

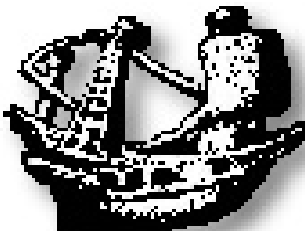
DEA Sciences de l'environnement marin
Université Aix-Marseille II
Année 2001-2002

Bastien SIMONNET

**Détermination de l'abondance du picophytoplancton
eucaryote par PCR Quantitative**

Sous la direction de
Daniel Vaultot

Equipe « Phytoplancton Océanique »
UMR 7127
Station Biologique de Roscoff



Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur André Toulmond pour m'avoir accueilli au sein de la station biologique de Roscoff.

Mes plus sincères remerciements vont à Daniel Vaultot, pour m'avoir permis d'effectuer ce stage dans son équipe, mais aussi et surtout pour la qualité de ses conseils et la façon dont il a guidé mon travail.

Un grand merci à Isabelle Biegala, pour les innombrables conseils et informations qu'elle m'a donné, toute l'aide qu'elle m'a apporté, sa gentillesse et son sens de l'humour à tout épreuve.

L'apprentissage de la biologie moléculaire aurait pu être un calvaire sans les multiples coups de main que m'ont apporté, avec la bonne humeur qui est la leur, Isabelle Mary et Khadidja Romari, je leur en suis très reconnaissant.

J'ai particulièrement apprécié l'ambiance régnant dans cette équipe, qui a réussi à rendre vraiment agréables les longs moments passés au laboratoire, aussi je voudrais remercier encore Isabelle(s), Nathalie, Delphine, Florence, Claire, Christophe, Alexis, Fabrice et Fred pour leur générosité et leur sympathie, dans ou en dehors de la station...

Enfin, merci à tous les autres (Cédic, Vivek, Carole, Vincent, Xavier) et à tous ceux que je n'ai pas cité et qui ont contribué à faire de ce séjour une expérience enrichissante sur bien des aspects.

Résumé :

La fraction picoplanctonique du phytoplancton (<3µm) a été récemment reconnue comme pouvant jouer un rôle majeur dans les écosystèmes marins. De plus les travaux de ces dernières années ont montré que cette fraction de taille recèle une diversité insoupçonnée d'organismes. La quantification et la distribution des différentes classes, genres et espèces dominantes de picoeucaryotes dans les zones côtières et océaniques présente donc un intérêt majeur dans la compréhension des écosystèmes marins.

Grâce à l'utilisation de méthodes moléculaires telles que l'hybridation *in situ* et le « dot blot » il a été possible de quantifier de façon fiable le picophytoplancton à différents niveaux hiérarchiques. Cependant ces techniques sont encore trop fastidieuses pour acquérir un grand nombre de données, nécessaires à la compréhension des écosystèmes.

Dans cette étude nous avons effectué une série de mises au point et d'analyses en vue de tester une nouvelle méthode de biologie moléculaire, la PCR quantitative. Cette méthode, utilisée avec succès pour la quantification des bactéries marines, pourrait répondre à ces exigences de haut débit de données quantitatives sur les picoeucaryotes photosynthétiques. Pour cela, nous avons élaboré des séquences complémentaires (amorces) de l'ADN 18S de plusieurs groupes taxonomiques, leur spécificité a été vérifiée et leur concentration optimale définie. De plus, la reproductibilité et les limites de détection de cette méthode ont été évaluées sur des cultures de picoeucaryotes.

Enfin, les premiers tests sur des échantillons du milieu naturel ont montré qu'il était possible d'établir l'abondance relative de différentes espèces de la classe des Prasinophycées dans les eaux côtières de Roscoff.

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>	4
<u>I. Cultures et échantillons naturels.</u>	4
<u>II. Estimation de la concentration en cellules par cytométrie en flux</u>	4
<u>III. Extraction de l'ADN</u>	5
1. <u>Méthodes d'extraction</u>	5
1.1. <u>Extraction sur cellules collectées par centrifugation</u>	5
1.2. <u>Extraction sur cellules collectées par filtration</u>	5
1.3. <u>Dosage de l'ADN, préparation des gammes de concentration</u>	6
<u>IV. PCR</u>	7
1. <u>Étapes de la PCR</u>	7
2. <u>La PCR « simple »:</u>	9
3. <u>La PCR Quantitative</u>	9
3.1. <u>Principe</u>	9
3.2. <u>Application de la chimie Sybr®Green</u>	11
<u>V. Amorces utilisées.</u>	13
<u>RÉSULTATS ET DISCUSSION</u>	15
<u>I. Extraction et dosage de l'ADN</u>	15
1. <u>Extractions après centrifugation ou filtration</u>	15
<u>II. Mise au point des couples d'amorces</u>	16
1. <u>Stratégie de mise au point des amorces</u>	17
2. <u>Tests de spécificité en PCR simple</u>	18
3. <u>Analyse de l'efficacité en PCRQ</u>	21
4. <u>Optimisation des conditions de PCRQ</u>	22
5. <u>Tests de spécificité en PCRQ une fois la réaction optimisée</u>	23
<u>III. Caractéristiques de la méthode</u>	24
1. <u>Reproductibilité</u>	24
2. <u>Influence de la méthode d'extraction de l'ADN</u>	26
3. <u>Limites de détection théorique</u>	27
<u>IV. Application au milieu naturel</u>	28
1. <u>Effet de la quantité d'ADN</u>	28
2. <u>Analyse de l'abondance des picoeucaryotes</u>	29
<u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	31
<u>ANNEXES</u>	33
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	36

Introduction

L'importance du phytoplancton marin en terme de phylogénie, de production primaire, et plus récemment son rôle clé dans les flux de carbone, en a fait un sujet d'étude florissant en océanographie. Cependant, les techniques d'études disponibles ont souvent contribué à restreindre le champ d'étude aux fractions de taille allant de 5 à 200 μm

Pourtant, le picophytoplancton, terme désignant les organismes phytoplanctoniques passant au travers d'un filtre de 3 μm , recèle une grande diversité d'organismes, présents dans tous les écosystèmes marins du globe. Ces représentants sont constitués par des procaryotes, les Oxyphotobactéries, et des Eucaryotes, qui englobent différentes classes algales

Bien que les organismes picoplanctoniques puissent avoir un rôle écologique non négligeable en milieu côtier (Courties et al, 1998), c'est dans les écosystèmes pélagiques, et particulièrement les zones oligotrophes qu'ils semblent être les plus abondants et jouer un rôle majeur. Ils y atteignent des concentrations allant de 10^3 à 10^5 cellules par millilitre, avec un maximum d'abondance situé au niveau (ou légèrement au dessous) du maximum profond de chlorophylle pour les picoeucaryotes (Campbell et al, 1997; Li et al, 1988), tandis que celui des procaryotes est situé plus haut dans la colonne d'eau (Partensky et al, 1999).

Si l'abondance des picoeucaryotes est inférieure à celle des procaryotes au sein de picoplancton, leur importance en terme de production primaire est à souligner, du fait d'un fort taux d'absorption du carbone (Li, 1994), qui peut les amener à être les producteurs dominants.

L'identification de ces organismes, repartis en diverses classes que sont les Chlorophyceae, Prasinophyceae, Eustigmatophyceae, Prymnesiophyceae, Pelagophyceae, Chrysophyceae et Bolidophyceae, nécessite l'utilisation de nombreuses techniques telles que la microscopie électronique, l'analyse des pigments par HPLC, puis le séquençage de zones du génome utiles à l'analyse phylogénétique (Guillou et al, 1999). De plus, leur adaptation à des milieux oligotrophes les rend difficiles à isoler. Pour pallier à cette difficulté, des techniques de biologie moléculaire telles que le clonage du gène codant pour l'ARNr 18S ont été appliquées à des échantillons de campagnes océanographiques, révélant une diversité insoupçonnée chez ces minuscules organismes (Moon-van der Staay et al, 2001).

Si l'étude de la diversité des picoeucaryotes a pu être menée au niveau de l'espèce, l'étude de leur abondance par les techniques conventionnelles ne pouvait pas se faire à un niveau aussi précis. La cytométrie en flux, si elle permet un fort débit d'analyse et des applications *in-situ* (Vaulot et al, 1999), ne distingue pas les taxons pour les eucaryotes (Simon et al, 1994). Les techniques d'analyse

des pigments photosynthétiques sont aussi utilisées, mais leur résolution taxonomique est limitée à la classe, et la conversion des dosages de pigments en abondance ou en biomasse peut être fortement biaisée par l'effet des conditions du milieu..

Dans ce contexte, l'outil moléculaire offre un grand intérêt, en raison de sa forte spécificité, pour estimer l'abondance des populations picoplanctoniques eucaryotes. Les premiers résultats ont été obtenus grâce à des sondes oligonucléotidiques fluorescentes spécifiques de l'ADNr 18S, hybridées a des cellules, couplé à l'analyse par cytométrie en flux (Simon et al, 1995), ou hybridées directement sur filtre couplé à la microscopie par épifluorescence avec amplification du signal (FISH-TSA) (Not et al., *in press*). Une autre approche consiste à amplifier l'ADNr 18S de cellules du milieu naturel par PCR, puis à hybrider des sonde spécifiques radioactives ou chemiluminescentes directement sur l'ADN amplifié (Moon-van der Staay et al, 2000). Si ces techniques possèdent une forte spécificité, elles permettent cependant d'analyser seulement un nombre limité d'échantillons, en raison du temps de traitement nécessaire.

Récemment, la PCR Quantitative, une technique d'amplification de gène couplée à l'hybridation de molécules ou de sondes fluorescentes permettant le suivi de la quantité de la séquence cible, a été adaptée au milieu marin. Utilisée pour la détection de Dinoflagellés toxiques (Bowers et al, 2000), et pour la quantification de bactéries marines (Suzuki et al, 2000), elle a par la suite prouvé son efficacité pour la cartographie d'espèce picoplanctoniques bactériennes, alliant rapidité d'analyse et faibles volumes de prélèvement (Suzuki et al, 2001) (Figure 1).

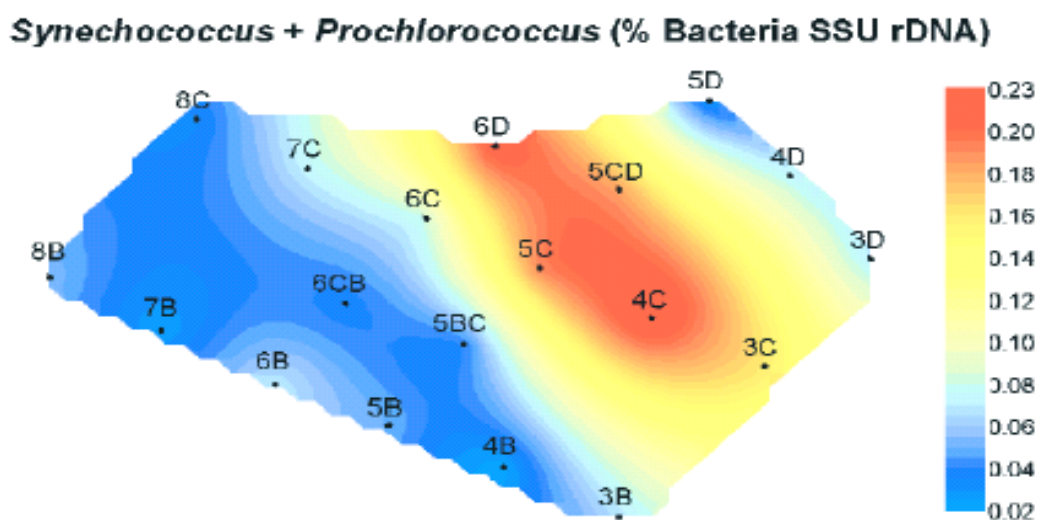


Figure 1 : Distribution de l'abondance de *Prochlorococcus* et *Synechococcus* (en % des bactéries totales) en surface, dans le panache de l'upwelling de la Baie de Monterey, obtenue par PCR quantitative. (Suzuki, 2001)/

Dans le cadre du programme européen PICODIV, grâce entre autres aux bibliothèques de clones et au FISH-TSA, la diversité et l'abondance de certains picoeucaryotes photosynthétiques est suivi tout au

long de l'année dans les eaux côtières de Roscoff. Il a été observé, en plus des variations temporelles des populations, la présence tout au long de l'année de représentants des Prasinophycées (Romari, *in prep*). Il apparaît en particulier que la famille des Mamiellales (Prasinophycées), comprenant les genres *Ostreococcus*, *Micromonas* et *Bathycoccus* (Figure 2) composent jusqu'à 80% du peuplement, le genre *Micromonas* étant le composant majeur de cette classe tout au long de l'année (Not, *unpublished*).

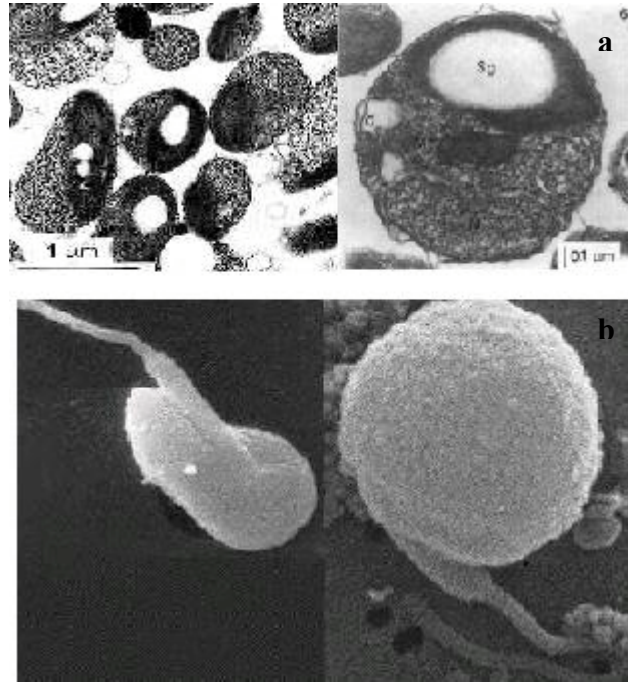


Figure 2 : Photographie en microscopie électronique de deux picoeucaryotes, *Ostreococcus tauri* (a) et *Micromonas pusilla* (b). (photos : C. Courties, H. Moreau et L. Guillou)

Afin d'appliquer la PCR Quantitative aux picoeucaryotes marins, les trois espèces citées ont alors été choisies comme cible, dans le but de les quantifier relativement à la totalité des picoeucaryotes, et premiers essais ont été réalisés sur des cultures (Biegala, non publié).

Le but de mon travail de DEA était d'appliquer la PCR quantitative à l'estimation de l'abondance du picoplancton eucaryote, et en particulier de Prasinophycées. Les principales étapes ont consisté à valider les amorces spécifiques des différents groupes taxonomiques du picoplancton, à estimer la reproductibilité de cette méthode, et à déterminer les paramètres critiques à l'aide d'expérimentations sur cultures, en vue d'appliquer cette technique à des échantillons naturels.

Matériel et méthodes

I. Cultures et échantillons naturels.

Les souches cultivées utilisées (Tableau 1) proviennent de la collection de la station biologique de Roscoff. Les numéros RCC (Roscoff Culture Collection) indiquent leur ordre d'entrée dans cette collection. Ces souches ont été utilisées comme contrôles positifs ou négatifs pour les différents couples d'amorces testés.

Tableau 1: Espèces picoplanctoniques en culture utilisées.

Règne	Phylum	Classe	Genre	Espèce	Souche	RCC
Eucaryotes	Chlorophyta	Prasinophyceae	<i>Ostreococcus</i>	<i>tauri</i>		116
			<i>Bathycoccus</i>	<i>prasinos</i>		113
			<i>Micromonas</i>	<i>pusilla</i>	CCMP 490	114
			<i>Micromonas</i>	<i>pusilla</i>	CCMP 489	450
			<i>Micromonas</i>	<i>sp</i>	BL 122	434
	Cryptophyta	Cryptophyceae	<i>Rhodomonas</i>	<i>salina</i>	CCMP 322	20
	Heterokontophyta	Bolidophyceae	<i>Bolidomonas</i>	<i>pacifica</i>		205
Pelagophyceae		<i>Pelagomonas</i>	<i>calceolata</i>		341	

Les espèces picoplanctoniques sont cultivées à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de lumière blanche, excepté *Pelagomonas* qui est cultivée en lumière bleue, à $4 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La solution de culture est composée de 50 ou 200 ml de milieu K (Keller et al., 1987), selon la quantité de cellules désirées pour l'extraction. Ces cultures sont diluées au dixième ou au quarantième, une fois par semaine.

Escherichia coli (Top 10F⁺, du Kit TOPO TA Cloning, Invitrogen) est cultivée dans 10 ml de milieu LB ().

Les échantillons d'eau de mer sont prélevés en zone côtière à la station « Estacade » (48°43' 56'' N, 03° 59' W), en surface, avec un récipient de 10 l.

II. Estimation de la concentration en cellules par cytométrie en flux

L'estimation de la concentration cellulaire en culture et en milieu naturel est faite par un cytomètre en flux de type FACsort (Becton Dickinson, San Jose, Calif.), équipé avec un laser de 15 mW émettant à 488 nm et le jeu de filtres standards [Partensky, 1996 #19]. L'énumération est faite pendant 3 min avec un flux de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, après dilution au centième dans du milieu K pour les cultures, sans dilution pour les échantillons du milieu naturel.

La discrimination du picoplancton eucaryote photosynthétique est faite sur la base des paramètres de taille et de fluorescence dans le rouge, excepté pour *Rhodomonas salina*, pour laquelle la fluorescence orange est prise en compte, du fait de la présence de phycoérythrine.

III. Extraction de l'ADN

1. Méthodes d'extraction

1.1. Extraction sur cellules collectées par centrifugation

Afin d'estimer l'influence de l'extraction sur l'amplification de l'ADN, les premiers essais ont été effectués sur des cellules de culture, après centrifugation, par la méthode d'extraction au CTAB (Hexadecyltrimethyl-Ammonium Bromide, (Doyle and Doyle, 1989) et au phénol/chloroforme. Cette méthode est composée de quatre étapes:

- la lyse cellulaire : les cellules centrifugées (10 min, 10000 g, 20°C) dans des tubes Falcon® 50ml sont plongées 50 min dans 7 ml de CTAB (3% CTAB, 1,4M NaCl, 0,2% 2-mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCL pH 8,0) à 50°C. Le tout est agité toutes les dix minutes.
- la séparation ADN/protéines : 7 ml de chloroforme isoamyl alcool (24 :1) est ajouté, le tout est passé au vortex pendant 10 min puis centrifugé (10 min, 10000 g, 20°C)
- la déshydratation et l'isolation de l'ADN : la phase aqueuse est recueillie dans un tube Falcon® 50 ml. L'isopropanol (2/3 du volume) est alors ajouté et la solution est agitée doucement. L'ensemble, contenant l'ADN déshydraté, est centrifugé dans un même Eppendorf de 1,5 ml par sous échantillons successifs, afin de concentrer le culot d'ADN sur une surface réduite. La phase liquide est jetée.
- le lavage à l'éthanol : deux lavages successifs sont réalisés (1,5 ml d'éthanol 70%, centrifugation 3 min, 10000 rpm, 20°C), puis les échantillons sont mis à sécher avant d'être repris dans 100 à 200 µl d'eau stérile (eau distillée, filtrée sur 0,2 µm et autoclavée).

1.2.. Extraction sur cellules collectées par filtration

a/ Cultures

Selon la concentration estimée par cytométrie, 15 à 40 ml d'échantillons de culture sont filtrés sur 0,2µm (SUPOR® 200, Gelman Science, Michigan,USA) à l'aide d'une pompe à vide (dépression maximale de -40 kPa). Les filtres sont ensuite plongés dans un tampon de lyse (0,75 M sucrose, 50 mM Tris HCl pH 8,0, 40 mM EDTA pH 8,0), congelés dans l'azote liquide, et conservés à -80°C. La suite de l'extraction est identique à celle appliquée aux cellules collectées par centrifugation, le filtre étant retiré avant l'ajout de chloroforme.

b/ Milieu naturel

750 ml à 1 litre sont filtrés dès l'arrivée au laboratoire, sur 0,2µm (Supor® 200), après préfiltration sur 3 µm (Nucleopore®, Whatman, Kent, UK) quand seule la fraction picoplanctonique est recherchée. L'ADN est extrait par la méthode au CTAB.(voir ci-dessus § 1.1)

1.3. Dosage de l'ADN, préparation des gammes de concentration.

L'établissement de courbes de calibration pour la réaction de PCRQ nécessite un dosage précis de la quantité d'ADN utilisée. Pour obtenir ce type de données, deux techniques ont été testées : le dosage de l'ADN en solution par spectrophotométrie, et le dosage à l'aide d'un marqueur fluorescent se liant à l'ADN (PicoGreen®) par spectrofluorimétrie.

a/ dosage par spectrophotométrie

L'ADN réhydraté après extraction est dosé directement à l'aide d'un spectrophotomètre (Gene QuantII, Pharmacia Biorad), dans une cuve de 70 µl. Cet appareil mesure l'absorption de la lumière incidente à 260 et 280 nm. L'ADN absorbe majoritairement à 260 nm, 1 unité de DO correspond à 50 µg/ml d'ADN double brin. Il est possible d'estimer la pureté de la solution d'ADN grâce au rapport A260nm/A280nm (R). Les solution d'ADN et d'ARN pur ont un rapport R=1,8 et 2,0 respectivement (Sambrook et al, 1989). S'il y a contamination par des protéines, le rapport sera inférieur à 1,8, s'il y a contamination par des ARN, il tendra alors vers 2.

A cause du volume limité de solution d'ADN, certaines solutions sont dosées après dilution (4 à 8x), puis la concentration obtenue est multipliée par le facteur de dilution. Pour les mêmes raisons, un seul sous-échantillon est dosé, mais le dosage est effectué deux fois, avec homogénéisation de la solution dans la cuve.

b/ dosage au PicoGreen®

Pour pallier au manque de précision du dosage spectrophotométrique pour les faibles concentrations (<1ng/µl), le dosage spectrofluorimétrique associé à l'ajout de PicoGreen® (Molecular Probes,) a également été testé.

Le principe de cette méthode repose sur l'utilisation d'une molécule fluorescente, se fixant spécifiquement sur l'ADN double brin. 500µl de solution d'ADN et 500 µl de solution de PicoGreen (solution mère diluée 200x) sont ajoutés dans une cuve d'1 ml. Après excitation à 480 nm, le maximum de fluorescence est lu entre 500 et 523 nm. La fluorescence obtenue est ensuite comparée à une gamme étalon réalisée avec de l'ADN de thymus de veau. Cette méthode permet théoriquement de mesurer une concentration minimale de 25 pg/ml, et d'éviter les interférences avec d'autres acides nucléiques ou des protéines. Cependant, les premiers essais de dosage au Picogreen® ont montré (Figure 3) la nécessité de mettre au point une gamme étalon à partir de l'ADN de picoeucaryotes, et non de l'ADN fourni comme standard (thymus de veau).

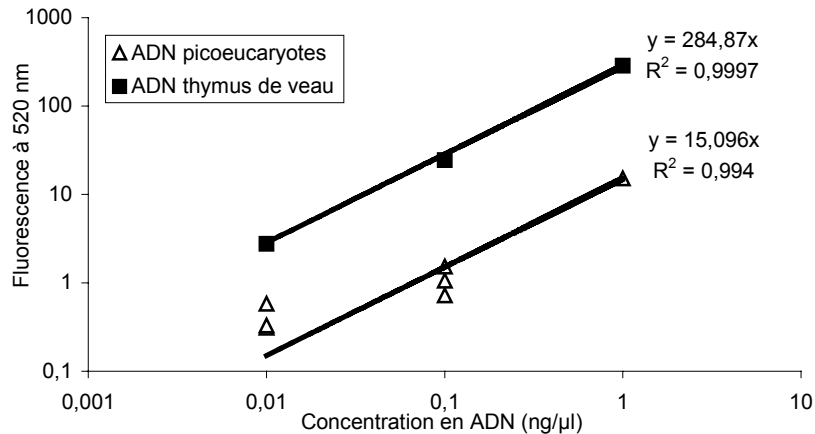


Figure 3 : Dosage Picogreen® (fluorescence à 520 nm fonction de la concentration en ADN): comparaison de résultats obtenus selon l'origine de l'ADN génomique.

Les différences entre les droites étalons obtenues proviennent vraisemblablement de la différence de taille des ADN dosés, selon les mises en garde du fabricant. La linéarité de cette méthode permet donc un dosage précis des faibles concentrations, à condition d'utiliser comme standard de l'ADN de taille identique à celui que l'on veut doser. En raison du temps nécessaire pour ce type de dosage, cette méthode n'a pas été retenue.

c/ Gammes de concentration d'ADN

Après extraction de l'ADN génomique, la solution est dosée au spectrophotomètre, puis diluée dans de l'eau stérile pour obtenir une concentration finale de 2ng/μl.

Cet échantillon est conservé au moins 12 heures à 4°C, puis sert de solution mère pour obtenir des échantillons à 0,2 ng/μl (dilution 10x) et 0,02 ng/μl (dilution 100x). Dans certains cas, notamment en chimie Taqman, des échantillons à 1 ng/μl (dilution 2x) et 0,002 ng/μl (dilution 1000x) ont été réalisés.

IV. PCR

La PCR (Polymérase chain reaction) est une technique de biologie moléculaire mise au point en 1985 par Karry Mullis. C'est une technique d'amplification génique qui permet de cibler une séquence d'ADN dans un mélange et de la multiplier rapidement. Le principe de la PCR classique ou quantitative est le même, et repose essentiellement sur l'utilisation de l'activité polymérase et la présence d'amorces spécifiques, la PCR quantitative utilisant en plus une molécule fluorescente, qui permet de suivre l'augmentation de la quantité de séquence amplifiées.

1. Etapes de la PCR

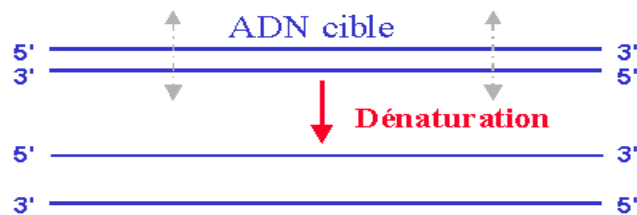
Lors d'une PCR, l'ADN double brin contenant la séquence à amplifier est mis en solution en présence de deux amorces sens et anti-sens (ou forward et reverse, notées f et r), qui sont de courtes séquences d'ADN (environ 20 paires de base - pb). Ces amorces sont la clef de voûte de la réaction, car elles doivent être spécifique de la région d'hybridation (grâce à la complémentarité des bases avec

le brin d'ADN cible), répondre à des critères strictes de température d'hybridation, et encadrer uniquement la région que l'on veut amplifier.

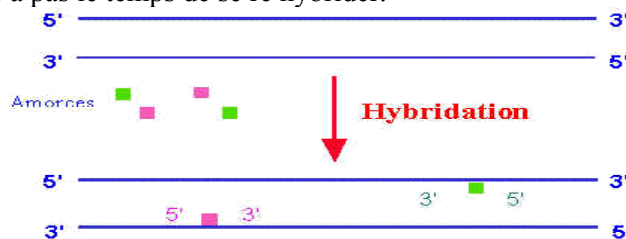
On ajoute ensuite un enzyme, la Taq Polymérase (Taq Pol), qui est une ADN polymérase de type I, thermorésistante, extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*. Son rôle est, à partir de la fixation de l'amorce spécifique, de synthétiser un nouveau brin d'ADN complémentaire en utilisant les dNTP (désoxyriboNucléotidesTriPosphates) en solution. Elle nécessite la présence d'ions Mg^{2+} pour son fonctionnement, ajoutés sous forme de $MgCl_2$.

La réaction de PCR se déroule ensuite de la façon suivante :

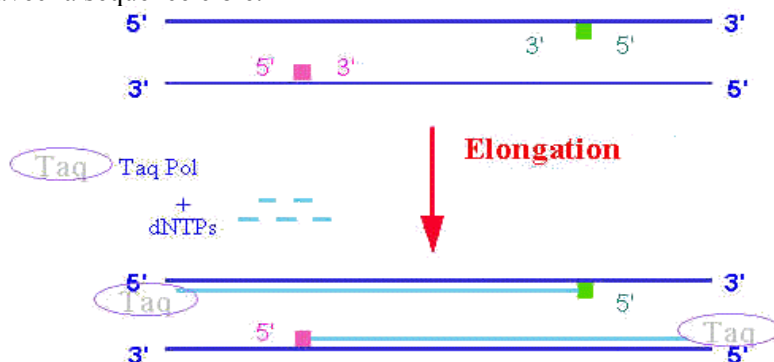
Dénaturation : L'ADN double brin est chauffé jusqu'à $95^{\circ}C$, température à laquelle les deux brins se dissocient



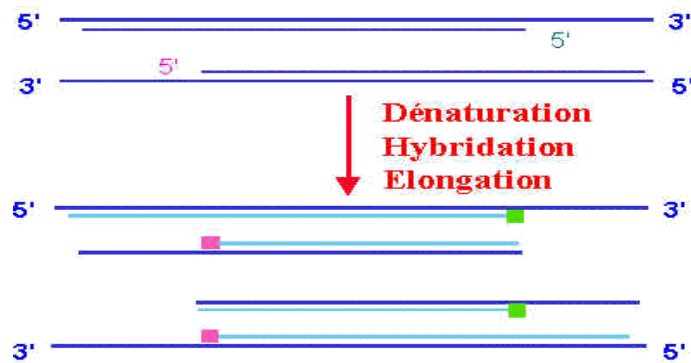
Hybridation : La température est rapidement abaissée pour atteindre 55 à $65^{\circ}C$, selon la température d'hybridation des amorces. Chaque amorce « reconnaît » alors sa séquence complémentaire. Cette étape dure environ une minute pour laisser le temps aux amorces de s'hybrider correctement ; l'ADN total étant plus long, il n'a pas le temps de se ré hybridier.



Elongation : La température du tube est ensuite augmentée à $72^{\circ}C$, ce qui permet à la Taq Pol d'ajouter des nucléotides aux amorces hybridées, dans le sens $5' \rightarrow 3'$, en fonction de leur complémentarité avec la séquence cible.



Ce premier cycle a permis de synthétiser autant de brins complémentaires (plus courts puisque bornés par une amorce) que de brins cibles. Il devient à leur tour des ADN cibles. Au deuxième cycle, la quantité d'ADN continue de doubler et les premiers brins dont la taille est limitée par les deux amorces (amplicons) font leur apparition.



A chaque cycle de PCR, dans les conditions optimales, la quantité d'amplicons va doubler, c'est à dire que leur nombre croît de façon exponentielle. Ensuite, l'épuisement des substrats et l'augmentation de la concentration en produits formés vont contribuer à ralentir l puis à stopper la réaction (effet plateau).

2. La PCR « simple »:

La PCR « simple » est utilisée dans notre cas pour évaluer la spécificité des amorces et tester l'influence de la température d'hybridation (noté T_m pour melting temperature). Pour chaque tube de PCR, pour un volume final de 50 μ l, sont ajoutés : 5 μ l de tampon (thermophilic DNA poly10x buffer) ; 2,5 mM de $MgCl_2$; 1,25 U de Taq DNA Polymérase (Promega, Madison WI, USA) ; 1,6 mM de dNTP (Eurogentec, Belgium), 400nM d'amorces forward et reverse (HPSF oligonucleotids, MWG Biotech AG). Le i-Cycler (Bio-Rad, France) est programmé pour 10 min à 95°C (première dénaturation de l'ADN) suivi de 35 cycles composés d'1 min à 95°C (pour la dénaturation), de 20 s à 60°C (pour l'hybridation, dans le cas des tests de T_m , un gradient de température de 55°C à 65°C sera appliqué), et de 40 s à 72°C pour l'élongation. La PCR se termine par trois cycles à 72°C pour permettre à la polymérase d'achever d'éventuelles élongations.

La séparation des produits de PCR est réalisée sur gel d'agarose 2% ou de polyacrylamide 0,1%, plongés pendant 25 min dans du bromure d'ethidium (0,5 μ g.ml⁻¹), l'observation est faite avec une lampe UV couplée à une caméra (Baby Imager, Appligene Oncor, France)

3. La PCR Quantitative

3.1. Principe

La PCR quantitative (PCRQ) allie la PCR à un système de détection des amplicons, ce qui permet de quantifier le nombre de séquences cibles dans un mélange. Pour cela, un fluorochrome se liant à l'ADN cible est ajouté au mélange réactionnel. L'émission de fluorescence est mesurée à chaque cycle, à l'aide d'une caméra CCD, ce qui permet de suivre la dynamique de la réaction, et notamment la phase exponentielle.

Dans une réaction de PCR, la seule période où la quantité de produit formé est proportionnelle à la quantité initiale de séquences cibles est la phase exponentielle. Donc, contrairement à la PCR, où l'on observe, sur gel, les produits en fin de PCR (phase plateau), les résultats de PCRQ seront pris au milieu de la phase exponentielle.

Pour cela, un seuil de fluorescence est fixé au milieu de la phase exponentielle (ou au milieu de la phase linéaire en coordonnées semi-logarithmiques) (Figure 4), et la comparaison entre les échantillons se fera à l'aide du nombre de cycles de PCR nécessaires pour atteindre ce seuil (C_T , pour threshold cycle).

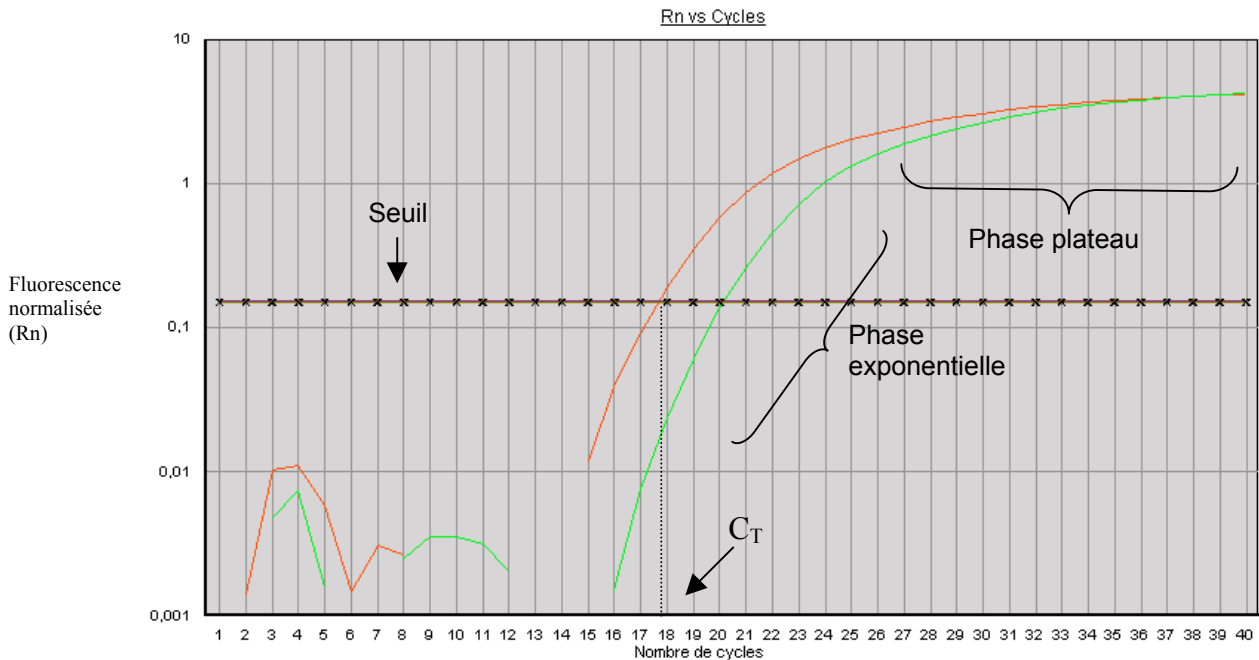


Figure 4 : Exemple de résultat de PCRQ, pour deux quantités différentes d'ADN cible

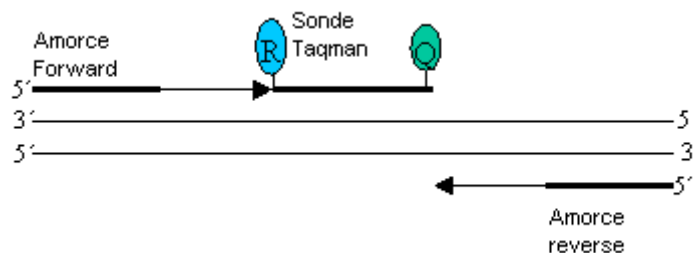
Plus un échantillon contiendra de séquences cibles, plus l'amplification sera importante, et donc plus le nombre de cycles nécessaires pour atteindre le seuil sera faible. **La valeur du C_T est inversement proportionnelle à la quantité d'ADN cible .**

a/ Chimie Sybr®Green

Le Sybr®Green (Molecular Probes) est un molécule possédant une forte affinité pour le petit sillon de l'ADN, elle se fixe donc non-spécifiquement sur l'ADN double brin, et au fur et à mesure de l'élongation. Excitée à 497 nm, son maximum de fluorescence se situe à 520 nm ; le signal fluorescent est augmenté 1000 fois lorsque la molécule est liée..

b/ Chimie TaqMan®

Cette technique permet de marquer de façon plus spécifique la séquence cible, évitant ainsi les problèmes de bruit de fond générés par le Sybr®Green. En plus des amorces nécessaires à la PCR, une sonde (oligonucléotide) complémentaire d'une zone située entre les deux amorces est utilisée :



Cette sonde (appelée sonde TaqMan) est marquée à son extrémité 5' par un « reporter » ® (fluorescéine, excitée à 497 nm et émettant entre 520 et 550 nm), et à son extrémité 3' par un « quencher » (Q) (rhodamine, de type TAMRA). Le quencher bloque l'émission de fluorescence du reporter par le phénomène de FRET (transfert d'énergie par résonance, du reporter vers le quencher), et l'émission de fluorescence du quencher se situe dans une gamme de longueur d'onde non détectable par la caméra CCD.

Durant la PCR, la sonde TaqMan s'hybride avant les amorces car elle possède un T_m supérieur de 10°C. Pendant l'extension, la sonde est coupée par l'activité exonucléase de la polymérase, libérant ainsi le reporter, et générant une augmentation du signal fluorescent.

L'utilisation des sondes TaqMan permet d'augmenter la spécificité de la réaction de PCR, car elle se fixe uniquement sur la séquence complémentaire, contrairement au Sybr®Green.

3.2. Application de la chimie Sybr®Green

Bien que les paramètres optimaux de la PCRQ (concentration en amorces, températures d'hybridation) soient variables selon les couples d'amorces utilisés, les conditions suivantes ont été appliquées pour tous les essais. Pour un volume total de 25µl sont ajoutés 12,5 µl de Master Mix 2x (Applied Biosystems), contenant les dNTP (dCTP, dGTP, dUTP et dATP), la Taq Polymerase, le tampon, la solution de MgCl₂ et l'Amperase UNG, 400nM de chaque amorce (sauf tests de concentration en amorces), et 5 µl de la solution d'ADN. Le volume est ajusté avec de l'eau stérile. Les réactions sont réalisées dans des tubes fermés par des bouchons optiques (Applied Biosystems) avec un appareil de PCRQ ABI 5700 (Applied Biosystems).

Le cycle thermique est composé :

- d'une phase de 2 minutes à 50°C permettant l'action de l'Amperase UNG, enzyme qui hydrolyse tout les produits contenant de l'Uracyle, et élimine ainsi toute possibilité de contamination (ARN, produits de PCR précédentes).

- d'une phase de 10 minutes à 95°C, permettant l'activation de la polymérase (enzyme « Hot Start »)

- de 40 cycles composés de 15 sec à 95°C (dénaturation) et d'une minute à 60°C (hybridation-élongation)

Les résultats sont analysés avec le logiciel GeneAmp® 5700 SDS (Applied Biosystems). Ce logiciel fournit deux types de données (Figure 5): la fluorescence émise en fonction du nombre de cycles, et donc le nombre de cycles nécessaires pour atteindre un niveau de fluorescence seuil (C_T), ainsi que les courbes de dissociation. Les courbes de dissociation indiquent la température à laquelle la moitié des polynucléotides, amorces ou amplicons, sont sous forme double brin (T_m)

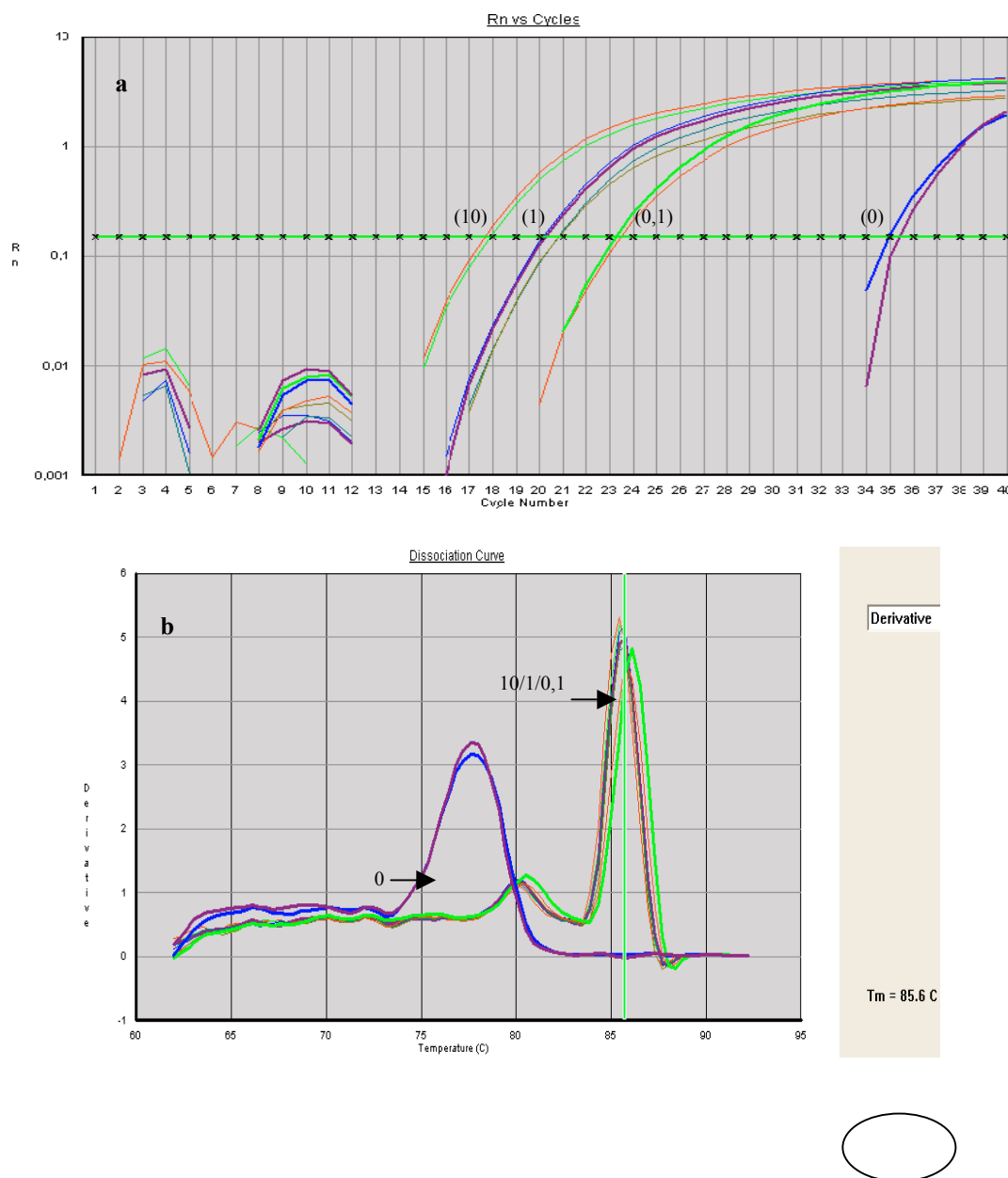


Figure 5 : Fluorescence (R_n) fonction du nombre de cycles (a) et $\frac{\partial \text{Fluorescence}}{\partial t}$ fonction de la température (courbes de dissociation) (b) du couple Euk528/Ostreo02 en présence de différentes quantités d'ADN d'*Ostreococcus tauri* (RCC116), indiquées en ng sur les graphiques. Chaque concentration est analysée en triplicat.

L'exemple de courbe de dissociation présentée indique pour les échantillons de 0,1, 1 et 10 ng deux pics distincts correspond à deux T_m , ce qui suggère que deux séquences différentes sont formées pendant la réaction. Le T_m dépend d'une part de la taille de la séquence, et d'autre part de sa richesse en GC (GC%). Il faut remarquer la présence du pic de dissociation dans les échantillons à 0 ng d'ADN (blancs), crée par la formation de polymères d'amorces, responsables du bruit de fond.

Les C_T obtenus pour chaque échantillons permettent de calculer l'efficacité (E) de la PCRQ, grâce à la relation entre le logarithme de la quantité d'ADN utilisé et le C_T correspondant (figure 6).

On obtient une droite reliant ces deux paramètres (C_T et Log_{10} quantité d'ADN) :

$$C_T = a * \log_{10} x_{DNA} + b \quad (1)$$

Si l'efficacité est de 1 (ou 100%), la quantité d'ADN cible (N) double à chaque cycle :

$$N = N_0 * (1+E)^{C_T}$$

L'efficacité de la PCRQ peut donc être calculée à partir de la pente a de la droite :

$$E (\%) = \left[1 - (10^{1/a}) \right] * 100 \quad (2)$$

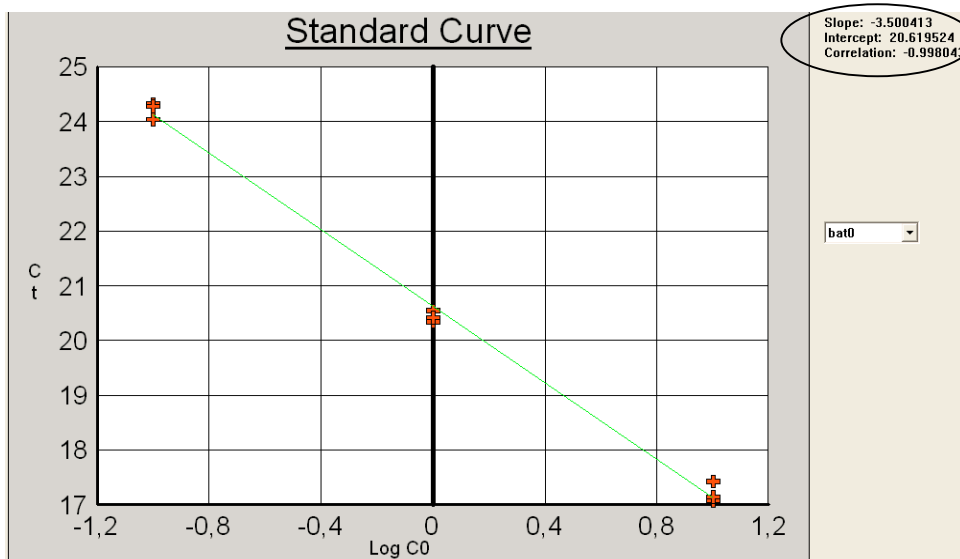


Figure 6 : Exemple de droite utilisée pour le calcul de l'efficacité de PCR, cas du couple d'amorce Euk528f/Bathy03r. (C0= quantité d'ADN utilisée).

V. Amorces utilisées.

Un nombre important d'amorces, visant des niveaux taxonomiques différents (Tableau 2 et 3), ont été élaborés à partir d'une base de données comprenant 14 000 séquences (complètes ou partielles) incluant les séquences codant pour la petite sous unité de l'ARN ribosomal (ADNr 16S ou 18S). 3600 de ces séquences proviennent d'organismes eucaryotes. La recherche de séquences conservées pour un groupe taxonomique donné, mais variable pour les groupes non ciblés, est faite à l'aide du logiciel ARB (Technical University of Munich, Germany) (D.Vaulot). Pour mettre au point des amorces spécifiques de groupes taxonomiques restreints (par exemple le genre), notre stratégie a été la suivante : la première amorces (« forward ») est une amorce universelle reconnaissant tous les eucaryotes, l'autre amorce (« reverse ») est spécifique du groupe ciblé. En ce qui concerne le couple d'amorces ciblant l'ensemble des eucaryotes (et qui sert de référence), nous avons utilisé deux zones très conservées du gène de l'ARN 18S.

Après identification des régions de l'ADN favorables à l'élaboration des amorces, le choix final est fait à l'aide du logiciel Primer Express (Applied Biosystems), qui permet la prise en compte des

différentes conditions nécessaires au fonctionnement des amorces en PCRQ. En effet, les performances de la PCRQ sont meilleures avec des amplicons courts (inférieurs à 200 pb) (Tableau 3), des amorces ne comportant pas de queue 3' riche en GC (dans les 5 dernières bases). De plus, un Tm aussi proche que possible de 58°C (Tableau 2) est nécessaire pour la phase d'hybridation. Enfin, il faut éviter que ces amorces puissent se replier sur elle-même ou s'apparier entre elles, car cela entraîne dans ces deux cas une diminution de l'efficacité de la PCRQ.

Tableau 2 : Séquence et caractéristiques des amorces en chimie SybrGreen.

Nom de l'amorce	Type d'amorce (f/r)	Séquence de l'amorce (5' - 3')	Position sur l'ARN 16S d'E.coli	Position sur l'alignement de l'ARN 18S sous ARB	Taille (pb)	Tm (°C, d'après Primer Express)	GC %
Euk309f_QPCR	f	CCGGAGAGGGAGCCTGA	309	3816	17	58	71
Euk345f_QPCR	f	AAGGAAGGCAGCAGGCG	345	3871	17	59	65
Euk500f_QPCR	f	TTRGAGGGCAAGTCTGGTG	500	4799	19	58	58
Euk528f_QPCR	f	CCGCGGTAATTCCAGCTC	524	5373	18	58	61
Euk528r_QPCR	r	GAGCTGGAATTACCGCGG	524	5373	18	58	61
CHL02r_QPCR	r	CTTCGAGCCCCCAACTTTC	765	7988	19	58	58
NCHL02r_QPCR	r	TCTTCGATCCCCTAACTTTCGT	765	7985	22	58	45
PRAS03r_QPCR	r	CCACCAGTGCACACCGG		5696	17	58	71
PRAS04r_QPCR	r	CAAGCGTAAGCCCGCTTT		7984	18	58	56
CRYPT12r_QPCR	r	CGGCCCAACTGTCCC	658	7579	16	59	75
PRYM02r_QPCR	r	GGAATACGAGTGCCCCTGAC	664	7594	20	58	60
BOLI02r_QPCR	r	TCATTACCTAGGTACGCAAACCAA	651	7186	24	59	42
PELA01r_QPCR	r	AACGTCCTTGTTTCGACGCTT	729	7722	20	58	50
OSTRE02r_QPCR	r	AGTAACCACGGTGACTAAGTGGC	651	6803	23	58	52
BATHY02r_QPCR	r	AAGTAACCACGATGACTCCATGTC	651	6828	24	58	46
BATHY03r_QPCR	r	ACCACGATGACTCCATGTCTCA	651	6822	22	59	50
MICRO02r_QPCR	r	GTCCAGACGATTAAGCCCAGA	651	6761	21	58	52
MICRO03r_QPCR	r	GCACGTCTCTACAGGAAGTTAAA	645	5896	24	58	56
MICRO04r_QPCR	r	CGCGTCCTCTACAGGAAGTTG	647	5898	21	59	57

f/r : amorces forward ou reverse

GC% : pourcentage en bases G et C

Tableau 3 : Caractéristiques des couples d'amorces

Groupe phylogénétique	Organismes ciblés	Amorce forward	Amorce reverse	Taille de l'amplicon (pb)	Nombre de séquences reconnues
Eucaryotes	Tous	Euk309f	Euk528r	209	3000
	Tous	Euk345f	Euk528r	174	3000
	Tous	Euk528f	Euk765r		3000
Chlorophyta	Tous	Euk528f	CHL02r	410	915
non Chlorophyta	Tous	Euk528f	NCHL02r	425	1755
Prasinophyceae	Prasinococcales	Euk528f	PRAS03r	111	8
	Mamiellales	Euk528f	PRAS04r	205	139
Cryptophyta	Tous	Euk528f	CRYPT12r	305	68
Prymnesiophyceae		Euk528f	PRYM02r	321	91
Heterokontophyta	Bolidophycées	Euk528f	BOLI02r	292	19
	Pelagophycées	Euk528f	PELA01r	395	20
Prasinophycées	<i>Ostreococcus sp.</i> OTTH059S	Euk528f	OSTRE02r	167	43
	<i>Bathycoccus sp.</i>	Euk528f	BATHY02r	176	32
		Euk528f	BATHY03r	171	32
	<i>Micromonas</i> CCMP 490	Euk528f	MICRO02r	157	14
	<i>Micromonas</i> CCMP 489	Euk528f	MICRO03r	136	29
<i>Micromonas</i> BL 122	Euk528f	MICRO04r	135	13	

Résultats et discussion

I. Extraction et dosage de l'ADN

Avant d'appliquer la PCRQ à des échantillons prélevés en milieu naturel, il est nécessaire de calibrer la méthode à partir des cultures. Pour cela, il nous fallait estimer les quantités d'ADN extractibles chez les espèces utilisées. Ces données sont obtenues grâce à des extractions après centrifugation ou après filtration des cultures, la deuxième méthode étant plus appropriée pour les échantillons naturels.

1. Extractions après centrifugation ou filtration

Afin d'estimer l'influence du type de traitement sur la quantité d'ADN extraite, selon l'espèce et le protocole utilisé, les extractions d'ADN ont été réalisées sur trois espèces de la classe des Prasinophycées (RCC 113, 114 et 116, Tableau 1) par le méthode au CTAB. Une extraction au phénol/chloroforme a également été réalisée, sans amélioration des résultats (non présentés). Le comptage cellulaire en cytométrie de flux suivi du dosage par spectrophotométrie permettent le calcul de la masse d'ADN extraite par cellule traitée (Tableau 4). Les extractions ont été dosées en duplicat.

Tableau 4 : Comparaison des quantités moyennes d'ADN génomique extrait par cellules, pour trois espèces de Prasinophycées. Deux types d'extraction sont représentées : sur culture centrifugées ou filtrées .

Espèce	RCC et Souche	Traitement	Quantité moyenne d'ADN (fg /cellule)	Ecart type (fg)	Nombre d'échantillons
<i>Micromonas pusilla</i>	RCC 114 CCMP 490	centrifugée	24,9	3,3	4
		Filtrée	33,8		1
<i>Ostreococcus tauri</i>	RCC 116 OTTH 059S	centrifugée	26,5	7,8	3
		Filtrée	31,9	12	2
<i>Bathycoccus prasinus</i>	RCC 113□	centrifugée	66,9	1,8	2
		Filtrée	78,5		1

Les quantités moyennes d'ADN extraites se situent entre 25 et 79 fg/cellule. On remarque peu de différences d'ADN extrait entre les deux types de traitement pour une même espèce. Les quantités d'ADN extraites pour l'espèce *Bathycoccus prasinus* sont plus de deux fois supérieures aux autres espèces.

Le traitement sur filtre semble être légèrement plus efficace, cela peut-être expliqué par une meilleure lyse cellulaire lors de ce traitement, qui inclut un passage dans du tampon de lyse et à basse température (bain d'azote liquide puis congélation à -80°C), traitement qui n'est pas appliqué aux échantillons centrifugés.

Les quantités estimées d'ADN par cellule (de 32 à 79 fg) sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par cytométrie en flux par Simon et al. (1994) pour les Prasinophycées *Ostreococcus*, *Micromonas* et *Bathycoccus* (de 19 à 32 fg), sachant les incertitudes liées à la méthode en cytométrie en flux.

II. Mise au point des couples d'amorces

La mise au point des couples d'amorces passe par plusieurs étapes avant leur application aux échantillons du milieu naturel (Figure 7)

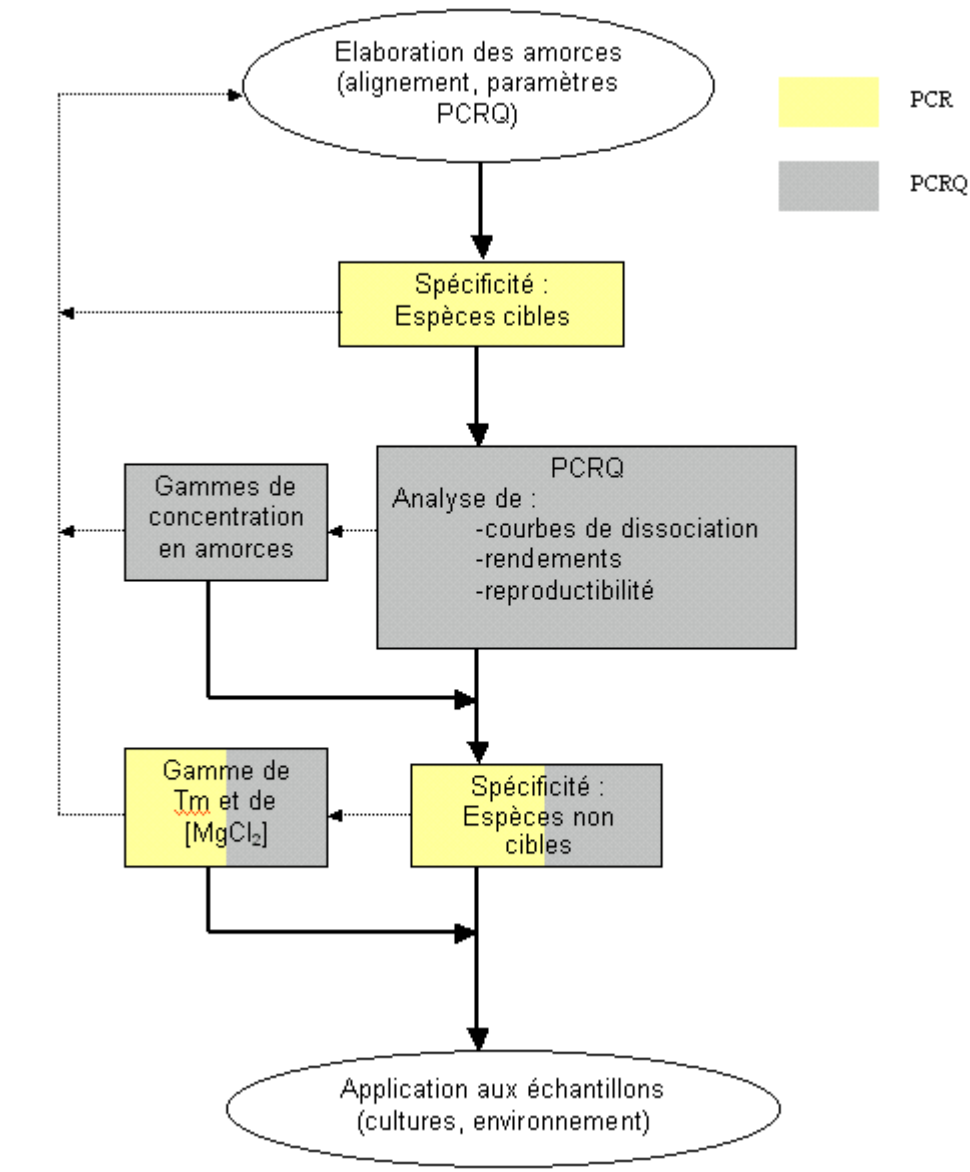


Figure 7 : Schéma synoptique des tests nécessaires pour valider un jeu d'amorces

Ces étapes comprennent l'élaboration des amorces grâce à des logiciels de bioinformatique, qui permettent la recherche de zones du gène de l'ARN 18S communes aux organismes visés, et l'intégration dans le choix des séquences des différents paramètres nécessaires à leur utilisation en PCRQ. Puis la spécificité des couples d'amorces vis-à-vis de leur ADN cible est testée en PCR, avant de les appliquer en PCRQ. L'analyse des données de PCRQ (dissociation, rendement) et de leur stabilité au cours des expérimentations (reproductibilité) mène soit à leur application à des espèces non cibles afin de valider leur spécificité, soit à l'essai de différentes concentrations en amorces afin de déterminer leur concentration optimale. Enfin, selon les résultats de spécificité sur les espèces non

cibles, le couple d'amorces sera appliqué aux échantillons naturels, ou fera l'objet de correction de la spécificité par modification des températures d'hybridation ou des concentration en ion magnésium.

1. Stratégie de mise au point des amorces.

Les données de FISH-TSA et des bibliothèques de clones (Not, Romari non publié) ont mis en évidence la présence constante de la classe des Prasinophycées dans les eaux côtières, ainsi que la prédominance en terme d'abondance du clade des Mamiellales. A l'intérieur de cette clade, le genre *Micromonas* est très nettement dominant, suivi des genre *Bathycoccus* puis *Ostreococcus* (Not, *com.pers.*)

Le choix des groupes ciblés a été fait en raison d'une part de leur présence dans les eaux côtières de Roscoff, d'autre part en raison de la disponibilité dans les banques de données de nombreuses séquences pour les représentants de cette classes ou de ces genres (Figure 9).

Cela permettait d'élaborer des amorces soit à partir de l'alignement de plusieurs séquences (Figure 8), provenant d'espèces en culture ou de clones d'espèces du milieu naturel, soit en modifiant des amorces déjà disponible pour l'hybridation in-situ (Fish) (Simon et al, 2000 ; Not et al, in prep) afin d'obtenir un Tm de 58°C.

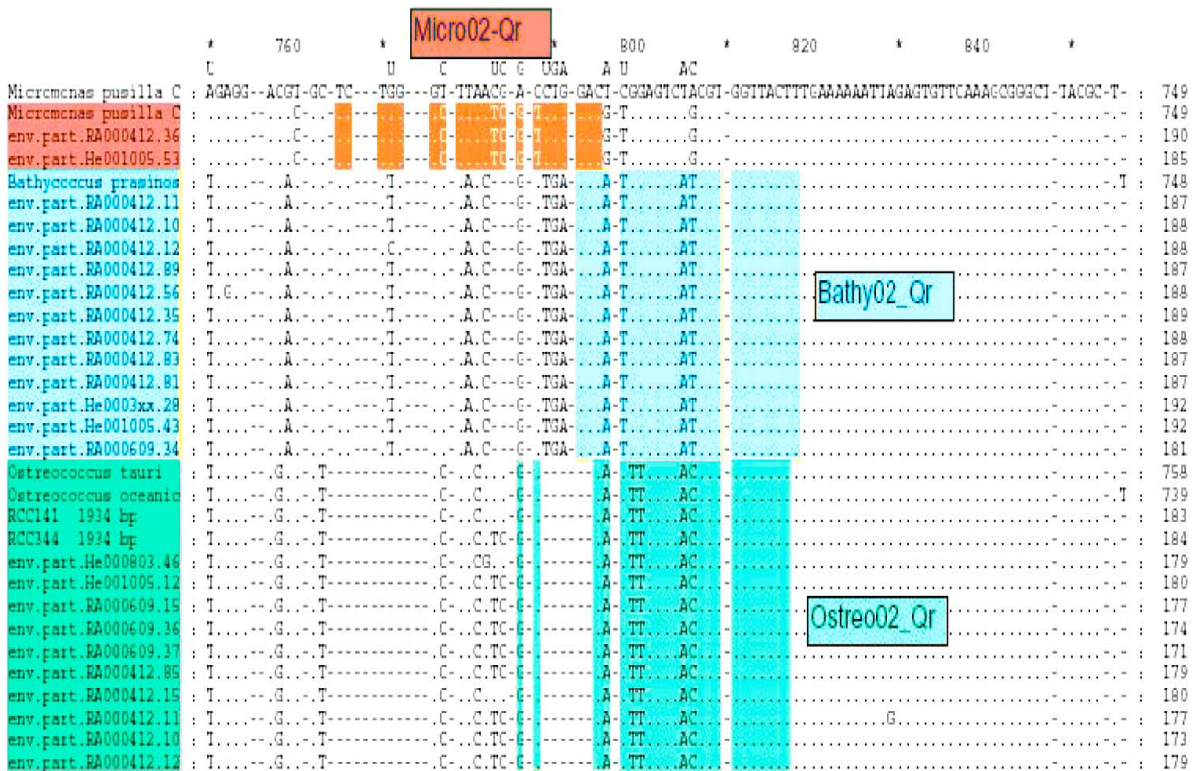


Figure 8 : Exemple de recherche de séquence spécifique pour l'élaboration d'amorces, à partir de séquences d'espèces en culture (RCC) et de clones du milieu naturel (env.part.). Les amorces Micro02 et Ostreo02 sont spécifiques des genres *Micromonas* et *Ostreococcus* respectivement.

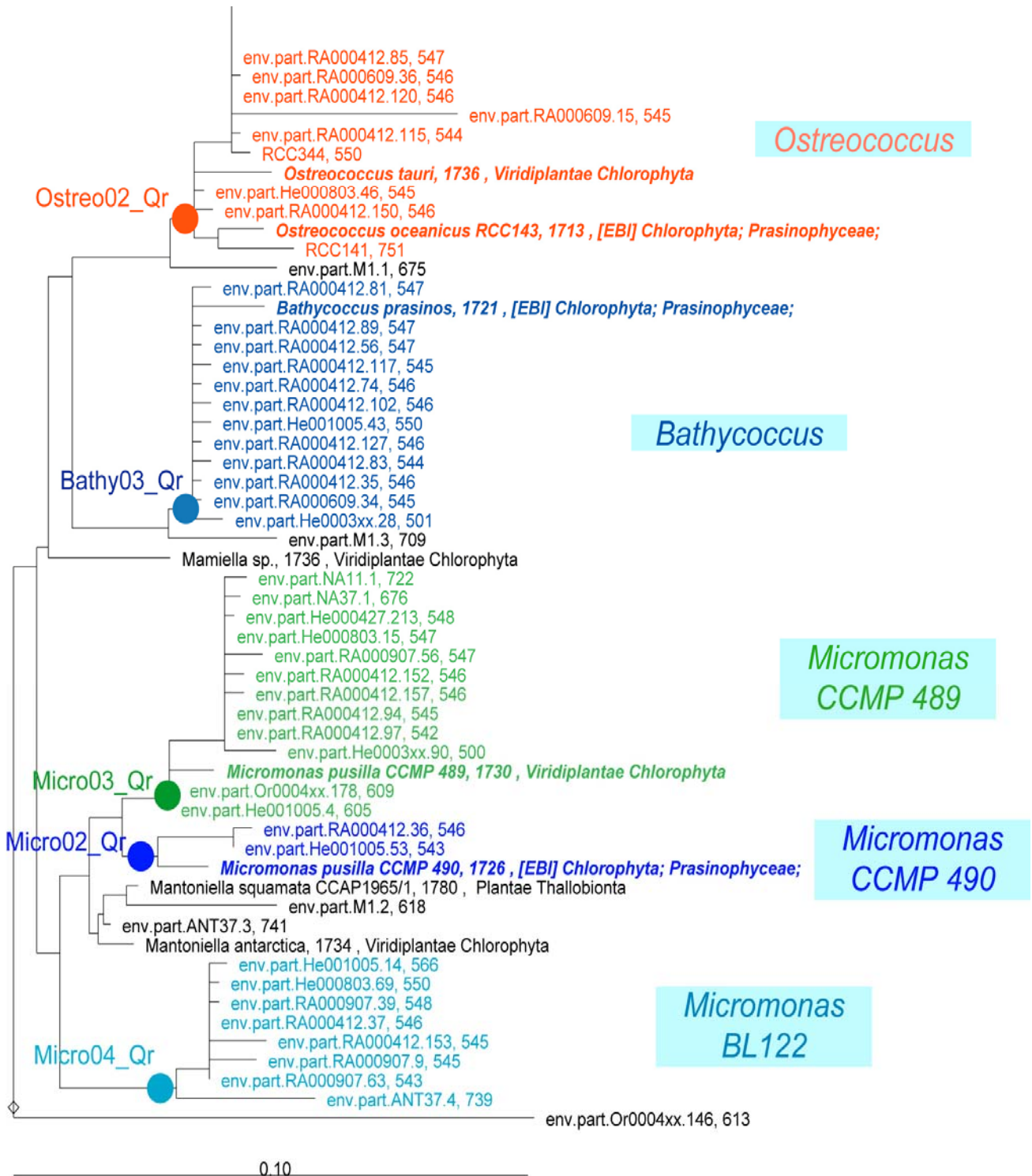


Figure 9: Arbre phylogénétique représentant, au sein du clade des Mamiellales (Prasinophycées), les différentes souches présentes dans la base de donnée ARB. Les cercles pleins représentent la position des amorces. (env.part : séquence partielle du milieu naturel)

2. Tests de spécificité en PCR simple

Pour chaque couple d'amorces une PCR est réalisée en présence de son (ou ses) ADN cible(s), pour vérifier la synthèse d'amplicons de taille prévue (Tableau 5).

Tableau 5 : Résultats des tests de spécificité en PCR simple après 35 cycles. Les cases grisées indiquent un résultat non attendu, les + et – la présence ou non d'amplicons et les chiffres entre parenthèse les températures d'hybridation pour lesquelles ces résultats ont été observés. Sont indiquées en gras les couples d'amorces sélectionnés pour la PCRQ

ADN	Règne	Blanc (H20)	Eucaryotes								Procaryote
	Phylum		Chlorophyta					Cryptophyta	Heterokontophyta		Bacteria
	Classe		Prasinophyceae					Cryptophyceae	Bolidophyceae	Pelagophyceae	Enterobacteria
	Genre		<i>Ostreococcus</i>	<i>Bathycoccus</i>	<i>Micromonas</i>			<i>Rhodomonas</i>	<i>Bolidomonas</i>	<i>Pelagomonas</i>	<i>Escherichia</i>
	Espèce		<i>tauri</i>	<i>prasinus</i>	<i>pusilla</i>	<i>pusilla</i>	<i>sp</i>	<i>salina</i>	<i>pacifica</i>	<i>calceolata</i>	<i>coli</i>
	Souche		OTTH 059S		CCMP 490	CCMP 489	BL 122	CCMP 322	OLI 31 SE 3	Prosope 63	
	RCC		116	113	114	450	434	20	205	341	
amorce spécifique			Ostreo02r	Bathy02/03r	Micro02r	Micro03r	Micro04r	Crypt12r	Boli02r	Pela01r	
Amorces :			Pras04r								
Forward	Reverse										
Euk309f	Euk528r	- (66-64,9°C)	+ (66,5-56°C)	+ (66,5-56°C)	+ (66-60°C)						+ 60°C
Euk345f	Euk528r	+ (60°C)	+ (64-60,2°C)	+ (64-60,2°C)	+ (64-60,2°C)						+ 60°C
Euk528f	Euk765r	- (60°C)	+ (60°C)	+ (60°C)	+ (60°C)			+ (60°C)	+ (60°C)	+ (60°C)	- 60°C
Euk500f	Euk765r	- (60°C)	+ (60°C)	+ (60°C)	- (60°C)						
Euk528f	Pela01r	- (60°C)	- (60°C)				- (60°C)	- (60°C)		+ (60°C)	- 60°C
Euk500f	Pras04r	- (60°C)	+ (60°C)	+ (60°C)	+ (60°C)	+ (60°C)	+ (60°C)	- (60°C)	- (60°C)	- (60°C)	- 60°C
Euk528f	Pras04r	- (60°C)	+ (60°C)	+ (60°C)	+ (60°C)				- (60°C)		- 60°C
Euk528f	Ostreo02r	- (60°C)	+ (66-60°C)	- (66-60°C)		- (66-60°C)					- 60°C
Euk500f	Ostreo02r	- (60°C)	+ (66-60°C)	- (60°C)	+ (66-60°C)						
Euk528f	Bathy02r		+ (66-64,9/61,2-60°C)	+ (66-60°C)		+ (66-60°C)					
Euk528f	Bathy03r		- (60°C)	+ (60°C)	- (60°C)	- (60°C)		- (60°C)	- (60°C)	- (60°C)	- (60°C)
Euk500f	Bathy03r	- (60°C)	- (60°C)	+ (66-60°C)				- (60°C)			
Euk528f	Micro02r	- (60°C)	- (66-60°C)	- (70-60°C)	+ (70-60°C)	+ (65,6-60°C)	+ (60°C)				- 60°C
Euk500f	Micro02r	+ (60°C)	+ (60°C)		+ (60°C)	+ (60°C)	+ (60°C)				
Euk528f	Micro03r	- (60°C)	+ (60°C)		+ (60°C)	+ (60°C)	+ (60°C)				
Euk500f	Micro03r	- (60°C)	+ (60°C)		+ (60°C)	+ (60°C)	+ (60°C)				
Euk528f	Micro04r	- (60°C)	- (60°C)		+ (60°C)	+ (60°C)	+ (60°C)				
Euk500f	Micro04r	+ (60°C)	+ (60°C)		+ (60°C)	+ (60°C)	+ (60°C)				

Pour des raisons pratiques, cette analyse est souvent couplée à un gradient de température d'hybridation, qui permet de connaître la gamme de température permettant l'amplification par PCR pour chaque couple. On vérifie aussi l'absence d'amplification avec une bactérie (*E. coli*) et avec quelques espèces non cibles dont les séquences sont proches, ainsi que l'absence d'amplicon dans les blancs (H₂O stérile). L'intégralité des tests est présenté en Annexe 1.

La spécificité des couples d'amorces les plus générales (par exemple ciblant les eucaryotes) et les plus spécifiques (d'espèce) pose le plus de problèmes. Dans le cas des eucaryotes, la présence d'un amplicon dans les blancs avec le couple Euk309f/Euk528r nous a amené à concevoir une nouvelle amorce « forward » (Euk345f). Cependant le couple Euk345f/Euk528r donne aussi une amplification dans les blancs. Ce sont les essais avec de l'ADN bactérien qui nous ont permis d'expliquer ce phénomène. En effet, la séquence où s'hybrident les amorces Euk528r comprend une zone conservée à la fois chez les procaryotes et les eucaryotes (Figure 10), en 5' du brin sens.

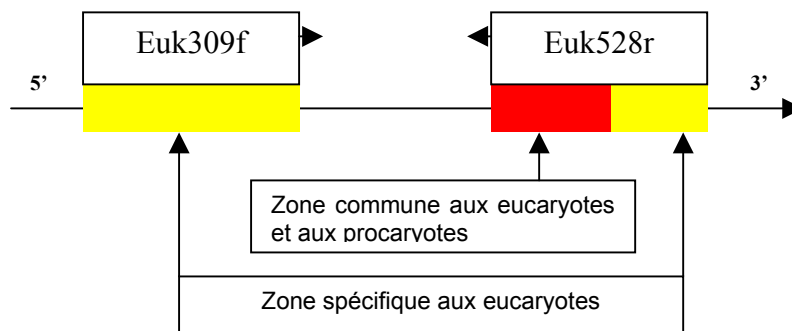


Figure 10 : Schéma représentant les zones d'hybridation des amorces Euk309f et Euk345r.

La spécificité des amorces étant fortement liée à l'hybridation de la partie 3' (côté interne de l'amorce), l'amorce Euk528r peut amplifier aussi bien les séquences de bactéries que d'eucaryotes. L'amorce Euk528f s'hybride à la séquence commune à son extrémité 5', ce qui explique qu'elle n'amplifie pas les bactéries. La présence d'amplicons dans les blancs lors de l'utilisation de Euk528r peut alors être expliquée par la contamination d'une des solutions utilisés dans la réaction.

Cette constatation nous a amené à tester un nouveau couple d'amorces « forward » (Euk500f) et « reverse » (Euk765r). L'utilisation du couple Euk500f/Euk765r s'est révélée inadéquate, puisque l'ADN d'une des souches du genre *Micromonas* (RCC114) n'a pas pu être amplifié. Finalement, le couple Euk528f/Euk765r a été retenu, puisqu'il remplit les conditions de spécificité (Tableau 5). Cependant, il n'a pas pu être testé sur un grand nombre d'eucaryotes.

L'utilisation des amorces visant les différentes souches de *Micromonas* démontre la difficulté à obtenir une forte spécificité pour des espèces possédant des séquences très proches. Aucun des couples utilisés (Euk500f ou Euk528f/Micro02r,03r,04r) n'est vraiment spécifique du groupe cible, et l'amorce Euk500f induit l'amplification de plus d'espèces non cibles au sein des Prasinophycées. L'explication du manque de spécificité peut provenir du peu de différences entre la séquence des amorces et celle des organismes non cibles pour Micro04r (seulement deux bases non complémentaires avec les souches CCMP490 et 489). Par contre Micro03r possède 4 bases non complémentaires avec CCMP

490 et Micro02r en possède 5 avec CCMP 489 et 6 avec BL 122, ce qui devrait théoriquement être suffisant pour empêcher l'amplification.

Cependant, à défaut de pouvoir distinguer les trois clades du genre *Micromonas* les couples Euk528f/Micro02r et 04r nous permettent de détecter les trois représentants de ce genre. La spécificité du couple Euk528f/Micro02r ayant été testée pour plusieurs températures d'hybridation, il a été choisi pour l'application en PCRQ.

Deux autres couples d'amorces, Euk528f/Ostreo02r et Euk528f/Bathy03r, semblent être spécifiques des organismes cibles, les témoins négatifs n'étant pas amplifiés (Tableau 5).

Enfin, la spécificité des amorces visant les organismes à l'échelle de la classe (Pela01) ou de la famille (Pras04) est confirmée vis à vis du groupe ciblé.

3. Analyse de l'efficacité en PCRQ

Dans le but de quantifier des espèces (ou un autre niveau taxonomique) relativement à l'abondance d'un niveau taxonomique plus élevé (par exemple les eucaryotes), la réaction de PCRQ doit se dérouler avec la même efficacité en présence des deux couples d'amorces utilisés. Cette efficacité (E) est calculée à partir de la pente de la droite de régression $C_t=f(\log \text{ quantité ADN cible})$ (voir Matériel et Méthode, §3.2, équations (1) et (2)). Ce paramètre a donc été analysé pour les différents couples d'amorces et comparé aux résultats obtenus pour le couple Euk528f/Euk765r (Figure 11).

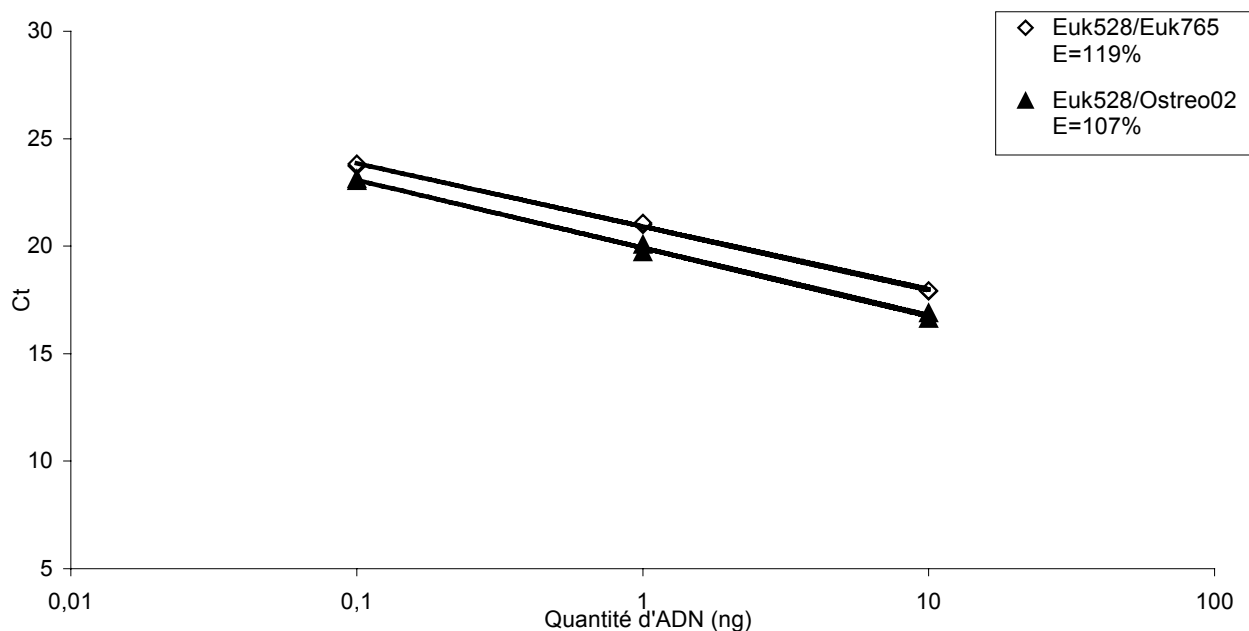


Figure 11 : Exemple de comparaison des efficacités (E) en PCRQ. Deux couples d'amorces (Euk528f/Euk765r et Euk528f/Ostreo02r) ont été utilisés sur de l'ADN d'*Ostreococcus tauri* (RCC116) extrait sur filtre.

Les deux couples d'amorces ont des efficacités identiques. Il faut remarquer que le C_T est plus faible avec le couple Euk528f/Ostreo02r, (ce qui indique que la fluorescence est plus forte pour un même nombre de cycles de PCRQ. Cela est surprenant car l'amplicon est plus court (Tableau 3), ce qui devrait induire une fluorescence plus faible.

4. Optimisation des conditions de PCRQ

L'analyse de la spécificité et de l'efficacité nous a amené, pour les couples d'amorces ne présentant pas des caractéristiques optimales, à ajuster deux paramètres : la concentration en amorces et la température d'hybridation.

La réaction de PCRQ a donc été réalisée avec différentes concentrations en amorces pour rechercher la concentration induisant les valeurs de C_T les plus faibles, et par conséquent l'amplification la plus efficace (Figure 12).

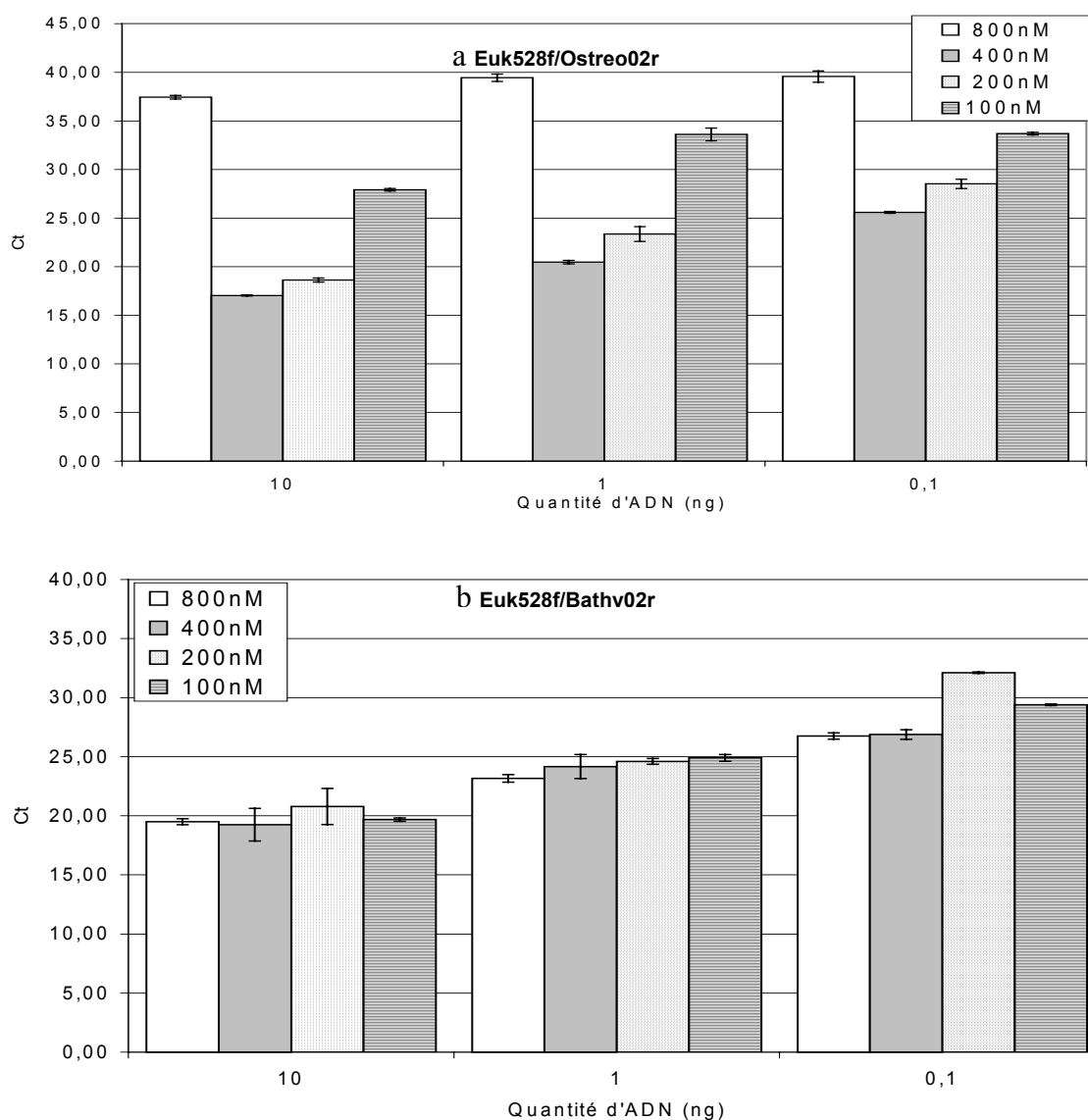


Figure 12 : Exemple d'effet de la concentration en amorces sur la valeur du C_T . (a) couple d'amorces spécifiques du genre *Ostreococcus* (Euk528f/Ostreo02r), (b) couple d'amorces spécifiques du genre *Bathycoccus* (Euk528f/Bathv02r), utilisés à 100, 200, 400 et 800 nM.

La conséquence des variations de concentrations en amorces est différente pour les deux couples considérés. La concentration des amorces spécifiques de *Bathycoccus* semble avoir plus d'effet pour des faibles concentrations d'ADN (0,1 ng), et les meilleurs résultats sont obtenus pour les

concentrations en amorces plus élevées, bien qu'il y ait peu de différence entre les résultats obtenus avec 400 et 800 nM d'amorces.

Concernant les amorces spécifiques d'*Ostreococcus*, l'effet de leur concentration est notable pour toute la gamme de concentration en ADN. Les quantités croissantes d'amorces jusqu'à 400nM ont pour effet d'améliorer la fluorescence, mais, à 800 nM, le seuil de concentration maximal utilisable semble être atteint. On peut donc conclure d'une part que la concentration de 400nM peut être utilisée pour ces deux couples d'amorces, d'autre part que le couple d'amorce Euk528f/Ostreo02r est plus sensible à la fois la limitation et à l'excès d'amorces.

En parallèle, des gammes de températures d'hybridation ont été effectuées afin de déterminer dans quelle mesure la spécificité pouvait être corrigée à l'aide de ce paramètre (Figure 13). Pour un aperçu plus complet des essais effectués, voir Tableau 5 et Annexe 1.

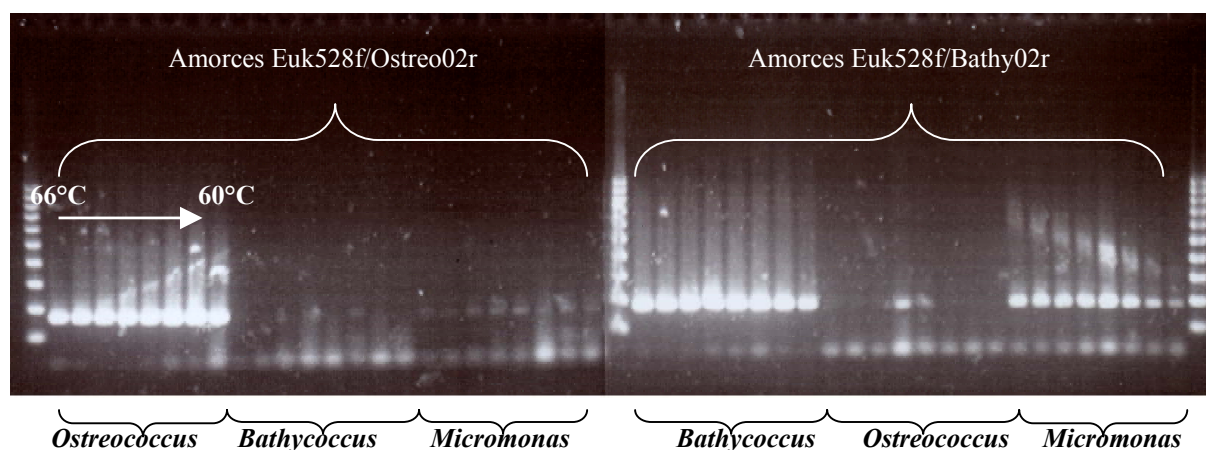


Figure 13: Exemple de l'effet de la température d'hybridation sur la spécificité des amorces Ostreo02r et Bathy02r, vis à vis de l'ADN de trois espèces différentes. : *Ostreococcus tauri* (RCC 116), *Bathycoccus prasinos* (RCC 113) et *Micromonas pusilla* (CCMP489)

Le couple Euk528f/Ostreo02r est spécifique vis à vis de son ADN cible quelle que soit la température d'hybridation utilisée. On note cependant des traces d'amplificons en présence de l'ADN de RCC113 et CCMP 489, dont l'effet en PCRQ devra être examiné.

La spécificité du couple Euk528f/Bathy02r vis à vis de *Micromonas* CCMP 489 ne peut pas être améliorée par la température d'hybridation, ce qui confirme la nécessité d'élaborer d'une nouvelle amorce « reverse » (Bathy03r, voir ci dessus, §1)

5. Tests de spécificité en PCRQ une fois la réaction optimisée

Une fois la concentration optimale et la gamme de température de spécificité des amorces connues, la spécificité en PCRQ peut alors être vérifiée. Pour cela, chaque couple est mis en présence de son ADN cible, d'un ou plusieurs négatifs (gamme de concentration d'ADN non cible) et d'un blanc (H₂O stérile). Les valeurs de C_T obtenues avec la gamme de concentration d'ADN cible (10,1 et 0,1 ng) sont ensuite comparées avec celles obtenues avec 10 ng d'ADN non cibles et avec de l'eau (Tableau 6).

Tableau 6 : Exemples de valeurs de C_T obtenues pour différents couples d'amorces en présence d'ADN cible, non cible et d'eau.

Amorces		Nom de la cible			Type de Cible	ADN (ng)			H ₂ O
Forward	Reverse	Genre	RCC	Souche		10	1	0,1	
Euk528f	Euk765r	<i>Ostreococcus</i>	116	OTTH 059S	+	17	20,2	22,7	26,2
		<i>Escherichia coli</i>			-	26,2			
Euk528f	Osreo02r	<i>Ostreococcus</i>	116	OTTH 059S	+	17,1	19,8	23,6	35
		<i>Bathycoccus</i>	113		-	33,6			
		<i>Micromonas</i>	114	CCMP 490	-	34,6			
		<i>Micromonas</i>	450	CCMP 489	-	34,9			
Euk528f	Bathy03r	<i>Bathycoccus</i>	113		+	17,2	20,4	24,2	39
		<i>Micromonas</i>	114	CCMP 490	-	34,6			
Euk528f	Micro02r	<i>Micromonas</i>	114	CCMP 490	+	17,2	20,3	24	34,2
		<i>Bathycoccus</i>	113		-	35,8			
		<i>Ostreococcus</i>	116	OTTH 059S	-	31,7			
Euk528f	Pras04r	<i>Ostreococcus</i>	116	OTTH 059S	+	16,1	20,8		29,5

Quelles que soient les amorces utilisées, les valeurs de C_T obtenues avec les ADN non cibles et les blancs (Tableau 6) sont supérieures à celles obtenues avec les plus basses concentrations d'ADN cibles. Cela permet de valider la spécificité des amorces dans la gamme de concentration d'ADN utilisé, dans la mesure où la fluorescence générée par l'ADN non cible est proche ou égale au bruit de fond (fluorescence générée par l'eau), et n'interfère jamais avec la fluorescence des ADN cibles.

Enfin, les C_T obtenus pour les différents ADN cibles sont proches pour des concentrations identiques bien que les écarts augmentent avec la diminution des quantités d'ADN. La différence de taille des amplicons produits (voir Tableau 3) a donc peu d'influence sur la fluorescence émise.

Le manque de données pour l'ADN non cible pour Pras04 et Bathy03 provient de l'élaboration plus tardive de ces amorces, qui demandent à être validées sur une plus grande diversité d'ADN non cible.

III. Caractéristiques de la méthode

A partir des amorces mises au point, plusieurs points concernant la méthode restaient à éclaircir en vue de l'application aux échantillons du milieu naturel. Tout d'abord, il fallait s'assurer de la reproductibilité des résultats sur l'ADN extrait à partir de cultures, puis évaluer l'effet de l'extraction après filtration ainsi que les limites de détection pour chaque couple d'amorces.

1. Reproductibilité

La reproductibilité des résultats a été contrôlée pour deux couples d'amorces (Euk528f/Euk765r et Euk528f/Ostreo02r) par plusieurs PCRQ sur différents ADN d'une même souche (*Ostreococcus*,

souche OTTH059S). Les valeurs de C_T pour chaque concentration d'ADN ont ensuite été moyennées afin d'estimer la dispersion des valeurs (Tableaux 7 et 8)

Tableau 7 : Reproductibilité des résultats de PCRQ pour le couple d'amorce Euk528f/Euk765r

	Quantité d'ADN (ng)		
	10 n=8	1 n=8	0,1 n=6
Moyenne C_T	17,0	20,0	22,5
Ecart-type	0,6	0,7	0,3

Les moyennes obtenues sont calculées à partir des résultats de 3 PCRQ différentes, où les quantités d'ADN sont appliquées en duplicat ou triplicat. La droite de régression (équation (1)) appliquée à ces données possède une pente de $-2,78$, soit une efficacité moyenne (équation (2)) de 128% ($R^2=0,94$) (figure non présentée).

Cette efficacité supérieure à 100% peut être causée par l'amplification de séquences non cibles, ou par la formation de dimères d'amorces pour les basses concentrations en ADN, générant un signal fluorescent supplémentaire à celui dû à l'ADN cible. Cette hypothèse est appuyée par la présence d'un pic de dissociation supplémentaire lors de l'utilisation de basses concentrations d'ADN (non présenté), une diminution des concentrations d'amorces serait à tester dans ce cas.

L'écart type ne dépasse pas 0,69 (pour 1 ng), sachant qu'un cycle de PCR équivaut au doublement de la quantité de séquence cible, cet écart type maximal représente un variation de 1,6 fois la quantité de gène cible initiale.

Tableau 8 : Reproductibilité des résultats de PCRQ pour le couple d'amorce Euk528f/Ostreo02r

	Quantité d'ADN (ng)				
	10 n=20	5 n=4	1 n=23	0,5 n=6	0,1 n=20
Moyenne C_T	15,8	17,2	18,9	20,2	22,9
Ecart-type	0,7	0,6	0,8	0,6	1,0

Ces résultats proviennent de neuf PCRQ différentes, sur de l'ADN d'*Ostreococcus* provenant de quatre extractions différentes. Toutes les gammes n'ont pas été faites à partir des mêmes concentrations, ce qui explique les différences dans le nombre de données. La droite de régression pour cette série possède un coefficient directeur de $-3,49$, soit une efficacité moyenne de PCR de 93 % ($R^2=0,91$, non présenté)

Les écarts-types sont notablement plus élevés que dans le cas du couple Euk528f/Euk765r.

Cette efficacité plus faible, associée à la plus grande variabilité des résultats pour 0,1 ng d'ADN, est à comparer aux données du tableau 6. En effet, il apparaît que ce sont les amorces visant les ensembles taxonomiques les plus restreints qui génèrent les C_T les plus fort à basse concentration d'ADN, ainsi que les efficacités les plus faibles. Dans ce cas, on peut supposer que les conditions de

PCR ne sont pas réellement optimales à cette basse concentration, et qu'un ajustement supplémentaire ($[MgCl_2]$) serait nécessaire.

L'écart type maximal (1,04) équivaut à un doublement de la quantité de séquence cible, et représente le minimum de précision de la méthode.

2. Influence de la méthode d'extraction de l'ADN

L'influence de la méthode d'extraction est estimée par une PCRQ réalisée sur l'ADN d'*Ostreococcus*(RCC116) extrait à partir d'une même culture selon les deux méthodes (extraction après filtration ou centrifugation)(Figure 14)

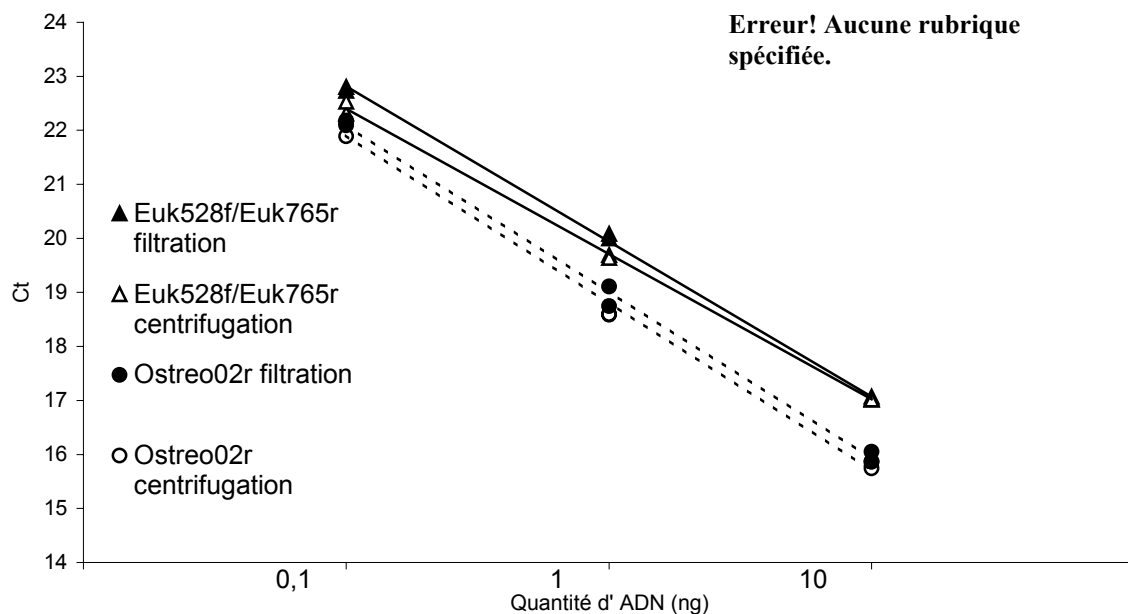


Figure 14 : C_T fonction de la quantité d'ADN de RCC116 extrait après filtration et centrifugation, pour deux couples d'amorces (Euk528f/Euk765r et Euk528f/Ostreo02r).

Les valeurs obtenues pour un même couple d'amorce présentent suffisamment peu de différences pour pouvoir conclure à l'équivalence des deux méthodes d'extraction. Il faut remarquer cependant que les extractions réalisées sur filtre aboutissent à des C_T légèrement plus élevés pour une même concentration d'ADN. Etant donné que la réaction de PCR est de type exponentielle, ce phénomène pourrait provenir de l'incertitude sur les concentrations, liées au dosage spectrophotométrique, d'ADN introduit. D'autre part, cela souligne l'importance de la quantification relative (quantité d'ADN d'*Ostreococcus* par rapport à la quantité d'ADN total d'origine eucaryote par exemple) comme méthode de normalisation.

Comme pour les données utilisées pour l'estimation de la reproductibilité, on observe une efficacité plus importante pour les PCRQ réalisées avec le couple Euk528f/Euk765r, et ce quel que soit la méthode d'extraction.

3. Limites de détection théorique

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la limite inférieure de détection (quantité minimale de cellules détectables), pour évaluer l'applicabilité de la méthode à des organismes présents en faible quantité.

Dans le but d'obtenir un ordre de grandeur de la limite de détection en terme de quantités d'ADN, une limite théorique peut être calculée à partir de l'équation des droites de régression (pente a et ordonnée à l'origine b , voir équation (1)), établies pour chaque couple d'amorces. Les valeurs extrêmes de la limite de détection sont calculées grâce aux valeurs minimales et maximales de C_T obtenues avec de l'eau (assimilée au bruit de fond maximal). (Tableau 9). Cette limite en terme de quantité d'ADN peut ensuite être traduite en nombre de cellules grâce à l'estimation de la masse d'ADN par cellule obtenue lors des extractions sur filtre (Tableau 1).

Tableau 9 : Limites de détection théoriques pour quatre couples d'amorces après optimisation de la réaction de PCRQ.

Amorces	Variables de la droite de régression		C_T des blancs		Limite théorique de détection (fg d'ADN)		Limite théorique de détection (nombre de cellules)			
	a	b	minimum	maximum	maximum	minimum	maximum	minimum	Genre	souche
Euk528f/Euk765r	-3,49	19,23	25,93	36,05	1,2E+04	1,5E+01	353,8	0,4	<i>Micromonas</i>	CCMP 490
							375,9	0,5	<i>Ostreococcus</i>	OTTH 059S
							152,3	0,2	<i>Bathycoccus</i>	
Euk528f/Ostre02r	-2,78	19,84	28,22	40	9,7E+02	5,7E-02	30,4	0,002	<i>Ostreococcus</i>	OTTH 059S
Euk528f/Bathy03r	-3,50	20,61	38,91	40	5,9E+00	2,9E+00	0,1	0,04	<i>Bathycoccus</i>	
Euk528f/Mic02r	-3,41	20,48	34,08	34,27	1,0E+02	9,0E+01	3,0	2,7	<i>Micromonas</i>	CCMP 490

Les équations présentées n'ont pas toutes la même fiabilité : celles concernant Euk528f/Euk765r et Euk528f/Ostre02r proviennent des tests de reproductibilité (Tableaux 7 et 8), et représentent donc une équation moyenne, calculée sur plusieurs essais, tandis que celles concernant Bathy03 et Mic02 proviennent d'un essai unique.

On peut donc supposer que les valeurs de limites de détection théoriques pour les deux premiers couples donnent une meilleure estimation, car elles prennent en compte la variabilité des résultats. Par contre, il faut souligner que l'équation utilisée pour le couple Euk528f/765r a été obtenue sur de l'ADN d'*Ostreococcus*. Les calculs concernant les genres *Bathycoccus* et *Micromonas* ne sont alors valables que si l'on admet que ce couple d'amorces fournit les mêmes résultats en PCRQ pour ces trois genres.

Au final, la limite de détection varie dans une large gamme, qui va de la cellule à la centaine de cellules selon les souches visées, ou de 12 pg à 0,06 fg d'ADN selon les amorces utilisées. L'augmentation de la limite de détection est essentiellement attribuable à un fort bruit de fond (C_T de 25,93 et 28,22 dans les blancs pour Euk528f/Euk765r et Euk528f/Ostre02r respectivement).

La limite de détection atteinte par Suzuki et al. (2000) pour les Archaeobactéries marines est de 0,14 pg d'ADN. En considérant notre limite maximale, nous obtenons des valeurs 86 fois supérieures à 24 fois inférieures à cette référence.

Ces limite de détection sont à comparer aux abondances des picoeucaryotes estimées par FISH, qui indiquent un minimum d'environ 1000 cellules par millilitre pour la station côtière ASTAN (au large de Roscoff).

IV. Application au milieu naturel.

Cinq amorces, visant les eucaryotes en général, le clade de Mamiellales (classe de Prasinophycées), ainsi que les genres *Micromonas*, *Bathycoccus* et *Ostreococcus*, ont été appliquées à un échantillon d'eau de mer prélevé en zone côtière. Le but de cette ultime application était de cerner les problèmes liés à l'analyse d'un mélange d'ADN d'espèces inconnu.

L'eau de mer, prélevée en Mai 2002, a été filtrée sur 0,2 μ m, avec et sans préfiltration sur 3 μ m. Deux échantillons différents ont ainsi été obtenus, contenant la totalité du phytoplancton ou uniquement la fraction picoplanctonique.

Les concentrations d'ADN obtenues après extraction sont de 41,2 ng. μ l⁻¹ pour les échantillons non préfiltrés et de 15,2 ng. μ l⁻¹ pour les échantillons préfiltrés sur 3 μ m.

La PCRQ est réalisée sur chaque échantillon, pur et dilué au centième. Un blanc est réalisé avec de l'eau stérile (pour le détail des résultats, voir Annexe 2)

Les résultats obtenus ont permis d'observer l'effet des fortes concentrations d'ADN (Figure 15 ; Annexe 2) et de la préfiltration (Tableau 10). Ces différents effet pris en compte, il a alors été possible d'analyser l'abondance des différent genres de Prasinophycées dans cet échantillon (Tableau 10).

1. Effet de la quantité d'ADN

Cinq microlitres de solution d'ADN sont utilisés pour chaque tube de PCR (voir Matériel et méthodes), cette solution pouvant être pure ou diluée au centième. Cela représente donc des quantités d'ADN de 206 et 2,06 ng pour les échantillons non préfiltrés, et de 76 et 0,76 ng pour les échantillons préfiltrés. Les valeurs de C_T obtenues sont ensuite analysées avec un seuil de 0,15.

La figure 15 montre qu'après dilution au centième, les C_T diminuent fortement. Les quantités d'ADN de l'ordre de 100 ng possèdent donc un effet inhibiteur sur la réaction. La quantité optimale d'ADN est de l'ordre du nanogramme pour Euk528f/Euk765r.

Pour les autre couples d'amorces (Voir Annexe 2) cette tendance à la diminution des C_T avec la diminution des quantités d'ADN (révélant un effet inhibiteur) est aussi observée, mais semblent se produire pour des quantités supérieures. Le couple d'amorces le plus sensible aux fortes concentrations d'ADN est le couple Euk528f/Euk765r (Annexe 2)

La différence dans la sensibilité des amorces aux quantités d'ADN peut être attribué au nombre de séquences cibles présentes dans un mélange pour ces différents couples. En effet, le couple Euk528f/Euk765r visant un ensemble taxonomique très vaste (les eucaryotes), comprenant à la fois des autotrophes et des hétérotrophes, est susceptible d'amplifier un nombre beaucoup plus important

de séquences que le couples visant un clade précis (Euk528f/Pras04r) ou des genres précis (Euk528f/Micro02r, Bathy03r ou Ostreo02r) d'autotrophes.

Les futures applications en milieu naturel devront donc être faite à partir d'une gamme de dilution importante, afin de cerner la gamme de concentration en ADN compatible avec le fonctionnement optimal des couples d'amorces. Cela permettra également d'attribuer une efficacité de PCRQ pour chaque couple d'amorces, et ainsi effectuer la quantification relative des gènes cibles.

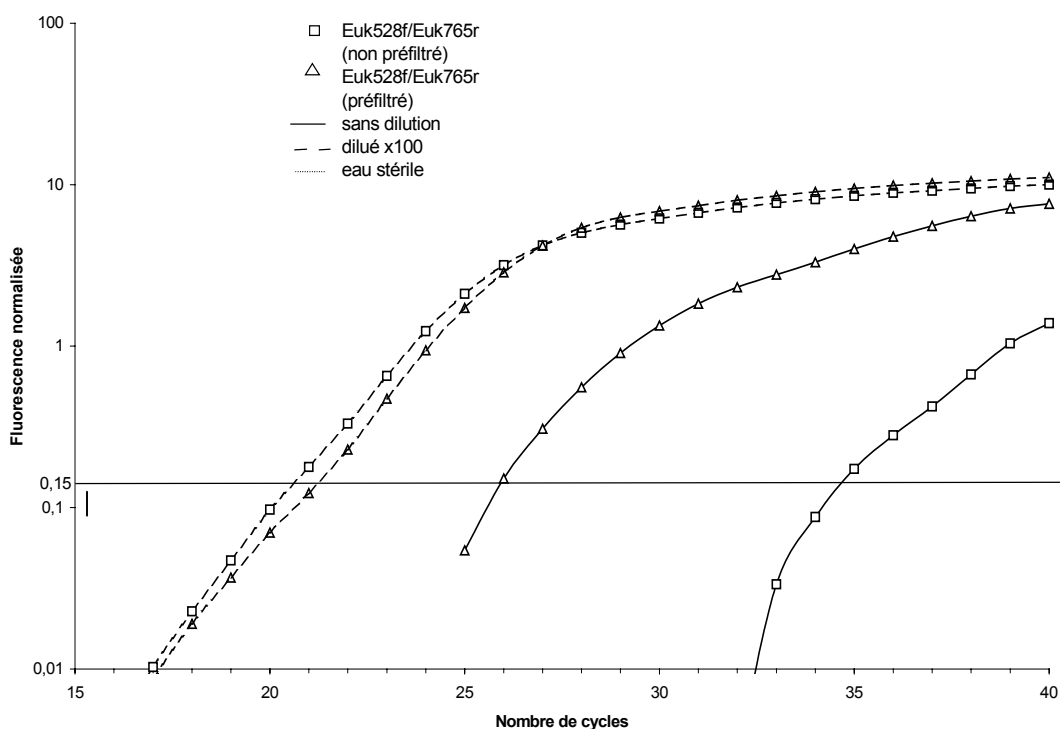


Figure 15 : Effet de la quantité d'ADN sur le C_T obtenu, pour le couple d'amorces Euk528f/Euk765r.

2. Analyse de l'abondance des picoeucaryotes.

Afin de vérifier la cohérence des résultats vis à vis des données moyennes obtenues par FISH, l'estimation de l'abondance des picoeucaryotes visés à été réalisé, à partir des données obtenues après dilution au centième (Tableau 10). Pour cela, nous avons fait l'hypothèse d'une efficacité de 100.

Nos données suggèrent que la concentration d'ADN du picoplancton représente environ 30% de l'ADN total (15,2 ng/41,2 ng). Par contre, 66% Des gènes de l'ARN ribosomal amplifié par les amorces générales se retrouve dans le picoplancton, ce qui peut être expliqué par une amplification différentielle et plus efficaces des séquences picoplanctoniques.

Tableau 10 : C_T et abondances relative des obtenus pour les différents organismes visés, dans un échantillon du milieu naturel dilué au centième

Couple d'amorces	Préfiltration sur 3µm	Quantité d'ADN (ng)	C _T	Abondance des organismes cibles, en % des eucaryotes totaux	Abondance des organismes cibles, en % des Mamiellales dans la fraction picoplanctonique
Euk528f/765r	non	2,06	20,8	100	
	oui	0,76	21,4	66,2	
Euk528f/Pras04r	non	2,06	25,4	4,0	
	oui	0,76	25,0	5,3	100,0
Euk528f/Micro02r	non	2,06	26,3	2,1	
	oui	0,76	26,0	2,8	52,1
Euk528f/Ostre002r	non	2,06	27,6	0,9	
	oui	0,76	27,0	1,4	25,4
Euk528f/Bathy03r	non	2,06	29,9	0,2	
	oui	0,76	28,9	0,4	7,0

La hiérarchie obtenue, en terme d'abondance relative, indique que les picoeucaryotes représentent plus de la moitié des eucaryotes totaux pour la station échantillonnée (Tableau 10). Cela est cohérent avec l'abondance habituellement estimée pour les picoeucaryotes [Campbell, 1994 #30].

En ce qui concerne l'abondance relative des trois genres visés au sein des Mamiellales, il apparaît que le genre *Micromonas* est nettement dominant (52,1%) au sein de cette clade. Les estimations en FISH (Not et al., *unpublished*) pour la période d'Avril à Juin 2001 indiquent une abondance relative moyenne de 47%, au large de Roscoff (station ASTAN).

Les genres *Ostreococcus* et *Bathycoccus* représentent respectivement 25 et 7% des Mamiellales. Ces résultats sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus par FISH (3,4 et 13,3% respectivement), sachant que les différences observées sont probablement attribuables au décalage temporel d'une année.

Conclusion et perspectives

Les multiples mises au point réalisées sur cette technique de PCR quantitative ont abouti à la sélection de cinq couples d'amorces susceptibles d'être utilisés pour la quantification en milieu naturel. Les amorces Euk528f/Euk765r, Euk528f/Pras04r, Euk528f/Bathy03r et Euk528f/Ostreo02r remplissent les conditions de spécificité désirées vis à vis des souches utilisées. Seul le couple Euk528f/Micro02r ne remplit pas les exigences voulues (à savoir la spécificité vis à vis d'une souche unique), mais le fait qu'il permette l'amplification des trois souches de *Micromonas* en fait une amorce applicable à la détection de ce genre.

Les limites de détection obtenues sont plus élevées pour le couple Euk528f/Euk765r que pour les autres couples d'amorces, mais permettent tout de même une détection très fine de ces organismes (de l'ordre du nanogramme d'ADN ou de la centaine de cellules). La reproductibilité des résultats est bonne, puisque les écarts type ne dépassent pas l'équivalent d'un facteur deux en quantité d'ADN détecté, pour le couple d'amorce donnant les résultats les plus variables (Euk528f/Euk765r). Cependant, la reproductibilité des résultats n'a pas été testée sur un nombre important d'échantillons pour tous les couples d'amorces.

Ces mises au point ont permis l'application de la PCR quantitative sur des échantillons d'eau de mer prélevés à Roscoff. Les résultats obtenus confirment l'applicabilité de la méthode au milieu naturel (pas de problème d'inhibition de la PCR), la spécificité vis à vis des Prasinophycées et nous ont également permis de détecter les problèmes liés à l'analyse des échantillons naturels, comme l'optimisation nécessaire de la quantité d'ADN utilisée. De plus, ils nous permettent de penser que de faibles volumes de prélèvement (de l'ordre 10 ml en milieu côtier) sont suffisants pour cette technique.

Certains problèmes ainsi que les limites liées à cette méthode ont également pu être révélés. Il apparaît, au vu du nombre d'amorces éliminées au cours des tests, qu'une attention particulière doit être portée à leur élaboration. Les principales difficultés sont d'arriver à isoler une séquence répondant aux critères assez strictes de la PCR quantitative, dans des zones du gène de l'ARN ribosomal qui laissent peu d'alternatives (Neefs et al, 1993), surtout pour les amorces visant les groupes taxonomiques les plus larges. Il est souvent apparu que même des amorces répondant théoriquement à ces critères posaient des problèmes inattendus au moment de l'application. Il semble également que le bruit de fond lié à cette méthode puisse dépendre des propriétés des amorces, notamment de leur capacité à s'hybrider entre elles.

L'application de la PCR quantitative demande un effort d'optimisation importante, qui est donc à prendre en compte pour son utilisation sur une grande variété d'organismes.

Enfin, il reste quelques expérimentations à réaliser, comme par exemple des détections de quantité connues de mélange de cultures, ou l'optimisation des concentrations en magnésium, qui n'ont pas pu être faites faute de temps. La calibration de la technique à partir de gènes du 18S clonés dans des plasmides devra être faite, pour pouvoir prendre en compte le nombre de copies de ce gène dans le génome des espèces étudiées.

L'effet des fortes concentrations en ADN sur les résultats obtenus avec les couple Euk528f/Euk765r indiquent également que des mises au point supplémentaires sont à envisager.

La chimie Taqman, la plus utilisée en PCR quantitative, notamment pour le faible bruit de fond qui lui est associé, pourrait également être appliquée aux groupes taxonomiques étudiés ici. Des essais préliminaires ont été réalisés pendant ce stage.

A moyen terme, cette méthode sera testée sur un ensemble d'échantillons naturels collectés au large de Roscoff, le long d'un transect allant d'une embouchure d'estuaire à une station en pleine mer. Les abondances déterminées pourraient être éventuellement comparées à celles obtenues par d'autres techniques telles que le FISH ou le dot blot.

Enfin, une fois ces essais réalisées en milieu naturel, la méthode pourra être appliquée à des échantillons de campagnes océanographiques.

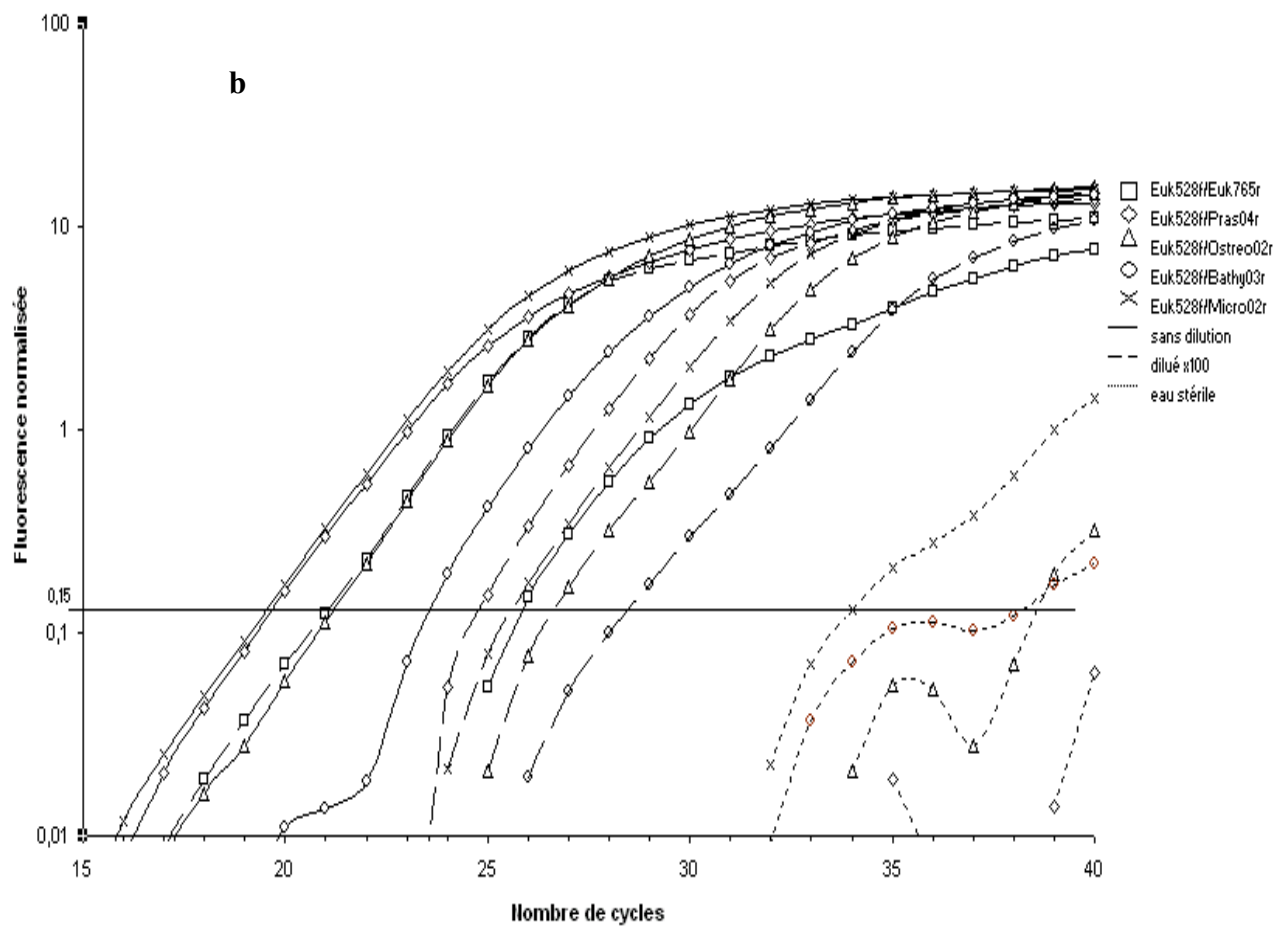
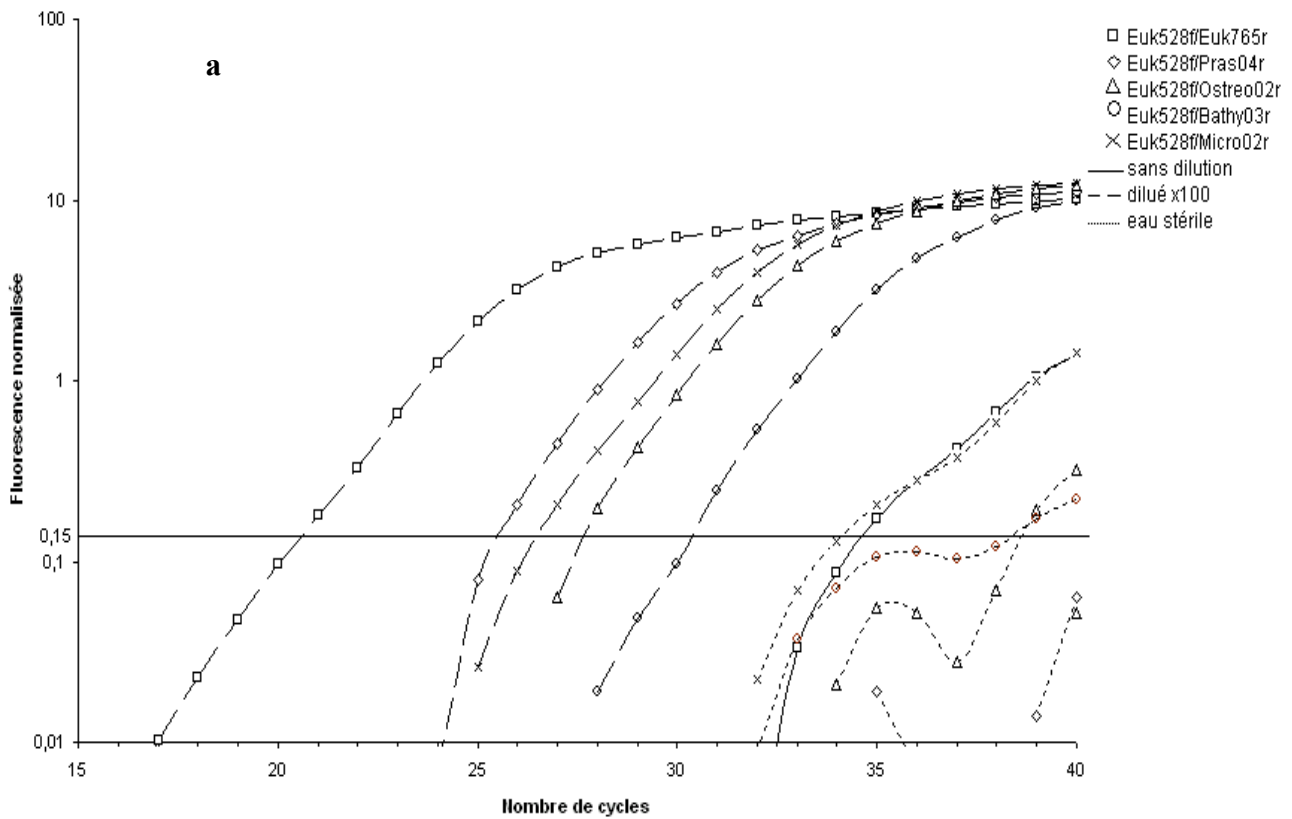
Annexes

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des tests de spécificité effectués en PCR (35 cycles). Les cases grisées indiquent des résultats non attendus, les chiffres entre parenthèse les températures pour lesquelles ces résultats sont

ADN	Règne	Blanc (H2O)	Eucaryotes							
	Phylum		Chlorophyta					Cryptophyta	Heterokontophyta	
	Classe		Prasinophyceae					Cryptophyceae	Bolidophyceae	Pelagophyceae
	Genre		Ostreococcus	Bathycoccus	Micromonas	Micromonas	Micromonas	Rhodomonas	Bolidomonas	Pelagomonas
	Espèce		tauri	prasinos	pusilla	pusilla	sp	salina	pacifica	calceolata
	Souche		OTTH 059S		CCMP 490	CCMP 489	BL 122	CCMP 322	OLI 31 SE 3	Prosoppe_63
RCC	116	113	114	450	434	20	205	341		
amorces spécifiques			Ostreo02r	Bathy02/03r	Micro02r	Micro03r	Micro04r	Crypt12r	Boli02r	Pela01r
Amorces :			Pras04r					Nchlo02r		
			Chlo02r							
Forward	Reverse		Nchlo02r							
Euk309f	Euk528r	- (66-64,9°C)	+	+	+	+				
Euk345f	Euk528r	+	+	+	+					
Euk528f	Euk765r	- (60°C)	+	+	+			+	+	+
Euk500f	Euk765r	- (60°C)	+	+	-					
528	Chlo02	- (60°C)	+	+	+		+	-	+	-
528	NChlo02	- (60°C)	+	+	+		+	+	+	+
528	Crypt12	- (60°C)	+					+	+	+
528	Boli02	- (60°C)	-					+	+	+
Euk528f	Pela01r	- (60°C)	-				-	-	-	+
Euk500f	Pras04r	- (60°C)	+	+	+	+	+	+	-	-
Euk528f	Pras04r	- (60°C)	+	+	+				-	
Euk528f	Ostreo02r	- (60°C)	+	-	-		-			
Euk500f	Ostreo02r	- (60°C)	+	-	+					
Euk528f	Bathy02r	- (60°C)	+	+	+		+			
Euk528f	Bathy03r	- (60°C)	+	+	+		+	-	-	-
Euk500f	Bathy03r	- (60°C)	+	+	+		+	-		
Euk528f	Micro02r	- (60°C)	+	+	+	+	+	+		
Euk500f	Micro02r	- (60°C)	+	+	+	+	+	+		
Euk528f	Micro03r	- (60°C)	+	+	+	+	+	+		
Euk500f	Micro03r	- (60°C)	+	+	+	+	+	+		
Euk528f	Micro04r	- (60°C)	+	+	+	+	+	+		
Euk500f	Micro04r	- (60°C)	+	+	+	+	+	+		

valables

Annexe 2 : Fluorescence en fonction du nombre de cycles, obtenu par PCRQ sur un échantillon du milieu naturel : (a) échantillon filtré sur 0,2 μm ; (b) échantillon préfiltré sur 3 μm puis filtré sur 0,2 μm . Chaque échantillon à été utilisé pur et dilué au centième. Un blanc est réalisé avec de l'eau stérile.



Bibliographie

1. **Bowers, H. A., T. Tengs, H. B. Glasgow, J. M. Burkholder, P. A. Rublee, and D. W. Oldach.** 2000. Development of real-time PCR assays for rapid detection of *Pfiesteria piscicidia* and related dinoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**(11):4641-4648.
2. **Campbell, L., H. B. Liu, H. A. Nolla, and D. Vaultot.** 1997. Annual variability of phytoplankton and bacteria in the subtropical North Pacific Ocean at Station ALOHA during the 1991-1994 ENSO event. *Deep - Sea Research Part I - Oceanographic Research Papers*. **44**(2):167-192.
3. **Campbell, L., H. A. Nolla, and D. Vaultot.** 1994. The importance of *Prochlorococcus* to community structure in the central North Pacific Ocean. *Limnology and Oceanography*. **39**:954-961.
4. **Courties, C., R. Perasso, M. J. ChretiennotDinet, M. Gouy, L. Guillou, and M. Troussellier.** 1998. Phylogenetic analysis and genome size of *Ostreococcus tauri* (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Journal of Phycology*. **34**(5):844-849.
5. **Doyle, J. J., and J. L. Doyle.** 1989. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. **12**(1):13-15.
6. **Guillou, L., M. J. Chrétiennot-Dinet, L. K. Medlin, H. Claustre, S. Loiseaux de Goer, and D. Vaultot.** 1999. *Bolidomonas*: A new genus with two species belonging to a new algal class, the Bolidophyceae (Heterokonta). *J Phycol*. **35**(2):368-381.
7. **Li, W. K. W.** 1994. Primary productivity of prochlorophytes, cyanobacteria, and eucaryotic ultraphytoplankton: measurements from flow cytometric sorting. *Limnology and Oceanography*. **39**:169-175.
8. **Li, W. K. W., and A. M. Wood.** 1988. Vertical distribution of North Atlantic ultraphytoplankton: analysis by flow cytometry and epifluorescence microscopy. *Deep-Sea Research*. **35**:1615-1638.
9. **Moon-van der Staay, S. Y., R. De Wachter, and D. Vaultot.** 2001. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*. **409**:607-610.
10. **Moon-van der Staay, S. Y., G. W. M. van der Staay, L. Guillou, D. Vaultot, H. Claustre, and L. K. Medlin.** 2000. Abundance and diversity of Prymnesiophytes in the picoplankton community from the equatorial Pacific Ocean inferred from 18S rDNA sequences. *Limnol Oceanogr*. **45**(1):98-109.

11. **Neefs, J. M., Y. Van de Peer, P. De Rijk, S. Chapelle, and R. De Wachter.** 1993. Compilation of small ribosomal subunit RNA structure. *Nucleic Acid Research*. **21**(13).
12. **Partensky, F., J. Blanchot, F. Lantoine, J. Neveux, and D. Marie.** 1996. Vertical structure of picophytoplankton at different trophic sites of the tropical northeastern Atlantic Ocean. *Deep - Sea Research I*. **43**(8):1191-1213.
13. **Partensky, F., W. R. Hess, and D. Vaultot.** 1999. *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **63**(1):106-127.
14. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning*. Cold spring harbor university press.
15. **Simon, N., R. G. Barlow, D. Marie, F. Partensky, and D. Vaultot.** 1994. Characterization of oceanic photosynthetic picoeukaryotes by flow cytometry. *Journal of Phycology*. **30**:922-935.
16. **Simon, N., N. Lebot, D. Marie, F. Partensky, and D. Vaultot.** 1995. Fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify small phytoplankton by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**(7):2506-2513.
17. **Suzuki, M. T., C. M. Preston, F. P. Chavez, and E. F. DeLong.** 2001. Quantitative mapping of bacterioplankton populations in seawater: field tests across an upwelling plume in Monterey Bay. *Aquatic Microbial Ecology*. **24**(2):117-127.
18. **Suzuki, M. T., L. T. Taylor, and E. F. DeLong.** 2000. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl Environ Microbiol*. **66**(11):4605-14.
19. **Vaultot, D., and D. Marie.** 1999. Diel variability of photosynthetic picoplankton in the equatorial Pacific. *Journal of Geophysical Research*. **104**(C2):3297-3310.