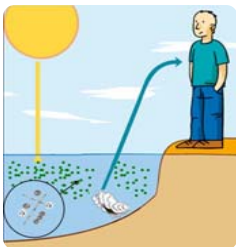


Étude des efflorescences d'algues toxiques en baie de Seine : impact sur la pêche de Coquilles St Jacques ; LERN, LERFBN, EMP/Phyc, ERT/IC, Univ Caen et Dyneco/Benthos;

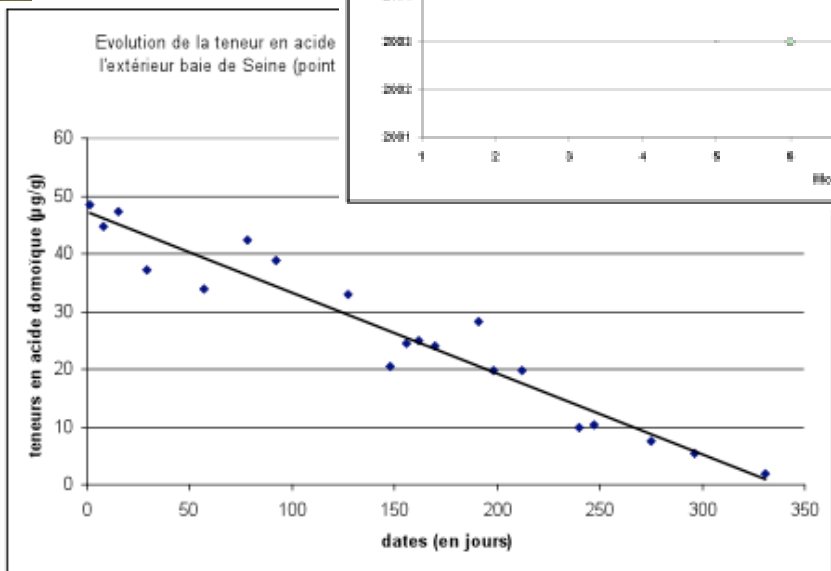
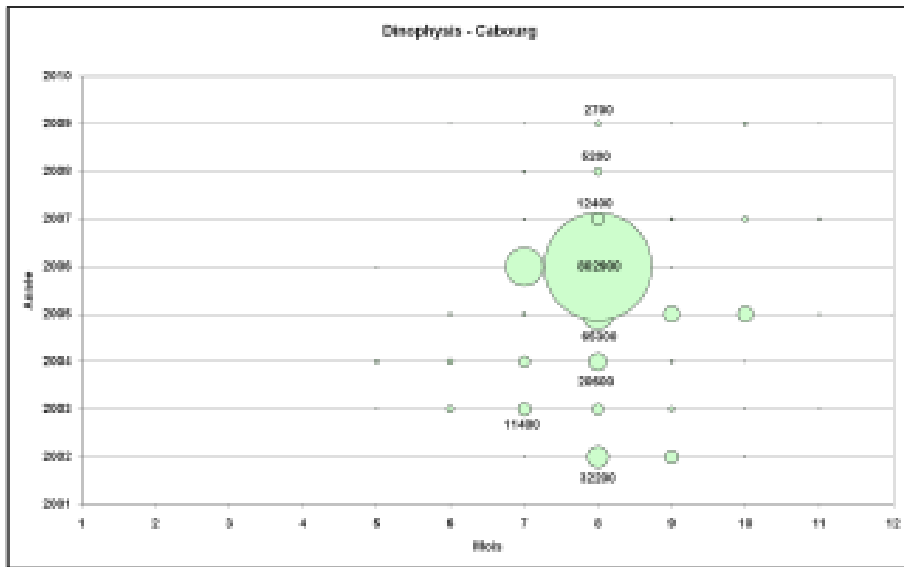
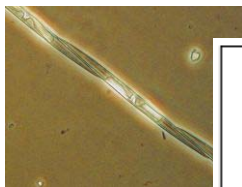
CONTEXTE : Deux crises sanitaires en 2004 et 2005 : fermeture totale et/ou partielle de la pêche

OBJECTIFS : Comprendre les mécanismes d'apparition des efflorescences d'algues toxiques et optimiser les moyens de diagnostiquer leur présence.

Phycotoxine **DSP**



ASP



Étude des efflorescences d'algues toxiques en baie de Seine : impact sur la pêche de Coquilles St Jacques ; LERN, LERFBN, EMP/Phyc, ERT/IC, Univ Caen et Dyneco/Benthos;

CONTEXTE : Deux crises sanitaires en 2004 et 2005 : fermeture totale et/ou partielle de la pêche

OBJECTIFS : Comprendre les mécanismes d'apparition des efflorescences d'algues toxiques et optimiser les moyens de diagnostiquer leur présence.

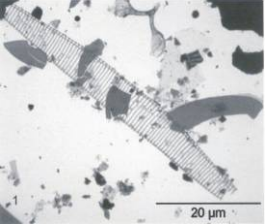
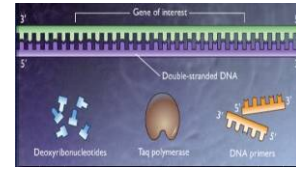
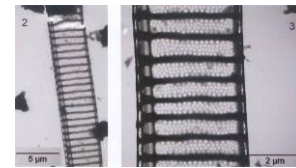
Déroulement du projet : 3 ans et organisé en 4 axes :

- Des campagnes en mer (échantillonnage) et analyses des coquilles St Jacques
Évaluation délicate de cette tâche en fonction des efflorescences
(LERN, LERFBN et EMP/Phyc) ;

- Culture d'algues toxiques *Pseudo-nitzschia*; travaux *in vitro* ;
meilleure compréhension du cycle de vie de cette espèce
(Université de Caen)

- Développement de sondes génomiques (identification rapide d'espèces toxiques) ;
(ERT/IC)

- Modèle statistique et/ou un modèle hydrobiologique ; relations entre des blooms d'algues toxiques et les conditions hydrométéorologiques
(DYNECO/Benthos et LERN)

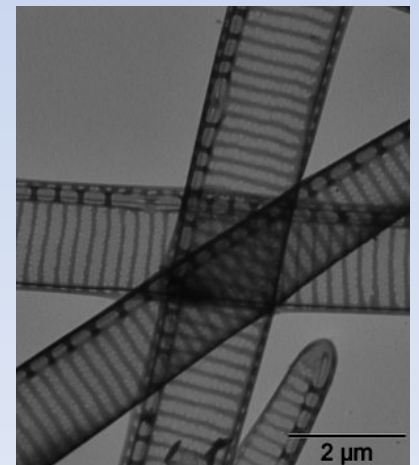


ANR COMANCHE
Tâche 5.2

**Identification, cultures et écophysiologie
de différentes espèces de *Pseudo-nitzschia***

Juliette FAUCHOT, Pascal CLAQUIN et Benoît VERON

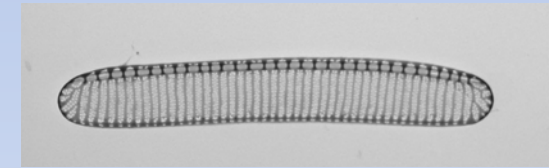
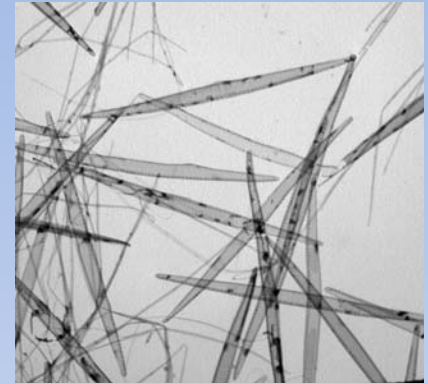
Université de Caen Basse-Normandie – PE2M



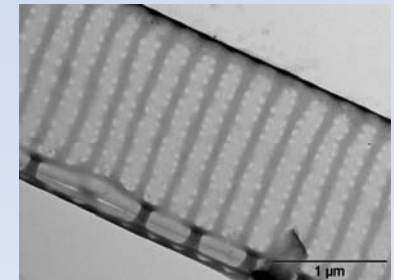
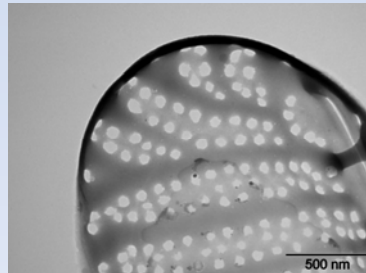
Identification des espèces de *Pseudo-nitzschia*

- Détermination en **microscopie électronique à transmission (MET)**.
- **Centre de microscopie appliquée à la biologie** de l'UCBN (CMABio).
- *Pseudo-nitzschia* en **populations naturelles et en cultures**.
- Nettoyage des frustules à l'acide (Lundholm & Moestrup 2000).
- Observation de la **morphologie du frustule** au MET:

Longueur et largeur des valves, densité des interstries et fibules, présence d'un nodule central, ultrastructure des poroïdes...



- **30 séances de MET.**



Culture des espèces de *Pseudo-nitzschia*

- **Isolement** de cellules de *Pseudo-nitzschia*
à partir des échantillons prélevés *in situ*.



- **Mise en culture** de plusieurs souches des **différentes espèces observées en Baie de Seine.**

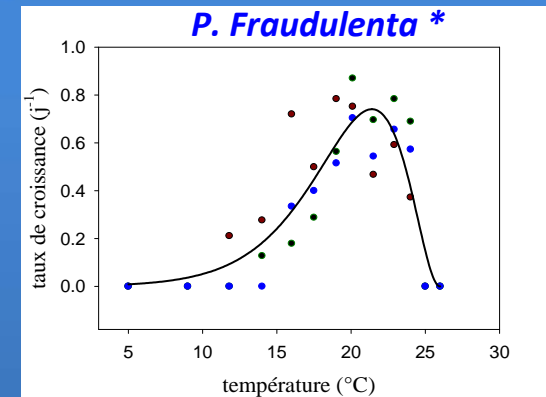
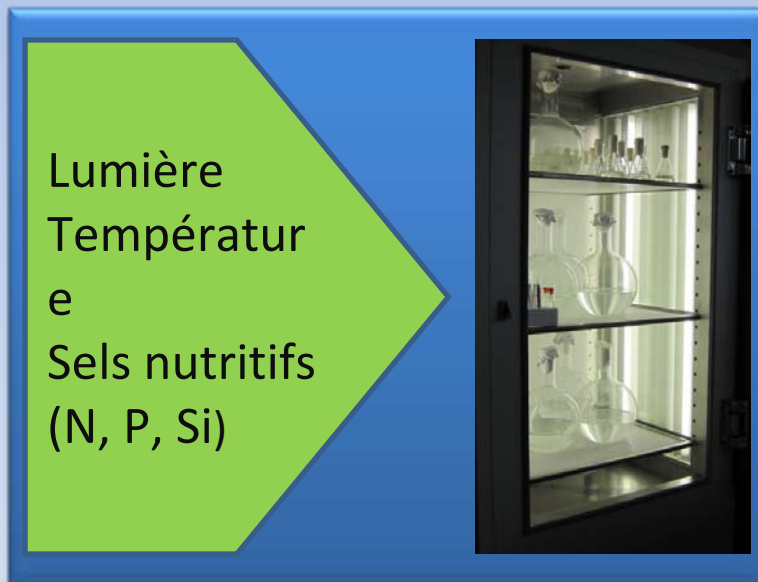
- Isolement et entretien des cultures:

- **Bertrand Leroy** (Technicien biologiste)
- **Virginie Raimbault** (CDD assistant ingénieur COMANCHE)



Ecophysiologie des espèces de *Pseudo-nitzschia* isolées

- Pour les différentes espèces de *Pseudo-nitzschia* observées *in situ* et isolées.



Croissance
Photosynthèse
Etat physiologique
Production d'acide domoïque

- En fonction des phases de croissance, en cultures « batch ».
- En cultures semi-continues (maintenues en phase de croissance exponentielle).

Objectifs

- Compléter l'**inventaire des espèces de *Pseudo-nitzschia*** présentes en Baie de Seine.
- Etablir une **collection de cultures** représentatives de la diversité des *Pseudo-nitzschia* en Baie de Seine.
- Etablir une « **carte d'identité biologique et physiologique** » pour chaque espèce:



Pseudo-nitzschia pungens

Taille (min-max)

Taux de croissance maximum

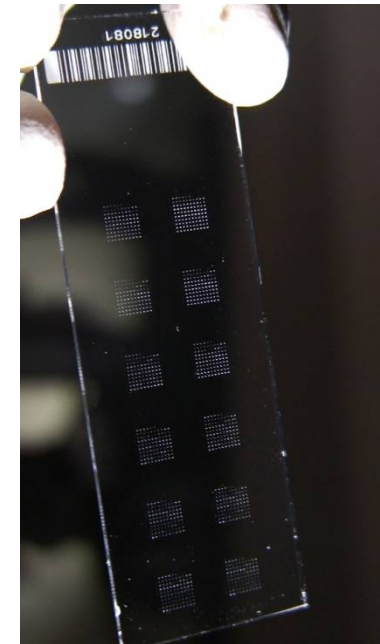
Conditions optimales de croissance
(température, lumière)

Paramètres photosynthétiques

Production d'acide domoïque

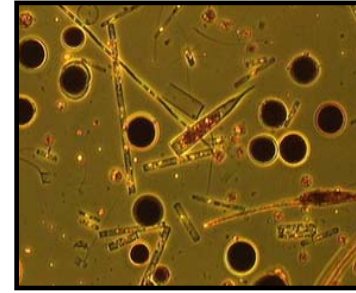
Tâche 5.3: Service IC et GenoToulBiopuce

Développement d'une biopuce dédiée à l'identification des espèces du genre *Pseudo-nitzschia* et *Dinophysis*



Partenaires : C. Dreanno et V. Le Berre (sous-traitance)
Aide demandée ANR: Un post doctorant

Identification moléculaire : un océan de techniques



Extrait et purification de l'ADN et ARN

Quelles sont les taxons présents?
Combien de taxons sont présents?

Proportion de chaque taxon ?

Banque -Séquences



PCR quantitative
(qPCR)



Automated rRNA intergenic
Spacer analysis (ARISA)



Phylochips – Puces à ADN

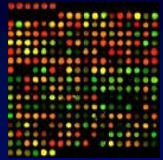


→ **Comanche**

FISH



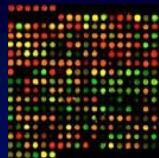
Métagénomique



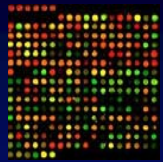
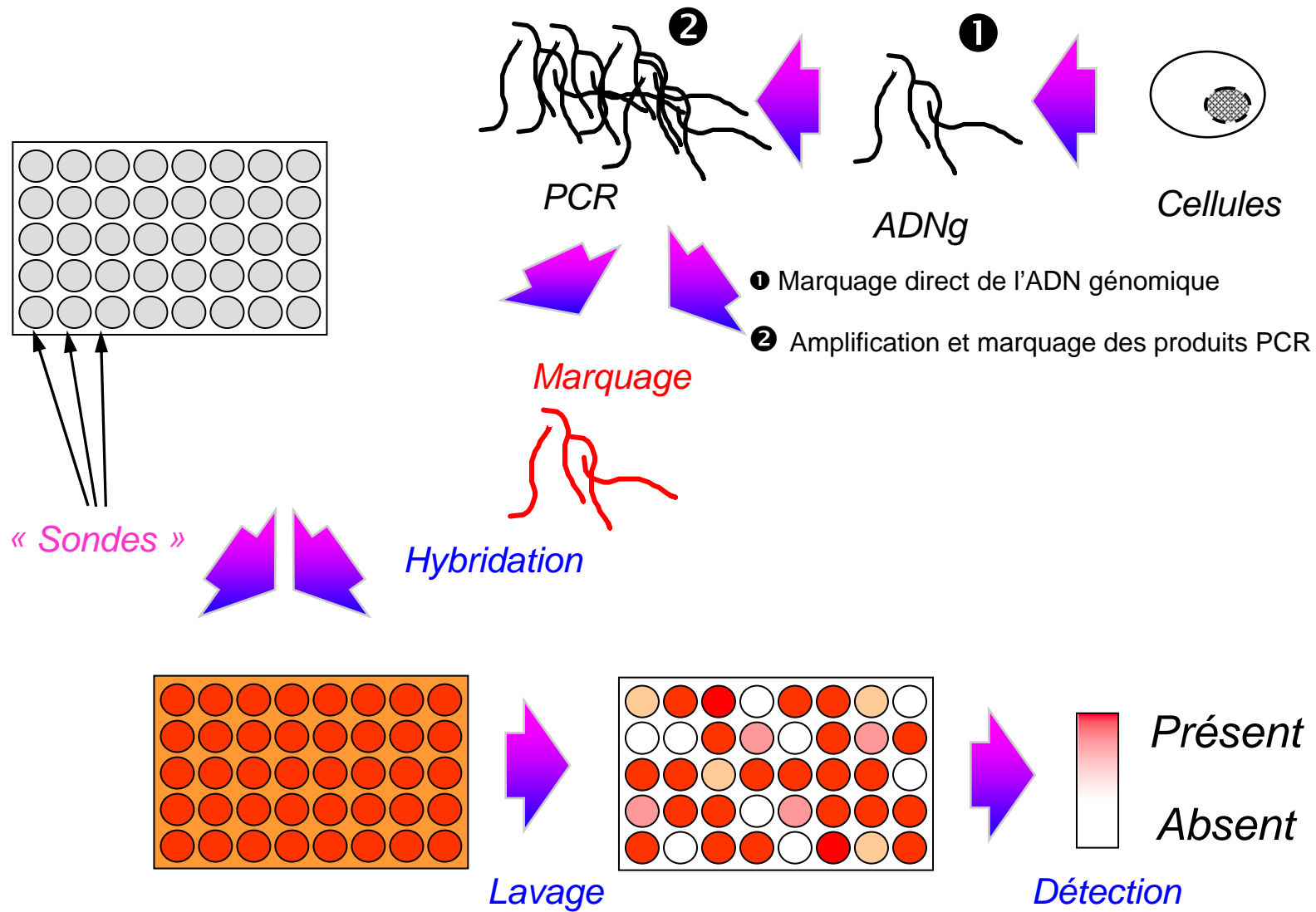
Premières applications des puces phylogénétique à ADN

- Epidémiologie : détection de pathogènes (bactéries, virus)
 - Biopuces commerciales (Greiner: Parocheck, Papillocheck, Carnocheck, etc...)
- Ecologie - diversité :
 - Small et al. (2001): bactéries (écologie terrestre)
 - De Santis et al. (2007) : écologie et diversité terrestre (Technologie Affymétrie): 842 taxons (300 000 sondes)
 - Castiglioni et al. (2004): Cyanobactéries aquatiques
 - Barlaan et al. (2007): bactéries marines (Nanochip)
- **HAB : Projet EU MIDTAL (L. Medlin)**

Intérêts : Pas de limitation du nombre de sonde
: Identification différentielle (taxons, génotype, etc..)
: Méthode simple, fiable et évolutive
: Méthode semi-automatisable (>100 échantillons par run)
: Coût d'une analyse (environ 20 euros)



Principe d'une biopuce de détection



Développement de sondes moléculaires

Diatomées

- *Pseudo-nitzschia* (genus)
 - *Pseudo-nitzschia americana*
 - *Pseudo-nitzschia australis*
 - *Pseudo-nitzschia brasiliiana*
 - *Pseudo-nitzschia calliantha*
 - *Pseudo-nitzschia cuspidata*
 - *Pseudo-nitzschia decipiens*
 - *Pseudo-nitzschia delicatissima*
 - *Pseudo-nitzschia fraudulenta*
 - *Pseudo-nitzschia galaxiae*
 - *Pseudo-nitzschia heimii*
 - *Pseudo-nitzschia multiseriis*
 - *Pseudo-nitzschia multistriata*
 - *Pseudo-nitzschia pungens*
 - *Pseudo-nitzschia seriata*
 - *Pseudo-nitzschia subpacifica*
 - Et autres espèces ?

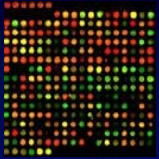
Dinophyceae

- *Dinophysis* (genus)
 - *Dinophysis acuminata*
 - *Dinophysis acuta*
 - *Dinophysis norvegica*
et autres espèces ?

- *Alexandrium* (genus)
 - *Alexandrium minutum*
 - *Alexandrium catenella*
 - *Alexandrium tamarense*

- *Karenia* (genus)
 - *Karenia brevis*
 - *Karenia mikimotoi*

- *Prorocentrum lima*
- *Prorocentrum micans*
- *Prorocentrum minimum*



Développement de sondes moléculaires

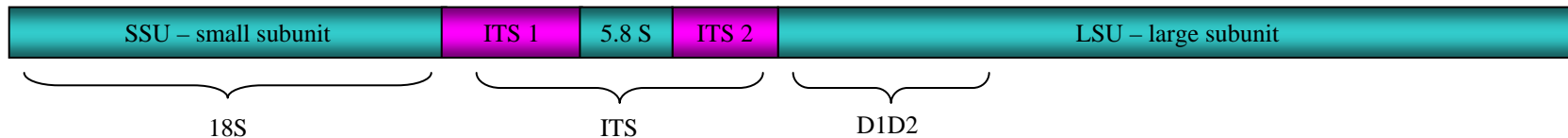
Sélection des marqueurs : ITS et LSU:

Présent dans chaque organisme et fonction identique (biosynthèse des protéines)

=> Evolution : molécules conservées

=> Comparaison directe des séquences

=> Reconstruction- Etablissement de la phylogénie



Détermination des sondes

=> Caractérisation taxonomique des espèces (Séquençage)

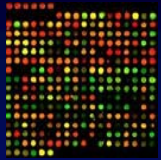
=> Alignement des séquences

=> Recherche et sélection de régions uniques (ARB et Roso)

=> Sélection des sondes potentielles :

Taux de GC : 40-60%, Taille (25 nucléotides au moins)

Température d'hybridation : 60-75°C, Structure moléculaire de la sonde

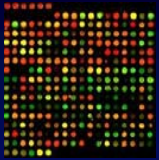


Bioinformatique:

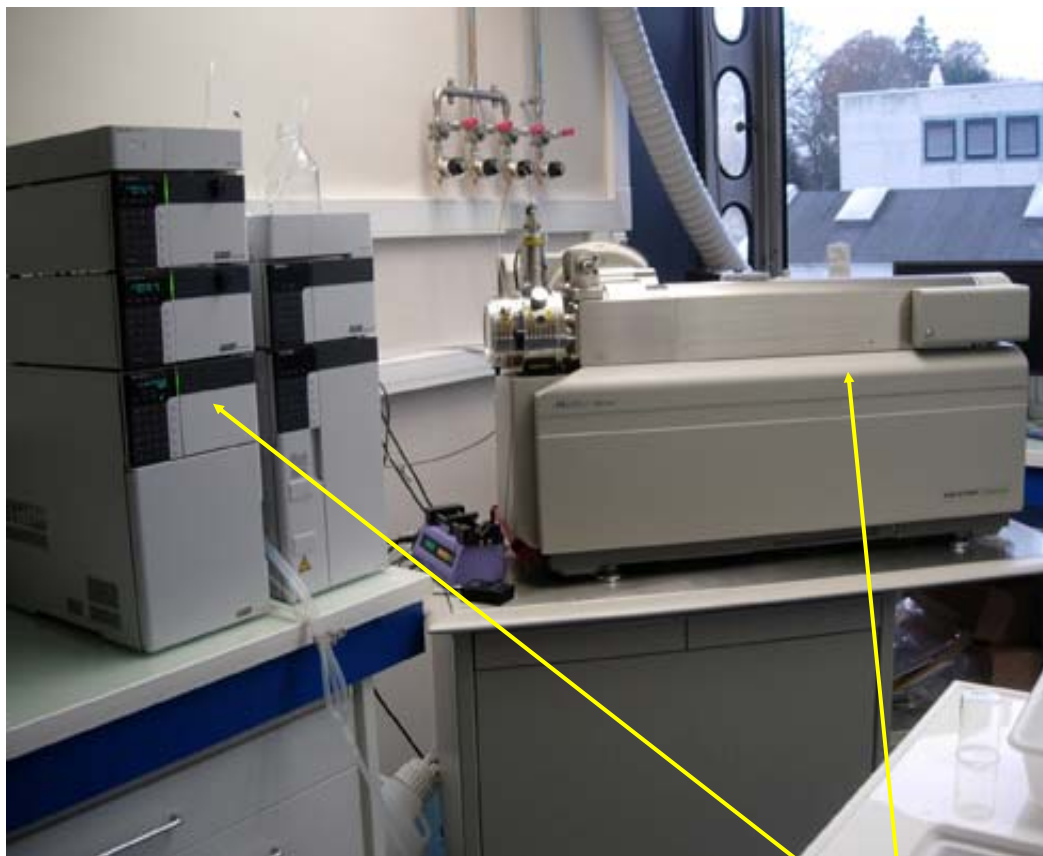
Optimisation du désign des sondes (hiérarchie) et de la puce: Test *in silico*

Expérimentation

- Vérification de la spécificité des sondes
 - Dot blot, microarray => matériel biologique « contrôlé »(cultures, cellules isolées)
 - Optimisation du protocole d'amplification et de marquage
 - PCR multiplex => matériel biologique « contrôlé»(cultures, cellules isolées)
 - Validation de la puce
 - Microarray => matériel biologique « contrôlé»(Echantillons naturels enrichis par des cultures d'algues)
- => Echantillons naturels : corrélation avec comptage au MO et par séquençage des banques ou /et PCR

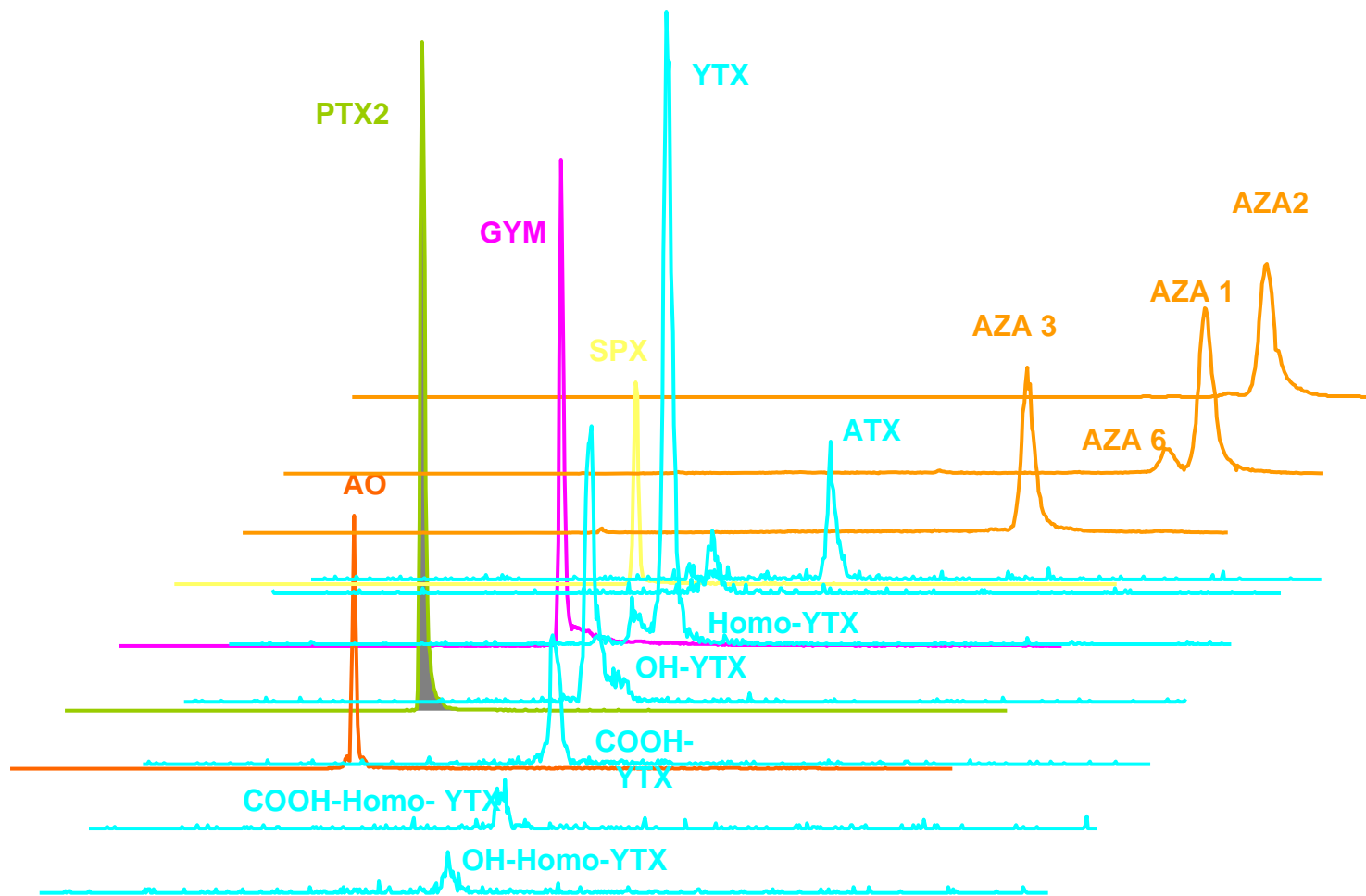


*Contribution PHYC / Projet COMANCHE
Recherche des biotoxines marines
Echantillons coquillages & Phytoplancton*



*Systeme analytique en Chromatographie Liquide (CL) couplée
à la Spectrométrie de masse en tandem (SM/SM)*

Exemple de résultat analytique Toxines lipophiles



Couplage CL-SM/SM pour la détection Multi-toxines

Étude des efflorescences d'algues toxiques en baie de Seine : impact sur la pêche de Coquilles St Jacques ; LERN, LERFBN, EMP/Phyc, ERT/IC, Univ Caen et Dyneco/Benthos;

CONTEXTE : Deux crises sanitaires en 2004 et 2005 : fermeture totale et/ou partielle de la pêche

OBJECTIFS : Comprendre les mécanismes d'apparition des efflorescences d'algues toxiques et optimiser les moyens de diagnostiquer leur présence.

Déroulement du projet : 3 ans et organisé en 4 axes :

- Des campagnes en mer (échantillonnage) et analyses des coquilles St Jacques
Évaluation délicate de cette tâche en fonction des efflorescences
(LERN, LERFBN et EMP/Phyc) ;

- Culture d'algues toxiques *Pseudo-nitzschia*; travaux *in vitro* ;
meilleure compréhension du cycle de vie de cette espèce
(Université de Caen)

- Développement de sondes génomiques (identification rapide d'espèces toxiques) ;
(ERT/IC)

- Modèle statistique et/ou un modèle hydrobiologique ; relations entre des blooms d'algues toxiques et les conditions hydrométéorologiques
Compréhension des phénomènes apparus en 2004 et 2005
(DYNECO/Benthos et LERN)

