d'insectes, des études sur les génomes de ces invertébrés marins afin de rechercher des éléments de type rétrotransposons, mais aussi des promoteurs, des séquences régulatrices, etc.. A l'instar également des priorités définies pour la transgénèse chez les insectes, la recherche de systèmes vecteurs d'intégration doit être considérée prioritairement pour les mollusques et les crustacés. Dans cette optique, une tumeur hémocytaire de la moule est particulièrement étudiée car elle est infectieuse et une étiologie rétrovirale est soupçonnée (7). L'utilisation d'intégrases rétrovirales recombinantes est une alternative particulièrement intéressante dans la mesure où ces "DNA-binding proteins" semblent être fonctionnelles de façon non spécifique (29).

En conclusion, la transgénèse des invertébrés marins, dont les applications premières concernent la pathologie et l'immunologie, nécessitera de nombreuses collaborations entre équipes dont les compétences sont thématiquement complémentaires. Il faut souligner cependant que la multitude des applications de la transgénèse, que ce soit en oncologie, en endocrinologie, en génétique, etc., lui confère en tant que méthodologie une importance similaire à celle qui a été démontrée pour la culture cellulaire, en permettant maintenant d'aborder les études non plus à l'échelle de la cellule mais à celle de l'organisme entier. Il faut espérer que les instances dirigeantes de la recherche soutiendront les travaux sur la transgénèse des mollusques et des crustacés, ceci afin d'éviter de reproduire la situation concernant la culture cellulaire pour laquelle l'absence de lignées établies constitue toujours une carence majeure.

Figure 1: Stratégie de recherches sur la transgénèse chez les mollusques et les crustacés en vue de l'obtention de souches résistantes aux maladies.

TRANSGÉNOSE CHEZ LES ANIMAUX ET LES PLANTES

Insectes résistants aux agents pathogènes
spécifiques ou transmis



PATHOLOGIE:

- purification des agents pathogènes
- caractérisation génétique (séquences virales/antisens)

IMMUNOLOGIE:

- caractérisation de gènes immunitaires (protéines antimicrobiennes, cytokines)
- étude de l'activité microbicide de molécules recombinantes sur des agents pathogènes spécifiques.

METHODOLOGIES DE TRANSGÉNOSE CHEZ LES MOLLUSQUES ET LES CRUSTACÉS:

- électroporation / ADN
- microinjection / ADN
- "macroinjection"/blastomères
- transformation de blastomères
- étude de promoteurs hétérologues
- étude de vecteurs d'intégration
- étude d'intégrases



APPLICATIONS DE LA TRANSGÉNOSE

- pathologie infectieuse / résistance:
 - gènes immunitaires (cecropines, attacines, etc..)
 - séquences virales antisens
- oncologie / tumorigénèse / culture cellulaire
- endocrinologie
- génétique moléculaire

GENÉTIQUE MOLECULAIRE:

- caractérisation de promoteurs (spécificité spatio-temporelle)
- recherche de retrotransposons (vecteurs d'intégration)
- caractérisation de séquences cibles ("gene targeting")
- caractérisation de gènes ("immunitaires, etc...")

BIBLIOGRAPHIE

- 1 / MIALHE E., BACHERE E., LE BEC C. et GRIZEL H., 1985. Isolement et purification de *Marteilia* (Protozoa: Ascetospora) parasites de bivalves marins. C. R. Acad. Paris, Série III, 301:137-142.
- 2 / MIALHE E., BACHERE E., CHAGOT D. and GRIZEL H., 1988. Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L.. Aquaculture, 71:293-299.
- 3 / ROUBAL F. R., MASEL J. and LESTER R. J. G., 1989. Studies of *Marteilia sydneyi*, agent of QX Disease in the Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis*, with implications for its life cycle. Aust. J. Mar. Freshwater Res., 40:155-167.
- 4 / LE GALL G., MIALHE E., 1991. Purification of Rickettsiales-like procaryotes associated with *Pecten maximus* (Mollusca: Bivalvia). Serological and biochemical characterization. (submitted to Diseases aquat. Org.)
- 5 / ROGIER H., HERVIO D., BOULO V., CLAVIES C., HARVAUD E., BACHERE E., MIALHE E., GRIZEL H., PAU B. and PAOLUCCI F., 1991. Monoclonal antibodies against *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospora), an intrahaemocytic parasite of flat oyster *Ostrea edulis* (Mollusca: Bivalvia). Diseases aquat. Org., in press.
- 6 / LE GALL G., MOURTON C., BOULO V., MIALHE E., PAOLUCCI F. and PAU B., 1991. Monoclonal antibody against gill Rickettsiales-like organism (RLO) of *Pecten maximum* (Bivalvia): application to indirect immunofluorescence (IIF) diagnostic. (submitted to Diseases aquat. Org.)
- 7 / NOEL D., BOULO V., CHAGOT D., MIALHE E., PAOLUCCI F., CLAVIES C., HERVAUD E. and E. ELSTON R., 1991. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against neoplastic hemocytes of *Mytilus edulis* (Bivalvia). Diseases aquat. Organ., 10:51-58.
- 8 / GOGGIN C.L., BOULO V., MIALHE E., COUSIN K., HERVIO D., 1991. Diagnosis of *Perkinsus atlanticus* with monoclonal antibodies and DNA probes. E.A.S., Aquaculture Europe 91, Dublin 10-12 June 1991.
- 9 / NOEL T., BOULO V., MIALHE E. and NICOLAS J.L., 1991. Diagnosis of the brown ring disease in *Tapes philippinarum* with monoclonal antibodies.. E.A.S., Aquaculture Europe 91, Dublin 10-12 June 1991.
- 10 / MIALHE E., BOULO V., BACHERE E., HERVIO D., COUSIN K., NOEL D., NOEL T., OHRESSER M., LE DEUFF R.M. and GENDREAU S., 1991. Development of new methodologies for diagnostic of infectious diseases in mollusc and shrimp aquaculture. Aquat. Fish. Manag, in press.
- 11 / HERVIO D., BACHERE E., COCHENNEC N., BOULO V., VUILLEMIN V., LE COGUIC Y., MAZURIE J. and MIALHE E.. Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster *Ostrea edulis* with the intrahaemocytic protozoan parasite *Bonamia ostreae*: application to parasite resistant oyster selection. (submitted, Aquaculture).
- 12 / BACHERE E., CHAGOT D. and GRIZEL H., 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counter flow centrifugal elutriation. Dev. comp. Immunol., 12:549-559.

- 13 / HERVIO D., BACHERE E., MIALHE E. and GRIZEL H., 1989. Chemiluminescent responses of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* hemocytes to *Bonamia ostreae* (Ascetospora). Dev. comp. Immunol., 13:449.
- 14 / GRUMET R., 1990. Genetically engineered plant virus resistance. Hort. Sci., 25:508-513.
- 15 / CHEN X. Z., YUN J. S. and WAGNER T. E., 1988. Enhanced viral resistance in transgenic mice expressing the human β -1 interferon. J. Virol., 62:3883-3887
- 16 / TRAN H.T.T., METCALF D. and CHEERS C., 1990. Anti-bacterial activity of peritoneal cells from transgenic mice producing high levels of GM-CSF.. Immunology, 71:377-382.
- 17 / JAYNES J. M., XANTHOPOULOS K. G., DESTEFANO-BELTRAN L. and DODDS J. H., 1987. Increasing bacterial disease resistance in plant utilizing antibacterial genes from insects. Bioassays, 6:263-270.
- 18 / ERNST L.K., ZAKOARCHENKO V.I., SURAEVA N.M., PONOMAREVA T.I., MIROSHNICHENKO O.I., PROKOFEV M.I. and TIKCHONENKO T.I., 1991. Transgenic rabbits with antisense RNA gene targeted at Adenovirus H5. Theriogenology, 35:1257.
- 19 / VERMA D. P. S., DELAUNEY A. J. and NGUYEN T., 1987. A Strategy towards antisense regulation of plant gene expression. in "Tailoring genes for crop involvement", pp 155-162.
- 20 / MILLER L.H., 1989. Strategies for malaria control: realities, magic and science. Ann. N. Y. Acad. Sci., 569:118-126.
- 21 / MCGRANE V., CARLSON J. O., MILLER B. R. and BEATY B. J., 1988. Microinjection of DNA into *Aedes triseriatus* ova and detection of intrgration. Amer. J. trop. Med. Hyg., 39:502-510.
- 22 / OBROCHTA D.A., 1990. Genetic transformation and its potential in insect pest control. Bull. Entomol. Res., 80:241-244
- 23 / EGGLESTON P, 1991. The control of insect-borne disease through recombinant DNA technology. Heredity, 66:161-172.
- 24 / JAENISCH R., 1988. Transgenic animals. Science, 240:1468-1474.
- 25 / WALKER V. K., 1989. Gene transfer in insects. Adv. Cell Cult., 7:87-124.
- 26 / CADORET J.P. and LEDU C., 1990. Electric field mediated polyploidy induction in commercially important farmed species in aquaculture. I.C.E.E., Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, 28-31 Oct. 1990.
- 27 / CADORET J.P., DELECHENEAU J.M., GENDREAU S. and MIALHE E.. Protocols for microinjection of 1-cell embryos of bivalve molluscs and for detection of injected molecules. submitted to Canad. J. Fish. aquat. Sci..
- 28 / MIALHE E., BOULO V. and GRIZEL H., 1988. Bivalve mollusc cell culture. Amer. Fish. Soc., SP 18: 311-315.
- 29 / KHAN E, MACK J.P.G., KATZ R.A., KULKOSKY J and SKALKA A.M., 1991. Retroviral integrase domains - DNA Binding and the recognition of LTR sequences. Nucleic Acids Res., 19:851-860.

T H E M E V I I

**BIOTECHNOLOGIES ET LUTTES CONTRE LES
POLLUTIONS MARINES DUES AUX HYDROCARBURES**

TRAITEMENT DU PETROLE BRUT PAR FERMENTATION : BIODEGRADATION, PRODUCTION DE BIOMASSE ET DE BIOSURFACTANTS

BERTRAND J.C., GILEWICZ M.

**Centre d'Océanologie de Marseille (UA 41)
Campus de Luminy - Case 901
F 13288 MARSEILLE CEDEX 9**

MILLE G.

**Laboratoire de Spectroscopie Moléculaire - UA 1409
Faculté des Sciences et Techniques de Saint Jérôme
13397 MARSEILLE CEDEX 13**

INTRODUCTION

La biodégradation est un facteur essentiel dans l'élimination des polluants rejetés dans le milieu marin et notamment des hydrocarbures, dont le devenir en mer est, en termes qualitatifs, relativement bien connu (ATLAS, 1981 ; BERTRAND & MILLE, 1989 ; FLOODGATE, 1984 ; LEAHY & COLWELL, 1990).

La dégradation de ces composés par voie biologique est de plus en plus envisageable et dans certaines conditions elle peut être le moyen le mieux adapté et le plus efficace de traitement (ATLAS, 1977 ; BARTHA & ATLAS, 1977 ; BARTHA, 1986 ; LEAHY & COLWELL, 1990 ; PRITCHARD & COSTA, 1991). Parmi ces moyens, on peut dès à présent prendre en compte les procédés de fermentation qui permettent dans un environnement contrôlé l'optimisation des processus de biodégradation.

Le but de cet article est d'évoquer les données fondamentales sur lesquelles s'appuie ce type d'approche, de préciser sa mise en oeuvre et de tenter d'en définir les possibilités et les limites.

Le développement de cette biotechnologie fait appel aux conclusions auxquelles ont abouti les études entreprises sur la physiologie et l'écologie des microorganismes hydrocarbonoclastes. Nous les résumerons :

1) les hydrocarbures pour être assimilés par la cellule doivent être solubilisés ou émulsifiés. Ce conditionnement du substrat fait intervenir la plupart du temps des molécules possédant des propriétés tensio-actives, appelées biosurfactants, produites par les microorganismes lors de leur croissance sur hydrocarbures (COOPER, 1986 ; ROSENBERG, 1986).

2) la croissance sur hydrocarbures est un processus essentiellement aérobie et la demande en oxygène pour l'oxydation d'un hydrocarbure est plus de 2 fois supérieure à celle nécessaire pour l'oxydation d'un hydrate de carbone (EINSELE, 1983). L'oxydation d'un gramme de pétrole demande 3.5 g d'oxygène (ZOBELL, 1969).

Il est intéressant de rappeler que l'utilisation des hydrocarbures en anaérobiose, qui fait toujours l'objet de nombreuses controverses, est à présent clairement établie. Cependant, elle ne concerne qu'un nombre limité de molécules et il s'agit d'un processus extrêmement lent (BERTRAND *et al.*, 1989)

3) Pour dégrader un pétrole dans des conditions optimales il faut maintenir des rapports C/N et C/P corrects (C/N/P - 1/10/100). De l'azote et du phosphore seront donc rajoutés au milieu de culture préparé avec de l'eau de mer naturelle qui en contient toujours des quantités insuffisantes.

4) Pour dégrader un substrat aussi complexe que le pétrole il faut utiliser des communautés bactériennes constituées de souches possédant des activités métaboliques complémentaires.

UTILISATION D'UN BIOREACTEUR : AVANTAGES ET INCONVENIENTS

En culture continue dans un fermenteur il y a maintien des conditions qui conduisent à une biodégradation maximale : pas de limitation en azote, phosphore-oxygène, régulation du pH et de la température. Un bioréacteur est un système ouvert qui permet l'élimination des produits du métabolisme susceptibles d'inhiber l'activité des microorganismes impliqués dans la biodégradation des hydrocarbures (ATLAS & BARTHA, 1973 ; SCHAEFFER *et al.*, 1979 TEH, 1974). La production de biomasse et de biosurfactants, sur laquelle nous reviendrons, assurent la valorisation du procédé.

Notons enfin que dans cette approche, les microorganismes sélectionnés doivent être isolés de la zone contaminée. Il s'agit de communautés bactériennes naturelles adaptées à la fois aux hydrocarbures que l'on souhaite traiter et à une aire géographique déterminée. Ces communautés ne représentent donc pas une menace pour l'environnement et peuvent ainsi être déversées dans le milieu.

Trois inconvénients majeurs doivent être pris en compte. Le premier réside dans le fait qu'il faut récupérer et transporter les hydrocarbures. Le second concerne le coût de l'installation, de l'entretien et du fonctionnement. La mise en oeuvre d'un tel procédé exige que l'ensemble des opérations (excepté l'isolement des communautés et leur conservation) soit effectué dans des conditions non stériles. Le troisième inconvénient est relatif aux limites d'utilisation et celles-ci seront précisées dans la rubrique "discussion et conclusion".

DESCRIPTION D'UN PROCEDE

La communauté bactérienne a été isolée d'une zone polluée chroniquement par des produits pétroliers (émissaire d'une raffinerie) et elle est composée de 8 souches qui ont été isolées et identifiées (AL MALLAH *et al.*, 1990 ; GOUTX *et al.* 1987, 1989 ; RAMBELOARISOA *et al.*, 1984). De l'azote et du phosphore sont rajoutés à l'eau de mer, la pO₂ est maintenue à 100 %, la température à 28° C, le pH à 8. La dégradation ne se produit que dans la mesure où le pétrole est introduit dans le bioréacteur sous forme émulsifiée (BERTRAND *et al.*, 1983). Cette opération est réalisée grâce aux biosurfactants produits par la communauté bactérienne. Ils sont récupérés à la sortie du réacteur (figure 1) et rajoutés à l'eau de mer qui alimente ce dernier ; l'émulsification se fait au niveau d'une "boucle d'émulsification" (MATTEI *et al.*, 1986).

Un dispositif d'ultrafiltration permet un recyclage externe des cellules qui maintient une biomasse élevée. Les conditions optimales de dégradation ont été établies en utilisant des matrices expérimentales de Doehlert (DUMENIL *et al.*, 1988). Un pourcentage de dégradation de 80 % est atteint pour une biomasse de 7,6 g/l et un taux de dégradation de 0.73 g/l/h. L'analyse du pétrole dégradé démontre une attaque non sélective des différentes fractions : saturée (90 %), aromatique (78 %), polaire (60 %) et asphalténique (65 %).

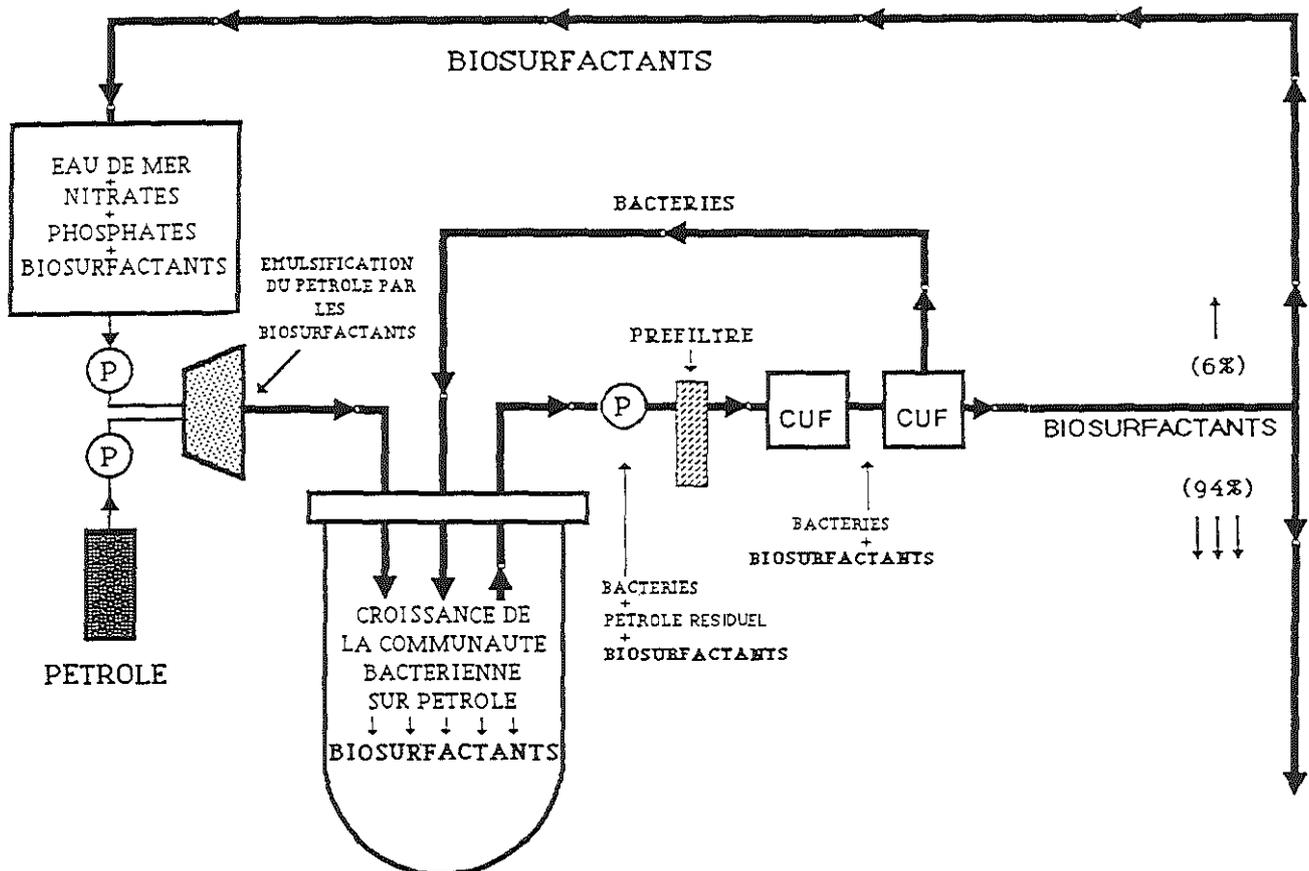


Figure 1 : Schéma du dispositif expérimental utilisé pour la dégradation en continu d'un pétrole brut (Mattéi *et al.*, 1986). P = Pompe ; CUF = Cassette d'ultrafiltration.

**UN EXEMPLE D'APPLICATION "IN SITU" :
BIODEGRADATION D'UN RESIDU PETROLIER DANS UN
REACTEUR BIOLOGIQUE SEMI-INDUSTRIEL DE 500 LITRES
(MATTEI & LE GUEN, 1986)**

Cette étude avait pour but d'établir les possibilités de (bio)dégradation de déchets pétroliers récupérés après l'échouage de l'Amoco Cadiz et stockés dans une fosse -dite fosse Polmar- située dans l'enceinte de la SMP de Brest. Les résidus pétroliers (4000 tonnes) étaient composés de 42,5 % d'eau, 2,65 % de dépôts (dont 1,65 % inorganiques) et 55 % d'hydrocarbures (extractibles au CCl₄). (Les analyses chimiques ont été effectuées par le Laboratoire Municipal de la ville de Brest).

Le protocole expérimental comportait trois étapes (figure 2).

- 1) Isolement d'une communauté bactérienne capable de se développer sur les hydrocarbures contenus dans les déchets.
- 2) Croissance en "batch" de cette communauté dans un fermenteur de 20 litres.
- 3) Croissance en culture "semi-continue" dans un fermenteur de 500 litres.

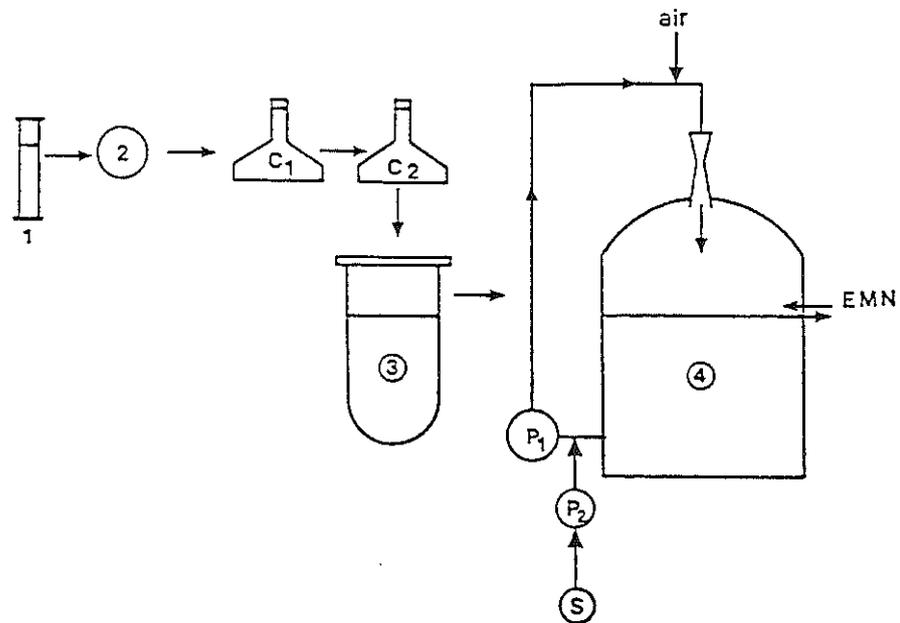


Figure 2 : Schéma du protocole expérimental mis en oeuvre pour dégrader dans un bioréacteur de 500 litres.

1 : carotte de sédiment ; 2 : isolement de la communauté bactérienne ; C1 : croissance sur milieu riche plus déchets ; C2 : croissance sur déchets ; 3 : culture en "batch" dans un fermenteur de 20 litres ; 4 : culture semi-continue dans un fermenteur de 500 litres ; P1 : pompe de circulation ; P2 : pompe à vis ; S : substrat ; EMN : eau de mer naturelle enrichie en azote et en phosphore.

La communauté bactérienne a été isolée de la couche superficielle d'un sédiment prélevé dans l'Aber Benoit, zone polluée par les hydrocarbures après l'échouage de l'Amoco Cadiz (800 mg/Kg sédiment poids sec). La communauté comprend 8 genres (*Pseudomonas*, *Flavobacterium* et *Alcaligenes*). (L'analyse bactériologique a été réalisée par le Laboratoire de Zoologie de l'Université de Bretagne Occidentale). Le fermenteur (Biolafitte) de 20 litres (17,5 litres de volume utile) étaitensemencé avec un inoculum de 1,6 litres (4 fioles de Fernback de 2 l contenant chacune 0,4 l de milieu) de cultures effectuées en eau de mer naturelle, non filtrée, enrichie en azote, phosphore et fer et contenant 2g/l de

déchets. Dans le fermenteur (température : 30° C ; pO₂ maintenue à 100 % ; agitation : 750 rpm) la concentration en déchets était de 14 g/l et après 4 jours de culture le pourcentage de dégradation atteignait 75 %.

En ce qui concerne les expériences de dégradation en "semi-continu", le bioréacteur utilisé se caractérise par un type de fonctionnement différent sur le plan mécanique et de l'aération, du bioréacteur utilisé pour les cultures en "batch" (Biolafitte). Le principe de ce réacteur (réacteur biologique, Emulsair Société SAPS anticorrosion France) repose sur l'utilisation d'un mélangeur externe de type venturi, assurant l'arrivée dans le réacteur d'une véritable émulsion constituée entre l'air d'apport et le liquide traversant le venturi. Afin d'assurer une émulsification maximale des déchets un aliquote de l'effluent était ajouté au milieu de culture (milieu de culture/effluent : 1/10). L'effluent contenait les biosurfactants produits par la communauté bactérienne lors de sa croissance sur les hydrocarbures présents dans les résidus pétroliers.

Ce bioréacteur était l'équivalent de la "boucle d'émulsification" utilisée dans le procédé décrit par MATTEI *et al.*, (1986). La culture est qualifiée de semi-continue car, compte tenu de sa viscosité, le substrat était introduit dans le fermenteur à l'aide d'une pompe à vis qui fonctionnait toutes les demi-heures. Par ailleurs, pour éviter qu'une partie du résidu introduit ne reste en surface, deux précautions ont dû être prises : le volume utile du réacteur a été ramené de 500 l à 350 l et le point d'injection du substrat pétrolier rapproché de la pompe de circulation. Pour une concentration en substrat de 50 g/l, un taux de dilution de 0,1 h⁻¹ et des expériences d'une durée de 6 jours, les pourcentages de dégradation étaient compris entre 70 et 80 %, avec des concentrations cellulaires comprises entre 5.10⁸ et 1.3 10⁹ cellules par ml.

Si ces travaux démontrent la fiabilité du traitement, ils ne peuvent cependant être considérés que comme préliminaires. En effet, les analyses ne concernent que les hydrocarbures totaux et il manque des informations concernant les molécules les plus récalcitrantes à la biodégradation : composés polyaromatiques, polaires et asphalténiques. De plus, le bilan en carbone n'a pas été fait et on ne connaît pas en particulier les pertes par évaporation qui, compte tenu de la conception du bioréacteur utilisé, sont très importantes.

DISCUSSION ET CONCLUSION

La dégradation des hydrocarbures par fermentation est un traitement très efficace. Ils confirment les résultats acquis en culture en milieu non renouvelé où des pourcentages élevés de biodégradation du pétrole brut par des communautés bactériennes naturelles ont été obtenus dans de nombreux laboratoires (ATLAS, 1977 ; BERTRAND & MILLE, 1989 ; LEAHY & COLWELL, 1990).

Une originalité des résultats acquis en culture continue concerne la mise en évidence d'une attaque simultanée des différentes fractions d'hydrocarbures -en particulier la fraction asphalténique- en désaccord avec les conclusions établies à partir de cultures en "batch" (WALKER *et al.*, 1973). La biodégradation des asphaltènes s'effectue très vraisemblablement par cooxydation ; en effet, RONTANI *et al.* (1985) ont démontré que la communauté bactérienne EM4 sélectionnée ne peut se développer sur la fraction asphalténique en l'absence de tout autre substrat de croissance. Par contre, en présence d'une coupe de paraffine (C₁₂-C₁₈) le pourcentage de dégradation des asphaltènes est de 45 %. Les paraffines qui sont en totalité dégradées, doivent à la fois servir de co-substrats et permettre la production de biosurfactants qui vont assurer la solubilisation et/ou l'émulsification des asphaltènes. L'absence de sélectivité dans la dégradation des différentes familles de produits pétroliers a également été observé par Horowitz et Atlas (1977), qui ont suivi l'évolution d'un pétrole dans un système à flux continu, constitué d'un réservoir de 250 litres, implanté *in situ* sur les côtes de l'Océan Arctique. Ces auteurs supposent, qu'à basse température, les phénomènes de cométabolisme jouent un rôle déterminant dans les taux de dégradation.

Une autre propriété de ce type de traitement par fermentation concerne la production de biomasse cellulaire qui peut être considérée comme une source de protéines (DUMENIL *et al.*, 1988), mais qui représente surtout un moyen d'ensemencement important de la zone d'implantation du fermenteur. Cet apport dans le milieu de cellules bactériennes (qui sont dans un état d'activité maximale de croissance sur hydrocarbures), s'accompagne de la libération de biosurfactants qui vont favoriser les processus de biodégradation dans la zone traitée. Les biosurfactants peuvent également être récupérés (MATTEI & BERTRAND, 1985). En effet, la demande en bio-tensioactifs est significative dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et pétrolières. Ces composés peuvent être aussi employés pour le nettoyage de surfaces polluées par des produits pétroliers (HARVEY *et al.*, 1990).

Il reste à préciser les possibilités d'utilisation des procédés de fermentation. Un bioréacteur ne peut être mis en place que sur, ou à proximité, d'un site pollué car, comme nous l'avons déjà signalé, le prix du transport des déchets est prohibitif. Précisons également, qu'il est impossible d'implanter des fermenteurs de gros

volume sur des navires qui se déplaceraient sur la zone où est localisée la pollution. La mise en oeuvre d'un tel traitement peut raisonnablement être envisagée dans plusieurs situations : traitement des déchets, réhabilitation d'une zone littorale limitée, épuration d'eaux industrielles, nettoyage de cuves de stockage ou de cuves de pétroliers (BANAT *et al.*, 1991), implantation sur une plateforme off-shore.

Pour conclure, nous devons considérer que le développement de ce moyen de lutte ne peut se faire que dans certaines conditions et pour résoudre que certains problèmes de pollution par les hydrocarbures ; il ne représente qu'un complément à d'autres (bio) technologies.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AL MALLAH, M., GOUTX, M., MILLE, G. & BERTRAND, J.C. (1990). Production of emulsifying agents during growth of a marine *Alteromonas* in sea water with eicosane as carbon source, a solid hydrocarbon. *Oil & Chemical Pollution*. **6** : 289-305.

ATLAS, R.M. & BARTHA, R. (1973). Inhibition by fatty acids of the biodegradation of petroleum. *Antonie van Leeuwenhoek*. **39** : 257-271.

ATLAS, R.M. (1977). Stimulated petroleum biodegradation. *Crit. Rev. Microbiol.* **5** : 371-386.

ATLAS, R.M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons : an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* **45** : 180-209.

BANAT, I.M., SAMARAH, N., MURAD, M., HORNE, R. & BANERJEE, S. (1991). Biosurfactant production and use in oil tank clean-up World J. Microbiol. Biotechnol. **7** : 80-88.

BARTHA, R. and ATLAS, R.M. (1977). The microbiology of aquatic oil spills. *Adv. Appl. Microbiol.* **22** : 225-266.

BARTHA, R. (1986). Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microb. Ecol.* **12** : 155-172.

BERTRAND, J.C., RAMBELOARISOA, E., RONTANI, J.F., GIUSTI, G. & MATTEI, G. (1983). Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture. *Biotechnol. Lett.* **5** : 567-572.

BERTRAND, J.C., CAUMETTE, P., MILLE, G., GILEWICZ, M. & DENIS, M. (1989). Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Sci. Prog. Oxf.* **73** : 333-350.

BERTRAND, J.C. & MILLE, G. (1989). Devenir de la matière organique exogène. Un modèle : les hydrocarbures, in *Micro-organismes dans les écosystèmes océaniques*, BIANCHI, M., MARTY, D., CAUMETTE, P., GAUTHIER, M. & BERTRAND, J.C., Eds. Masson, Paris, 343-385.

COOPER, D.G. (1986). Biosurfactants. *Microbiol. Sci.* 3 : 145-148.

DUMENIL, G., MATTEI, G., SERGENT, M., BERTRAND, J.C., LAGET, M. & PHAN-TAN-LUU, R. (1988). Application of a Doehlert experimental design to the optimization of microbial degradation of crude oil in sea water by continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27 : 405-409.

EINSELE, A. (1983). Biomass from higher n-alkanes in *Biotechnology, Vol. 3, Microbiol products, complex and secondary products*, REHM, H.J. & REED, G., Eds. Verlag Chemie, Weinheim, 44-81.

FLOODGATE, G. (1984). The fate of petroleum in marine ecosystems, in *Petroleum Microbiology*, ATLAS, R.M., Ed. Macmillan Publishing Co., New-York, 335-398.

GOUTX, M., MUTAFTSHIEV, S. & BERTRAND, J.C. (1987). Lipid and exopolysaccharide production during hydrocarbon growth of a marine bacterium from the sea surface. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 40 : 259-265.

GOUTX, M., ACQUAVIVA, M. & BERTRAND, J.C. (1989). Cellular and extracellular carbohydrate and lipid from marine bacteria during growth on soluble substrates and hydrocarbons. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 61 : 291-296.

GUTNIK, D.L. and ROSENBERG, E. (1977). Oil tankers and pollution : a microbiological approach. *Ann. Rev. Microbiol.* 31 : 379-396.

HARVEY, S., ELASHVILI, I., VALDES, J.J., KAMELY, D. & CHAKRABARTY, A.M. (1990). Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. *Bio/technology.* 8 : 228-230.

HOROWITZ, A. & ATLAS, R.M. (1977). Continuous open flow-through system as a model for oil degradation in the Arctic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 : 647-653.

LEAHY, J.G. and COLWELL, R.R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54 : 305-395.

MATTEI, G. & BERTRAND, J.C. (1985). Production of biosurfactants by a mixed bacteria population grown in continuous culture on crude oil. *Biotechnol. Lett.* **4** : 217-222.

MATTEI, G., & LE GUEN, Y. (1986). Biodégradation d'un résidu pétrolier dans un réacteur biologique semi-industriel de 500 litres, contrat/projet IFREMER n°86/1210342/YF. pp.47.

MATTEI, G., RAMBELOARISOA, E., GIUSTI, G., RONTANI, J.F. & BERTRAND, J.C. (1986). Fermentation procedure of a crude oil in continuous culture on seawater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23** : 302-304.

PRITCHARD, H.P. & COSTA, C.F. (1991). EPA'S Alaska oil spill bioremediation project. *Environ. Sci. Technol.* **25** : 372-379.

RAMBELOARISOA, E., RONTANI, J.F., GIUSTI, G., DUVNJAK, Z. & BERTRAND, J.C. (1984). Degradation of crude oil by a mixed population of bacteria isolated from sea-water foams. *Mar. Biol.* **83** : 69-81.

ROSENBERG, G. (1986). Microbial surfactants. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **3** : 109-137.

RONTANI, J.F., BOSSER-JOULAK, F., RAMBELOARISOA, E., BERTRAND, J.C. & GIUSTI, G. (1985). Analytical study of Ashart crude oil asphaltenes biodegradation. *Chemosphere.* **14** : 1413-1422.

SCHAEFFER, T.L., CANTWELL, S.G., BROWN, J.L., WATT, D.S. & FALL, R.R. (1979). Microbial growth on hydrocarbons : terminal branching inhibits biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **38** : 742-746.

TEH, J.S. (1974). Toxicity of short-chain fatty acids and alcohols towards *cladosporium resinae*. *Appl. Microbiol.* **28** : 840-844.

WALKER, J.D., COLWELL, R.R., & PETRAKIS, L. (1975). Microbial petroleum biodegradation : application of computerized mass spectroscopy. *Can. J. Microbiol.*, **21** : 1760-1767.

ZOBELL, C.E. (1969). Microbial modification of crude oil in the sea. in *Proceedings of joint conference on prevention and control of oil spills*. American Petroleum Institute, Washington, D.C. 317-326.

Perspectives ouvertes par le génie génétique sur le traitement des pollutions par les hydrocarbures

Danglot C., Ben Lemlih M., Kuchta W., Vilagines R.

Centre de Recherche et de Contrôle des Eaux de Paris
144, Avenue Paul Vaillant Couturier. 75014 PARIS

INTRODUCTION

Depuis le début des années 70, des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes moléculaires de la dégradation des hydrocarbures cycliques ou linéaires par les bactéries de l'environnement. Dans un premier temps, la biochimie de la dégradation de ces hydrocarbures a été étudiée ce qui a conduit à la mise en évidence d'un certain nombre de voies métaboliques majeures (Davies et Evans, 1964; Murray et coll., 1972; Sala Trepas, Murray et Williams, 1972; Stanier et Ornston, 1973; Stanier, 1976). Dans un second temps l'étude génétique de ces voies métaboliques a été entreprise (Chakrabarty, 1972; Chakrabarty, Chou et Gunsalus, 1973; Reinwald, Chakrabarty et Gunsalus, 1973; Wong et Dunn, 1974; Williams et Murray, 1974; Worsey et Williams, 1975), ce qui a conduit à la localisation des gènes codant pour les enzymes qu'elles regroupent, puis à la découverte des mécanismes moléculaires de régulation de leur expression génétique. Actuellement, ces systèmes génétiques complexes sont suffisamment connus pour qu'il devienne raisonnable d'envisager leur optimisation par les techniques du génie génétique et l'utilisation de bactéries ainsi optimisées pour le traitement des pollutions par les hydrocarbures.

Les souches bactériennes responsables de la dégradation des hydrocarbures appartiennent essentiellement au genre *Pseudomonas*, mais également aux genres *Alcaligenes*, *Flavobacterium* et *Acinetobacter*. Pour la grande majorité des systèmes génétiques connus, les gènes permettant la dégradation des hydrocarbures aromatiques et linéaires sont regroupés en régulons (ALK, TOL, NAH, SAL, CAM, etc...). Ces régulons sont très fréquemment des éléments génétiques mobiles (Tsuda et Iino, 1987; Tsuda et Iino, 1988; Tsuda et Iino, 1990), véhiculés par des transposons, ce qui leur permet de passer facilement du chromosome bactérien à un plasmide et vice versa et d'être transmis à d'autres bactéries par conjugaison.

DESCRIPTION DES SYSTEMES GENETIQUES

Nous ne décrivons que les trois systèmes les mieux connus sur le plan génétique et moléculaire, à savoir le régulon *alk* responsable de la dégradation des alcanes (C_6 à C_{10}) chez *Pseudomonas oleovorans*, le régulon *xyl* responsable de la dégradation du toluène et des xylènes chez *Pseudomonas putida* mt-2, et enfin le régulon *nah* responsable de la dégradation du naphthalène et du salicylate chez *Pseudomonas putida* PpG7.

• Le système ALK

Le régulon *alk* a été identifié par le laboratoire de Coon en 1963, son appartenance au mégaplasmide OCT a été décrite par le groupe de Chakrabarty en 1973, son étude génétique a été réalisée sur le plasmide OCT de *Pseudomonas putida* par le groupe de Shapiro entre 1974 et 1984, mais son étude sur le plan moléculaire a été essentiellement effectuée sur le plasmide pOCX de *Pseudomonas oleovorans* par le groupe de Witholt, aux Pays Bas entre 1984 et 1990.

Le plasmide pOCX est un mégaplasmide de 410 kbp porté par la souche TF4-IL de *Pseudomonas oleovorans*. Ce plasmide porte l'opéron *alk* sous forme de deux loci séparés par environ 34 kbp (Fig. 1). Le premier locus appelé opéron *alkBAC* est sous la dépendance d'un promoteur P_{alk} et comprend les gènes *alkB* (sous-unité catalytique de l'alcane hydroxylase membranaire; 45,7 kDa), *alkF* (rubrédoxine 1 dont le rôle est encore inconnu; 14 kDa), *alkG* (rubrédoxine 2 associée à l'alcane hydroxylase; 18 kDa), *alkH* (alcanal déshydrogénase; 52 kDa), *alkJ* (alcanol déshydrogénase; 58 kDa) et enfin *alkK* (59 kDa) et *alkL* (20 kDa) dont les rôles sont encore inconnus. Le second locus appelé *alkR* ne comprend que deux gènes dont le premier, *alkS* code pour une protéine de régulation AlkR (99 kDa) capable d'activer l'opéron *alkBAC* en présence d'alcane et le second *alkT* code pour une rubrédoxine réductase (48 kDa) NADP-dépendante, fonctionnellement associée à l'alcane hydroxylase.

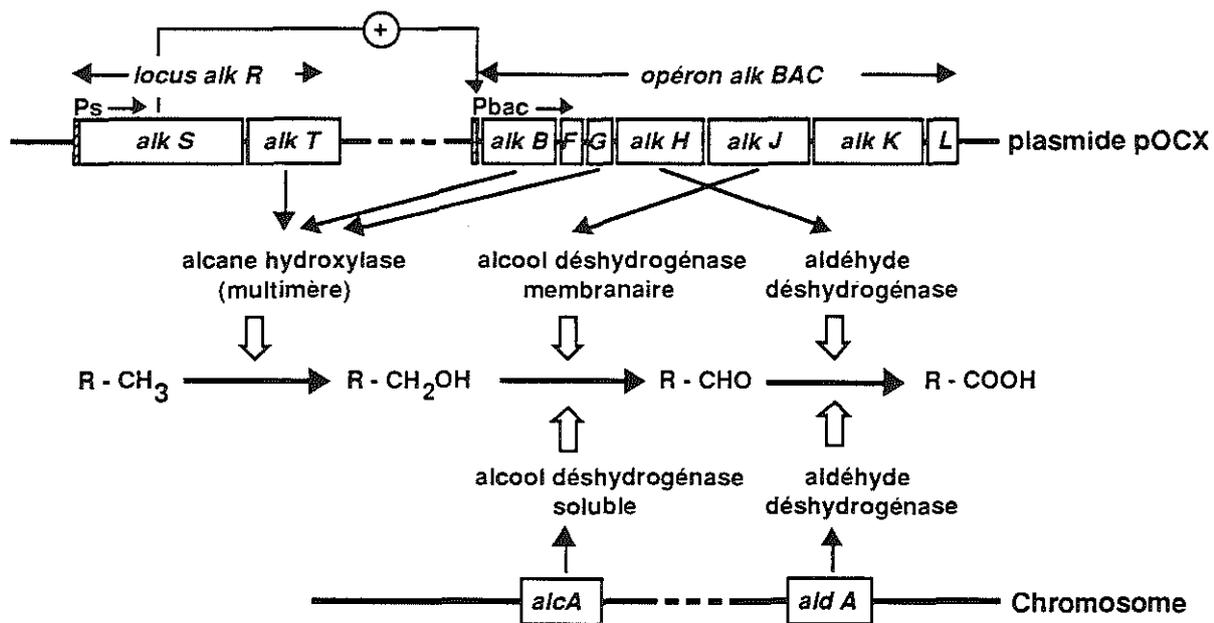


Figure 1: Organisation du régulon *alk* chez *Pseudomonas oleovorans*.

En présence ou en l'absence d'alcane, le locus *alkR* est transcrit à faible niveau. Cependant en présence d'alcane, la protéine AlkS forme avec ces derniers un complexe d'activation qui va stimuler la transcription de l'opéron *alkBAC* au niveau du promoteur P_{BAC} . Il faut cependant noter que la seule étape absolument indispensable pour conférer le phénotype Alk^+ à la souche hôte correspond à l'étape d'hydroxylation de l'alcane (Fig. 1), car les deux étapes suivantes, de déshydrogénation de l'alcanol et de l'alcanal peuvent être réalisées par les produits des gènes chromosomiques *alcA* et *aldA*. L'alcanoate après activation en acyl-CoA est ensuite dégradé par β -oxydation dans l'hélice de Lynen. La structure de P_{BAC} , promoteur de l'opéron *alkBAC* a récemment été publiée (Kok et coll., 1989). Il semblerait que

P_{BAC} soit du type A54 (Fig. 2)

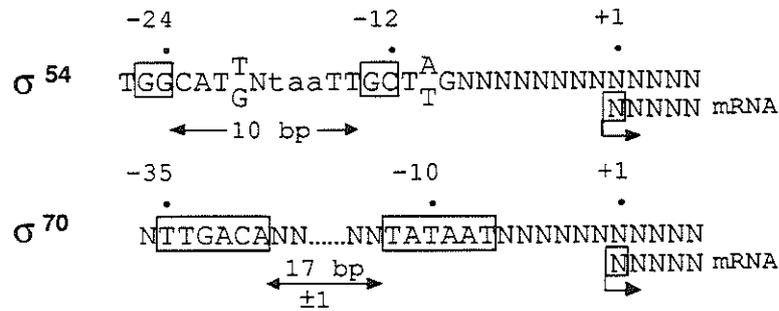


Figure 2: Structure des promoteurs de type A54 et A70

Il est donc très vraisemblable que la transcription de l'opéron *alkBAC* nécessite l'activité du gène *rpoN* (facteur σ^{54}) et son association avec la RNA polymérase et la protéine activatrice comme cela a été décrit pour les promoteurs OP1 et P_s du plasmide TOL (Inouye et coll., 1990; voir Fig. x)

• Le système NAH

La voie métabolique de la dégradation du naphthalène et les enzymes qui la composent ont été décrites par Davies et Evans en 1964. Ils ont montré à la suite de Strawinski et Stone (1943) que le salicylate était un composé intermédiaire dans la dégradation du naphthalène. Par la suite, Dunn et Gunsalus (1973) ont montré que la dégradation du naphthalène et du salicylate chez *Pseudomonas putida* G1 était sous la dépendance d'un plasmide de 83 kbp qu'ils ont nommé NAH7. La plupart des études génétiques réalisées sur le plasmide NAH7 ont été conduites dans le laboratoire de Gunsalus. Deux opérons impliqués dans la dégradation du naphthalène ont été identifiés sur le plasmide NAH7.

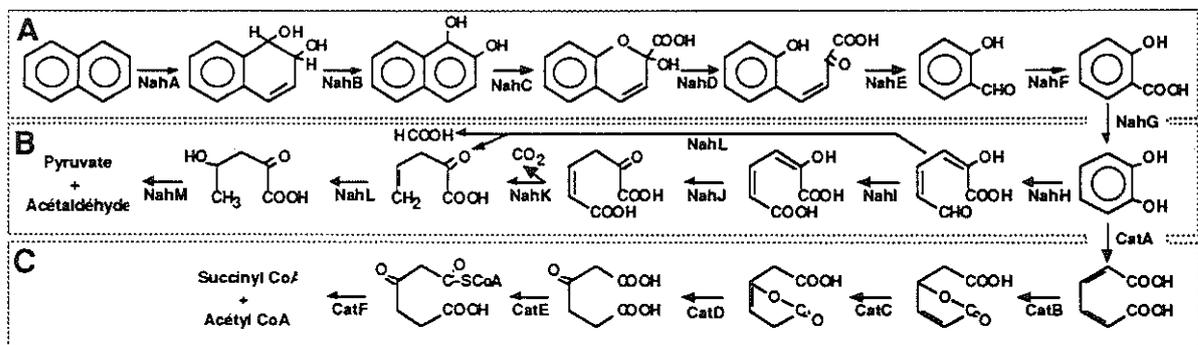


Figure 3: Catabolisme du naphthalène et du salicylate sous le contrôle du plasmide NAH7. A: Voie supérieure (opéron *nah*, plasmide NAH7) B: Voie méta (opéron *sal*, plasmide NAH7) C: Voie ortho (opéron *cat*, chromosome).

Le premier opéron, *nah*, correspond à la voie métabolique dite "supérieure" et permet la dégradation du naphthalène en salicylate (Fig. 3 encadré A). Le second opéron, *sal*, correspond à la voie métabolique dite "méta" et permet la dégradation du salicylate en pyruvate et acétaldéhyde (Fig. 3 encadré B). parallèlement à la voie "méta", une voie dite "ortho" dont les gènes sont chromosomiques (opéron *cat*) permet la dégradation du catéchol en succinyl-Coa et acétyl-CoA

L'activation des opérons *nah* et *sal* par le gène *nahR* en présence d'un inducteur (salicylate) a été

La figure 5 montre l'organisation de l'ADN entre les gènes *nahR* et *nahG*: les deux gènes sont transcrits dans deux directions opposés, et il est intéressant de noter que les zones -35 de leur promoteurs respectifs (P_1 -35 et P_2 -35) bien que situées sur des brins différents sont localisées pratiquement au même endroit sur l'ADN. Il est donc évident que la transcription d'un des deux gènes va bloquer ou du moins diminuer considérablement le taux de transcription du second. Cette situation de transcription alternative est encore renforcée par la situation de la séquence URS puisque la protéine NahR activée par le salicylate va, en se fixant sur la séquence URS, inhiber complètement sa propre transcription. Cette situation est très comparable à celle que nous décrivons plus loin pour les gènes de régulation *xylR* et *xylS* du régulon TOL.

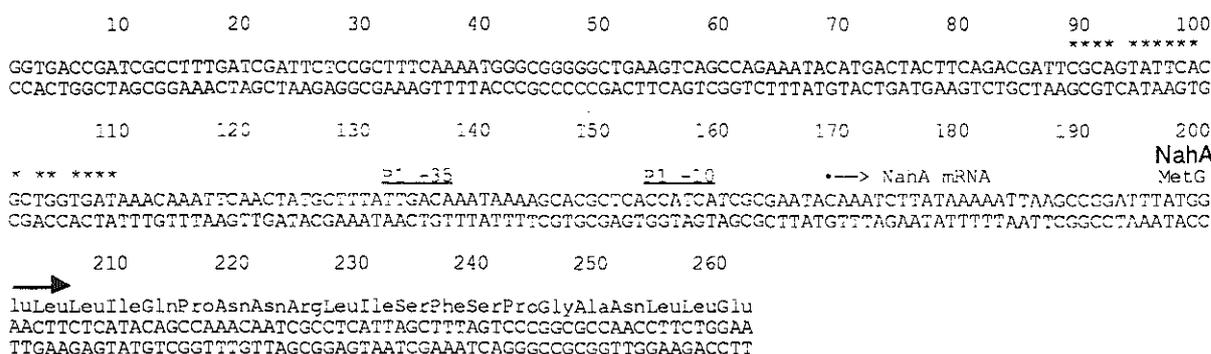


Figure 6: Séquence située en amont de *nahA* et du promoteur P_1 (P_1 -35 et P_1 -10) et contenant la séquence URS (*) reconnue par NahR. Le site d'initiation de la transcription correspond à la position relative +1 pour le messagers de NahA (*→).**

La figure 6 montre la structure de l'ADN en amont du promoteur P_1 de l'opéron *nah*. Son organisation est très similaire à celle décrite pour le promoteur P_2 de l'opéron *sal* et une séquence URS est également retrouvée en position -70 par rapport au site d'initiation de la transcription de *nahA*.

• Le système TOL

Les voies métaboliques "ortho" et "méta" de la dégradation du benzoate, du toluène et des xylènes ont été décrites pour l'essentiel au début des années 70 par les laboratoires de Williams (Murray et coll., 1972) et de Nakazawa (Nakazawa et Yokota, 1973). En 1974, Williams et Murray montrent l'existence du plasmide TOL (pWW0, 117 kpb) chez *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2. Par la suite l'étude génétique du régulon TOL a été réalisée par les laboratoires de Williams, Nakazawa et Timmis. C'est finalement Tsuda et Ino qui montrèrent en 1987 que le régulon TOL était porté par deux transposons "emboîtés" l'un dans l'autre Tn4651 et Tn4653.

Le régulon TOL comprend 2 opérons, l'opéron n°1 encore appelé opéron supérieur et l'opéron n°2 encore appelé opéron méta. L'opéron supérieur, sous le contrôle du promoteur OP1 (ou P_{op} , de type A54), débute par un cadre de lecture ouvert (ORF pour Open Reading Frame) dont le rôle demeure inconnu. Il se poursuit avec les gènes *xylC* (benzaldéhyde déshydrogénase, 57 kDa), *xylM* (sous unité de la xylène oxygénase, 35 kDa), *xylA* (sous unité de la xylène oxygénase, 40 kDa), *xylB* (alcool benzylique déshydrogénase, 40 kDa), *xylN* (rôle inconnu, 52 kDa) (Harayama et coll., 1989). L'opéron méta, sous le contrôle du promoteur OP2 (ou P_m , de type A70), est constitué des gènes *xylX* (sous unité de la toluate 1,2-dioxygénase, 57 kDa), *xylY* (sous unité de la toluate 1,2-dioxygénase, 20 kDa),

xylZ (sous unité de la toluate 1,2-dioxygénase, 30 kDa), *xylL* (1,2-dihydroxy-3,5-cyclohexadiène-1-carboxylate déshydrogénase, 28 kDa), *xylT* (rôle inconnu, 12 kDa), *xylE* (catéchol 2,3-dioxygénase ou métapyrocatéchase, 36 kDa), *xylG* (semialdéhyde 2-hydroxymuconique déshydrogénase, 60 kDa), *xylF* (semialdéhyde 2-hydroxymuconique hydrolase, 34 kDa), *xylI* (2-oxopent-4-énoate hydratase, 28 kDa), *xylQ* (rôle inconnu, 42 kDa), *xylK* (4-hydroxy-2-oxovalérate aldolase, 39 kDa), *xylI* (4-oxalocrotonate décarboxylase, 29 kDa) et *xylH* (4-oxalocrotonate tautomérase, 4 kDa) (Harayama et Reikik, 1990). Sous l'action des enzymes codées par l'opéron supérieur, les hydrocarbures sont métabolisés en acides carboxyliques, alors que les enzymes de l'opéron méta métabolisent les acides carboxyliques en produits (acétaldéhyde ou propionaldéhyde et pyruvate) directement repris dans le cycle de Krebs (voir Fig. 7).

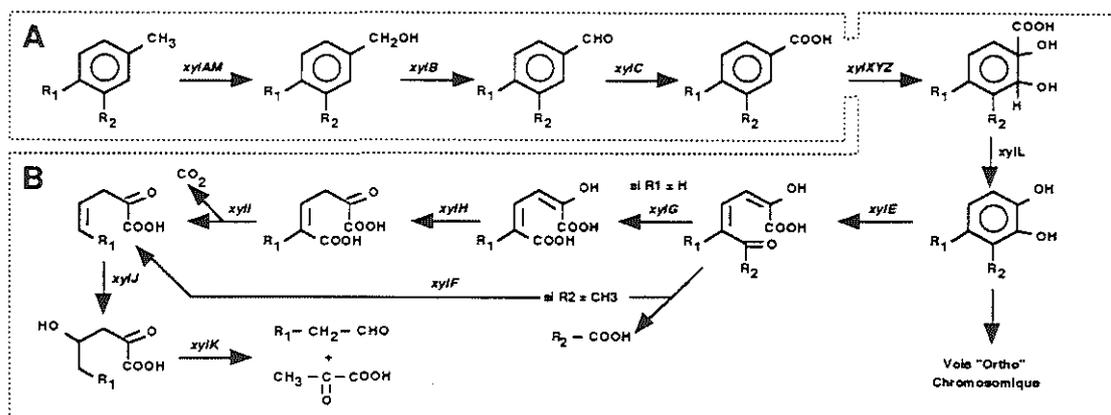


Figure 7: Catabolisme du toluène et des xylènes sous le contrôle du plasmide TOL. A: Voie supérieure (opéron 1, plasmide TOL) B: Voie méta (opéron 2, plasmide TOL)

L'activité des opérons supérieur et méta est sous le contrôle de deux gènes de régulation *xylR* et *xylS*. Le gène *xylR* est sous la dépendance d'un promoteur P_r de type CEC70 (Deretic et coll., 1989) et se trouve donc transcrit à faible niveau de manière constitutive. Le gène *xylS*, sous la dépendance d'un promoteur de type A54, n'est efficacement transcrit qu'en présence d'activateur (*XylR*) et d'un facteur

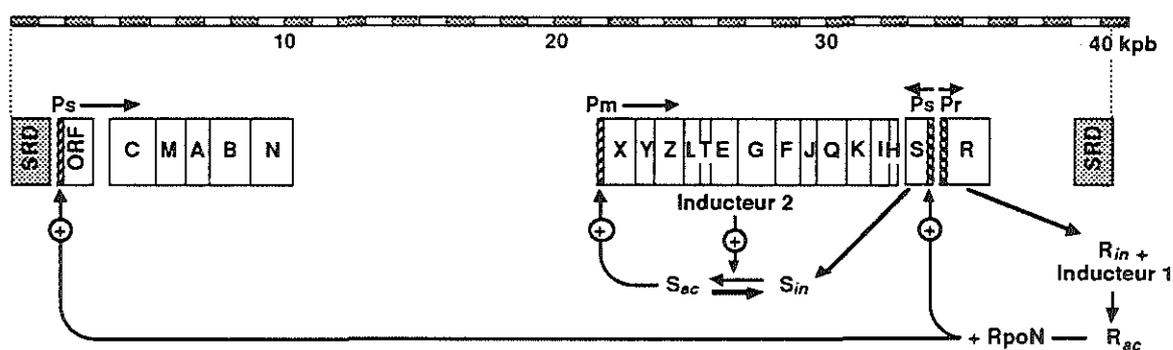


Figure 8: Régulation des opérons supérieur et méta du plasmide TOL (pWW0). R_{in} : protéine *XylR* inactive. R_{ac} : protéine *XylR* active. S_{in} : protéine *XylS* inactive. S_{ac} : protéine *XylS* active. Inducteur 1: toluène, m et p-xylène (alcools et aldéhydes correspondants à un moindre degré). Inducteur 2: benzoate, m et p-toluate. *SRD*: séquences répétées directes. RpoN est le facteur σ_{54} indispensable à la transcription des promoteurs de type A54 comme OP1 et P_s . Les autres promoteurs (OP2 et P_r) nécessitent pour être transcrits le facteur σ_{70} .

sigma approprié (RpoN ou σ_{54}) (voir Figure 8). En l'absence de XylR le gène *xylS* n'est transcrit qu'à un faible niveau. Le promoteur OP1 étant, comme P_s , de type A54 nécessite lui aussi la présence d'activateur (XylR) et d'un facteur sigma σ_{54} . Par contre le promoteur OP2 étant de type A70 nécessite la présence d'un activateur (XylS) et du facteur sigma standard σ_{70} . En présence d'un inducteur de type 1 (hydrocarbure ou aldéhyde correspondant) la protéine XylR, synthétisée à faible niveau de manière constitutive, va se trouver activée et va se fixer sur les séquences URS situées en amont du promoteurs OP1 (en position -170 à -130) (voir Figure 10). La protéine XylR ainsi fixée va pouvoir former un complexe avec la protéine RpoN qui va pouvoir se fixer sur les séquences -24 et -12 du promoteur de type A54. L'interaction de XylR et de RpoN va entraîner la formation d'une boucle de l'ADN et la fixation à un taux accru de l'ARN polymérase ($\alpha\alpha'\beta\beta'$) (voir Figure 9). Il résulte de cette succession d'évènements une stimulation de 10 à 50 fois du taux de transcription de l'opéron supérieur (Dixon, 1986; Ramos, Mermod et Timmis, 1987; Inouye et coll., 1990).

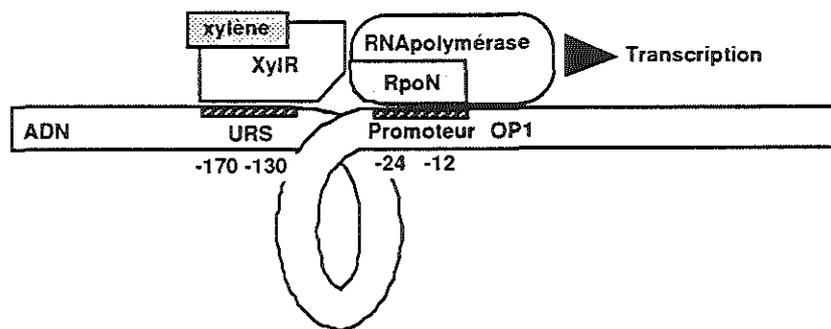


Figure 9: Modèle d'activation du promoteur OP1 par XylR en présence de m-xylène, du facteur σ_{54} (RpoN) et d'ARN polymérase. D'après Inouye et coll., 1990.

```

951 CATAGGGCTCGGCSTGGACGAAGATCTGACTTTTCTCGTTCAATAAGCAAAAATCCATAGTTCACGGTTCCTTATTTTAAATGTGGGCTGCTTGGTGTGA
GTATCCCGAGCCGACCTGCTTCTAGACTGAAAAGAGCAAGTTATCGTTTTTAGGTATCAAGTGCCAAGAGAATAAAATTACACCCGACGAACCACT
aTyrProGluAlaHisValPheIleGlnSerLysGluAsnLeuLeuCysPheAspMet
1051 TGTAGAAAGGCCCAAGTCGATGAAAATGCATCTCGACGTGATGCGTATACGGGTTACCCCCATTGCCACGTTGCGCCATCCTTTTTGCAATCAGTGACC
ACATCTTTCCGGGTTTCAGCTACTTTTACGTAGAGCTGCCTACGCATATGCCAATGGGGTAAACGGTGCAACCGGTAGGAAAACGTTAGTCACTGG
XylS mRNA ←
1151 ACTTTTCCAAGCAAAAATAACGCCAAGCAGAAGCAAGAGCGTTCTTTTAAAGAAGCAGAACACCAGAAGTTCGTGCTGTCCGGGCGATCCGGCGACGAATT
TGAAAAGGTTGGTTTATTTGGGTTTCGCTTCTGCTCTGCAAGAAAATTTCTGCTCTTGTGGTCTTCAAGCAGCAGACCCCGTACGCCGCTGCTTAA
Ps-12 Ps-24 Pr1-35 Pr1-10Pr2-35 Xyl1 mRNA1 Pr2-10 Xyl1 mRNA2
1251 GGCGGATAAAGGGGATCTGCGTTGAGGTGGATTTCAGTTAATCAATTGGTTAATCTTTCAGGACCACCTAAGCAAATGCTAAAGTGCCAGATGGAATGCT
CCGCCTATTTCCCTAGACGCAACTCCACCTAAAGTCAATTAGTAAGCAATTAGAAAAGTCTGGTGGATTCTGTTTACGATTTACCCGCTTACCTTACGA
URS1 URS2 URS3
1351 GAGCCGGCAAGCACAGGCCTTGACGTTGCAAGGTAGTCATGACCGCAGTGAGCCTCTGTATGTTCCGCCGGGTGGATCATCCCGATAAAAACAAGAGGAAA
CTCGCCGCTTCGTTCCGGAACTGCAACGTTCCATCAGTACTGCGCTCAGTCCGGAGACTACAAGGGCGCCACCTAGTAGGGCTATTTTGTTCCTCTTT
XylR →
MetSerLeuThrTyrLysProLysMetGlnHisGluAspMetGlnAspLeuSerSerGlnIleArgPheValAlaAlaGluGlyLysIleTrpLeu
1451 ACAATGTCCGTTACATACAAACCAAGATGCAGCATGAGGATAGCAAGACCTTAGCAGCCAGATCCGTTTTCGTTGCCCGCGAAGGCAAGATCTGTTG
TGTTTACAGCGAATGTAATGTTTGGTTCTACGTCGTAATACGTTCTGGAATCGTCGGTCTAGGCAAAGCAACGGCGGCTTCCGTTCTAGACCAAC

```

Figure 10: Séquence séparant les gènes *xyIS* et *xyIR*, contenant les promoteurs Ps (Pr -24 et Pr -12), PR1 (P1 -35 et P1 -10) et PR2 (P2 -35 et P2 -10) et les 3 séquences URS (***) reconnue par XylR en amont de Ps mais également en amont de OP1. Le site d'initiation de la transcription correspond à la position relative +1 pour les messagers de XylIS et de XylIR (•→). Les deux flèches situées dans la zone des URS indiquent des palindromes.

Le mécanisme d'action de XylR au niveau du promoteur Ps est tout à fait similaire à ce qui vient d'être décrit pour OP1. La situation est cependant plus complexe du fait de la structure particulière de la région intercistronique *xylS/xylR* qui ressemble beaucoup à celle des gènes *nahR/nahG* du régulon NAH. La région d'ADN située entre *xylS* et *xylR* contient les promoteurs P_s et P_{r1}/P_{r2} des deux gènes. Tant que la protéine XylR n'a pas été activée par un inducteur de type 1, cette zone d'ADN va rester libre. Une transcription à faible niveau mais continue de *xylR* va survenir puisque, en l'absence d'activation, *xylS* n'est transcrit qu'à un faible niveau et que son opérateur, P_s, n'est pas situé au même niveau que les opérateurs P_{r1} et P_{r2}. Cependant, dès que la protéine XylR est activée, elle va se fixer sur les séquences URS en amont de *xylS*, et bloquer sa propre transcription puisque les séquences URS se situent exactement au niveau de P_{r1} et de P_{r2}.

Lorsque la protéine XylS est synthétisée à faible niveau, elle peut stimuler la transcription de l'opéron méta si elle est activée par un inducteur de type 2. En l'absence d'inducteur de type 2 et en présence d'inducteur de type 1, l'accumulation de protéine XylS sous forme native (S_{in}) va permettre de stimuler la transcription de l'opéron méta par déplacement de l'équilibre S_{in} \longleftrightarrow S_{ac} (ce qui n'est pas le cas pour XylR). Ainsi donc en présence d'un inducteur de type 1 l'opéron supérieur est activé le premier puis l'opéron méta est activé lorsque XylS s'est accumulé en quantité suffisante. En présence d'inducteur de type 2 seul l'opéron méta est activé en raison de l'activation de la faible quantité de XylS synthétisée en l'absence de XylR activée (Ramos, Mermoud et Timmis, 1987).

Ce système de régulation sophistiqué représente un bel exemple de la complexité des structures moléculaires qu'ont du développer les bactéries pour s'adapter aux variations de leur environnement métabolique. Cependant le régulon TOL appartient lui même à une structure génétique encore plus complexe que Tsuda et Ino ont décrite en 1987, les transposons Tn4651 et Tn4653.

La Figure 11 montre la structure "emboîtées" des deux transposons contenant le régulon TOL dans une zone limitée par des séquences répétées directes (SRD).

Le transposon Tn4651 est la structure la plus interne. Il est limité par deux séquences répétées inversées de 46 pb (SRI), possède une transposase (*tnpA*) responsable de la première étape de la transposition (formation d'un ADN cointégré avec duplication des séquences du transposon), une résolvase, constituée des produits des deux gènes *tnpS* et *tnpT*, et responsable de la seconde étape de la transposition (résolution de l'ADN cointégré) et enfin d'un site *res* au niveau duquel la résolvase effectue la recombinaison entre les transposons dupliqués.

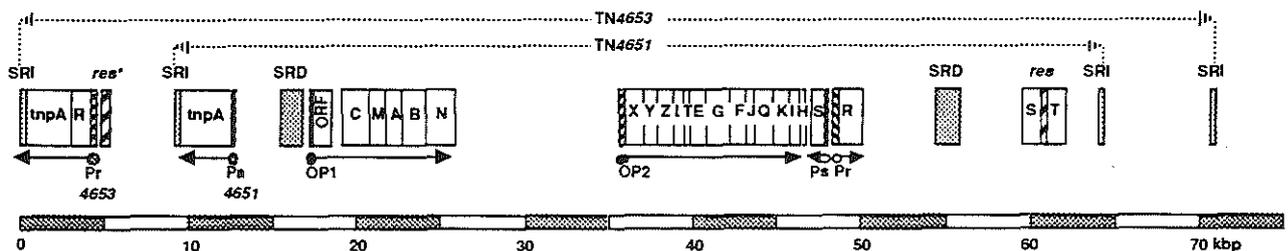


Figure 11: Structure des transposons Tn4651 et Tn4653. *tnpA*: transposase, *tnpR*: résolvase de Tn4653, *tnpS* et *tnpT*: résolvase de Tn4651, *res*: site de résolution de Tn4651, *res**: site de résolution défectif de Tn4653. SRI: séquences répétées inversées, SRD: séquences répétées directes. D'après Tsuda et Ino, 1989.

A l'intérieur du transposon Tn4651, le régulon TOL est encadré par deux séquences répétées directes (SRD), au niveau desquelles peuvent survenir des recombinaisons entraînant la délétion du seg-

ment d'ADN situé entre elles, donc du régulon TOL. Ces délétions sont stimulées lorsque la bactérie hôte est cultivée en présence de benzoate. Le mécanisme moléculaire sous-jacent à la stimulation par le benzoate des recombinaisons entre SRD reste à déterminer.

Le Transposon Tn4653 contient entièrement le transposon Tn4651. Il est limité à ses deux extrémités par des séquences répétées inversées de 38 pb, et contient une résolvase (*tnpA*) et une transposase vraisemblablement (*tnpR*) dont le message commun semble transcrit à partir d'un promoteur commun Pr₄₆₅₃. Juste en aval de *tnpR* se situe un site de résolution déficient *res** qui manque d'une des trois séquences de reconnaissance de TnpR (site I). Le couple TnpR et *res** de Tn4653 est donc non fonctionnel et c'est la transposase (*tnpS* et *tnpR*) de Tn4651 et son site *res* qui vont permettre la résolution de Tn4653 après cointégration.

Dans les souches porteuses de ce système il est fréquent d'isoler des bactéries sans plasmide où l'un des deux transposons s'est intégré dans le chromosome, et qui sont susceptibles de transformer un plasmide acquis (comme RP4 par exemple) en un plasmide TOL qui va pouvoir exporter par conjugaison, le ou les transposons nouvellement acquis (mobilisation des transposons).

L'ETUDE GENETIQUE RAPIDE DES BACTERIES HYDROCARBONOCLASTES

Lorsque nous avons entrepris il y a près de cinq ans l'étude du traitement biologique des pollutions par les hydrocarbures dans les rivières, il nous est vite apparu qu'il était nécessaire de ne pas nous cantonner dans l'utilisation des souches hydrocarbonoclastes décrites dans la littérature et adaptées depuis longtemps à un environnement de laboratoire, mais qu'il était impératif de commencer par étudier les bactéries hydrocarbonoclastes indigènes afin de définir l'environnement génétique sur lequel nous avons l'intention de travailler. Après avoir isolé près d'une centaine de souches différentes capables de dégrader les hydrocarbures aromatiques et linéaires, nous avons réalisé que l'étude génétique détaillée de toutes ces souches par les méthodes traditionnelles représentait un travail gigantesque qu'il était impossible de mener à bien en quelques années. Nous avons donc entrepris la mise au point de méthodes permettant une analyse génétique ultra-rapide des souches indigènes sur lesquelles nous ne possédions aucune information.

La première étape a été de faire le pari que les souches indigènes, nettement différentes des souches décrites dans la littérature, devaient posséder des systèmes génétiques assez voisins de ceux déjà décrits et qu'il serait possible de détecter ces homologies par hybridation. La seconde étape a donc consisté à cloner systématiquement tous les gènes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures aromatiques du système TOL (plasmide pWW0 de 117 kpb) et tous les gènes impliqués dans la dégradation des alcanes du système ALK (plasmide pOCX de 410 kpb). Ces gènes ont été clonés dans un plasmide spécialisé baptisé pGEM-3zf(-) qui permet de réaliser simplement des sondes d'ARN complémentaires des gènes insérés dans le site de clonage multiple. La troisième étape a consisté à mettre au point une technique permettant de purifier rapidement des quantités suffisantes de plasmide ou de chromosome bactérien pour pouvoir réaliser aisément des cartes génétiques détaillées. La dernière étape a consisté à mettre au point une technique de cartographie génétique ultra-rapide permettant d'obtenir en quelques jours la carte détaillée d'un plasmide ou d'un fragment de chromosome. Pour cela nous avons utilisé les enzymes de restriction à faible taux de coupure (Not I, Sfi I, Xba I) associées à l'électrophorèse à champs pulsés qui permet de déterminer avec précision (erreur < 0,5%) la taille des très gros fragments d'ADN générés par ces enzymes. Il suffit ensuite d'hybrider sur des digests de restriction les différentes sondes

de la bibliothèque pour localiser en quelques jours les principaux systèmes génétiques portés par le plasmide ou le chromosome étudié.

Cette approche s'est avérée lourde à mettre en place, mais permet une analyse particulièrement rapide et efficace des bactéries indigènes hydrocarbonoclastes. Elle a permis de montrer par exemple que toutes les souches isolées de la Seine et capables de dégrader le toluène étaient porteuses soit d'un (ou de plusieurs) plasmide TOL soit d'un (ou de plusieurs) transposon TOL intégré dans le chromosome. Elle a également permis de montrer que les souches isolées de la Seine et capables de dégrader les alcanes ne portaient le plus souvent pas de plasmide, mais qu'elles possédaient des gènes homologues du système ALK intégrés dans leurs chromosomes. Certaines souches particulièrement intéressantes pour leur particularités métaboliques ont été étudiées plus en détail, c'est le cas de la souche MA2 dont la carte du régulon TOL est comparée à celle de pWW0 à titre d'exemple.

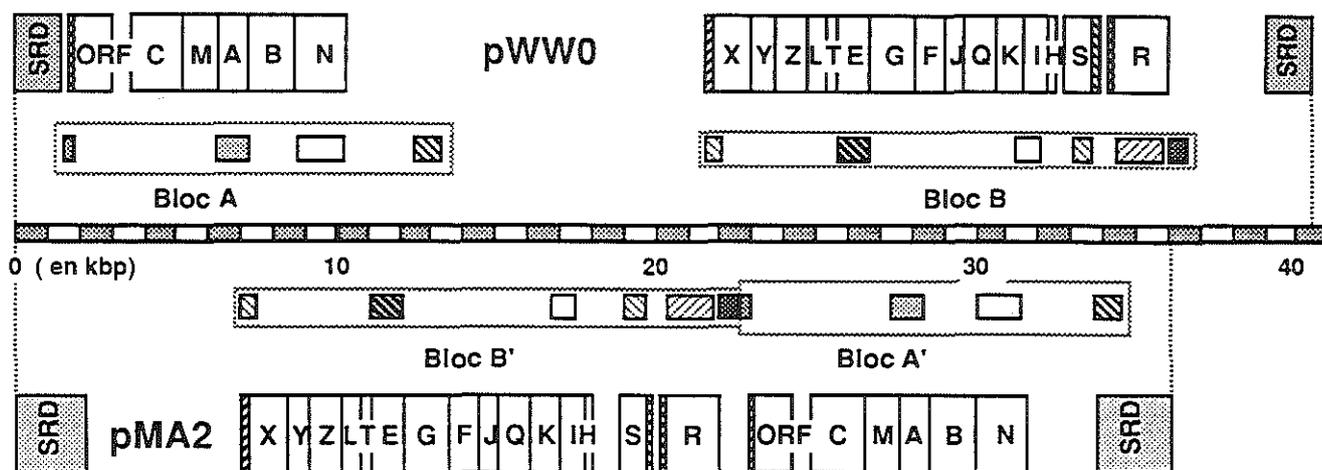


Figure 12: Comparaisons des homologies génétiques entre les régulons TOL des plasmides pWW0 et pMA2

Tous les systèmes génétiques "indigènes" étudiés ont été clonés, et constituent maintenant une véritable génothèque dans laquelle nous pouvons puiser pour assembler des unités génétiques indépendantes pouvant être réinsérées dans n'importe quelle bactérie indigène choisie.

L'UTILISATION DE CASSETTES GENETIQUES SPECIALISEES

Prenons comme exemple d'utilisation possible de cette génothèque la construction d'une souche capable de dégrader les hydrocarbures aromatiques tels que les toluènes et les xylènes, ainsi que les alcanes. Avec cet objectif en tête, nous avons tout d'abord construit une cassette *alk* regroupant le locus *alkBAC* (10,8 kpb) et le locus *alkR* (4,9 kpb) débarrassés de toutes les séquences non impliquées dans la dégradation des alcanes. La figure 13 montre comment il est possible de construire une cassette ALK (15,7 kpb) sous forme d'un bloc Not. Ce bloc ALK a ensuite été ligué à un fragment Not contenant l'origine de réplcation d'un plasmide indigène (24,6 kpb) et l'ensemble a été réinséré par électroporation dans une bactérie indigène capable d'utiliser les alcanes comme seules sources de carbone. L'opération a permis d'obtenir un régulon ALK sous la forme d'un "petit" plasmide d'environ 40 kpb

constituant pour la bactérie hôte une charge génétique beaucoup plus faible que le plasmide OCT d'origine (335 à 410 kpb). A partir de ce mini-plasmide il devient possible d'utiliser le site Sfi I unique pour réintroduire, par exemple, un régulon TOL et un bloc EMU (groupe de gènes contrôlant la synthèse d'un biosurfactant) sous la forme de blocs génétiques indépendants.

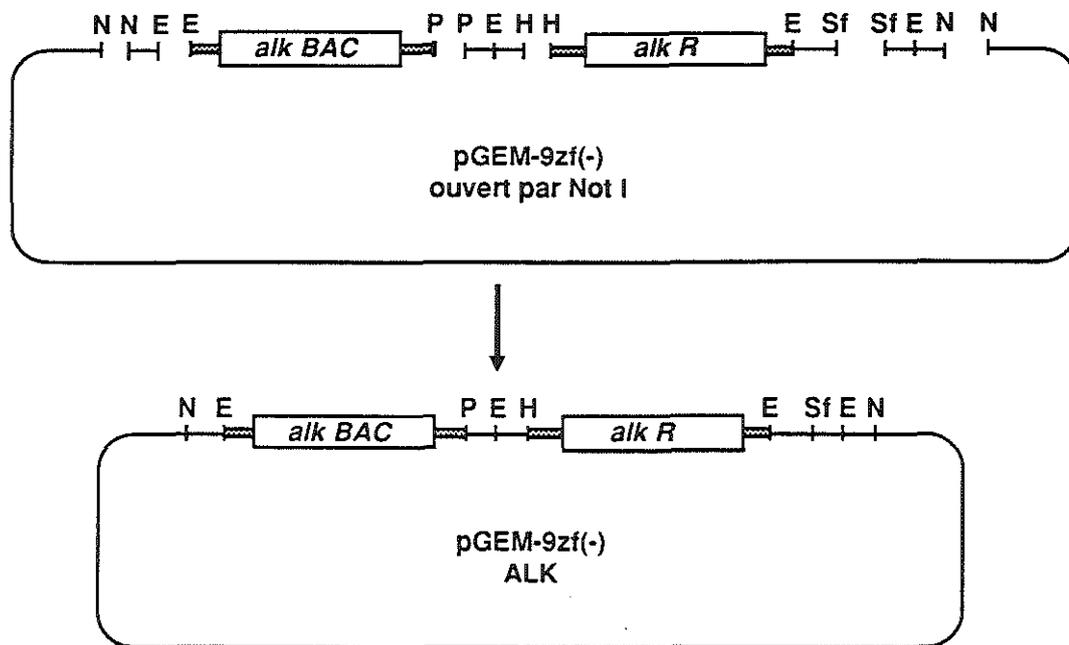


Figure 13: Obtention d'une cassette ALK sous forme d'un bloc Not. Les oligonucléotides N-E, P-E-H et Sf-E-N ont été produits grâce à un synthétiseur ABI 317.

Ce genre d'approche devrait permettre de construire rapidement des plasmides pollution-spécifiques que l'on pourrait réintroduire en moins de 48 heures dans des bactéries adaptées à l'environnement concerné. Associée à l'utilisation d'un feeding bien adapté, le "seeding à la carte" pourrait devenir dans les prochaines années une technique industriellement envisageable pour le traitement des pollutions par les hydrocarbures.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chakrabarty A.M. (1972)
Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas putida*.
J. Bacteriol. 112: 815-823.
- Chakrabarty, A.M., G. Chou et I.C. Gunsalus (1973)
Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in *Pseudomonas*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 1137-1140.
- Davies, J.I. et W.C. Evans (1964)
Oxidative metabolism of naphthalene by soil *Pseudomonads*.
Biochem. J. 91: 251-261.

- Deretic, V., W.M. Konyecsni, C.D. Mohr, D.W. Martin et N.S. Hibler (1989)
Common denominators of promoter control in *Pseudomonas* and other bacteria.
Biotechnol. 7: 1249-1254.
- Dixon R. (1986)
The xylABC promoter from *Pseudomonas putida* TOL plasmid is activated by nitrogen regulatory genes in *Escherichia coli*.
Mol. Gen. Genet. 203: 129-136.
- Dunn, N.W. et I.C. Gunsalus (1973)
Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas*.
J. Bacteriol. 114: 974-979.
- Eggink, G., R.G. Dageveen, B. Altenburg et B. Witholt (1987)
Controlled and functional expression of the *Pseudomonas oleovorans* alkane utilizing system in *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. 262: 17712-17718.
- Eggink, G., H. Engel, W.G. Meijer, J. Otten, J. Kingma et B. Witholt (1988)
Alkane utilization in *Pseudomonas oleovorans*. Structure and function of the regulatory locus alkR.
J. Biol. Chem. 263: 13400-13405.
- Eggink, G., H. Engel, G. Vriend, P. Terpstra et B. Witholt (1990)
Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*. Structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints.
J. Mol. Biol. 212: 135-142.
- Eggink, G., P.H. van Delyveld et B. Witholt (1984)
The construction of a gene bank from *pseudomonas oleovarans*. molecular cloning of the alk sequences of the OCX plasmid coding for the alkane oxidizing enzymes.
Prog. Indust. Microbiol. 20: 373-380.
- Eggink, G., P.H. van Lelyveld, A. Arnberg, N. Arfman, C. Witteveen et B. Witholt (1987)
Structure of the *Pseudomonas putida* alkBAC operon. Identification of transcription and translation products.
J. Biol. Chem. 262: 6400-6406.
- Ghosal, D., I.S. You et I.C. Gunsalus (1987)
Nucleotide sequence and expression of gene nahH of plasmid NAH7 and homology with gene xylE of TOL pWW0.
Gene 55: 19-28.
- Harayama, S., R.A. Leppik, M. Rekik, N. Mermod, P.R. Lehrbach, W. Reineke et K.N. Timmis (1986)
Gene order of the TOL catabolic plasmid upper pathway operon and oxidation of both toluene and benzyl alcohol by the xylA product.
J. Bacteriol. 167: 455-461.
- Harayama, S., N. Mermod, M. Rekik, P.R. Lehrbach et K.N. Timmis (1987)
Roles of the divergent branches of the meta-cleavage pathway in the degradation of benzoate and substituted benzoates.
J. Bacteriol. 169: 558-564.
- Harayama, S. et M. Rekik (1990)
The meta-cleavage operon of TOL degradative plasmid pWW0 comprises 13 genes.
Gene 221: 113-120.

- Harayama, S., M. Reik, M. Wubbolts, K. Rose, R.A. Leppik et K.N. Timmis (1989)
Characterization of five genes in the upper-pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and identification of the gene products.
J. Bacteriol. 171: 5048-5055.
- Holtel, A., M.A. Abril, S. Marques, K.N. Timmis et J.L. Ramos (1990)
Promoter, upstream activator sequences are required for expression of the *xylS* gene and upper-pathway operon on the *Pseudomonas* TOL plasmid.
Mol. Microbiol. 4: 1551-1556.
- Inouye, S., Y. Ebina, A. Nakazawa et T. Nakazawa (1984)
Nucleotide sequence surrounding transcription initiation site of *xylABC* operon on TOL plasmid of *Pseudomonas putida*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1688-1691.
- Inouye, S., M. Gomada, U.M.X. Sangodkar, A. Nakazawa et T. Nakazawa (1990)
Upstream regulatory sequence for transcriptional activator *xylR* in the first operon of xylene metabolism on the TOL plasmid.
J. Mol. Biol. 216: 251-260.
- Inouye, S., A. Nakazawa et T. Nakazawa (1981)
Molecular cloning of gene *xylS* of the TOL plasmid: evidence for positive regulation of the *xylDEGF* operon by *xylS*.
J. Bacteriol. 148: 413-418.
- Inouye, S., A. Nakazawa et T. Nakazawa (1983)
Molecular cloning of regulatory gene *xylR* and operator-promoter regions of the *xylABC* and *xylDEGF* operons of the TOL plasmid.
J. Bacteriol. 155: 1192-1199.
- Inouye, S., A. Nakazawa et T. Nakazawa (1984)
Nucleotide sequence of the promoter region of the *xylDEGF* operon on TOL plasmid of *Pseudomonas putida*.
Gene 29: 323-330.
- Inouye, S., A. Nakazawa et T. Nakazawa (1985)
Determination of the transcription initiation site and identification of the protein product of the regulatory gene *xylR* for *xylS* operons on the TOL plasmid.
J. Bacteriol. 163: 863-869.
- Inouye, S., A. Nakazawa et T. Nakazawa (1986)
Nucleotide sequence of the regulatory gene *xylS* on the *Pseudomonas putida* TOL plasmid and identification of the protein product.
Gene 44: 235-242.
- Inouye, S., A. Nakazawa et T. Nakazawa (1987)
Expression of the regulatory gene *xylS* on the TOL plasmid is positively controlled by the *xylR* gene product.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5182-5186.
- Inouye, S., A. Nakazawa et T. Nakazawa (1988)
Nucleotide sequence of the regulatory gene *xylR* of the TOL plasmid from *Pseudomonas putida*.
Gene 66: 301-306.
- Kohler, T., S. Harayama, J.L. Ramos et K.N. Timmis (1989)
Involvement of *Pseudomonas putida* RpoN sigma factor in regulation of various metabolic functions.
J. Bacteriol. 171: 4326-4333.

- Mermod, N., J.L. Ramos, A. Bairoch et K.N. Timmis (1987)
The xyl S gene positive of TOL plasmid pWW0: identification, sequence analysis and overproduction leading to constitutive expression of meta cleavage pathway.
Mol. Gen. Genet. 207: 349-354.
- Murray, K., C.J. Duggleby, J.M. Sala Trepas et P.A. Williams (1972)
The metabolism of benzoate and methylbenzoates via the meta-cleavage pathway by *Pseudomonas arvilla* mt2.
Europ. J. Biochem. 28: 301-310.
- Nakai, C., H. Kagamiyama, M. Nozaki, T. Nakazawa, S. Inouye, Y. Ebina et A. Nakazawa (1983)
Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2.
J. Biol. Chem. 258: 2923-2928.
- Nakazawa, T., E. Hayashi, T. Yokota, Y. Ebina et A. Nakazawa (1978)
Isolation of TOL and RP4 recombinants by integrative suppression.
J. Bacteriol. 134: 270-277.
- Nakazawa, T. et T. Yokota (1973)
Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: demonstration of two benzoate pathways.
J. Bacteriol. 115: 262-267.
- Owen, D.J., G. Eggink, B. Hauer, M. Kok, D.L. Mac Beth, Y.A.N.G. Yun Diu et J.A. Shapiro (1984)
Physical structure, genetic content and expression of the alkBAC operon.
Mol. Gen. Genet. 197: 373-383.
- Ramos, J.L., N. Mermod et K.N. Timmis (1987)
Regulatory circuits controlling transcription of TOL plasmid operon encoding meta-cleavage pathway for degradation of alkylbenzoates by *Pseudomonas*.
Mol. Microbiol. 1: 293-300.
- Ramos, J.L., C. Michan, F. Rojo, D. Dwyer et K. Timmis (1990)
Signal-regulator interactions. Genetic analysis of the effector binding site of xylS, the benzoate-activated positive regulator of *Pseudomonas* TOL plasmid meta-cleavage pathway operon.
J. Mol. Biol. 211: 373-382.
- Ramos, J.L., A. Stolz, W. Reineke et K.N. Timmis (1986)
Altered effector specificities in regulator of gene expression: TOL plasmid xylS mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria.
Proc. Natl. Acad. Sci USA 83: 8467-8471.
- Sala Trepas, J.M., K. Murray et P.A. Williams (1972)
The metabolic divergence in the meta cleavage of catechols by *Pseudomonas putida* NCIB10015. Physiological significance and evolutionary implications.
Europ. J. Biochem. 28: 347-356.
- Schell M.A. (1985)
Transcriptional control of the nah and sal hydrocarbon-degradation operons by the nahR gene product.
Gene 36: 301-309.
- Schell M.A. (1986)
Homology between nucleotide sequences of promoter regions of NAH and SAL operons of NAH7 plasmid of *Pseudomonas putida*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 369-373.

- Schell, M.A. et P.E. Wender (1986)
Identification of the nahR gene product and nucleotide sequences required for its activation of the SAL operon.
J. Bacteriol. 166: 9-1
- Stanier R.Y. (1976)
Réflexions sur la taxonomie des Pseudomonas.
Bull. Inst. Pasteur 74: 255-270.
- Stanier, R.Y. et L.N. Ornston (1973)
The beta-ketoadipate pathway.
Adv. Microb. Physiol. 9: 89-151.
- Strawinski R.J. et R.W. Stone (1943)
Conditions governing the oxidation of naphthalene and the chemical analysis of its products.
J. Bacteriol. 45: 16-24.
- Tsuda, M. et T. Iino (1987)
Genetic analysis of a transposon carrying toluene degrading genes on a TOL plasmid pWW0.
Mol. Gen. Genet. 210: 270-276.
- Tsuda, M. et T. Iino (1988)
Identification and characterization of Tn4653, a transposon covering the toluene transposon Tn4651 on TOL plasmid pWW0.
Mol. Gen. Genet. 213: 72-77.
- Tsuda, M. et T. Iino (1990)
Naphthalene degrading genes on plasmid NAH7 are on a defective transposon.
Mol. Gen. Genet. 223: 33-39.
- Tsuda, M., K.I. Minegishi et T. Iino (1989)
Toluene transposons Tn4651 and Tn4653 are class II transposons.
J. Bacteriol. 171: 1386-1393.
- Williams, P.A. et K. Murray (1974)
Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by Pseudomonas putida (arvilla) mt-2: evidence for existence of a TOL plasmid.
J. Bacteriol. 120: 416-423.
- Williams, P.A. et K. Murray (1974)
Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by Pseudomonas putida (arvilla) mt-2: evidence for existence of a TOL plasmid.
J. Bacteriol. 120: 416-423.
- Wong, C.L. et N.W. Dunn (1974)
Transmissible plasmid coding for the degradation of benzoate and m-toluene in Pseudomonas arvilla mt-2.
Genet. Res. 23: 227-232.
- Worsey, M.J. et P.A. Williams (1975)
Metabolism of toluene and xylene by Pseudomonas putida (arvilla) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid.
J. Bacteriol. 124: 7-13.
- Yen, K.M. et I.C. Gunsalus (1982)
Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 874-878.

Yen, K.M. et C.M. Serdar (1988)
Genetics of naphthalene catabolism in Pseudomonads.
Crc Critical Reviews In Microbiology 15: 247-268.

You, I.S. et I.C. Gunsalus (1986)
Regulation of the NAH and SAL operons of plasmid NAH7: evidence for a new function in nahR.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 141: 986-992.

ACCELERATION DE LA BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES

Anne BASSERES

Société Nationale Elf Aquitaine
GRL- BP 34 - 64170 Lacq , France

et

Alain LADOUSSE

Société Nationale Elf Aquitaine
Tour ELF-Cedex 45
92078 Paris La Défense

INTRODUCTION

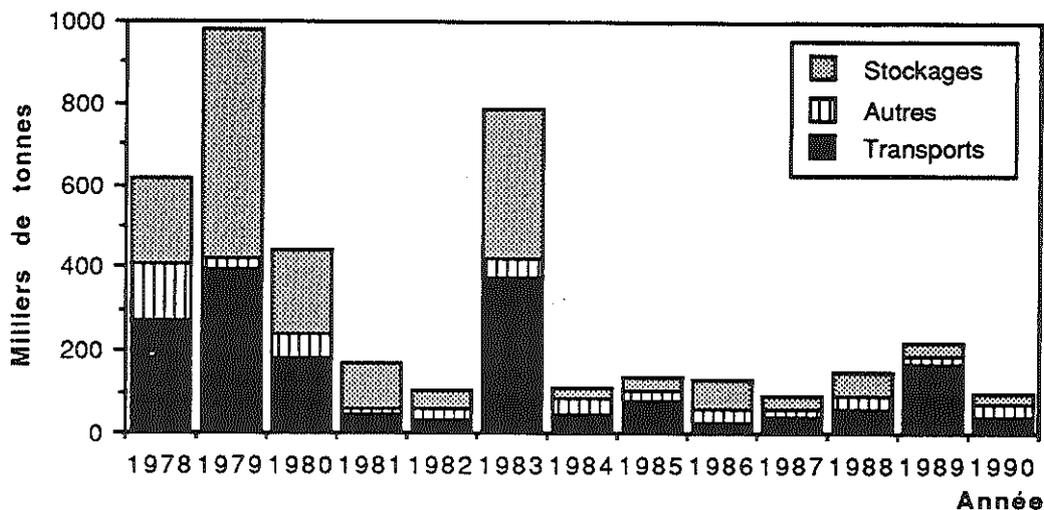
Depuis une vingtaine d'années, le souci d'enrayer les déversements accidentels d'hydrocarbures, de traiter ces pollutions et de réhabiliter les sites pollués, s'est accru. La connaissance scientifique en ce domaine s'est développée, entraînant la mise en place de nouvelles techniques d'intervention diversifiées.

La quantité d'hydrocarbures déversés accidentellement montre une décroissance prometteuse au cours de la dernière décennie (cf. figure)¹. On a constaté 4 fois moins de brut déversé entre 1984 et 1990 qu'entre 1978 et 1983, avec une tendance à la diminution des déversements liés au stockage.

Les moyens de lutte contre les déversements accidentels d'hydrocarbures sont très diversifiés et sont choisis en fonction des conditions du milieu à traiter. Dans un premier temps, les hydrocarbures peuvent être récupérés mécaniquement, puis des dispersants peuvent être utilisés. Ces derniers permettent d'une part le fractionnement de la nappe de pétrole, évitant une arrivée massive à la côte, et d'autre part favorisent la biodégradation en augmentant la surface d'échange eau / pétrole et le contact avec les bactéries spécifiques hydrocarbures présentes dans le milieu. La dégradation naturelle des hydrocarbures est obtenue par l'évaporation et la dissolution, phénomènes rapides, et par l'oxydation et la biodégradation, qui sont des phénomènes beaucoup plus lents.

L'accélération de la biodégradation des hydrocarbures est un nouvel outil de lutte contre les déversements d'hydrocarbures et fait l'objet d'un programme de recherche démarré il y a 12 ans par le Groupe Elf Aquitaine. Son application à grande échelle est décrite ci-dessous dans le traitement des plages polluées d'Alaska. Il s'avère être un moyen de lutte facilement applicable et peu coûteux.

Déversements accidentels de brut dans le monde



(Transports : pétroliers, Stockages : réservoirs , Autres : pipelines ...)

PRINCIPE

La biodégradation des hydrocarbures est un phénomène bien connu² dans lequel les hydrocarbures sont dégradés en biomasse et dioxyde de carbone. Les microorganismes capables de réaliser cette biodégradation sont présents dans de nombreux environnements^{3,4}. Deux voies peuvent être envisagées pour accélérer ce phénomène : l'utilisation de souches bactériennes spécifiques hydrocarbures pures et l'utilisation de souches bactériennes indigènes. Compte tenu des facteurs de compétitivité observés en milieu naturel⁵, il semble que le meilleur choix soit d'utiliser les flores bactériennes indigènes. Partant de ce principe, l'accélération de la biodégradation est obtenue en fournissant aux bactéries présentes les éléments nutritifs indispensables à leur développement et qui sont généralement limitants dans le milieu naturel^{6,7,8} ; ceci peut être réalisé quand aucun autre paramètre n'est limitant. Plusieurs auteurs ont montré que la biodégradation des hydrocarbures peut-être accélérée par l'addition de fertilisants contenant de l'azote et du phosphore dans les milieux liquides⁹ et dans les sédiments^{10,11,12}. Des études ont porté sur la mise au point de formulations oléophiles^{2,13,14,15}.

La démarche d'Elf Aquitaine est de fournir aux bactéries présentes dans le milieu les éléments nécessaires à leur développement, par le biais d'une formulation oléophile sous forme de microémulsion⁹.

MODE D'ACTION :

Le mode d'action des accélérateurs de biodégradation dépend de la nature de ceux-ci. Les différents produits proposés fournissent les éléments minéraux nutritifs (azote et phosphore). Ces éléments, hydrosolubles, peuvent être présentés sous

forme hydrophile ou encapsulés dans une phase organique les rendant oléophiles. Les produits sélectionnés répondent en général aux critères suivants : les éléments nutritifs doivent être relargués lentement et ne pas provoquer d'eutrophisation du milieu.

La formulation oléophile (INIPOL EAP 22) présente l'intérêt de rester au contact du pétrole, mettant à la disposition des bactéries spécifiques hydrocarbures l'azote et le phosphore nécessaire à la dégradation de ce dernier à l'endroit précis de la dégradation.

Les formulations hydrophiles relarguent plus ou moins lentement les éléments nutritifs solubles qui risquent alors d'être lessivés dans l'eau.

PRODUITS PROPOSES :

Différents produits ont été proposés et testés lors de la pollution des côtes en Alaska. Parmi ceux-ci, se trouvent plusieurs produits hydrophiles (urée, magnésio-ammonio-phosphate...) ^{16,17,18,19,20} et un seul produit oléophile, INIPOL EAP 22.

L'INIPOL EAP 22, mis au point par Elf Aquitaine⁹, est une microémulsion dans laquelle l'azote, sous forme d'urée, et le phosphore, sont encapsulés dans de l'acide oléique, qui confère au produit son caractère oléophile. Les principales caractéristiques de l'INIPOL EAP 22 sont les suivantes:

- caractère oléophile permettant la présence des éléments nutritifs à l'interface eau/hydrocarbure ;
- rapport optimum azote / phosphore ;
- effet retard lors de la libération de l'azote et du phosphore ;
- inhibition de la formation d'émulsion inverse ;
- absence de toxicité pour la flore et la faune ;

Ce produit est liquide et peut être mis en œuvre par tous les systèmes classiques d'épandage par pulvérisation. Le dosage nécessaire à l'initiation du développement bactérien est généralement de 5 à 10% en poids d'hydrocarbures à traiter.

Ce produit est particulièrement bien adapté au traitement de sédiments des zones côtières, quand les conditions de présence de flore bactérienne et d'oxygénation sont présentes. Son utilisation doit venir en complément des techniques de nettoyage classiques. L'accélération de la biodégradation des hydrocarbures par addition de fertilisants est réellement efficace quand le niveau de contamination d'hydrocarbures est réduit.

APPLICATION SUR SITE

La première utilisation de l'INIPOL EAP 22 en milieu naturel a été réalisée au SPITSBERG en 1985 en collaboration avec le SINTEF¹⁰ (organisme de recherche Norvégien), pour accélérer la dépollution d'une plage polluée par du diesel (80 tonnes) provenant d'une fuite d'un stockage proche. Dans des conditions climatiques extrêmement rigoureuses, l'utilisation de l'INIPOL EAP 22 a permis d'obtenir une élimination de la pollution de 90% en moins d'un an, alors que

seulement 15% étaient éliminés naturellement. Dans cette expérience, une augmentation maximale de 60% de la biodégradation de la fraction aliphatique était observée. La réponse microbiologique à l'addition d'accélérateur de biodégradation, estimée par le dénombrement de la flore totale et de la flore spécifique hydrocarbure, montrait une nette augmentation des deux flores (facteur 200 à 250).

Suite à l'accident de l'Exxon Valdez, en 1989, un projet de démonstration à échelle réelle a été réalisé par l'EPA (US Environmental Protection Agency) et EXXON sur les plages de l'Alaska, pour évaluer l'efficacité de fertilisants pour stimuler la biodégradation des hydrocarbures. Des tests sur le site et des tests de laboratoire ont montré les très bons résultats obtenus par l'application de l'INIPOL EAP 22. 500 tonnes de produit ont alors été commandés par EXXON et appliqués en deux étés : 1989 et 1990.

Les observations de l'EPA et d'EXXON sur le site et en laboratoire ont amené aux conclusions suivantes¹⁶ :

- l'analyse des hydrocarbures en chromatographie gazeuse met en évidence la biodégradation des hydrocarbures en présence d'INIPOL EAP 22 ;
- l'INIPOL nettoie les plages souillées par hydrocarbures par des mécanismes de biodégradation et non par des mécanismes physico-chimiques ;
- l'accélération de la biodégradation des hydrocarbures augmente avec des concentrations croissantes d'INIPOL de 0 à 40% ;
- la biodégradation accélérée par INIPOL augmente avec des températures croissantes et diminue avec des températures décroissantes de 2°C à - 20°C.
- durant les tests, la flore hétérotrophe totale et la flore spécifique hydrocarbure ont été augmentée d'un facteur 1000.
- l'INIPOL est efficace à une profondeur de 30 centimètres.
- l'INIPOL est un produit non toxique pour la faune et la flore.

CONCLUSION

Les récentes utilisations de cette nouvelle technique de nettoyage des côtes polluées par hydrocarbures montrent qu'il est possible d'accélérer la biodégradation de pétrole en appliquant un fertilisant oléophile.

Ce traitement biologique est peu coûteux et facile à appliquer. Son utilisation doit être contrôlée de manière à appliquer le produit dans les conditions voulues. Il permet l'élimination rapide des hydrocarbures résiduels dans l'environnement, qui ne seraient naturellement dégradés qu'à long terme.

Cette technique de traitement biologique est désormais un nouvel outil de lutte contre les pollutions par hydrocarbures.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - Oil Spill Intelligence Report, 1991, Vol XIV, N°8

- 2 - Zobell, C.E, 1969. *Proceedings of a conference on prevention and control of oil spills*, pp 317-326
- 3 - Atlas, R.M et R. Bartha, 1973a, *Environmental Pollution*, V4, pp 291-300
- 4 - Atlas, R.M, et R. Bartha, 1973b, *Environmental Sciences and Technology*, V7, pp 538-541
- 5 - Lee, K, et Levy, E.M, 1989, Enhancement of the natural biodegradation of condensate and crude oil on beaches of Atlantic Canada, *Oil Spill Conference Proceedings*, pp 479-486
- 6 - Atlas, R.M, et R. Bartha, 1972a, *Biotechnology and Bioengineering*, V14, pp 309-318
- 7 - Atlas, R.M., et R. Bartha, 1972b, *Canadian Journal of Microbiology*, V18, pp 1851-1855
- 8 - Frankenberger, W.T, Jr., 1988, *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, V40, pp 66-68
- 9 - Tramier , B et Sirvens, A, 1983, Enhanced oil biodegradation : a new operational tool to control oil spills. *Oil Spill Conference Proceedings*
- 10 - Sveum, P. et A. Ladousse, 1989, Biodegradation of oil in the Arctic : Enhancement by oil soluble fertilizer. *Proceedings of the 1989 Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute Washington, pp 439-446
- 11 - Bromn, K.W , Donnely, K.C et Deuel, L.E, 1983, *Microbioal ecology*, V9, pp 363-373
- 12 - Lee, K, et Levy, E.M, 1987, *Oil Spill Conference Proceedings*, pp 411-416
- 13 - Branchard, R,D,E et Cardon, J, 1985, *Oil Spill Conference Proceedings*
- 14 - Olivieri, R, Bacchin, P, Robertiello,A, Oddo, N, Degen, L et Tonolo, A, 1976, *Applied Environmental Microbiology*, V31, pp629-634
- 15 - Olivieri, R, Robertiello, A et Degen, L, 1978, *Marine pollution Bulletin*, V9, pp217-220
- 16 - Chianelli, R.R, Alzel,T, Bare, R.E, Georges, G.N, Genowitz, M.W, Crossman, M.J, Haith, C.E, Kaiser, F.J, Lessard, R.R, Liotta, R, Matracchio, R.L, Minak-Bernero, V, Prince, R.C,Robbins,W.K, Stiefel, E.I,Wilkinson, J.B,Hinton, S.M, Bragg, J.R, McMillen, J.J et Atlas, K.M, 1991,Bioremediation Technology development and application to the Alaskan spill, *Oil Spill Conference proceedings*, pp 549-558
- 17 - Glaser, J.A, Venosa, A.D et Opatken, E.J, 1991, Development and evaluation of application technique for delivery of nutrients to contaminated shoreline in Prince William Sound, *Oil Spill Conference Proceedings*, pp559-562
- 18 -Safferman, S.I, 1991, Selection of nutrients to enhance the biodegradation for the remediation of oil spilled on beaches, *Oil Spill Conference Proceedings*, pp 571-576
- 19 - Ladousse, A et Tramier, B, 1991, Results of 12 years of research in spilled oil bioremediation : Inipol EAP22, *Oil Spill Conference Proceedings*, pp 577-581
- 20 - Tabak H.H, Haines J.R, Venosa, A.D, Glaser, J.A , Desai, S et Nisamaneepong,W, 1991, Enhancement of biodegradation of Alaskan weathered crude oil components by indegenous microbiota with the use of fertilisers and nutrients, *Oil Spill Conference Proceedings*, pp 583-590

T H E M E V I I I

B I O C A P T E U R S

BIOCAPTEURS : PRINCIPES ET POTENTIALITES

Loïc BLUM et Pierre COULET

Laboratoire de Génie Enzymatique
CNRS - UMR 106 - Université Claude Bernard Lyon 1
43 Bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex

Le développement de nombreux procédés biotechnologiques nécessite la mise au point de capteurs sélectifs permettant la détermination rapide et fiable des paramètres pris en compte pour la conduite d'opérations en milieu industriel. L'automatisation des procédés de fabrication fait apparaître le besoin d'informations de plus en plus nombreuses et précises pour le contrôle de la qualité des matières premières, des produits finis et du processus même de production.

Le domaine biomédical ainsi que celui de l'environnement et de la défense nationale, ces deux derniers étant très proches quant à leurs besoins, sont également demandeurs de techniques d'analyses spécifiques, sensibles et rapides afin de pouvoir intervenir en un temps très court face à une urgence médicale, une pollution aquatique ou atmosphérique, ou une agression chimique ou bactérienne.

DEFINITION

Les capteurs biologiques, ou biocapteurs, représentent actuellement, du fait de leur haute spécificité, une catégorie de capteurs très attractifs capables de répondre aux critères de sensibilité, spécificité et rapidité. En effet, un biocapteur (Figure 1) est obtenu par l'association de deux éléments principaux :

- un élément biologique sensible - *le biorécepteur* - immobilisé sur un support, capable de reconnaître spécifiquement une substance cible, c'est-à-dire le composé à doser, présente dans un milieu complexe;

- un système électronique - *le transducteur* - qui mesure les modifications physico-chimiques engendrées par le système biologique au contact de sa substance cible et les traduit en un signal électrique mesurable et interprétable.

L'élément biologique, au contact intime du transducteur, confère une très grande spécificité au système mais en contrepartie, son inhérente fragilité est un facteur dont il faudra tenir compte à la fois dans la conception du biocapteur et dans ses limites d'utilisation. Le biorécepteur est généralement constitué d'un des éléments affines des couples enzyme/substrat, anticorps/antigène ou lectine/sucre. D'autres matériels biologiques, constitués par des cellules microbiennes, animales ou végétales ou par des coupes fines de tissus ont également été immobilisés et intégrés dans des biocapteurs.

Les transducteurs utilisés sont principalement de type électrochimique (électrodes ampérométriques ou potentiométriques et transistors à effet de champ), enthalpimétrique (thermistances et thermocouples), massique (cristaux piézoélectriques) et, plus récemment, optique avec l'utilisation de fibres optiques couplées à un système optoélectronique.

Ainsi, à l'aptitude de certaines structures biochimiques à reconnaître de façon spécifique de nombreux composés organiques, un biocapteur allie l'efficacité des capteurs physiques ou chimiques à répondre de façon immédiate ou quasi immédiate.

Les techniques d'immobilisation du biorécepteur sont habituellement répertoriées selon cinq catégories et on a été principalement développées pour l'immobilisation d'enzymes : l'adsorption, l'inclusion, le confinement, la réticulation et le couplage covalent sur support activé. *L'adsorption* est simplement due à des interactions entre le biorécepteur et son support. Si ce dernier est non chargé, des liaisons de faible énergie (hydrogène, van der Waals, hydrophobe) s'établissent entre l'enzyme et le support. S'il est chargé, des liaisons ioniques viennent s'ajouter aux liaisons précédentes. Toutefois les biorécepteurs ainsi immobilisés peuvent facilement se désorber sous l'effet d'une variation de pH ou de la force ionique. *L'inclusion* consiste à incorporer le biorécepteur dans un polymère se présentant généralement sous forme de gel.

Le biorécepteur n'est donc pas directement lié à son support. Cette méthode est principalement utilisée pour l'immobilisation de cellules entières ou de fractions subcellulaires. Dans la technique de *confinement*, le biorécepteur reste en solution à l'intérieur d'un compartiment limité par une membrane poreuse qui ne laisse passer que les petites molécules. L'utilisation d'agents bifonctionnels telles que le glutaraldéhyde ($\text{CHO}-(\text{CH}_2)_3-\text{CHO}$) a permis la *réticulation* de molécules d'enzymes entre elles ou leur *co-réticulation* en présence d'une protéine inactive (sérum albumine ou gélatine). La réticulation est également utilisée pour accroître la stabilité des complexes enzyme-support obtenus après adsorption ou inclusion. *La fixation covalente* de biorécepteurs sur supports activés se fait par l'intermédiaire de groupements fonctionnels portés par ces supports et des groupements fonctionnels du biorécepteur n'intervenant pas dans le processus de reconnaissance moléculaire. Les méthodes les plus courantes mettent en jeu les groupements $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ et $-\text{SH}$.

REALISATIONS

Les électrodes à enzyme(s) résultent de l'association d'une préparation enzymatique, généralement immobilisée sur un support, et d'un capteur électrochimique (potentiométrique ou ampérométrique) détectant spécifiquement une espèce chimique impliquée dans la réaction enzymatique. L'oxydation enzymatique du glucose par la glucose oxydase (GOD) illustre les différentes possibilités que l'on peut envisager quant au type de capteur électrochimique :



En effet, la mesure du glucose peut être effectuée en détectant soit la consommation d'oxygène (électrode à pO_2 ou électrode de Clark), soit l'apparition d'acide gluconique (électrode de pH), soit l'apparition du peroxyde d'hydrogène (électrode métallique). En pratique, seules les mesures ampérométriques de la consommation de l'oxygène dissous ou du peroxyde d'hydrogène apparu sont utilisées.

Les principaux problèmes liés à l'utilisation des capteurs électrochimiques concernent la compatibilité de fonctionnement de l'enzyme et du capteur électrochimique en ce qui concerne le pH (cas du dosage de l'urée) ainsi que les interférences électrochimiques. Dans les faits, seuls les problèmes liés aux interférences électrochimiques peuvent être contournés et ceci explique que la plupart des électrodes à enzyme décrites sont basées sur l'utilisation d'une oxydase spécifique associée à une détection ampérométrique de O_2 ou H_2O_2 .

Le transistor à effet de champ (FET) en tant qu'élément transducteur d'un biocapteur a été utilisé plus tardivement que le capteur électrochimique. Sont principalement employés les ISFETs (ion selective field effect transistors) sensibles au pH permettant de détecter, au cours d'une réaction enzymatique, l'apparition ou la disparition d'une espèce présentant un caractère acide ou basique (ex : hydrolyse de la pénicilline par la pénicillinase et hydrolyse de l'urée par l'uréase). D'une part, ces transducteurs ont pour avantage leur faible coût, dû à une production de masse pour les besoins de la microélectronique, et d'autre part, permettent la réalisation de biocapteurs miniaturisés. En revanche, l'immobilisation de biorécepteurs sur de très petites surfaces ne semble pas encore complètement maîtrisée et des problèmes notamment d'étanchéité entre la phase, nécessairement liquide, contenant l'échantillon et le transducteur demeurent.

Les thermistors à enzyme exploitent le fait que toute réaction enzymatique s'accompagne d'une variation d'enthalpie (ΔH) qui peut être détectée par des thermistances ou des thermocouples. On ne peut en fait qu'effectuer une mesure globale de la variation du système (réaction enzymatique + réactions chimiques entre les différentes espèces présentes dans le milieu réactionnel) et pas seulement de la réaction enzymatique d'où le manque de sélectivité de ce type de capteur. Une solution consiste à effectuer en parallèle des mesures en l'absence d'enzyme. Le plus souvent, ces mesures manquent de sensibilité car la variation d'enthalpie est généralement très faible. Pour y remédier on peut avoir recours à une amplification chimique en utilisant un tampon dont la réaction avec un produit de la réaction enzymatique s'accompagne d'une forte variation d'enthalpie (ex : ΔH de protonation du

Tris = -47,5 Kj/mol). L'amplification enzymatique est obtenue en co-immobilisant un enzyme qui fonctionne en séquence avec la réaction enzymatique spécifique (ex : oxydase + catalase; $\Delta H_{\text{catalase}} = -100$ Kj/mol).

La détection massive par l'intermédiaire d'un *cristal piézo-électrique* est fondée sur le principe selon lequel la fréquence propre de vibration d'un cristal oscillant dépend de la masse de substance adsorbée à sa surface. Sous certaines conditions bien définies, la variation de la fréquence de résonance du cristal est directement proportionnelle à la quantité de matière présente sur sa surface. Les applications ont été principalement développées pour des réactions immunologiques et pour la détection spécifique de substances volatiles.

Les biocapteurs à fibres optiques sont d'un développement plus récent. Leur principe est fondé sur des mesures d'absorbance/réfléctance, de fluorescence ou de bio- et chimiluminescence. Un biocapteur à fibres optiques résulte de l'association d'une phase réactive incorporant un élément biologique immobilisé et d'un système de transduction composé d'une fibre optique ou d'un faisceau de fibres optiques couplé à un détecteur de lumière.

Les fibres optiques sont des guides de lumière dont le fonctionnement repose sur le principe de la réflexion totale interne. Elles se composent d'un cœur cylindrique et d'un enrobage ou gaine optique dont l'indice de réfraction est inférieur à celui du cœur. A l'interface cœur/gaine optique, les conditions de réflexion totale interne ne sont pas parfaites et font apparaître le phénomène d'ondes évanescentes. Ces ondes se propagent parallèlement à l'interface cœur/gaine et peuvent être exploitées pour exciter un fluorophore immobilisé à la surface du cœur (Figure 2). Avec ce type de configuration, principalement exploité pour le développement d'immunocapteurs, on parle de *biocapteurs intrinsèques* à fibres optiques.

Dans les *biocapteurs extrinsèques*, la fibre optique n'est utilisée que pour conduire la lumière entre la phase réactive et le détecteur ainsi qu'entre une source lumineuse et la phase réactive pour les mesures de fluorescence ou d'absorbance (Figure 3). Parmi les biocapteurs extrinsèques on peut distinguer principalement trois catégories : les biocapteurs enzymatiques, les biocapteurs à biorécepteurs non catalytiques et les biocapteurs à détection de bio- ou

chimiluminescence. Les biocapteurs enzymatiques font intervenir une réaction enzymatique dont l'un des substrats ou produits est détecté soit directement s'il possède des propriétés optiques (fluorescence ou absorbance; ex : NADH) soit indirectement par un capteur chimique à fibres optiques (pH, O₂, NH₃) s'il ne présente aucune propriété optiquement mesurable. Les biocapteurs à biorécepteur non catalytique font intervenir une réaction antigène-anticorps ou une réaction lectine-sucre. Enfin dans les biocapteurs à détection de bioluminescence ou de chimiluminescence, un enzyme catalysant une réaction d'émission de lumière est immobilisé à l'une des extrémités de la fibre ou du faisceau de fibres.

UTILISATION POTENTIELLE DES BIOCAPTEURS

Trois domaines sont particulièrement concernés : les biotechnologies industrielles, le génie biologique et médical et l'environnement. Il faut souligner que le cahier des charges d'un biocapteur sera très différent selon le secteur d'application même si le concept de base et la substance à doser sont les mêmes. Par exemple, pour la mesure du glucose avec une électrode enzymatique, les problèmes se poseront en termes différents selon que l'échantillon est du sang ou une mélasse.

En conclusion, la demande en capteurs fiables et sélectifs reste très importante. Le peu de réalisations commerciales existantes à ce jour en comparaison du nombre de publications parus dans ce domaine n'a pas diminué l'attrait existant pour les biocapteurs. En effet, la possibilité de suivre en temps réel l'évolution de la concentration ou de l'activité d'un composé est l'un des principaux avantages qui rend l'usage des biocapteurs extrêmement attractif par rapport aux méthodes classiques d'analyses.

Bibliographie

Loïc J. Blum and Pierre R. Coulet. *Biosensor Principles and Applications*. Marcel Dekker, New York, 1991.

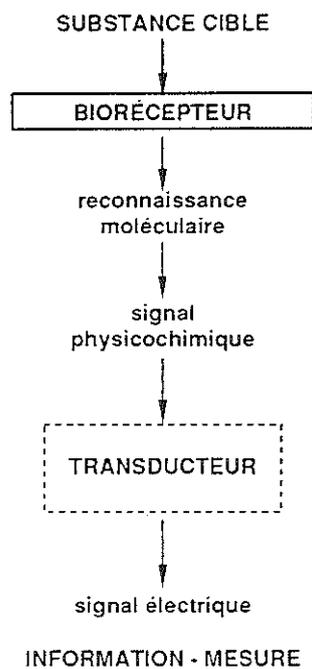


Figure 1. Principe d'un biocapteur

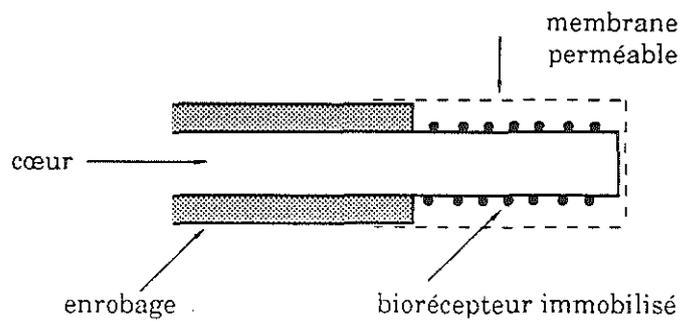


Figure 2. Configuration d'un biocapteur intrinsèque à fibre optique utilisant le phénomène d'onde évanescente pour le suivi de réactions immunologiques.

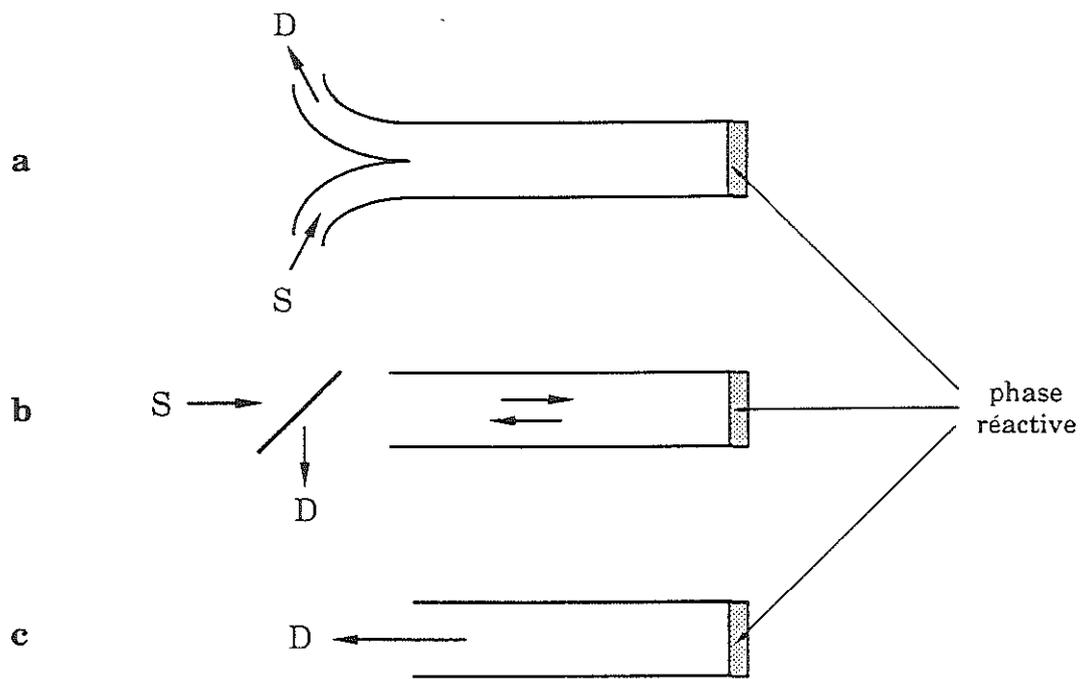


Figure 3. Différentes configurations d'un biocapteur extrinsèque à fibres optiques. D, détecteur; S, source lumineuse. Mesures d'absorbance ou de fluorescence : (a) faisceau de fibres bifurquées; (b) la même fibre conduit la lumière de la source à la phase réactive et de cette dernière au détecteur, un séparateur orientant la lumière émergente vers le détecteur; Mesures de bioluminescence ou de chimiluminescence : (c) la lumière émise directement par la phase réactive est conduite au détecteur par la fibre ou le faisceau de fibres.

T H E M E IX

MICROORGANISMES RECOMBINES

LA SURVIE DES ENTEROBACTERIES EN MER

G.N. FLATAU, CLEMENT R.L., GAUTHIER M.J.
I.N.S.E.R.M., U. 303, 1 av. Jean Lorrain, 06300 NICE, FRANCE.

Les entérobactéries

Les entérobactéries sont une vaste famille de bactéries. La plupart des espèces qui la composent sont des hôtes normaux ou pathogènes du tube digestif de l'homme et des animaux. Ces germes sont définis par des caractères bactériologiques plutôt qu'écologiques. Les entérobactéries sont des bacilles à **Gram négatif, mobiles ou immobiles, aérobies-anaérobies facultatifs, se développant jusqu'à 44°C, réduisant les nitrates en nitrites, possédant une catalase mais pas d'oxydase et fermentant les hydrates de carbone** (bactéries omnivores). La famille des entérobactéries regroupe les genres *Escherichia*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Yersinia*, *Edwardsiella*.

Les *Escherichieae* sont largement distribués dans le monde. On les trouve dans les sols, l'eau, les légumes, les grains, les plantes à fleurs, les arbres et dans les animaux depuis les insectes jusqu'aux hommes. De nombreuses espèces ont une importance économique importante puisque certaines d'entre elles peuvent provoquer la rouille, et la pourriture des racines du blé, de la pomme de terre, de l'ananas, détruisant ainsi une forte proportion de la récolte.

L'industrie des poissons tropicaux est parfois affectée par des maladies causées par la présence de *Yersinia ruckeri* et des espèces d'*Edwardsiella*.

Salmonella typhimurium, germe ubiquiste est la cause fréquente d'infection chez l'homme et les animaux. Elle est l'agent le plus fréquent d'empoisonnement par la nourriture chez l'homme. *E. coli* elle-même comme *Yersinia enterocolita* provoque des diarrhées graves chez les enfants et les adultes dans de nombreux pays. *Klebsiella pneumoniae* a été isolée chez des patients atteints de maladies tropicales. Certaines souches d'*Enterobacter* sont capables de produire des entérotoxines.

Les *Enterobacteriacés*, peuvent provoquer des infections extra intestinales chez des sujets affaiblis (malnutrition, diabète, immunosuppression, brûlure, cancer, âge...). Ces infections (méningites néonatales, infection des voies urinaires, septicémie) sont souvent

associées à la présence de *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia* et *Serratia marcescens*.

Shigella est responsable de la dysenterie bacillaire.

Salmonella est responsable de fièvres, entérites, et septicémie.

Citrobacter est non pathogène mais peut l'être en milieu clinique: on la retrouve dans l'urine, les crachats au cours d'otites, méningites, bactériémies, plaies, abcès. Elle semble être un pathogène opportuniste.

Klebsiella peut être trouvée dans l'intestin mais en petit nombre par rapport à *E. coli*. Elle est responsable d'infection des voies urinaires et respiratoires.

Les entérobactéries, bien que généralement non pathogènes peuvent donc provoquer des maladies. Il existe donc un risque et leur dissémination dans l'environnement est à éviter (Buchanan et Gibbons, 1974).

La survie en mer des entérobactéries : le concept ancien

Les résultats des premiers travaux, qui datent du début de ce siècle, ont montré que la disparition des bactéries était plus rapide qu'une simple dilution des germes dans l'eau. De nombreux facteurs ont été évoqués, notamment la salinité élevée, le potentiel rédox, le pH, l'irradiation solaire qui participent à la destruction des germes provenant de la terre. Les teneurs bactériennes diminuent de 90% après 1 à 2 heures de contact avec l'eau de mer en plein soleil. Cet ensemble de facteurs a été appelé le "**pouvoir autoépurateur**" de la mer. Sur ces bases, le rejet à la mer pouvait donc être réalisé sans créer de nuisances.

Le concept nouveau de survie en mer

La survie en mer des bactéries était analysée en terme de possibilités nutritionnelles, l'évolution des cellules étant supposée dépendre essentiellement de la présence de matière organique assimilable dans le milieu. En fait, les bactéries qui pénètrent dans la mer subissent de profondes modifications structurales et métaboliques. Elles évoluent vers un état de **dormance** qui entraîne leur **incapacité à se développer** sur les milieux de cultures classiquement utilisés pour leur dénombrement et leur identification. Cet état de stress est particulièrement important pour les bactéries entériques et il est probablement aggravé par la présence de détergents, de métaux lourds, d'hydrocarbures, de pesticides, présents dans les rejets urbains. L'apparition de techniques nouvelles comme la numération directe dans les échantillons naturels par épifluorescence ou immunofluorescence a

permis la mise au point du comptage direct des cellules vivantes. L'utilisation de ces méthodes a permis de montrer que la mortalité des bactéries entériques en mer n'était qu'apparente (Xu et coll., 1982; Roszak et coll., 1984; Colwell et coll., 1985; Rollins et Colwell, 1986). **Les bactéries entériques demeurent vivantes pendant de longues périodes (plusieurs dizaines de jours) mais perdent en quelques jours leur capacité à se multiplier dans un milieu nutritif solide ou liquide.** Le passage à l'état non cultivable est toutefois progressif et il est possible de "ressusciter" une partie des cellules en rajoutant de la matière organique au milieu à condition que le temps de contact avec l'eau de mer n'ait pas été trop long (Roszak et coll., 1984). Cependant, ces germes pourraient conserver leur éventuelle virulence une fois réinjectés dans l'animal. Cet état de dormance n'est donc bien qu'une étape transitoire de maintien dans l'attente de conditions plus favorables.

Les mécanismes probables de la survie en milieu hyperosmotique

Lorsque les bactéries entériques pénètrent dans l'eau de mer via les rivières, égouts, canalisations,... elles subissent généralement un choc thermique, nutritionnel (l'eau de mer est pauvre en éléments nutritifs) et hyperosmotique dû à la plus forte salinité du milieu marin.

Les cellules bactériennes entretiennent une pression interne élevée, **la pression de turgescence**, (entre 3 et 5 bars chez *E. coli*). Leur contact avec le milieu marin salé (environ 30 g/l) provoque une chute de cette pression au-dessous d'un seuil qui n'est plus compatible avec le métabolisme, donc avec le développement. La première réaction des cellules est donc le rétablissement de celle-ci par l'absorption de potassium, cation monovalent majoritaire dans les cellules (Epstein, 1986). La concentration intracellulaire de K^+ est proportionnelle à la concentration extracellulaire pour un bon nombre d'espèces bactériennes (Christian, 1955; Clark et Parker, 1984; Epstein et Schultz, 1965). Cette concentration massive de potassium induit la synthèse et l'accumulation de glutamate qui est le contre-ion du potassium et qui permet de réduire la charge ionique intracellulaire. D'autre part, le glutamate complète l'action osmoprotectrice du potassium. Mais le glutamate a également le rôle d'inducteur pour un certain nombre de mécanismes postérieurs. La présence de glutamate de potassium induit des mécanismes de synthèses et d'accumulations de molécules organiques jouant un rôle plus ou moins important dans les phénomènes d'osmorégulation : **les osmolytes compatibles**. Chez bon nombre de

bactéries le choc hyperosmotique induit l'accumulation ou la synthèse de γ -aminobutyrate mais uniquement dans certains milieux de culture. Par contre, le **tréhalose** est biosynthétisé jusqu'à 200 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines (Flatau et coll., 1991, données non publiées) et jusqu'à 20 % de la concentration osmolaire en soluté dans le milieu de culture (Larsen et coll., 1987). Cette synthèse n'est possible qu'à forte osmolarité car la tréhalose-6 phosphate synthase n'est activée que dans ces conditions. L'accumulation de proline, dont le glutamate est le précurseur immédiat (Csonka, 1988), a été également observée chez les bactéries cultivées à forte osmolarité. De nombreux travaux suggèrent que la synthèse ou la dégradation de la proline est contrôlée par la force osmotique. Un autre osmolyte d'importance est la **glycine bêtaïne** (N,N,N, triméthyl-glycine) qui est un osmoprotecteur très efficace pour les membres de la famille des *Enterobactéries* (LeRudulier et Bouillard, 1983). Les teneurs en glycine bêtaïne sont proportionnelles à l'osmolarité du milieu environnant (Perroud et LeRudulier, 1985). Le rôle de l'accumulation d'osmolytes compatibles, quels qu'ils soient, est d'éliminer le potassium intracellulaire en excès tout en maintenant la pression de turgescence au niveau initial.

L'environnement marin et ses conséquences sur la survie d'*Escherichia coli* en mer.

Les résultats décrits proviennent pour une grande majorité, d'expérimentations effectuées en milieux nutritifs, donc dans lesquels les bactéries peuvent trouver tous les éléments nécessaires à la mise en place des mécanismes pour leur adaptation et leur croissance à forte osmolarité.

Or l'eau de mer est pauvre en matière organique, et la question à résoudre est de savoir si les bactéries sont effectivement capables de s'adapter à la forte salinité de l'eau de mer. De récents travaux ont montré qu'*Escherichia coli* résiste mal à l'eau de mer, même contenant de la glycine bêtaïne, osmoprotecteur puissant. Dans ces conditions, les cellules n'accumulent que de très faibles quantités de bêtaïnes car l'expression des gènes codant pour le transport de la bêtaïne est réprimée par l'état de jeûne des cellules. Par contre, si les cellules sont en contact avec des sédiments contenant de fortes proportions de matière organique, alors les teneurs intracellulaires en bêtaïnes sont beaucoup plus fortes et la survie plus importante (Gauthier et coll., 1991). Ces résultats suggèrent que les cellules ont besoin de substances nutritives en plus des substances osmoprotectrices pour pouvoir surpasser le choc osmotique et rétablir leur métabolisme. Les

sédiments contiennent plus de matière organique que l'eau elle-même, servant ainsi de sources de carbone et d'azote mais aussi comme source d'osmoprotecteurs. De nombreux organismes marins sont capables de synthétiser un grand nombre de substances dont le pouvoir osmoprotecteur a été établi. Des bactéries, (*Ectothiorhodospira halochloris*), des cyanophycées (*Aphanotece halophytica*), des algues, (*Porphyra tenera*, *Codium fragile*), des mollusques (*Mytilus edulis*), des échinodermes (*Cucumaria punctata*), des arthropodes (*Uca pugnax*) et des poissons (*Gadus morhua*) sont capables de synthétiser la glycine bêtaïne ou des amines quaternaires jouant un rôle important dans l'osmoprotection (King, 1988). Ces substances se retrouvent donc ensuite adsorbées dans les sédiments, comme toutes les molécules qui sont véhiculées par la mer. Effectivement, des teneurs entre 0,01 et 84 $\mu\text{mol/g}$ de glycine bêtaïne et de triméthylamine ont été mesurées dans des sédiments marins (King, 1988). Ainsi, les sédiments peuvent être un lieu privilégié pour la reviviscence des bactéries entériques, puisqu'elles sont capables d'en absorber des éléments nutritifs mais aussi la glycine bêtaïne nécessaire à leur osmoprotection (Ghoul et coll., 1990). Des études menées dans notre laboratoire ont montré que certaines souches de phytoplancton marin secrètent également des substances comportant des groupes onium (N^{IV} , P^{IV} , As^{IV} , S^{III}). Si elles n'ont pas d'effet significatif sur la résistance immédiate de certaines souches d'entérobactéries à l'eau de mer (quantifiée par la mesure de la quantité minimale de sel inhibitrice de la croissance) quelques unes d'entre elles favorisent et parfois dans de fortes proportions la survie d'*Escherichia coli* en eau de mer lorsque les cellules ont été précultivées en présence d'extraits de plancton ou de végétaux marins (Flatau et coll., 1991, résultats non publiés). Ces résultats suggèrent donc une possibilité de survie prolongée dans les eaux eutrophisées à forte production phytoplanctonique.

Conclusions

Les méthodes nouvelles de dénombrement ont formellement établi que les bactéries entériques ne sont pas forcément détruites lorsqu'elles pénètrent dans le milieu marin. Elles passent plutôt de l'état viable et cultivable, donc dénombrables par les techniques classiques, à l'état viable mais non cultivable ou état de dormance. La dispersion de germes éventuellement pathogène dans le milieu marin est donc dangereuse dans la mesure où l'eau de mer est utilisée à des fins récréatives, médicales ou piscicoles. Au moment de leur pénétration dans l'eau de mer, ces bactéries subissent un choc hyperosmotique qui

inhibe probablement le métabolisme. Afin de le rétablir, les cellules doivent mettre en place divers mécanismes assurant la correction de leur pression de turgescence en activant des mécanismes de synthèse et d'accumulation d'osmolytes compatibles. Si l'eau de mer, pauvre en matière organique, n'assure pas une survie des entérobactéries en mer, le sédiment, riche en éléments organiques peut la favoriser s'il contient des éléments nutritifs et des éléments assurant l'osmoprotection des germes. Les eaux côtières eutrophisées pourraient jouer un rôle analogue.

Bibliographie

- Buchanan, R.E. et Gibbons, N.E. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8^{ème} ed. Cowan, S.T., Holt, J.G., Liston, J., Murray, R.G.E., Niven, C.F., Ravin, A.W. et Stanier, R.Y., eds. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Christian, J.H.B. 1955. The influence of nutrition on the water relations of *Salmonella oranienburg*. *Aust. J. Biol. Sci.* **8**, 75-82.
- Clark, D. et Parker, J. 1984. Proteins induced by high osmotic pressure in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**, 81-83.
- Colwell, R.R., Brayton, P.R., Grimes, D.J., Roszak, D.B., Huq, S.A. et Palmer, L.M. 1985. Viable but non culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implication for release of genetically engineered microorganisms. *Biotechnology.* **3**, 817-820.
- Csonka, L.N. 1988. Regulation of cytoplasmic proline levels in *Salmonella typhimurium*: effect of osmotic stress on synthesis, degradation and cellular retention of proline. *J. Bacteriol.* **170**, 2374-2378.
- Epstein, W. 1986. Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **39**, 73-78.
- Epstein, W. et Schulte, S.G. 1965. Cation transport in *Escherichia coli* : V. Regulation of cation content. *J. Gen. Physiol.* **49**, 221-234.
- Gauthier, M.J., Flatau, G.N. et Breittmayer, V.A. 1991. Protective effect of glycine betaine on survival of *Escherichia coli* cells in marine environments. *Wat. Sci. Tech.* **24**, 129-132.
- Ghoul, M., Bernard, T. et Cormier, M. 1990. Evidence that *Escherichia coli* accumulates glycine betaine from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 551-554.
- King, G.M. 1988. Distribution and metabolism of quaternary amines in marine sediments. Dans : Nitrogen cycling in coastal marine environments. Blackburn, T.H. et Sorensen, J. eds., Wiley, J. & sons Ltd. pp143-176.

- Larsen, P.I., Sydnes, L.K., Landfald, D. et Strom, A.R. 1987. Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes : betaines, glutamic acid and trehalose. Arch. Microbiol. **147**, 1-7.
- LeRudulier, D. et Bouillard, L. 1983. Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the *Enterobacteriaceae*. Appl. Environ. Microbiol. **46**, 152-159.
- Perroud, B et LeRudulier, D. 1985. Glycine betaine transport in *Escherichia coli* : osmotic modulation. J. Bacteriol. **161**, 393-401.
- Rollins, D.M. et Colwell, R.R. 1986. Viable but non culturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. Appl. Environ. Microbiol. **52**, 531-538.
- Roszak, D.B., Grimes, D.J. et Colwell, R.R. 1984. Viable but non recoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. Can. J. Microbiol. **30**, 334-338.
- Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J. et Colwell, R.R. 1982. Survival and viability of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. Microbiol. Ecol. **8**, 313-323.

Figures

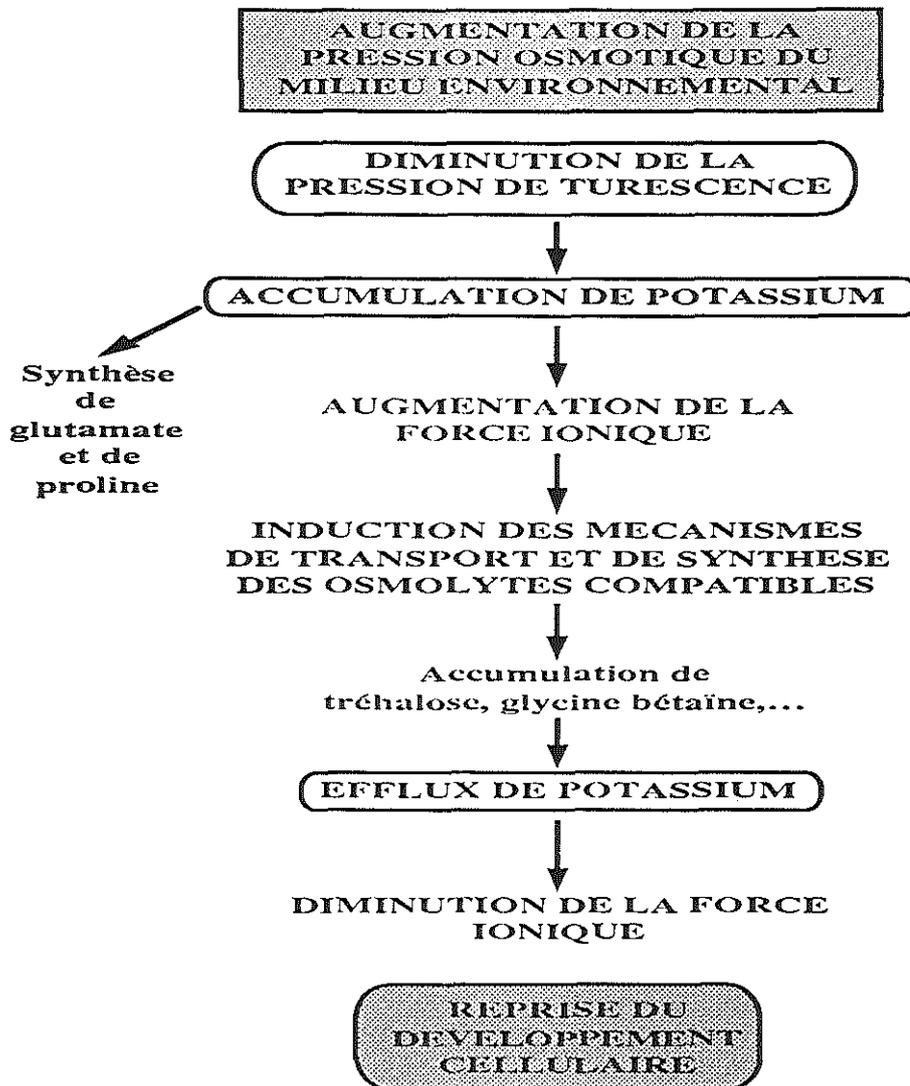


Fig. 1 : Mécanismes d'osmorégulation (d'après Booth et coll., 1988).

T H E M E X

LEGISLATION ET PROPRIETE INDUSTRIELLE

DROIT ET BIOTECHNOLOGIES MARINES

ENCADREMENT ACTUEL ET EVOLUTIONS PROBABLES

CHRISTINE NOIVILLE

Bien qu'entamée récemment, la transformation du droit dans le but d'y intégrer les biotechnologies avance à grands pas.

Jusqu'ici, le travail juridique a été peu réalisé en fonction des organismes, de l'espèce à laquelle ils appartiennent, du milieu dans lequel ils vivent. C'est normal car la règle juridique est générale; elle sera précisée au fur et à mesure de l'apparition des spécificités. Pour l'instant, donc, à tort ou à raison, les textes juridiques ne distinguent pas entre biotechnologies appliquées au milieu marin ou à d'autres milieux.

C'est plutôt par branches du droit, en fonction des problèmes juridiques posés, qu'a été divisé ce travail. Pour l'heure, il s'est essentiellement limité à deux questions: celle de la sécurité relative aux recherches et productions biotechnologiques et celle de la protection juridique des innovations en découlant.

Alors que le problème des disséminations vient d'être juridiquement encadré (I), le choix du système de protection des inventions n'a pas encore été définitivement effectué par le législateur et ce sont principalement les décisions des juges et de l'administration qui nous fournissent quelques lignes directrices (II).

I-DES BIOTECHNOLOGIES EN LABORATOIRE AUX EXPERIMENTATIONS EN MILIEU NATUREL POUR ABOUTIR A LA MISE SUR LE MARCHÉ: UNE REGLEMENTATION RECENTE CONTRAIGNANTE.

* Deux directives ont été adoptées à Bruxelles le 23 avril 1990, réglementant respectivement:

- l'utilisation confinée de microorganismes génétiquement modifiés (MGM),
- la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés (OGM) dans l'environnement, soit à titre expérimental, soit pour la mise sur le marché.

Ces directives visent, par le contrôle des disséminations accidentelles ou délibérées, à réduire les risques potentiels qui y sont liés.

* Leur légitimité peut être contestée:

les risques de bouleversement des écosystèmes et d'atteinte à la diversité biologique ne sont pas l'appanage des activités biotechnologiques. Les introductions et transferts d'espèces en milieu marin en sont un exemple.

le génie génétique serait générateur de risques beaucoup moins grands que certaines activités du génie humain (nucléaire...).

En réalité, le fondement de cette réglementation est double:

l'harmonisation des législations et procédures en Europe, pour mettre fin aux distortions de concurrence, et parce que, une fois disséminés, les OGM ne connaissent pas les frontières,

l'organisation naissante d'une sorte de "veille biologique" destinée à protéger au mieux notre environnement;

*** En France, ces deux directives européennes interviennent dans un terrain très souplesment encadré.**

- absence de loi générale sur le génie génétique,
- encadrement peu contraignant constitué à la fois par des normes d'application volontaire mises en place par les acteurs économiques, et par un ensemble de lois se caractérisant par la souplesse.
- au stade de la recherche en laboratoire:
 - . observation volontaire des normes relatives au confinement, à la construction génétique...
 - . saisine facultative de la Commission du génie génétique, pour tout conseil relatif au classement des organismes, aux conditions de confinement à respecter en fonction de ce classement...
- au stade de la recherche expérimentale:
 - . observation volontaire des normes relatives à la dissémination (en cours d'élaboration pour les animaux),
 - . saisine facultative (devenue obligatoire si la dissémination expérimentale est suivie d'une demande de mise sur le marché) de la Commission du génie biomoléculaire, pour obtenir un avis sur le projet de relargage.
- au stade de la production:
 - application de la loi sur les installations classées (loi du 19 juillet 1976) qui prévoit une autorisation préfectorale et une enquête publique pour toute activité de production de MGM.

*** Les mécanismes mis en oeuvre par les deux directives européennes.**

- conception particulariste des activités biotechnologiques,
 - contrôle accru de ces activités, fin de l'autosurveillance,
 - information interétatique sur l'existence des risques associés aux biotechnologies au niveau communautaire.
-
- Pour limiter les disséminations accidentelles: mise en place d'un contrôle des utilisations confinées.
 - .le texte ne vise que les MGM,
 - .le risque lié à ceux-ci varie en fonction de l'association de trois critères:
 - le MGM est pathogène ou ne l'est pas,
 - il s'agit ou non d'une première utilisation,
 - cette utilisation a ou non un caractère industriel.
 - .selon le risque présumé, le contrôle varie:
 - simple tenue d'un registre,
 - déclaration à une autorité nationale compétente,
 - demande d'autorisation à cette même autorité.
-
- Pour éviter toute dissémination volontaire dommageable pour l'environnement: institution d'un système d'autorisations obligatoires.
 - .Ce système vise tout OGM mais diffère selon que la dissémination a un but expérimental ou qu'il s'agit d'une mise sur le marché.
 - .Pour tout projet de dissémination "recherche":
 - demande d'autorisation obligatoire à une autorité nationale chargée de rendre un avis au vu d'une étude d'impact réalisée par le scientifique,
 - avis rendu par cette autorité dans un délai moyen de 90 jours, après information des 11 autres pays membres de la CEE, aptes à formuler des observations à titre purement consultatif.

.Pour tout projet de mise sur le marché:

autorisation également obligatoire mais ici,
l'autorité nationale ne prend de décision qu'avec
l'accord de l'ensemble des pays membres;

en cas d'objection motivée soulevée par l'un ou
plusieurs de ces pays, une procédure lourde et
longue se met en place, toujours tranchée, in fine,
par les instances communautaires;

délai moyen: entre 5 mois et un an.

*** La France doit intégrer ces directives au droit interne avant fin Octobre 1991. Quelles incidences pour les biotechnologues?**

On ne sait pas encore quelle sera l'autorité nationale compétente mais dorénavant et déjà, on peut penser que les modifications suivantes interviendront:

- Pour la recherche en laboratoire:
 - . diminution du pouvoir d'appréciation personnelle des biotechnologues,
 - . saisine de l'autorité presque toujours obligatoire pour classement des opérations de recherche portant sur des MGM,
 - . institution de la CGG comme expert auprès de l'autorité nationale,
 - . observation volontaire des normes concernant la recherche sur les animaux et végétaux.

- Pour les disséminations expérimentales et la mise sur le marché:
 - . saisine de l'autorité toujours obligatoire avant une dissémination d'OGM à titre expérimental (pas pour les produits en découlant et pour lesquels une évaluation des risques pour l'environnement et la santé est déjà prévue).
 - . institution de la CGB comme expert auprès de l'autorité nationale,
 - . appréciation par la CGB inchangée sur certains points (autorisations délivrées au cas par cas, réalisation des expériences par étapes...), largement modifiée sur d'autres (compétence liée à l'accord des autres pays; ingérence systématique des instances communautaires dans la recherche nationale; critique la plus souvent formulée: plus de confidentialité des projets de recherche).

Cette dernière critique est inopportune dans la mesure où:

- . la confidentialité des informations est prévue par la directive,
- . la protection juridique de l'innovation est généralement obtenue avant la demande de dissémination.

II-LA PROTECTION DES INVENTIONS BIOTECHNOLOGIQUES: UN CHOIX EFFECTUE EN PASSE D'ETRE RATIFIE.

Pour des raisons économiques évidentes, une protection juridique optimale doit être conférée aux innovateurs. Ceci n'est contesté par personne.

Mais quelle protection? C'est cette question qui est la source d'un vaste débat, avec, comme enjeu, l'incitation à l'innovation et même, pour certains, la conservation de la diversité biologique.

En Europe, la tendance est à ne pas refuser de protection à une invention sous prétexte qu'elle porte sur la matière vivante.

C'est la jurisprudence de l'Office européen des brevets qui mérite d'être analysée, et ce à un double titre. D'abord parce que c'est l'OEB qui applique la Convention sur le brevet européen (Convention de Munich du 5 octobre 1973), ratifiée par la France et s'imposant donc au juge national; mais aussi parce que c'est sur la jurisprudence de cet Office que se fonde la CEE pour établir les grands principes de la future directive communautaire relative à la protection des innovations biotechnologiques, qui imposera aux pays membres de la communauté une interprétation commune de la CBE.

La tendance de l'OEB est à admettre la brevetabilité de la matière vivante dans son ensemble.

* Pour ce qui concerne les microorganismes, leur brevetabilité s'est intégrée dans l'indifférence au droit commun du brevet et est aujourd'hui parfaitement acquise.

- un microorganisme (MO) non manipulé mais seulement isolé du milieu naturel est brevetable; il y a là, d'après le juge, une intervention humaine qui dépasse le stade de la simple découverte,
- la sélection d'un microorganisme naturel présentant des qualités particulières, parmi une population entière de la même espèce, constitue un procédé microbiologique brevetable,
- l'utilisation d'un microorganisme dans un procédé industriel est brevetable,
- une méthode de production d'un nouveau MO, ou de réduction de la pathogénéicité d'un MO est brevetable,
- un microorganisme modifié génétiquement est brevetable.

Ainsi, de la collecte du microorganisme dans les fonds marins à la substance qu'il produit, en passant par la purification, et l'élaboration du procédé de production, chaque étape biotechnologique peut être protégée par un brevet d'invention, pourvu que soient remplies les conditions de nouveauté, activité inventive, applicabilité industrielle.

* Contrairement aux microorganismes, la brevetabilité des variétés végétales et des races animales est en partie exclue par la CBE mais l'OEB, par son interprétation, réduit le champ de cette exclusion.

- Article 53b) de la CBE: "il ne sera pas accordé de brevets européens pour:

. les variétés végétales ou les races animales,

. les procédés essentiellement biologiques d'obtention de végétaux ou d'animaux, cette disposition ne s'appliquant pas aux procédés microbiologiques et aux produits obtenus par ces procédés".

- Interprétation de cet article par l'OEB:

. les procédés d'obtention d'animaux ou de végétaux seront brevetables dès lors qu'ils ne sont pas essentiellement biologiques. Il suffit pour cela que le procédé inclue une seule étape microbiologique, pourvu que cette étape ait un caractère déterminant dans le succès de la méthode.

-> Constituent des procédés brevetables: la FIV, le clonage, la transgénèse...

. Les certitudes ne sont pas aussi grandes en ce qui concerne les produits:

seules sont exclues de la brevetabilité les variétés végétales susceptibles d'être protégées par un titre spécifique, le certificat d'obtention végétale, c'est à dire les variétés distinctes, homogènes et stables. Dès lors, toute plante manipulée génétiquement pourra être brevetée si l'un de ces trois caractères fait défaut;

seules seraient exclues de la brevetabilité les races animales (sachant qu'on ne sait plus bien ce qu'est une race); l'exclusion ne vise donc pas les animaux en tant que tels, notamment les espèces animales

-> sont déjà brevetables:

. le matériel animal infracellulaire(ex: gènes),

. les parties d'animaux non susceptibles de donner un animal(ex: cellules, lignées cellulaires...).

tout animal ne constituant pas une race.

Les conditions de brevetabilité en principe similaires dans tous les domaines de la technique sont appréciées de manière souple en biotechnologie.

L'invention biotechnologique doit satisfaire aux exigences de nouveauté, d'activité inventive et d'applicabilité industrielle, comme dans les autres domaines de la technique.

Mais les exigences de l'OEB quant à la description de cette activité inventive et quant à l'étendue de la protection demandée sont particulières aux biotechnologies et favorisent largement l'inventeur.

*** Des modalités de description de l'invention biotechnologique dérogatoires au droit commun.**

-Pour les microorganismes et à terme pour les animaux, l'inventeur peut remplacer la description écrite par le dépôt des matériels biologiques:

.dépôt de tout microorganisme, cellule, lignée cellulaire, fragment d'ADN...dans une institution homologuée, au plus tard au moment de la demande brevet. Si l'invention consiste en un procédé utilisant un microorganisme ou en un microorganisme génétiquement modifié, le dépôt doit bien sûr être complété par une description du procédé utilisé.

.Le dépôt du microorganisme ne limite pas l'invention à ce seul individu, mais couvre aussi tous les individus semblables, les variants et les mutants.

-> la protection conférée par le brevet s'étend à tout équivalent du microorganisme déposé permettant de produire à coup sûr la même invention.

.Le dépôt constitue une protection contre les divulgations intempestives de la part des tiers:

possibilité pour l'inventeur, tant que le brevet n'est pas octroyé, de réserver l'accès de la culture déposée à un expert indépendant agréé par l'OEB, qui s'engage à n'utiliser la souche qu'à des fins expérimentales et à ne communiquer le résultat de ses investigations qu'aux tiers qui auront formé la demande d'accès au matériel.

-Du fait du caractère vivant des matières mises en oeuvre, la description de l'invention est appréciée sagement.

- * Une tendance de l'OEB à accepter des revendications floues, ce qui mène à l'octroi de brevets conférant une protection très large.

Les biotechnologues ont tendance à formuler de larges revendications pour étendre le champ de la protection qui leur sera conférée.

L'OEB considère que ce n'est que s'il existe des doutes sérieux, étayés par des faits vérifiables, que l'objection d'insuffisance de description peut être soulevée à l'encontre de ces revendications -> renversement de la charge de la preuve.

Conséquences de cette jurisprudence

*** Le brevet: un mode de protection qui n'est pas forcément adapté aux exigences de la recherche.**

-La recherche en biotechnologie est étroitement dépendante de l'accès aux ressources génétiques.

-Or lorsqu'un brevet protège une invention biotechnologique, son titulaire dispose d'un droit exclusif sur cette invention et le matériel génétique ayant permis sa réalisation.

Tout autre chercheur peut utiliser ce matériel (dans le cadre de l'"exemption de recherche"),

mais cette utilisation ne doit pas dépasser le cadre de la recherche; si, à partir de l'invention brevetée, un chercheur concurrent met au point une nouvelle invention présentant une ressemblance avec la première, il devra obtenir une autorisation d'exploitation, payer des redevances ou essuyer un refus.

*** Ces inconvénients risquent d'être aggravés par la jurisprudence de l'OEB.**

Le système du dépôt rend l'accès aux ressources génétiques très difficile et très risqué. Dans ces conditions, la portée de l'exemption de recherche se réduit.

L'octroi, par l'OEB, de brevets conférant une protection très large risque de multiplier les cas de ressemblance entre une invention brevetée et une invention non encore protégée. D'où une inflation probable des accords contractuels et des risques de refus d'exploitation.

Il faudrait prévoir, comme le proposent certains spécialistes et l'actuel projet de directive européenne, un système de "licences d'office" assurant une libre utilisation, moyennant paiement, des ressources génétiques.

Indépendamment des décisions de l'OEB, d'autres problèmes découlant de la brevetabilité des inventions biotechnologiques ne sont pas encore résolus. En matière d'inventions animales, quelles peuvent être, par exemple, les modalités d'application du "droit de suite" attaché au brevet et conférant à son détenteur un droit sur chaque reproduction de l'invention?

ANNEXE 1

LISTE DES PARTICIPANTS

LISTE DES PARTICIPANTS
AU COLLOQUE "BIOTECHNOLOGIES MARINES"

du 28 au 30 mai 1991

AIGLE Michel

Laboratoire de Génétique
Avenue des Facultés
33 405 TALENCE CEDEX
Tél : 56.80.68.00

BASSERES Anne

Société Nationale Elf Aquitaine
GRL
B.P. 34
64 170 L'ACQ

AMZIL Zouher

Faculté de Pharmacie
B.P. 1024
1 Rue G.Veil
44 037 NANTES CEDEX

BATREL Yves

CRITT Biotechnologie Rennes
9 Rue du Clos Courtel
35 700 RENNES

BAEHR Jean-Claude

Université de Poitiers
Laboratoire de Biologie animale
40 Avenue du Recteur Pineau
86 000 POITIERS

BELIN Jean-Marc

ENS. BANA
Laboratoire de biotechnologie
Campus Universitaire
21 000 DIJON
Tél : 80.39.66.70

BAILLY Chantal

IFREMER
Technopolis 40
155 Rue Jean-Jacques Rousseau
92 138 ISSY LES MOULINEAUX
Tél : 1.46.48.21.00

BENSLAMINE Fattah

9. Rue de Vancouver
44 300 NANTES

BANAIGS Bernard

Laboratoire de chimie marine
Université de Perpignan
66 860 PERPIGNAN CEDEX
Tél : 68.66.20.74

BENSOUSSAN Maurice

Université de Bourgogne
ENS - BANA
Centre Universitaire
21 000 DIJON
Tél : 80.39.66.71

BARBIER Georges

IFREMER
Centre de Brest
B.P. 70
29 280 PLOUZANE
Tél : 98.22.45.21

BERTRAND Jean-Claude

Centre d'Océanologie de Marseille
Faculté des Sciences de Luminy
Case 901
13 288 MARSEILLE CEDEX 9
Tél : 91.26.91.47

BAROUX Bruno

CEREMMER
B.P. 118
34 140 MEZE
Tél : 67.43.87.67

BLUM Loïc

Laboratoire de génie enzymatique
Atelier de Biotechnologie du CNRS
Université de Lyon 1
41 Bd du 11 Novembre 1918
69 822 VILLEURBANNE CEDEX
Tél : 72.44.82.62

BOCHE Florent
3 Rue des Oeillets
64 600 ANGLET

BOURMAUD Anne Marie
INRA Domaine de Vivert
78 350 JOUY EN JOSAS
Tél : 36.65.25.87

BOURGUET Maryse
Laboratoire Chimie Muséum
Histoire Naturelle
75 PARIS

BRES DIN Fabienne
Laboratoire Océan Biotechnologie

Tél : 95.21.32.97

CAHU Chantal
IFREMER
Centre de Brest
B.P. 70
29 280 PLOUZANE

CAPRAIS Jean-Claude
IFREMER
Centre de Brest
B.P. 70
29 280 PLOUZANE

CHANTRAINE Jean-Marie
LUD - ORSTOM
4616 Rue du jeu de Mail des abbés
34 000 MONTPELLIER
Tél : 67.79.06.83

CHAUMONT Daniel
CEN Cadarache DPVE
13 108 ST PAUL LEZ DURANCE
Tél : 42.25.43.92

CHEVALIER Bertrand
Laboratoire GIC
Ecole Centrale
75 PARIS

CHEVELOT Lionel
Laboratoire de Biologie Marine
Faculté des Sciences
2 Rue des Sciences
44 072 NANTES CEDEX 03
Tél : 40.37.31.97

CHOURROUT Daniel
INRA
Laboratoire génétique des poissons
78 350 JOUY EN JOSAS

CLAIRE Corinne
68 Bd E.Orieux
44 000 NANTES

COMBAUT Georges
Université de Perpignan
66 860 PERPIGNAN CEDEX
Tél : 68.66.20.74

CORNER Laurence
IFREMER
Centre de Brest
B.P. 70
29 280 PLOUZANE

DANGLOT Claude
CRECEP
75 PARIS

DEBERNARD Jean-Jacques
Rhône Poulenc CRVA
13 Quai Jules Guesde
94 403 VITRY SUR SEINE CEDEX
Tél : (1) 45.73.81.62

DENIS Françoise
Université de Brest
Laboratoire Biologie Marine
29 287 BREST

DE ROECK Holtzhauer
CAEC
68 Bd E. Orieux
44 000 NANTES

DOMARD Alain
Laboratoire d'études de matériaux
plastiques et de biomatériaux
Université Lyon I
43 Bd du 11 Novembre 1918
69 622 VILLEURBANNE CEDEX
Tél : 72.44.85.87

DORANGE Germaine
Université de Brest
Laboratoire Biologie Marine
29 287 BREST

DUBACQ Jean-Paul
Laboratoire de Biomembranes
ENS
46 Rue d'Ulur
75 005 PARIS

DUPONT Christophe
Sté PRONATEC
62 Rue du Long Pot
59 800 LILLE
Tél : 20.47.71.72

DURAND Patrick
IFREMER
Centre de Nantes
B.P. 1049
44 037 NANTES CEDEX 01
Tél : 40.37.40.67

EMDADI Bori
Station Marine d'Endoume
Rue de la Batterie des Lions
13 007 MARSEILLE

FABRE Bernard
SYNTHELABO Pharmacie
Av. Gustave Eiffel
37 100 TOURS
Tél : 47.42.35.00

FARHI Gilles
CRITT Alimentaire
17 000 LA ROCHELLE

FLATAU Gilles
INSERM U303
1 Av. Jean Lorrain
06 300 NICE
Tél : 93.89.43.44

FLEURENCE Joël
CEVA
B.P. 3
22 610 PLEUBIAN
Tél : 96.22.93.50

FORET Maurice
Câteau de la Nitrière
Neuville s/Ain
01160 PONT D'AIN

FUCHS Jacques
IFREMER
Technopolis 40
155 Rue J.J. Rousseau
92 138 ISSY LES MOULINEAUX CEDEX

FRICKER Elisabeth
Mission interministérielle
de la mer
3 Place de Fontenay
75 007 PARIS

GALGANI François
IFREMER
Centre de Nantes
B.P. 1049
44 037 NANTES CEDEX
Tél : 40.37.40.00

GORRY Louis
Conseil Régional Poitou-Charentes
15 Rue de l'Ancienne Comédie
86 000 POITIERS

GOUYGOU Jean-Paul
IFREMER
Centre de Nantes
B.P. 1049
44 037 NANTES CEDEX 01

GROBOIS Jean-Luc
33, Contour de la Motte
B.P. 66A
35 031 RENNES CEDEX
Tél : 99.02.96.54

GRANDMONTAGNE Bernard
Sté ABER TECHNOLOGIE
29 PLOUGUERNEAU

GRIZEL Henri
IFREMER
B.P. 133
17 390 LA TREMBLADE
Tél : 46.36.30.07

GUERARD Fabienne
Laboratoire Biologie Marine
29 182 CONCARNEAU
Tél : 98.97.06.59

GUDIN Claude
CEN Cadarache DPVE
13 108 ST PAUL LEZ DURANGE
Tél : 42.25.43.66

GUINET Roland
Centre d'immunochimie microbienne
Institut Pasteur
Domaine du Poirier
69 210 LENTILLY
Tél : 74.01.80.55

GUINSBURGER VOGEL Thomas
Laboratoire de Biologie Marine
Université de Nantes
2 Rue de la Houssinière
44 072 NANTES CEDEX 03

GUYOT Michèle
Laboratoire Chimie
Muséum Histoire Naturel
75 PARIS

HAFFRAY Pierrick
SYSAAF SRA INRA
Nouzilly
37 380 MONNAIE
Té : 47.56.47.60

HAJJOU Mustapha
Laboratoire biologique marine
29 182 CONCARNEAU
Tél : 98.97.06.59

HAMON Valérie
Centre de Recherche Royallieu
Laboratoire de Technologie enzymatique
60 200 COMPIEGNE
Tél : 44.23.44.23

HAN CHING Luçay
IFREMER
Centre de Nantes
B.P. 1049

HELIS Leïla
CEN de Cadarache
DPVE/SECC
B.P 161
13 108 ST PAUL LEZ
Tél : 42.25.43.92

HENOCQUE Yves
IFREMER
Technopolis 40
155 Rue J.J. Rousseau
92 138 ISSY LES MOULINEAUX CEDEX
Tél : 46.48.21.86

JARMACHE Elie
IFREMER
155, Ruze J.J. Rousseau
92138 ISSY LES MOULINEAUX CEDEX
T&l : (1) 46 48 22 84

KLOAREG Bernard
CNRS Station Biologique de Roscoff
29 680 ROSCOFF
Tél : 98.29.28.24

KORNPROBST Jean-Michel
Faculté de Pharmacie
B.P.1024
1 Rue G.Vieil
44 035 NANTES CEDEX
Tél : 40.41.28.28

KRISTALLIDIS Antoine
Laboratoire CIC Ecole Centrale
92 295 CHAZENAY MALABRY CEDEX
Tél : 46.83.60.05

LACAILLE Michel
96, Montée Sandy Beach
CP 1070 GASPE
GOC,IRO
Canada

LAMY François
Centre de recherche de Royallieu
LTE
60206 COMPIEGNE CEDEX

LEBOUL Jean
Rhône Poulenc RORER
CRVA/IBV
BP 14
13, Quai Jules Guesdes
94403 VITRY SUR SEINE CEDEX

LEGAL Yves
Laboratoire Biologie marine
29 182 CONCARNEAU
Tél : 97.06.59

LEGOY Marie-Dominique
LTE, UTC
BP649
60206 COMPIEGNE CEDEX
Tél : 44234416

LE MAREC Françoise
Université de Brest
Laboratoire de Biologie Marine
29287 BREST

LE TUTOUR Bernard
IUT de St-Nazaire
Laboratoire de Génie des Procédés
BP420
44606 SAINT-NAZAIRE CEDEX

MABEAU Serge
CEVA
Presqu'île de Pen Lan
B.P.3
22 610 PLEUBIAN

MAESTRINI Serge
CREMA
Place du Séminaire
17 137 NIEUL/MER

MAILLARD Patrick
CEN Cadarache
13 108 ST PAUL LEZ
Tél : 42.25.48.27

MARCHAND Michel
IFREMER
Centre de Brest
B.P. 70
29 280 PLOUZANE
Tél : 98.22.45.25

MARCO Georges
ID MER
66 Bis rue F. Toulec
56 100 LORIENT
Tél : 97.83.86.83

MARHIC Alain
Laboratoire de Biologie Marine
Université de Brest
29 BREST

MARTIN Jean-Louis
FREMER
Technopolis 40
155 Rue J.J. Rousseau
92 138 ISSY LES MOULINEAUX

MARTY Pascale
Institut Océanographique Paul RICARD
Ile des Embiez
83 140 SIX FOURS LES PHARES

MASSOUD Zaher
IFREMER
Technopolis 40
155 Rue J.J. Rousseau
92 138 ISSY LES MOULINEAUX
Tél : 46.48.21.00

MAURICE Manuelle
IFREMER
Centre de Nantes
B.P. 1049
44 037 NANTES CEDEX
Tél : 40.37.40.77

MEYER Michèle
Laboratoire Chimie
Muséum Histoire Naturelle
75 PARIS

MIALHE Eric
IFREMER
B.P. 133
17390 LA TREMBLADE
Tél : 46 36 30 07

MILAS Michel
CERNAV CNRS
B.P. 53
38 041 GRENOBLE CEDEX
Tél : 76 54 11 45

MOAL Jeanne
IFREMER
Centre de Brest
BP 70
29280 PLOUZANE

MOREL Evelyne
Laboratoire Chimie
Muséum Histoire Naturelle
75 PARIS

MORAGA Dario
Université de Brest
Laboratoire de Biologie Marine
29 287 BREST

NOEL Hugues
"Recherches et création"
Domaine de St Hilaire
Parc d'activité de Pichamy
13 855 AIX EN PROVENCE CEDEX 3
Tél : 42.24.34.97.

NOIVILLE Christine
11 Rue des Halles
75 001 PARIS
Tél : 42.36.91.43

NOSENZO Georges
Câteau de la Nitrière
Neuville s/Ain
01160 PONT D'AIN

PAVIOT Gisèle
Sté GATTEFOSSE
36 Chein de Genas
69 800 ST PRIEST
Tél : 78.90.63.11

PELLOUX Marielle
IUT TOULON
Département biologie appliquée
Avenue de l'université
83 130 LA GARDE
Tél : 94.75.90.50

PEREZ René
IFREMER
Centre de Nantes
B.P. 1049
44 037 NANTES CEDEX 01
Tél : 40.37.41.26

POUCHUS Yves François
Faculté de Pharmacie
B.P. 1024
1 Rue G. Veil
44 035 NANTES CEDES
Tél : 40.41.28.28

PRIEUR Daniel
CNRS
Station pathologie
29 280 ROSCOFF
Tél : 98.29.23.40

PRUNET Paul
60 Bd St Michel
Ecole Nationale Supérieure des Mine
de Paris
75 272 PARIS CEDEX 06
Tél : 40.51.90.68

PROUVOST Rémy
14 Rue du Dr Pauchet
92 420 VANCRESSON

PUISEUX DAO Simone
Unité INSERM 303
06 230 VILLEFRANCHE SUR MER
Tél : 93.76.38.70

RENARD Thierry
Sté EUROLYSINE
16 Rue de Liège
75 009 PARIS

REYOND Dominique
41 Rue Maître
92 117 CLICHY
Tél : 47.56;76.63

RINCE Yves
Laboratoire de Biologie Marine
UFR Sciences et techniques
2 Rue de la Houssinière
44 072 NANTES CEDEX 03

ROBIN Jean
7 Avenue F.V. Raspail
94 110 ARCEUIL
Tél : 45.01.50.20

ROUSSAKIS CH.
Faculté de Pharmacie
B.P. 1024
1 Rue G.Veil
44 035 NANTES CEDEX
Tél : 40.41.28.28

ROY Philippe
IFREMER
Centre de Nantes
B.P. 1049
44 037 NANTES CEDEX

RULH Patricia
Biotechnica
2 Place de la Bourse
33 076 BORDEAUX CEDEX

SAMAIN Jean- François
IFREMER
Centre de Brest
B.P. 70
29 280 PLOUZANE
Té : 98.22.44.02

SEVERIN
FATMAR
Marais de Caillaud
17 320 MARENNES

SERGHERART Guy
Sté PRONATEC
62 rue du Long Pot
59 800 LILLE

SURBLED Michel
Archimex bibs
B.P. 31
56 038 VANNES CEDEX
Tél : 20.47.71.72

THEPENIER Catherine
CEN Cadarache
13 108 ST PAUL LEZ DURANCE
Tél : 42.25.48.27

TOULLEC Jean-Yves
CNS URA 686
Laboratoire de Biochimie
et Physiologie du Développement
46 Rue d'ULM
75 230 PARIS CEDEX 05
Tél : 43.29.12.25

TRIGNAU Jérôme
DESS
Faculté des Sciences
44 000 NANTES

VALS Guy
ANVAR
Délégation Poitou-Charentes

VERBIST Jean-François
Faculté de Pharmacie
B.P. 1024
1 Rue G. Veil
44 035 NANTES CEDEX
Tél : 40.41.28.28

ZANETTE Yvan
CREAA
Prise de Terdoux
17 480 LE CHATEAU D'OLERON
Tél : 46.47.51.93

ZOUHER Amzil
Faculté de Pharmacie
B.P. 1024
1 Rue G.Veil
44 035 NANTES CEDEX
Tél : 40.41.28.28