



**HAL**  
open science

# De la maîtrise de la reproduction à la sélection génétique, les enjeux de la propagation en aquaculture d'une Rhodophyte: *Palmaria palmata*

Augustin Drion

► **To cite this version:**

Augustin Drion. De la maîtrise de la reproduction à la sélection génétique, les enjeux de la propagation en aquaculture d'une Rhodophyte: *Palmaria palmata*. Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. dumas-01710007

**HAL Id: dumas-01710007**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01710007>**

Submitted on 15 Feb 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année universitaire : 2016-2017

Spécialité :

Sciences halieutiques

Spécialisation (et option éventuelle) :

Aquaculture

### Mémoire de fin d'études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

# De la maîtrise de la reproduction à la sélection génétique, les enjeux de la propagation en aquaculture d'une Rhodophyte : *Palmaria palmata*.

Par : Augustin DRION

*Soutenu à Rennes le 14 Septembre 2017*

**Devant le jury composé de :**

Président : Hervé Le Bris

Maître de stage : Philippe Potin

Enseignant référent : Hervé Le Bris

Autres membres du jury (Nom, Qualité)

Elodie Reveillac, enseignante Agrocampus Ouest

Bertrand Jacquemin, expert extérieur

*Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST*

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation

«Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France»

disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>





## Remerciements

Je remercie Catherine BOYEN directrice du laboratoire de Biologie Intégrative des Modèles marins ainsi que Catherine LEBLANC responsable de l'équipe Biologie des Algues et Interactions avec l'Environnement de m'avoir accueilli au sein de leurs unité et équipe afin que je puisse obtenir les moyens matériels de réaliser mes recherches.

Je tiens à remercier mon maître de stage, Philippe POTIN de m'avoir accordé ce stage et de m'avoir apporté son soutien, ses conseils et sa bienveillance.

Je remercie Akira PETERS de l'entreprise Bezhin Rosko pour son aide, ses remarques et ses idées.

Je remercie également Tristan LE GOFF, Ronan PIERRE et Pierre JAMES du CEVA (Centre d'Etude et de Valorisation des Algues) pour leur aimable collaboration et les différents échanges fructueux que nous avons pu avoir.

Je souhaitais également remercier Sylvie ROUSVOAL et Dominique MARIE qui m'ont accordé de leur temps et de leur énergie pour mener à bien mes expériences de génétiques et de cytométrie.

Gaëtan SCHIRES et Ian PROBERT du Centre de Ressources Biologiques Marines de Roscoff m'ont été d'une grande aide pour la mise en place de mes différentes expériences de maturations, qu'ils en soient chaleureusement remerciés.

Un grand merci également au personnel de la Station Biologique de Roscoff pour leur aide tant technique qu'administrative. Je pense particulièrement à Martine, Laurence, Maryvonne, Brigitte et Sofia-Eléna.



## Sommaire

Sommaire.....	- 1 -
Avant-propos.....	- 3 -
Introduction : de l'intérêt de développer l'aquaculture de <i>Palmaria palmata</i> .....	- 4 -
I. Matériel et méthodes.....	- 7 -
A. Matériel.....	- 7 -
1. Biologie de l'espèce.....	- 7 -
2. Aire de répartition.....	- 8 -
3. Cycle de reproduction.....	- 9 -
B. Méthodes.....	- 11 -
1. Méthodes d'échantillonnage.....	- 11 -
2. Maintien de cultures unialgales.....	- 11 -
3. Expériences de sporulation.....	- 13 -
4. Analyse de la ploïdie par cytométrie de flux.....	- 13 -
5. Identification des facteurs d'induction de la maturation.....	- 14 -
6. Mise au point d'un protocole d'extraction d'ADN.....	- 15 -
a. Broyage.....	- 17 -
b. Lyse.....	- 17 -
c. Fixation.....	- 17 -
d. Elution.....	- 17 -
e. Analyse au NanoDrop™.....	- 18 -
f. Électrophorèse.....	- 18 -
II. Résultats.....	- 19 -
A. Maintien de cultures unialgales.....	- 19 -
B. Expériences de sporulations.....	- 19 -
C. Analyse de la ploïdie par cytométrie de flux.....	- 20 -
D. Identification des facteurs d'induction de la maturation.....	- 21 -
E. Mise au point d'un protocole d'extraction d'ADN.....	- 23 -
III. Discussion.....	- 26 -
A. Maintien de cultures unialgales.....	- 26 -
B. Expériences de sporulations.....	- 26 -
C. Analyse de la ploïdie par cytométrie de flux.....	- 27 -
D. Identification des facteurs d'induction de la maturation.....	- 28 -
E. Mise au point d'un protocole d'extraction d'ADN.....	- 28 -
Conclusions et perspectives.....	- 29 -
Bibliographie.....	- 31 -
Annexes.....	- 34 -

Annexe 1 : Protocole de préparation du milieu SFC .....	ii
Annexe 2 : Protocole de préparation du milieu Von Stosch .....	iii
Annexe 3 : Identifications des diatomées et traitement (2 pages) .....	iv
Annexe 4 : Préparation d'antibiotiques liquides .....	vi
Annexe 5 : Résultats complets de l'analyse de ploïdie par cytométrie de flux.....	vii

## Avant-propos

L'étude décrite dans ce mémoire a été réalisée dans le cadre du projet IDEALG, financé par les Fonds d'Investissements d'Avenir. Ce projet vise à développer l'industrie des macro-algues en France et se déroule de 2011 à 2019. Placé sous la coordination scientifique de Philippe POTIN il est divisé en trois axes eux-mêmes subdivisés en différents workpackages qui concernent chacun une partie précise du développement de cette industrie ; de l'amélioration de la connaissance sur la biologie des algues (AXE 1) à leurs applications en biotechnologies (AXE 2) tout en assurant la durabilité de la ressource (AXE 3), (Potin, 2010). Cette organisation est décrite dans la Figure 1.

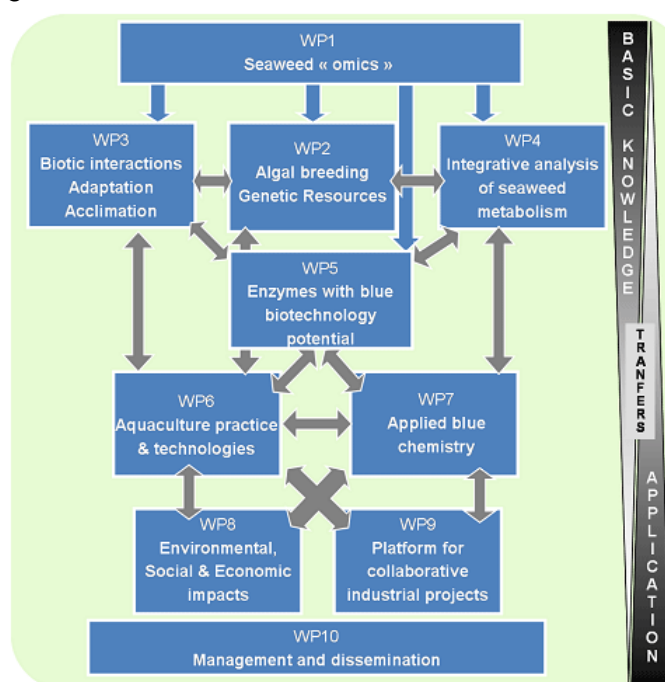


Figure 1 : organisation des différents workpackage au sein du projet IDEALG (source : [www.idealg.ueb.eu](http://www.idealg.ueb.eu))

Cette étude fait partie du workpackage 6 qui concerne le développement des techniques et des pratiques en aquaculture. Il vient en appui des recherches menées par différentes structures impliquées dont le CEVA, la société Aléor ou encore Bezhin Rosko. Le travail réalisé s'est donc voulu collaboratif avec ces entreprises et nous avons eu à cœur de nous tenir informés des avancées de nos recherches afin de mener à bien ce projet.



## Introduction : de l'intérêt de développer l'aquaculture de *Palmaria palmata*.

Contexte économique :

La culture d'algues marines, réalisée par plus de 50 pays, augmente rapidement et représente la majorité des plantes aquatiques cultivées dont la production mondiale s'élevait en 2016 à 27,3 millions de tonnes pour une valeur estimée à 5,6 milliards de dollars (FAO, 2016). Toujours selon la FAO l'augmentation annuelle de la production a avoisiné les 8% par an ces dix dernières années, contre un peu plus de 6% par an lors de la décennie précédente.

L'Asie est le plus gros producteur d'algues et représente à elle seule près de 99% de la production mondiale, Chine en tête, mais avec une part importante d'algues importées pour alimenter son secteur industriel des colloïdes d'algues brunes et rouges. L'Indonésie a joué un rôle important dans l'augmentation de la production mondiale ces dernières années, en multipliant par 10 sa production d'algues cultivées entre 2005 et 2014. Elle produit actuellement plus de 10 millions de tonnes notamment grâce à la culture des algues rouges tropicales *Kappaphycus alvarezii* et *Eucheuma spp.* essentiellement pour l'extraction de carraghénanes gélifiants (FAO, 2016).

La production européenne, essentiellement issue de la récolte, représente moins de 1% de la production mondiale, avec pour principaux pays producteur la Norvège, la France, l'Irlande et le Danemark (IDEALG Pôle halieutique Agrocampus Ouest, 2015).

Contrairement au reste du monde, la France produit essentiellement ses algues par la récolte. En effet si la production annuelle française avoisine les 90 000 tonnes par an, la part de l'aquaculture ne dépasse pas les 500 tonnes (Kalaydjian, Girard, 2017). L'activité de récolte représente 3% de la récolte mondiale (Sasi Nayar and Kriston Bott, 2014). Cette activité est essentiellement réalisée en Bretagne par des navires équipés de scoubidoues ou de peignes norvégiens selon les espèces ciblées. Au total entre 30 et 35 navires sont armés à la production d'algues brunes laminaires, essentiellement en Finistère représentant 90% de la production. Les 10% restants sont récoltés par des récoltants d'algues de rive pour des algues croissant sur les estrans rocheux découverts à marée basse. En 2015, 6000 tonnes fraîches d'algues de rive ont été livrées aux entreprises de transformation (Frangoudes, 2016).

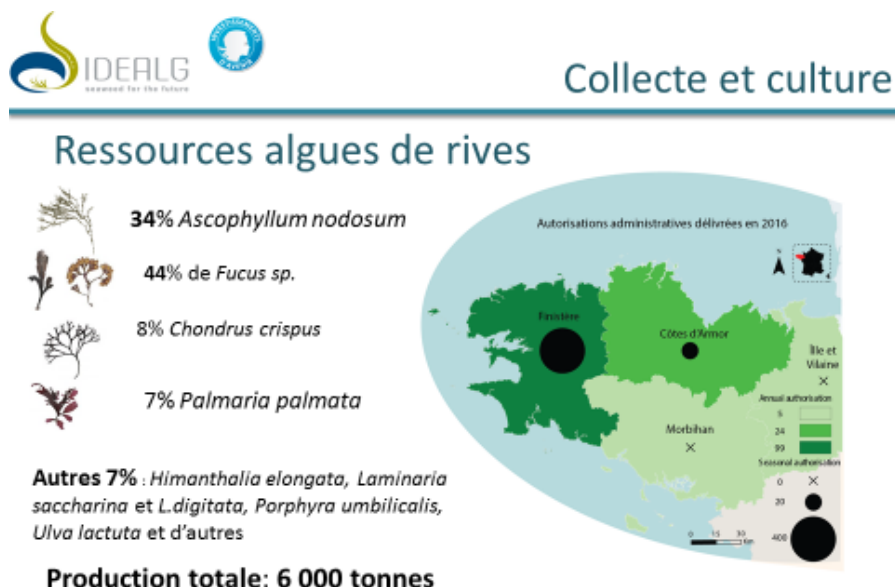


Figure 2 : Répartition de la récolte des algues de rives en Bretagne pour l'année 2016.  
source : Frangoudes, 2016

L'algue rouge *Palmaria palmata* représente 7% de ce tonnage comme indiqué en Figure 2 et est essentiellement vendue aux entreprises du secteur des algues alimentaires et de l'alimentation animale, notamment pour la nutrition des ormeaux dont elle constitue la principale algue de leur régime alimentaire. Ces marchés porteurs génèrent près de 1600 emplois essentiellement en Bretagne, tant dans l'exploitation que la valorisation des ressources pour une valeur avoisinant les 430 millions d'euros. (IDEALG Pôle halieutique Agrocampus Ouest, 2015).

#### De l'intérêt économique de *Palmaria palmata*

Les macro-algues dans leur ensemble sont au cœur d'un grand développement économique, en témoigne le grand nombre de projets et d'entreprises qui s'ouvrent dans le domaine comme évoqué plus haut.

Plus particulièrement, *Palmaria palmata* (ou dulse en anglais) présente un intérêt tant pour l'alimentation humaine et animale que pour la cosmétique ou encore la pharmacologie (Le Gall, 2002 ; Moroney et al., 2015). En effet elle fait l'objet d'une consommation grandissante sous différentes formes séchées en paillettes comme condiments, en tartare, ou encore cuite où elle a la réputation d'avoir un goût de bacon (Mouritsen et al., 2013). Sa richesse protéique (30 % en moyenne), ses fortes teneurs en fibres solubles et insolubles, acides gras polyinsaturés en oméga 3, en vitamines et en minéraux essentiels lui confèrent un fort intérêt tant pour la nutrition que pour la santé. En effet les propriétés antioxydantes de certaines de ses molécules et sa richesse en acide eicosapentaénoïque (acide gras essentiel en oméga 3) connu pour de nombreuses allégations santé telles que la baisse du taux de cholestérol sanguin, le développement du système nerveux chez l'enfant ou encore l'amélioration de l'agrégation plaquettaire en font une espèce d'intérêt pour la nutraceutique également (Morgan et al., 1980 ; Galland-Irmouli et al., 1999 ; Le Gall, 2002).

Longtemps appelée *Bezhin Saout* en Breton ce qui signifie goémon à vache (Boisvert, 1984), elle a toujours présenté un intérêt dans l'alimentation animale. Il a notamment été montré que son utilisation en tant qu'aliment fourrage pour les ormeaux (*Haliotis spp.*) était particulièrement bénéfique (Mai et al., 1994). Des entreprises de production de ce mollusque s'approvisionnent donc régulièrement en Dulse en la ramassant eux-mêmes ou auprès de récoltants, c'est le cas par exemple de la Société France Haliotis à Plouguerneau (Le Roux, 2010). D'autres études ont également porté sur son utilisation dans l'élaboration d'aliment pour saumon, ses qualités nutritionnelles riches en protéines et ses teneurs naturelles en pigments rouge permettant de limiter l'utilisation de l'asthaxanthine étant mises en avant, ainsi que ses effets sanitaires sur la limitation de l'infestation des saumons par les poux de mer (Moroney et al., 2015).

Ainsi cette algue présente un intérêt certain et les pistes de valorisation sont multiples. On observe d'ailleurs une augmentation de sa production en France de 200 Tonnes fraîches en 2012 à 420 Tonnes en 2015 (Mesnildrey et al., 2012 ; Frangoudes, 2016), signe d'une demande croissante et d'un marché en essor.

Mais une ressource instable :

Comme nous venons de le voir, *Palmaria palmata* présente de nombreuses valorisations possibles (cosmétique, nutraceutique, alimentation humaine ou animale...). La maîtrise de sa production serait donc un atout majeur pour le développement de la filière. Cependant à l'heure actuelle sa disponibilité sur les marchés est faible et saisonnière puisqu'exclusivement issue du ramassage par des récoltants d'algues de rives. En outre les stocks de biomasse disponible sont mal connus et la qualité de l'algue varie en fonction de la saison fragilisant d'autant plus son maintien sur le marché.

L'enjeu est donc de maîtriser son cycle de reproduction afin de mieux propager cette espèce en aquaculture et de développer une production importante et constante. Plusieurs voies de propagations sont possibles : la multiplication végétative, la sporulation ou encore la reproduction sexuée. À l'heure actuelle les tentatives de mise en culture de cette algue ont été

réalisées par ensemencement direct des supports de culture grâce à des individus sporophytiques matures récoltés dans le milieu. Cette technique est au point mais coûteuse et peu efficace car la qualité des spores, la densité d'ensemencement et la résistance des individus ne sont pas maîtrisées. Le coût des filières est donc élevé car dépendant de la récolte or la production est généralement faible du fait du décrochage d'une partie de la biomasse du support, de l'apparition de nombreux épiphytes ou encore des variations environnementales pouvant altérer la qualité finale de l'algue (Aleur, comm. pers.). De ce fait la rentabilité est un des freins majeurs au développement de l'aquaculture de *P. palmata*. Une étude de faisabilité économique menée en Irlande pointe ce problème majeur : pour une production annuelle en bassin de 1 920 kg le coût de production (prenant en compte l'amortissement du matériel et les frais de fonctionnement) s'élèverait à 4640 €. Or le cours actuel de *P. palmata* est de 2,50 € par kilos d'algue fraîche. Ainsi le chiffre d'affaire annuel serait de 4800 euros soit un bénéfice de 160 € sur l'année. La même étude évoque la possibilité de réaliser des économies d'échelle en augmentant la capacité des exploitations, cependant la rentabilité ne serait toujours pas suffisante (Werner, Dring, 2011). Pour rendre une telle culture rentable il est donc nécessaire soit de diminuer le coût de production, soit d'augmenter le prix de vente de l'algue, donc d'améliorer sa valorisation.

Afin de diminuer les coûts de production il serait donc intéressant de s'affranchir de la ressource naturelle, limitant ainsi les coûts liés à la récolte et permettant également de mieux maîtriser la qualité des individus. Pour ce faire plusieurs possibilités ont été envisagées ; des études portant sur l'utilisation de protoplastes comme technique de propagation ont été effectuées mais n'ont pas été concluantes (Le Gall, 2002). Parallèlement, en Allemagne, des travaux ont été entrepris par le Pr. Lüning pour mieux définir les bases biologiques de la propagation de *Palmaria* par sporulation (Pang, Lüning, 2006) ou par multiplication végétative en bassin (Pang, Lüning, 2004). Plus récemment, ces travaux ont été repris en Irlande (Werner, Dring, 2011), puis au Nouveau Brunswick au Canada dans le laboratoire du Pr. Chopin (Chopin, 2017) au Québec par le Pr. Tamigneaux, en Norvège au sein du Département d'Aquaculture de l'institut SINTEF (Skjermo, 2017), ainsi qu'au Danemark au sein du Algae Center et au DTU Food en partenariat au sein du projet européen Macrocascade. Actuellement, l'entreprise ALGA+ assure une production commerciale de *Palmaria palmata* en bassins de culture en Aquaculture Multitrophique Intégrée (AMTI), ce qui permet de disposer de cette algue conditionnée sur leur catalogue (<https://www.algaplus.pt/>). Une solution durable serait de pouvoir maintenir des cultures unialgales puis d'induire leur maturation de façon contrôlée rendant ainsi possible d'ensemencer des supports selon les besoins et de maîtriser la qualité des algues produites au travers de travaux de sélection génétique. En d'autres termes l'enjeu consiste en la mise au point de techniques fiables et reproductibles d'écloserie et de pré-grossissement dans un premier temps puis en l'amélioration de la survie en culture grâce à l'amélioration des supports de cultures notamment. C'est cela que nous avons cherché à étudier pendant ce stage afin d'éclaircir les axes potentiels de développement de cette aquaculture.

Nous nous intéressons ici principalement aux méthodes relevant de la sporulation et de la reproduction sexuée avec notamment 2 points de blocages identifiés :

- Le cycle biologique de *P. palmata* est digénétique (cf Partie I-A-3) : au stade sporophytique diploïde, les tetrasporocystes différencient des spores par divisions méiotiques. Ces spores une fois libérées puis fixées au substrat vont développer des gamétophytes mâles et femelles. La particularité de ce cycle vient entre autres du fait que le stade gamétophytique mâle est isomorphe du sporophyte tandis que le gamétophyte femelle forme une croûte microscopique d'où vont émerger les trichogynes, des filaments sur lesquels adhèrent les spermaties avant la fécondation (Van der Meer, Chen, 1979 ; Van der Meer, Todd, 1980).
- Outre cette différence morphologique importante, plusieurs articles font état d'une asynchronie de maturité des individus de la même génération, les femelles étant matures quelques jours après sporulation et porteuses de trichogynes pendant 3 à 4 semaines, contre plusieurs mois pour les mâles (Pang, Lüning, 2006)

Comme nous venons de le voir la maîtrise de la qualité des algues, et en premier lieu de la qualité des ensemencements relevant tant de la densité que de la résistance des algues aux intempéries est un élément essentiel pour assurer la rentabilité des exploitations. Il s'est donc avéré primordial de travailler dans le but de mettre au point des méthodes fiables, facilement reproductibles et peu onéreuses permettant une bonne propagation de *P. palmata* en aquaculture.

Cet objectif ambitieux n'était de toute évidence pas atteignable en 6 mois de stage, pour autant il s'agissait bien ici de dégager des axes potentiels de maîtrise des différents aspects de l'aquaculture. Ainsi nous avons essentiellement travaillé sur le maintien de cultures unialgales, l'identification de facteurs d'induction de la différenciation sexuelle mais également, en lien avec le CEVA et Aléor sur la détermination de supports de cultures efficaces. Parallèlement à cela nous travaillons à la mise en place d'un protocole fiable d'extraction et de séquençage de l'ADN des individus afin d'ouvrir à des perspectives de génotypage d'une collection d'individus de différentes populations bretonnes en vue de croisement et de sélection génétique lorsque la reproduction sexuée sera maîtrisée.

## I. Matériel et méthodes.

### A. Matériel.

#### 1. Biologie de l'espèce.

*Palmaria palmata* (Linnaeus) F.Weber & D. Mohr 1805 est une Rhodophyte pérennante pluriannuelle de la classe des Florideophyceae, de l'ordre des Palmariales et de la famille des Palmariaceae. Elle se distingue par sa taille de plusieurs dizaines de centimètres pouvant parfois même atteindre près d'un mètre et par son aspect foliacé. On la retrouve parfois fixée à même la roche mais le plus souvent en épiphytes sur des stipes de *Fucus serratus* dans l'horizon inférieur de la zone médiolittorale ou de laminaires (*Laminaria hyperborea* et *L. digitata*) dans la zone infralittorale (Dion, 1987 ; Le Gall, 2002). De son crampon discoïde émane un court stipe duquel partent des frondes qui prennent la forme de lames larges et plates. L'extrémité est souvent arrondie et les méristèmes apicaux se divisent de manière dichotomique lui donnant un aspect lacinié. À la base des lames on observe souvent des régénérations marginales lui permettant d'assurer sa pérennité de façon végétative. En effet, la finesse de ses thalles la rend fragile et il est fréquent de la trouver endommagée. Les jeunes thalles sont généralement rouge clair du fait de la finesse de leur fronde tandis que les vieux thalles, plus épais apparaissent plus foncés. Toutefois en cas d'ensoleillement trop intense ou de carence en nutriments il arrive que les lames deviennent pâles (Guiry, 1974 ; Van der Meer, Todd, 1980 ; Dion, 1987 ; Sagert, Schubert, 2000 ; Le Gall, 2002). L'ensemble de l'appareil végétatif de l'algue est représenté dans la Figure 3.

Il n'est pas rare que les vieux thalles de *Palmaria palmata* soient recouverts d'épiphytes ou d'épibiontes comme le bryzoaire *Membranipora membranacea* (Linnaeus). En outre des études sont actuellement en cours sur les stratégies de développement d'oomycètes tels que *Olpidiopsis palmariae* qui engendrent la mort des spores de *P. palmata*. (Sanderson, 2015)

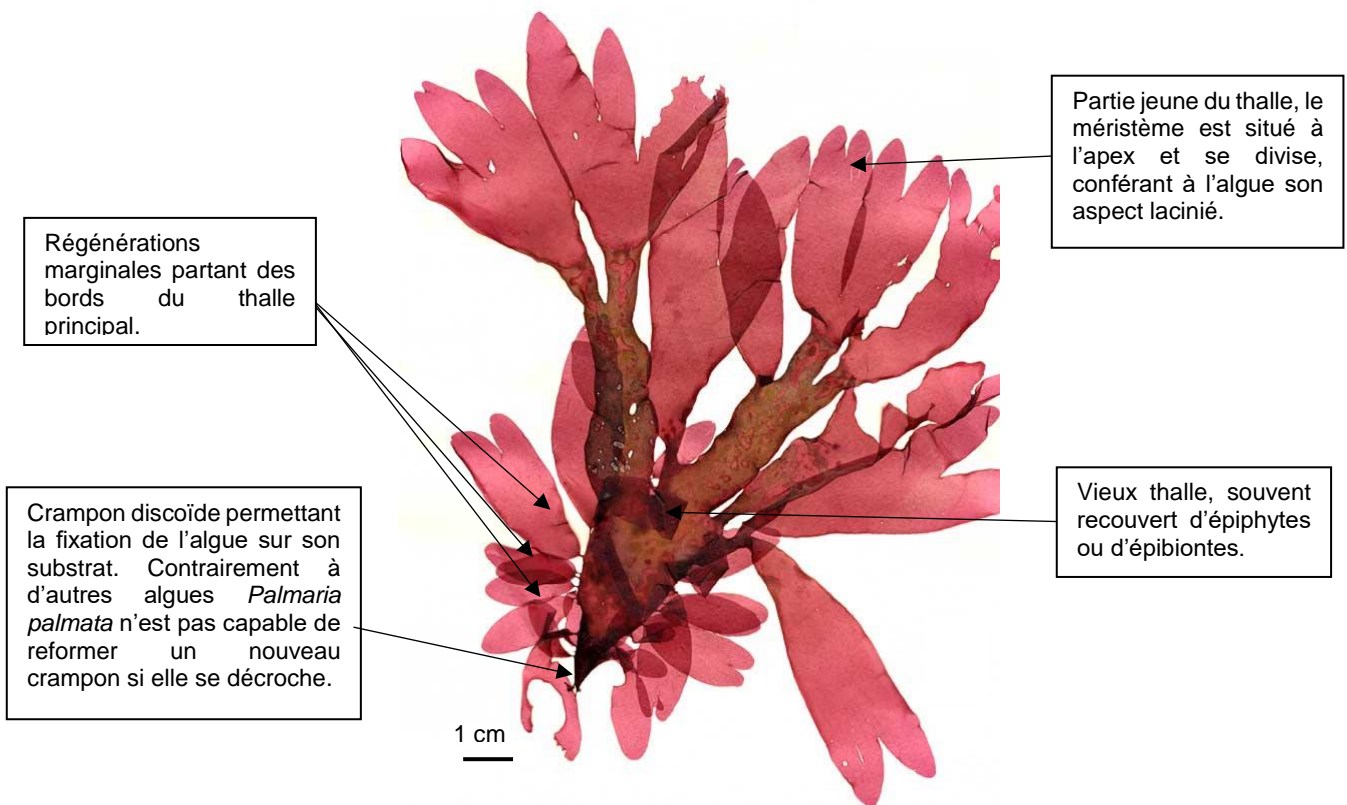


Figure 3 : Présentation de la Rhodophyte *Palmaria palmata* (Linnaeus) F.Weber & D. Mohr 1805 (photo : habitas.org.uk)

## 2. Aire de répartition

*Palmaria palmata* est connue pour être l'une des Rhodophytes les plus répandues de l'hémisphère Nord (Guiry, 1974). Généralement située au-delà du 35<sup>ème</sup> parallèle elle est présente le long des côtes de l'Atlantique est ; du nord du Portugal à l'archipel de Svalbard dans l'arctique au nord de la Norvège. Dans l'Atlantique Ouest elle a été répertoriée le long des côtes des États-Unis (à partir du New Jersey) et du Canada jusqu'à la Mer de Baffin à l'ouest du Groenland. Enfin une espèce proche, *Palmaria mollis* est également présente dans le Pacifique Nord, du détroit de Béring à la Californie à l'est d'une part et à la Corée à l'ouest d'autre part. (Kain (Jones), 1982 ; Dion, 1987). Des études de phylogénétique ont ensuite montré qu'il existait plusieurs populations différentes qui auraient évolué à partir d'une population commune restée isolée dans la Manche lors de la glaciation du Pléistocène (Provan et al., 2005). La répartition établie par Provan est montrée en Figure 4.

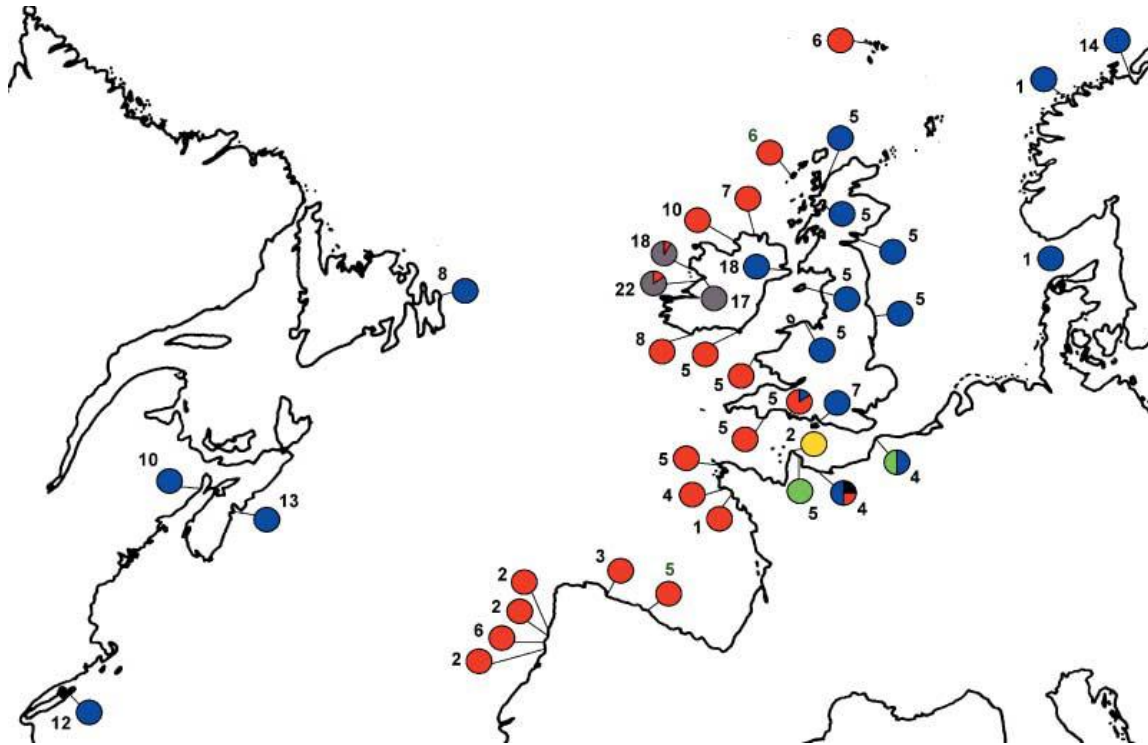


Figure 4 : Carte de répartition des différentes populations de *Palmaria palmata*. Les couleurs correspondent à différents haplotypes identifiés pour chaque population. (source : Provan et al., 2005)

### 3. Cycle de reproduction

Longtemps resté énigmatique le cycle de reproduction de *P. palmata* a été élucidé par Van der Meer, Todd et Chen grâce à des mutants de coloration ayant permis de mettre en évidence l'existence des gamétophytes femelles (Van der Meer, 1976 ; Van der Meer, Chen, 1979 ; Van der Meer, Todd, 1980). Ainsi ils distinguent trois stades du cycle de vie de cette Rhodophyte qui se distingue des autres par l'absence de stade carposporophytique (Dion, 1987).

Le premier stade correspond au stade indifférencié, en effet les gamétophytes mâles haploïdes et les sporophytes diploïdes sont isomorphes et l'absence de cellules différenciées empêche toute identification par simple observation. Seule des techniques de cytométrie ou de microscopie de fluorescence mettant en évidence la ploïdie des individus permettent une discrimination efficace (voir la partie I-B-4).

Le deuxième stade est sporophytique, les individus sont alors différenciables car leurs thalles présentent des marbrures rouge foncé virant au brun. Ces zones correspondent au tétrasporocystes dans lesquels les divisions méiotiques permettent la formation des tétraspores.

Enfin le troisième stade correspond au stade gamétophytique. Le gamétophyte mâle, isomorphe du sporophyte présente cette fois des marbrures blanches qui sont dues à la formation, par division mitotique post méiose, des spermaties, cellules reproductrices mâles. (Guiry, 1974). Le gamétophyte femelle, prend lui la forme d'un disque microscopique encroûtant d'où émanent des trichogynes (Van der Meer, Chen, 1979)

C'est lorsque les spermaties libérées par le gamétophyte mâle fécondent les trichogynes femelles que va se former le nouveau sporophyte qui se développe ensuite directement sur le gamétophyte femelle (Van der Meer, Todd, 1980). L'ensemble de ce cycle de reproduction, décrit dans la Figure 5 fait de *Palmaria palmata* une Florideophycidae digénétique contrairement au reste des Rhodophytes habituellement trigénétiques.

Des études phénologiques ont montré que la période de croissance dure de mars à août avec un pic de croissance de Mai à Juillet. À partir d'août les thalles commencent à se dégrader. La reproduction a lieu en hiver : la maturité des sporophytes s'étend de novembre à mars

pouvant parfois se prolonger en avril. Par ailleurs les gamétophytes mâles sont généralement matures quelques mois après leur fixation (entre 1 et 3 mois) et les gamétophytes femelles, beaucoup plus fugaces sont fertiles peu après leur fécondation mais ne le restent que quelques semaines (Lüning, 1985 ; Le Gall et al., 2004 ; Pang, Lüning, 2006). Cette différence temporelle dans la maturité bien que pouvant apparaître comme une stratégie évolutive laisse penser que les gamétophytes femelles de l'année n pourraient être fécondés par des spermatis de l'année n-1 sans pour autant que des preuves scientifiques aient été apportées pour confirmer cette hypothèse.

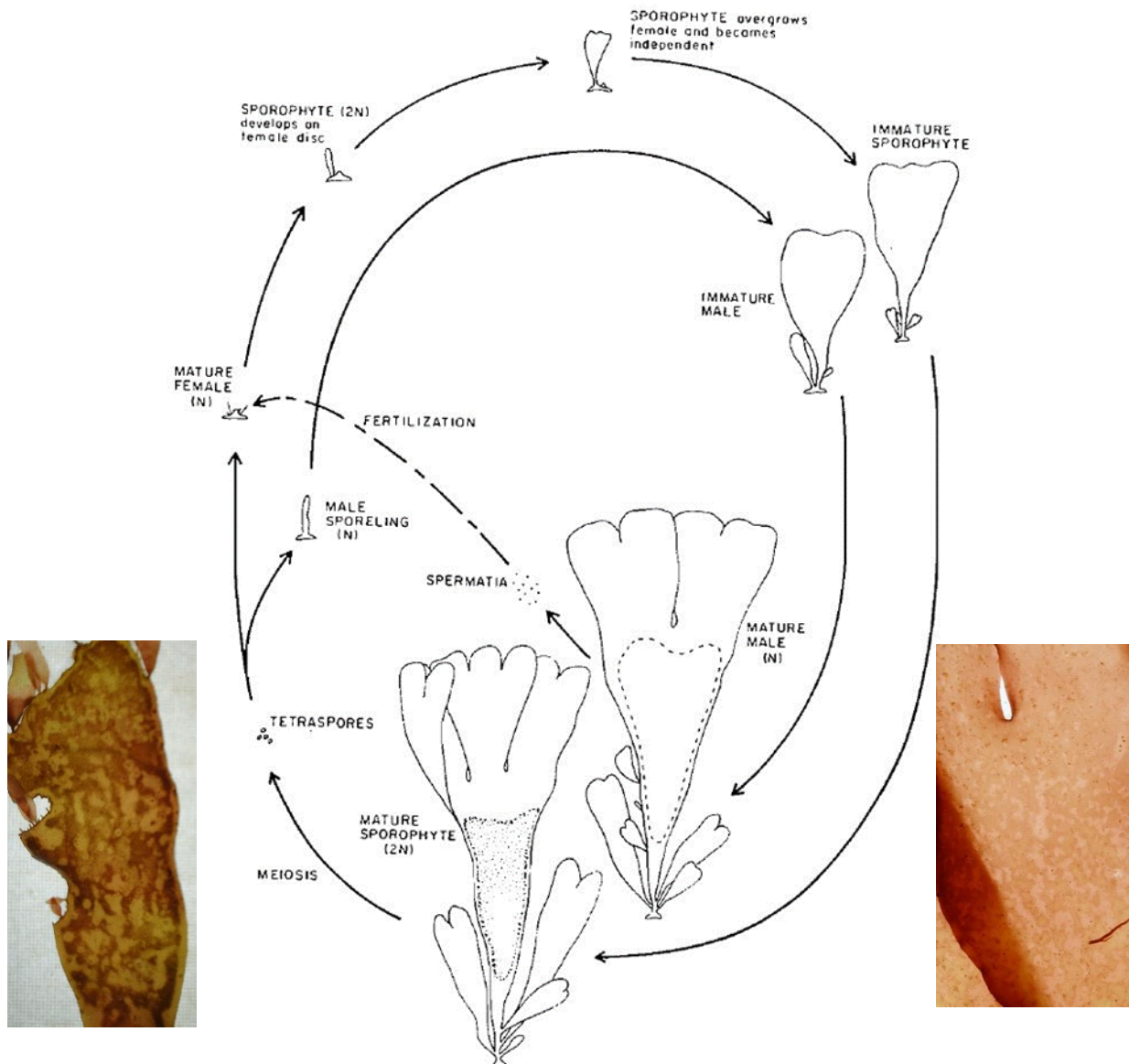


Figure 5 : le cycle de reproduction de *Palmaria palmata* d'après Van der Meer et Todd 1980  
 A gauche la photo montre un thalle de sporophyte différencié, les taches brunes correspondent aux tétrasporocystes (© A. Drion). A droite : photo d'un thalle de gamétophyte mâle différencié, les marbrures blanches sont dues à l'accumulation de spermatis. (© M. Guiry / Algaebase 2017)

## B. Méthodes.

### 1. Méthodes d'échantillonnage.

Selon les différents aspects étudiés nous avons utilisé différentes algues, cependant dans la très grande majorité des cas les individus provenaient du milieu naturel sans traitement particulier.

Afin de répondre aux besoins des expériences sur l'aspect génétique de *P. palmata* il a été nécessaire de maintenir des populations bien identifiées en cultures unialgales et en s'assurant qu'il n'y ait pas de maturation sexuelle. Nous avons récolté des algues de quatre sites en Bretagne : à Roscoff sur le site de Sainte Barbe, Santec au Theven, Argenton (Plage de Breoc'h) en mars 2017 et à Saint-Malo (Plage de la Varde) en avril 2017 (Figure 6)

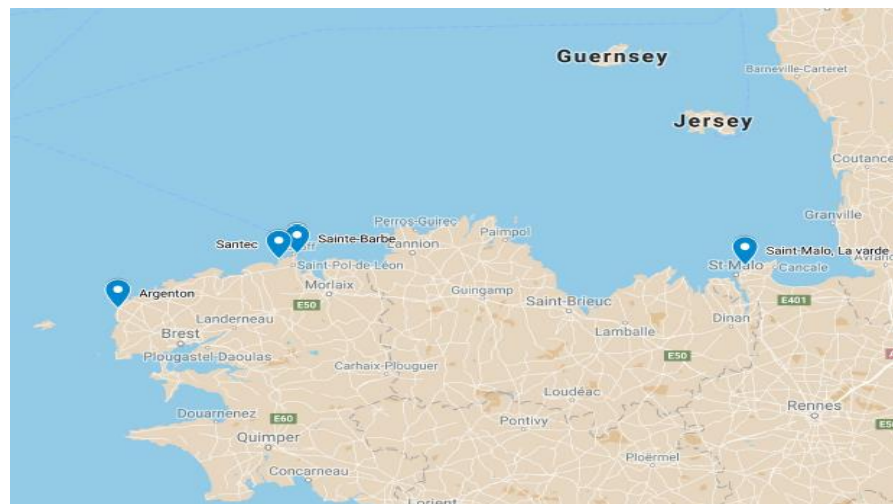


Figure 6 : Carte des prélèvements effectués

Pour chaque prélèvement entre 10 et 15 individus ont été isolés et identifiés comme sporophytes puis séparés en 3 lots distincts :

- Les jeunes pousses émanant des bords des thalles sont isolées et placées dans de l'eau de mer stérile dans le but de faire des **cultures unialgales**.
- Une partie des thalles matures (entre 3 et 6) est mise de côté pour les expériences de **sporulation** sauf pour la population de Saint-Malo.
- Enfin le reste de la biomasse est placé dans des sachets, plongés dans l'azote liquide puis conservé dans un congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$  afin de conserver de la matière pour l'**analyse ADN**.

Dans le cas des expériences **d'identifications des facteurs d'induction** de la maturation nous avons réalisé des récoltes sur le site de Sainte Barbe à Roscoff fin juin et début juillet. Ces individus étant potentiellement des gamétophytes ou des sporophytes nous avons procédé à des déterminations de ploïdie grâce à une expérience de cytométrie selon un protocole de Dominique Marie décrit en partie I-B-4 (Marie et al., 2001). Les individus ont ensuite été placés dans des caisses fermées d'une contenance de trois litres équipées d'un éclairage d'une puissance de 3000 LUX à 12 cm soit environ  $40,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  dont la photopériode est maîtrisable au moyen d'un minuteur et d'une circulation d'eau à température régulée. Nous disposons de douze caisses reliées en parallèle trois par trois sur des circuits différents permettant ainsi de réaliser quatre triplicats en conditions de photopériodes et de températures différentes.

### 2. Maintien de cultures unialgales.

Les premiers lots issus des individus sont placés dans des erlenmeyers en verre, portant l'identifiant correspondant à l'individu comme indiqué dans le Tableau 1. En premier lieu ils ne sont placés que dans de l'eau de mer stérile, à température ambiante et dans des conditions de photopériodes naturelles, soit environ douze heures de jour et douze heures de



nuit (Dans la suite de ce rapport nous conviendrons de la notation suivante : P = « durée du jour » : « durée de la nuit » soit dans ce cas : P = 12 :12). En effet ces expériences ont été réalisées en mars, donc dans des conditions d'éclairement proche de celles de l'équinoxe.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des individus récoltés et correspondance avec les clés d'identifications.

Lieu de récolte	Roscoff – Sainte Barbe	Santec	Argenton	Saint-Malo
Clé d'identification	SB+n°	SLG+n°	Ar+n°	SM+n°
Nombre total d'individus	12	12	15	6

Après quelques jours les milieux de cultures sont changés : les algues sont nettoyées à l'aide d'un pinceau, placées dans des ballons en verre d'un litre fermés par un bouchon et équipés d'un système de bullage comme indiqué sur la Figure 7 . On met cette fois un milieu enrichi en nutriments selon le protocole « Seawater Filtrated Culture » qui s'approche du milieu Von Stosch (cf. Annexe 1 et 2). L'ensemble des cultures est installé dans une salle à température contrôlée à 13°C et à photopériode constante (P = 12 : 12)

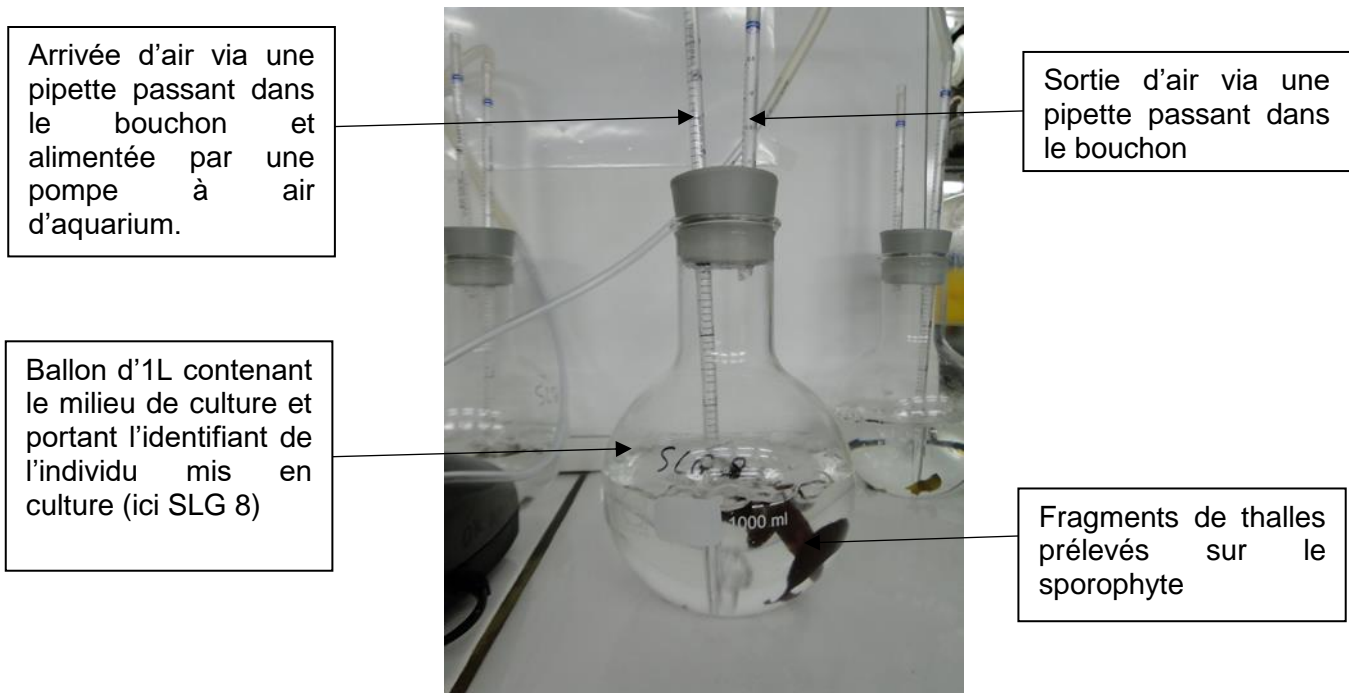


Figure 7 : Dispositif de mise en culture mis en place au laboratoire. (© A. Drion)

Chaque semaine les milieux, les ballons et les systèmes de bullages sont changés et remplacés par du matériel stérilisé par autoclavage afin de limiter les contaminations. Lors des changements de milieux, les algues sont observées et les parties présentant encore des épiphytes sont soigneusement coupées et évacuées. Ainsi en quelques semaines l'ensemble des cultures est unialgale et ne contient que *Palmaria palmata*. Malgré toutes les précautions prises pour éviter les contaminations certains lots se sont trouvés contaminés par des diatomées ou des bactéries proliférant rapidement du fait de la présence de milieu enrichi.

Afin de stabiliser les cultures contaminées nous avons d'abord utilisé une solution de Germanium, connue pour empêcher la multiplication des diatomées ainsi qu'une solution d'antibiotiques liquides. Ces deux protocoles ont été obtenus auprès de la banque de protocoles de la Station Biologique (Cf annexe 3 et 4). D'abord efficace, cette solution n'a pas permis de s'affranchir de l'ensemble des contaminants, en effet une souche de bactéries continuait de proliférer. Afin de ne pas engendrer des pertes par l'utilisation excessive d'antibiotiques nous avons cessé son utilisation et traité les algues contaminées avec un

protocole de lavage à l'hypochlorite de soude (Kerrison et al., 2016). En parallèle des lots témoins ont été créés afin de déterminer si la bactérie en question provenait directement de l'algue ou d'une contamination externe par le milieu de culture, ou l'air ambiant par exemple. La décontamination s'est avérée efficace pour une partie des individus mais insuffisante pour d'autres, de plus il a été déterminé de façon assez claire que la bactérie contaminante provenait effectivement de l'algue. Aussi a-t-il été décidé de stopper l'enrichissement du milieu afin de diminuer la prolifération des bactéries tout en préservant les algues d'une surcharge de traitements pouvant leur nuire à terme.

### 3. Expériences de sporulation.

Comme évoqué plus haut des lots de thalles ont été isolés afin de pratiquer des expériences de sporulation. Lors de la première session de récolte réalisée à Roscoff deux protocoles ont été utilisés pour la sporulation afin de déterminer le plus efficace.

Le premier protocole consiste à placer les thalles ou fragments de thalles matures dans des cristallisoirs contenant de l'eau de mer stérile et de les y laisser jusqu'à libération des spores. Des cristallisoirs en verre ont été utilisés préférentiellement car il a été montré que le plastique pouvait altérer la qualité et la survie des cellules (Akira Peters, Comm. Pers.)

Le second protocole consiste à mettre les algues dans des conditions de stress hydrique et thermique afin de favoriser la sporulation. Les thalles matures sont placés sur des feuilles de papiers absorbants en chambre froide à 4°C pendant une nuit à l'obscurité. Ils sont ensuite plongés une heure dans de l'eau de mer stérile à 10°C avec un fort bullage. Au bout d'une heure le bullage est arrêté et les thalles sont sortis des cristallisoirs, les spores libérées décantent alors au fond du cristallisoir (Le Gall, 2002). Pour augmenter la quantité de spores ainsi obtenues ce protocole est répété une fois avec les mêmes thalles ; après le bullage ils sont à nouveau placés sur du papier absorbant en chambre froide pendant une nuit et la sporulation est effectuée le lendemain.

Ces deux protocoles sont réalisés pour chaque sporophyte récolté à Roscoff séparément afin d'obtenir des populations de gamétophytes issus du même individu dans chaque cristallisoir. Suite aux résultats obtenus le second protocole est privilégié pour la sporulation des individus de Santec et d'Argenton.

La population de Saint Malo ayant été récoltée plus tardivement dans l'année les individus n'étaient d'une part plus matures et d'autre part indifférenciables entre les sporophytes et les gamétophytes. Cette expérience n'a donc pas été réalisée pour cette population.

Les cristallisoirs contenant les spores ainsi obtenus sont identifiés, recouvert d'un couvercle et laissés dans une salle à température ambiante et photopériode naturelle (en mars donc P = 12 : 12). L'eau de mer stérile est remplacée toute les semaines et l'évolution des spores est observée à la loupe binoculaire. Les lots dont les spores se développent sont conservés, ceux qui présentent des mortalités trop importantes sont éliminés. Après 3 semaines l'ensemble des lots encore viables est placé dans une salle à 13°C à photopériode constante (P = 12 : 12).

### 4. Analyse de la ploïdie par cytométrie de flux

Afin de réaliser les expériences d'induction de la maturation décrites dans la suite (partie I-B-5) de ce mémoire nous avons besoin d'utiliser des individus sporophytiques et gamétophytiques bien identifiés. Ne souhaitant pas sacrifier les individus maintenus en culture nous avons fait un échantillonnage sur le site de Sainte Barbe à Roscoff. Or les algues ayant été récoltées en été, la ploïdie des individus isomorphes n'était pas identifiable. Nous avons donc fait appel à la plateforme de cytométrie de la Station Biologique dirigée par Dominique Marie afin de réaliser une expérience de détermination de la ploïdie. Le principe de cette expérience repose sur la coloration de l'ADN nucléaire grâce à du Sybr Green ; des fragments d'algues broyés dans un tampon permettant la lyse des tissus mais le maintien de l'intégrité des noyaux. Une fois coloré au Sybr Green la solution contenant les noyaux est injectée dans un cytomètre de flux (BD FACSCanto™ II, BD Biosciences) qui mesure la quantité d'ADN

contenue dans les noyaux, ainsi on peut différencier les individus ayant n quantité d'ADN (1C) de ceux ayant 2n quantité d'ADN (Marie et al., 2001)

Afin de réaliser le témoin et de calibrer le cytomètre nous avons utilisé des fragments d'individus sporophytiques (2C) récoltés matures lors de l'hiver 2016-2017 maintenus en cultures unialgales. Une fois cette calibration faite nous avons répété l'expérience pour les individus récoltés spécialement pour l'expérience en prenant soin de bien les identifier.

## 5. Identification des facteurs d'induction de la maturation.

L'objectif de cette expérience était d'identifier si la température ou la photopériode pouvait être des facteurs suffisants pour l'induction de la maturation des sporophytes. Pour cela un système de culture en aquarium-boîte a été mis en place, des lots de 3 boîtes d'une contenance de 3 litres installées en parallèles sont alimentée en eau de mer thermorégulée, une partie de la structure est visible sur la Figure 8. Par ailleurs, l'éclairage est individuel, chaque boîte étant équipé d'un couvercle contenant des LEDs. La photopériode est contrôlée au moyen d'un minuteur.

Nous avons défini la photopériode de jours « longs » à P = 14 : 10 légèrement inférieur à la photopériode de solstice puisque l'expérience était réalisée en Juillet donc après ce dernier. Les jours « courts » correspondant à une photopériode de P = 8 : 16, identique à celle du solstice d'hiver. La photopériode constante étant toujours définie à P = 12 : 12. Plusieurs températures ont également été définies ; une température dite « haute » à 19°C en moyenne (cette eau provenait directement du vivier donc pouvait subir quelques faibles variations de températures selon la météo). La température dite « basse » était fixée à 8°C et la température médiane à 13°C.

5 triplicats ont été réalisés en faisant varier l'un des deux paramètres seulement. Ainsi lorsque l'on travaillait sur les températures la photopériode était fixée à P = 12 : 12 (photopériode constante) et à l'inverse lorsque l'on travaillait sur les photopériodes, la température était la « médiane » fixée à 13°C. Les individus atteignant leur maturité sexuelle au cours de l'hiver nous avons également réalisé un triplicat à température « basse » et photopériode « courte ». L'ensemble des triplicats réalisés est rappelé dans le Tableau 2. Pour les lots témoins nous avons défini les algues contenues en cultures unialgales, en effet elles sont en condition de photopériode constante P = 12 : 12 et de température fixée à 13°C.

Tableau 2 : conditions testées pour l'induction de la maturation. Les paramètres surlignés en Rouge dans les triplicats sont les paramètres testés.

Conditions	1	2	3	4	5	Témoin
Température	13°C	13°C	19°C	8°C	8°C	13°C
Photopériode	P = 14 : 10	P = 8 : 16	P = 12 : 12	P = 12 : 12	P = 8 : 16	P=12 : 12

Afin de suivre l'évolution des individus, chacun est identifié et pris en photo sur du papier millimétré plastifié avec un rétroéclairage intense grâce au dispositif présenté en Figure 9. Les conditions de température, pH et salinité de l'expérience sont mesurées régulièrement afin de s'assurer que les paramètres étudiés sont les seules variables d'un triplicat à l'autre.

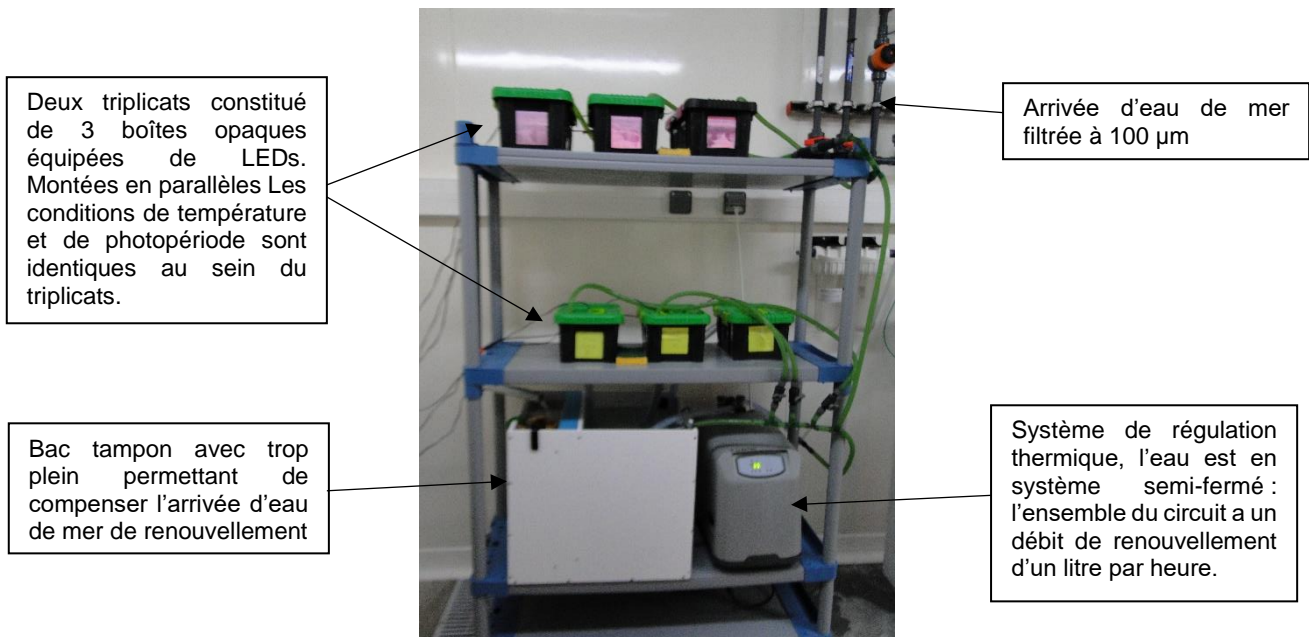


Figure 8 : Présentation du système expérimental pour la maturation sexuelle des individus. Sur la photo deux triplicats sont visibles, ils sont connectés au même réseau hydrique thermorégulé. La photopériode de chaque triplicat est régulées par un minuteur (© A. Drion)

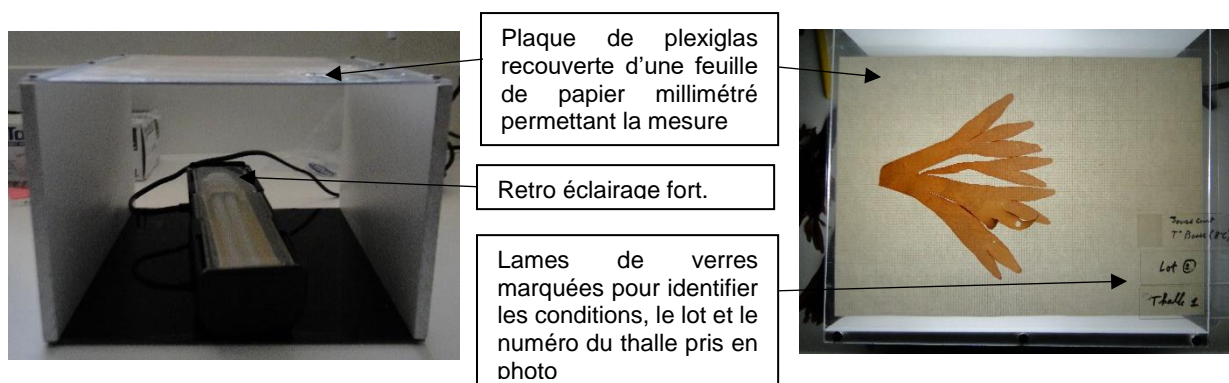


Figure 9 : Matériel expérimental destiné à la prise des photos lors de l'expérience de maturation afin de suivre l'évolution des individus. (© A. Drion)

## 6. Mise au point d'un protocole d'extraction d'ADN.

Comme évoqué en introduction, la maîtrise de la reproduction de *Palmaria palmata* pourrait ouvrir la voie de la sélection génétique. Les expériences de maintien de cultures unialgales ont entre autre pour objectif de maintenir des collections d'individus de sorte de déterminer leur génotype et suivre leur lignée génétique. De plus, elles permettent d'identifier si des individus ont une meilleure capacité de développement en conditions contrôlées ou non. En outre des différences morphologiques concernant la pigmentation mais également la forme des thalles et leurs épaisseurs ont été observées lors des différentes récoltes. Les individus de Saint Malo par exemple sont beaucoup plus allongés et mince que ceux de Santec ou de Roscoff. La sélection de certains de ces caractères et à terme la possibilité de faire des croisements afin de mieux répondre à la demande des consommateurs ou des

transformateurs est donc un levier important du développement de l'aquaculture de cette espèce. Pour autant la génétique de *Palmaria palmata* n'a à ce jour que faiblement été étudiée et la route est encore longue avant de parler de sélection variétale. En effet, l'étude et le développement de la connaissance du génome de cette espèce est une avancée nécessaire à la poursuite de cette ambition, notamment pour générer des marqueurs génétiques variables en grande quantité.

L'objectif de cette expérience réalisée en lien avec Sylvie ROUSVOAL était donc d'étudier différents protocoles d'extraction de l'ADN de *P. palmata* afin de définir la meilleure marche à suivre pour permettre ensuite des analyses de génotypage. La finalité étant bel et bien d'établir une première base de connaissances sur des individus dont nous avons maintenu des thalles vivants lors des expériences de mise en culture. De cette manière il est possible de mettre en lien les analyses effectuées avec les individus et de conserver ces génotypes. La suite de cette partie vise donc à expliquer la démarche expérimentale qui a été suivie pour mettre en place un protocole d'extraction fiable, reproductible et efficace.

Pour les expériences d'extraction d'ADN, nous avons commencé par utiliser du matériel congelé qui provenait d'algues récoltées en 2016 et dont les expériences étaient achevées. Permettant ainsi de limiter la perte trop importante de biomasse d'intérêt que représente celle conservée sur les individus mis en culture unialgales (cf Partie I-B-2). Une fois les premiers résultats obtenus nous avons pu continuer les expériences avec du matériel des individus en cultures afin d'en conserver l'ADN pour une première phase d'analyse et de génotypage. Bien que peu d'éléments soit connus sur la génétique de *Palmaria palmata*, d'autres Rhodophytes ont déjà fait l'objet d'analyse de génome et des protocoles existent pour l'extraction d'ADN. Nous avons donc pu nous en inspirer. Afin de pouvoir rendre l'expérience facilement reproductible nous sommes partis de l'utilisation d'un kit d'extraction fourni par Macherey-Nagel. Il s'agit ici du kit « Genomic DNA from plant - NucleoSpin® Plant II ». Notons ici que la qualité de l'échantillon extrait dépend du matériel utilisé d'une part et des différentes étapes du protocole d'autre part. C'est dans le but d'obtenir des échantillons de la meilleure qualité possible que nous avons tenté d'ajuster le protocole au niveau des étapes les plus cruciales que sont le broyage, la lyse, la fixation et enfin la purification.

Toutes les algues utilisées pour les expériences d'extractions étaient conservées en congélateur à -80°C afin de préserver la qualité de l'ADN. Les étapes de broyage ont d'abord été réalisées à la main à l'aide d'un pilon et d'azote liquide. Toutefois devant le nombre important d'échantillons et le besoin d'établir un protocole le plus rapide et reproductible possible nous avons également testé des extractions à partir de matériel lyophilisé puis conservé à -80°C avant d'être broyé à l'aide d'un broyeur à billes (TissueLyser II, QIAGEN®).

L'analyse de la qualité de l'ADN est effectuée à l'aide d'une analyse au NanoDrop™ One/One (ThermoFisher) et d'une électrophorèse sur gel d'agarose. C'est la combinaison des résultats de ces deux tests qui permet de conclure sur la qualité de l'échantillon obtenu. En effet l'électrophorèse permet de connaître la taille approximative de l'échantillon obtenu et de voir si celui-ci est contaminé ou non par d'autres molécules ou dégradé. Le Nanodrop™ analyse par spectrophotométrie l'absorbance de l'échantillon pour différentes longueurs d'ondes et permet donc une approche plus fine sur la concentration et la qualité d'ADN présent dans l'échantillon. En effet les valeurs des rapports d'absorbances peuvent déjà apporter des informations de qualité telles que la présence ou non d'éventuels résidus de sucres ou de protéines.

Enfin pour s'assurer que les résultats obtenus à chaque extraction n'étaient pas liés à un facteur intrinsèque aux individus, garantissant ainsi la reproductibilité de la manipulation, les différentes expériences d'extractions ont été réalisées pour 6 individus simultanément à chaque fois.

L'extraction de l'ADN consiste en plusieurs étapes successives dont chacune peut s'avérer déterminante pour la quantité et la qualité finale de l'échantillon extrait. L'ADN étant une molécule relativement sensible aux variations de température il était essentiel d'effectuer rapidement les phases préliminaires de broyage. Une fois ces étapes effectuées l'ajout d'un

tampon de lyse permet en effet de stabiliser la molécule. La majorité du protocole suivi provient du kit d'extraction, en se référant à la démarche conseillée pour les algues vertes (Macherey-Nagel, 2014). Nous avons procédé à plusieurs tentatives, d'abord en suivant rigoureusement le protocole fourni puis en modifiant certains aspects du protocole afin d'optimiser la qualité de l'extrait. Les modifications apportées aux différentes phases sont décrites ci-dessous.

#### a. Broyage

Cette première étape de l'extraction a une grande importance pour maximiser la quantité d'ADN extrait, en effet plus le broyat obtenu sera fin plus la phase de lyse sera efficace et de fait plus la quantité d'ADN pouvant être fixée sera importante. Lors de cette étape il était d'abord conseillé de broyer 100 mg de l'algue dans un mortier à l'aide d'un pilon. Afin de faciliter le broyage, de l'azote liquide est régulièrement versé dans le mortier de sorte que l'algue congelée reste très dure. Bien qu'efficace cette technique a le lourd inconvénient de nécessiter un lavage complet du matériel entre chaque broyage, ou de posséder autant de mortiers et de pilons que d'échantillons à broyer. Afin de rendre cette étape plus rapide et plus facile nous avons tenté par la suite un broyage mécanique sur des échantillons lyophilisés. Pour cela nous avons préalablement lyophilisé 1 g de chaque échantillon pendant 3 jours afin de s'assurer d'une lyophilisation maximale. Ensuite 20 mg d'algue sont disposés dans des tubes Eppendorf de 1,5mL auquel est ajoutée une bille de métal. Seul 20 mg sont utilisés cette fois-ci car nous partons de matière sèche. Les Eppendorf sont placés dans le lysér à différentes fréquences et pendant différentes durées jusqu'à obtention d'une fine poudre. Le tampon de lyse est alors ajouté rapidement pour stabiliser l'ADN de l'échantillon.

#### b. Lyse

De même que l'étape de broyage, la phase de lyse si elle est optimisée permet d'améliorer la quantité d'ADN extrait. Nous utilisons ici 400  $\mu$ L de tampon de lyse et 10 $\mu$ L de RNase dans un bain marie à 65°C. Cependant alors que le protocole préconisait 10 min d'incubation nous avons essayé avec des durées plus longues ; 15 et 20 min afin de déterminer si le temps d'incubation améliorerait nettement la quantité d'ADN obtenu.

#### c. Fixation

La fixation de l'ADN à l'aide d'une matrice absorbante et du tampon de fixation est importante sans quoi la quantité d'ADN obtenue lors des phases précédentes ne sera jamais obtenue in fine. C'est pourquoi il est important de bien mélanger le lysat et le tampon en aspirant puis relarguant le mélange entre 5 et 10 fois à la pipette jusqu'à obtention d'un mélange homogène.

#### d. Elution

Le protocole initial prévoit une élution en deux étapes successives avec 50  $\mu$ L de tampon d'élution à chaque fois. Toutefois les profils d'élution donnés par le fabricant et indiqués en Figure 10 montrent que la concentration des échantillons est optimale pour des quantités de tampon inférieur à 50  $\mu$ L et moins efficace au-delà. Dans notre cas c'est la concentration de l'échantillon qui primait sur la quantité d'ADN désiré nous avons donc opté pour une élution en deux étapes ; une première élution avec 50  $\mu$ L de tampon et une seconde avec cette fois 25  $\mu$ L de tampon. Les éluions sont toutes réalisées à 65 °C pendant 5 min.

70  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon d'ADN obtenu sont ensuite placés dans des Eppendorf bien identifiés et conservés dans un congélateur à  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Les 5  $\mu\text{L}$  restant étant mis de côté pour les tests de NanoDrop et la migration sur gel d'agarose.

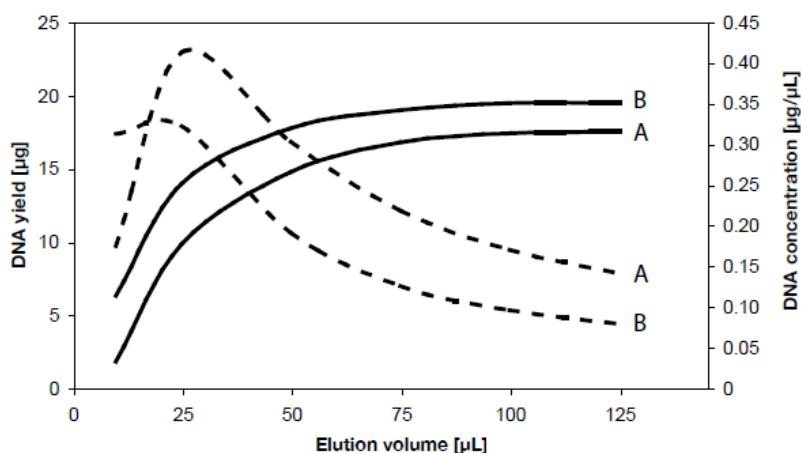


Figure 10 : Profil d'éluion du NucleoSpin® Plant II

De l'ADN provenant de 100 mg de feuilles de blé a été purifié puis élué une fois (A) ou deux fois (B) avec entre 10 et 125  $\mu\text{L}$  de tampon d'éluion. La quantité d'ADN obtenu est représentée par les traits pleins, la concentration est représentée par les pointillés.

Source ; Protocole du kit NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel, 2014)

#### e. Analyse au NanoDrop™

Le NanoDrop™ One/One est un spectrophotomètre UV-Visible à micro volume. Après calibrage avec le tampon d'éluion on dispose 2  $\mu\text{L}$  de notre échantillon d'ADN sur la cellule, l'appareil analyse l'échantillon et indique la concentration d'ADN de l'échantillon en  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Il indique également les rapports d'absorbances  $A_{260}/A_{280}$  et  $A_{260}/A_{230}$  qui donnent une indication sur la qualité de l'échantillon. En règle générale, dans le cas d'une spectrophotométrie d'ADN on considère comme pure une solution pour laquelle le rapport  $A_{260}/A_{280}$  est de 1,80 (+/- 0,1) si cette valeur est plus faible cela signifie que l'absorbance à 280 nm est trop importante et donc que l'extrait contient des éléments polluants comme des protéines ou des groupements phénols. Le rapport  $A_{260}/A_{230}$  est quant à lui révélateur de la présence de sucres ou de solvants comme l'EDTA. Il est normalement d'une valeur comprise entre 2,0 et 2,2, en dessous de ces valeurs, il est assez certain que l'extrait est pollué (Audebert, 2012).

#### f. Électrophorèse

Dans le même objectif d'analyse de la pureté de l'échantillon nous avons réalisé des migrations sur gel d'agarose. Le gel est concentré à 1% en agarose dans une solution de TAE (Tris, Acétate, EDTA) à 0,5 molaire dans lequel est ajouté 5  $\mu\text{L}$  de Bromure d'éthidium, intercalant de l'ADN afin de permettre la révélation en fluorescence UV des acides nucléiques présents après migration. Une fois les résultats de concentration de l'échantillon obtenus avec le NanoDrop™ nous pouvons déterminer la quantité d'échantillon à placer dans les puits. En règle générale pour un échantillon concentré à 70  $\text{ng}/\mu\text{L}$  ou plus 3  $\mu\text{L}$  de dépôt suffisent. Nous disposons d'un tampon de charge quatre fois concentré. Pour obtenir une solution équilibrée nous ajoutons donc généralement : 3  $\mu\text{L}$  de l'échantillon d'ADN, 3  $\mu\text{L}$  de tampon 4X et 6  $\mu\text{L}$  d'eau distillée. Toutefois lorsque les résultats de la spectrophotométrie montrent une concentration trop faible la quantité d'échantillon d'ADN mis en solution est augmentée et la quantité d'eau diminuée proportionnellement. Le premier puits est rempli avec 5  $\mu\text{L}$  de Smart ladder, marqueur de taille permettant l'analyse des résultats obtenus. Les autres puits sont remplis avec 12  $\mu\text{L}$  de la solution d'ADN tamponnée. Le gel est mis en migration avec un courant à 130V pendant 30 minutes.

Après migration le gel est placé sous une lampe à UV permettant de révéler les fragments d'ADN. Les gels sont photographiés afin d'analyser les résultats et de les comparer d'une expérience à l'autre.

## II. Résultats

### A. Maintien de cultures unialgales

Malgré le soin apporté au maintien des cultures, les épisodes de contaminations ont endommagé certaines cultures et provoqué leur perte. À l'inverse certaines algues se sont bien développées et ont montré une capacité de mise en culture intéressante. Ainsi les populations de Saint-Malo et d'Argenton ont été les plus impactées par les contaminations bactériennes et très peu ont survécu tandis que les populations de Santec et de Roscoff se sont bien maintenues et ont présenté un bon aspect tant d'un point de vue de la pigmentation que de l'épaisseur du thalle. In fine, comme indiqué dans le Tableau 3 sur les 45 individus de départ seuls 24 ont survécu soit 53,3% de survie. Dans l'ensemble, l'utilisation de milieu enrichi semble avoir plus profité aux bactéries qu'aux algues, probablement à cause de leurs vitesses de développement très différentes, provoquant dans certains cas la perte des individus.

Tableau 3 : tableau récapitulatif des effectifs par populations au début de la mise en culture et après 6 mois de cultures.

Population	Nombre d'individus au départ	Nombre d'individus à la fin	Taux de survie
<b>Argenton</b>	15	7	46,6%
<b>Santec</b>	12	8	66,6%
<b>Roscoff</b>	12	9	75%
<b>Saint Malo</b>	6	0	0%
<b>Total</b>	<b>45</b>	<b>24</b>	<b>53,3%</b>

### B. Expériences de sporulations

Comme évoqué plus haut, le protocole de sporulation utilisé est efficace. Nous avons obtenu de la sporulation pour tous les individus testés. Cependant la qualité de la sporulation était variable tant sur l'aspect de la densité de spores que sur la viabilité de ceux-ci. Les densités de sporulations observées étaient en effet assez différentes d'un individu à l'autre. Toutefois l'objectif n'étant pas celui-ci nous n'avons pas réalisé de comptage particulier et nous ne nous sommes limités qu'aux observations à la loupe binoculaire.

Sur l'aspect de la viabilité l'observation à la loupe binoculaire a montré que même si après la sporulation la quasi-totalité des spores était pigmentée, celles-ci ne se fixaient pas toutes sur le support et commençaient à se dégrader dès le lendemain. Dans d'autres cas les spores se fixaient bien et entamaient leur développement, mais celui-ci n'aboutissait pas toujours, une forte mortalité a été observée dans cette étape de l'expérience.



In fine sur l'ensemble de l'expérience trente-huit individus ont été mis à sporuler, et nous avons obtenus des plantules de gamétophytes pour seulement deux d'entre eux. Les photos présentés en Figure 11 montrent les différents gamétophytes obtenus.

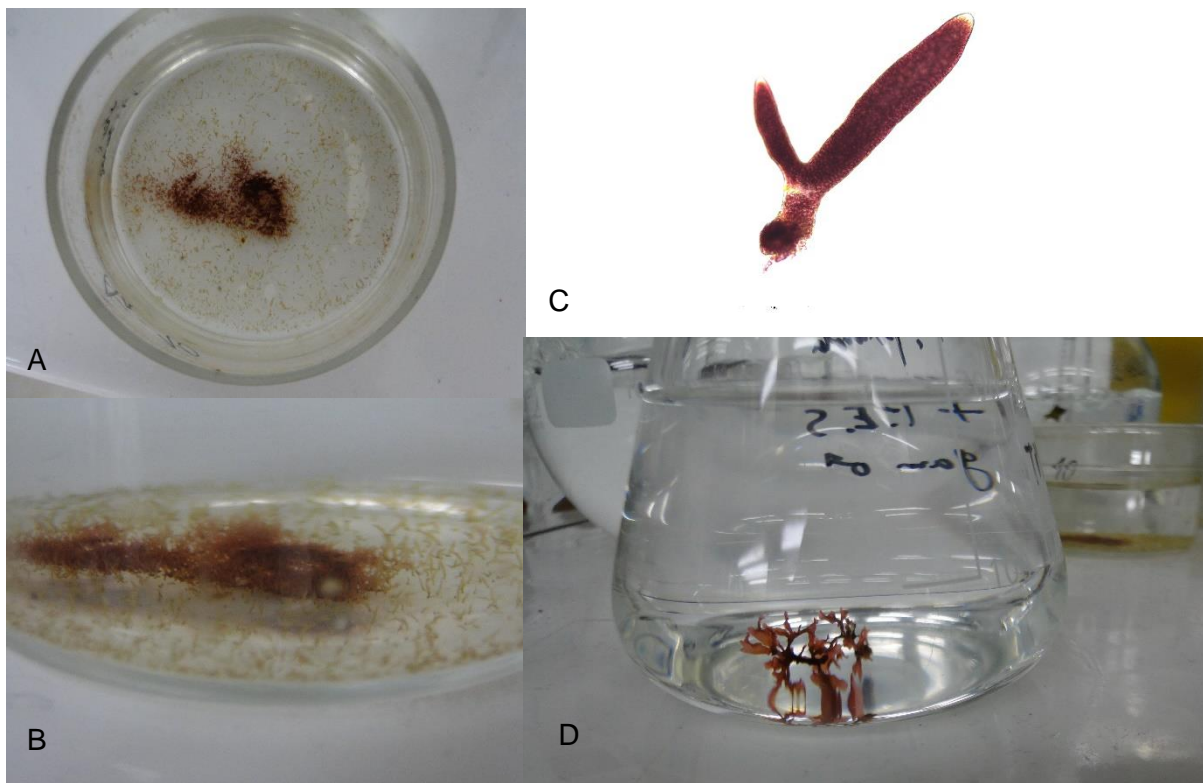


Figure 11 : photos montrant les gamétophytes mâles obtenus suite à la sporulation et après croissance. Les images A et B montrent les plages de spores dans les cristallisoirs, après le début de la croissance des individus. La photo C montre un individu observé au microscope inversé, la barre d'échelle représente 150  $\mu\text{m}$ . La photo D montre des gamétophytes mâles isolés après plusieurs mois de croissance. (© A. Drion)

### C. Analyse de la ploïdie par cytométrie de flux.

Les résultats obtenus lors de l'expérience de cytométrie de flux ont permis de différencier les individus haloïdes et diploïdes. Les différents types de résultats sont présentés sur la Figure 12, un graphique (à gauche) représente le nombre d'événements c'est-à-dire le nombre de noyaux détectés en fonction de la quantité d'ADN. L'autre graphique (colonne de droite) montre le nombre d'évènements cette fois en fonction de l'échelle logarithmique de la quantité d'ADN. Cette deuxième courbe apporte des informations complémentaires à la première, elle permet entre autres de distinguer ce qui est un pic lié au bruit de fond d'un pic de fluorescence dû à une accumulation effective d'événements. Le témoin est issu d'une expérience réalisée avec un individu déterminé comme sporophytique lors de sa récolte. On constate sur le graphique de gauche que le nombre majeur d'événements est situé pour une valeur de 200, correspondant à une quantité  $2n$  d'ADN. Le graphique de droite quant à lui présente un pic bien distinct, confirmant qu'il s'agit là d'un résultat fiable. Sur les 6 individus, 4 individus sont diploïdes de façon certaine, ils présentent les mêmes résultats que l'individu 6, avec un pic bien net d'événements pour une quantité d'ADN  $2n$ . En revanche deux résultats sont apparus moins clairs concernant les individus 2 et 3.

Dans le cas de l'individu 2 on observe un pic situé à 130 environ, l'individu n'est donc de toute évidence pas diploïde. Toutefois pour qu'il soit haploïde il devrait présenter un pic à 100 correspondant à 1n quantité d'ADN, ce qui n'est pas le cas. L'expérience a été répétée 3 fois avec des parties différentes de l'individu en obtenant toujours les mêmes résultats. Il n'est donc pas possible de conclure de manière certaine sur la ploïdie de cet individu.

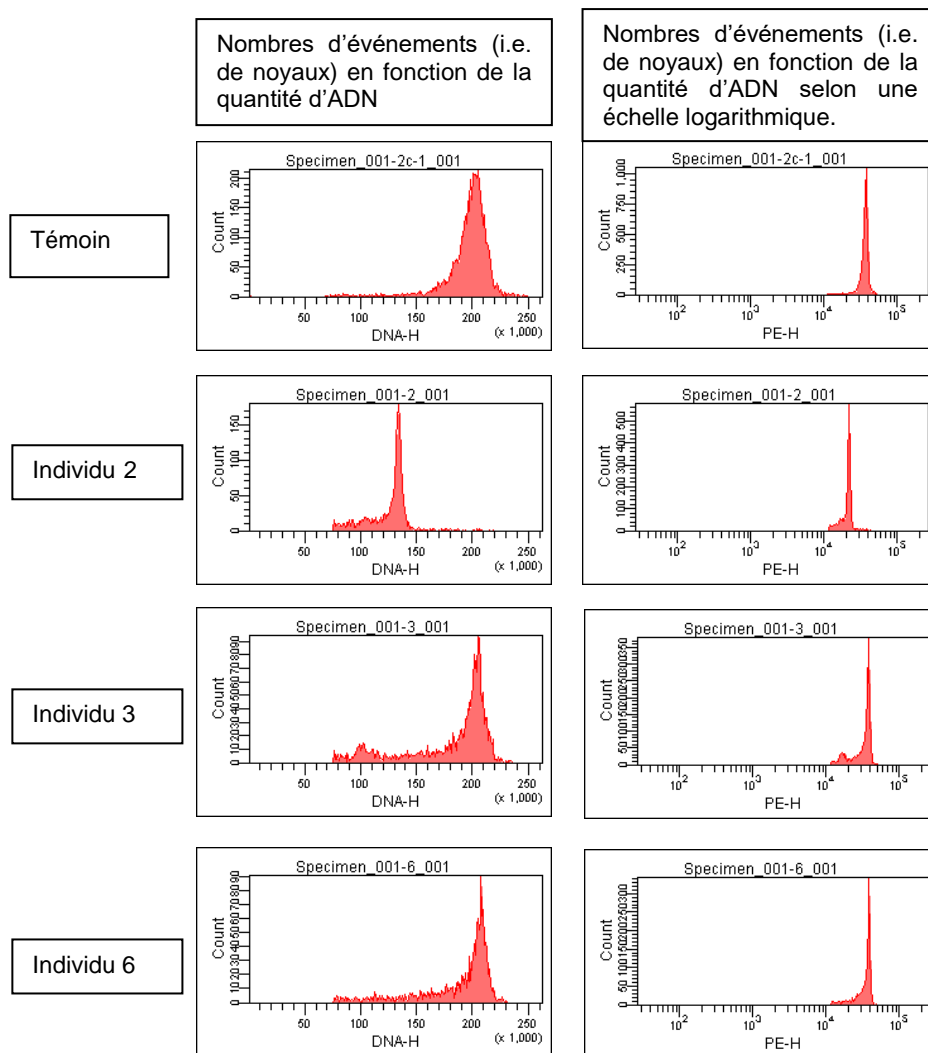


Figure 12 : Résultats de l'expérience de détermination de la ploïdie en cytométrie de flux, pour des raisons pratiques seuls les résultats modèles ont été présentés, l'ensemble des résultats de l'expérience est disponible en annexe 5

Pour l'individu 3 cette fois on observe bien un pic à 200 mais également un léger pic à 100. Il pourrait s'agir d'un bruit de fond mais le graphique en échelle logarithmique présente également un second pic, plus proche de  $10^4$  que le premier. Il ne s'agit donc pas d'un bruit de fond et cet individu présente des signes d'haploïdie et de diploïdie. Là encore 3 expériences similaires ont été réalisées avec différentes parties de l'individu sans que les résultats obtenus ne soient différents. Il est clair au vu de la différence de taille des pics que l'individu semble plus diploïde, pour autant il n'est pas possible de l'affirmer avec certitude.

#### D. Identification des facteurs d'induction de la maturation

Les conditions de températures de salinité et de pH de l'eau ont été surveillées tout au long de l'expérience. Ces paramètres sont restés stables tout au long de l'expérience. Seule la température de l'eau variait légèrement au cours de la journée, du fait des variations de températures de l'eau de renouvellement. Il est également à noter qu'une coupure de courant est survenue durant une nuit, l'éclairage n'en a pas été affecté puisqu'il s'activait principalement en journée, mais la température de l'eau est montée de quelques degrés, les

thermorégulateurs étant en panne, cet incident n'a pas pour autant empêché la poursuite de l'expérience.

Après 55 jours dans les conditions contrôlées, nous avons cessé l'expérimentation. Les résultats obtenus et décrits ci-dessous proviennent d'une part des observations régulièrement effectuées au cours de l'expérience et d'autre part des observations après 55 jours.

Comme nous pouvions nous y attendre les individus placés dans des conditions de température élevée, à 19°C n'ont pas résisté et se sont dégradés rapidement. Les triplicats en conditions de température « médiane » à 13°C n'ont pas présenté de signes particuliers de différenciation. En revanche comme on peut le voir sur les photos des Figure 13 et Figure 14, les individus placés à faible température (environ 8 °C) ont montré des marques de différenciations de sporocystes. On distingue une différenciation plus rapide chez les individus placés en photopériode de jours courts (P = 8 : 16, Figure 14) en une vingtaine de jours contre une maturation plus longue, d'environ 50 jours chez les individus en conditions de jours longs (P = 14 : 10) (Figure 13).



Figure 13 : Thalle mis en conditions de température basse et de photopériode longue (P= 14 : 10). Avant (à gauche) et après 50 jours d'expérience (à droite). On distingue nettement les taches sombres correspondant au tetrasporocystes différenciés. (© A. Drion)

Par ailleurs dans les deux cas on observe une croissance des thalles de quelques centimètres au niveau des méristèmes. On note également un début de jaunissement de certains thalles dans les parties non différenciées. Cependant cela n'est pas imputable directement à la différenciation sexuelle puisque dans les triplicats n'ayant pas présenté de différenciation de telles dépigmentations sont également visibles.

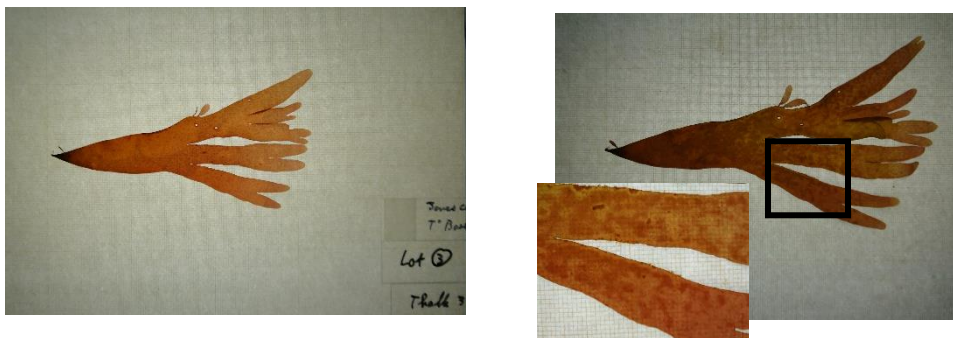


Figure 14: Thalle mis en conditions de température basse et de photopériode courte (P= 8 : 16). Avant (à gauche) et après 20 jours d'expérience avec un détail d'une partie du thalle (à droite). Après expérience, on distingue nettement les taches sombres correspondant au tetrasporocystes différenciés. (© A. Drion)

L'ensemble des résultats obtenus est rappelé dans le Tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus lors de l'expérience de maturation des individus. La notation des photopériodes est définie comme suit : P = Durée du Jour : Durée de la Nuit.

Température / Photopériode	Température		
	8°C	13°C	19°C
Jours Courts (P = 8 : 16)	Maturation en 20 jours	Pas de maturation	Non testé
Jours Médiants (P = 12 : 12)	Non Testé	Témoin : Pas de maturation	Morts des individus
Jours Longs (P = 14 : 10)	Maturation en 50 Jours	Pas de maturation	Non testé

### E. Mise au point d'un protocole d'extraction d'ADN

La mise au point du protocole d'extraction d'ADN a été réalisée suite à différents essais d'ajustement du protocole de départ décrit en I-B-6. Nous n'allons pas ici reprendre l'ensemble des résultats obtenus à chaque essai. Il apparait en effet plus pertinent de mettre en exergue les améliorations obtenues tout en décrivant les parties du protocole dont les modifications ont apporté un réel changement.

La première extraction réalisée sur des individus récoltés en 2016, nous a d'ores et déjà permis de montrer que l'utilisation du kit NucléoSpin Plant II était possible. En effet en plus d'obtenir des extractions d'ADN la qualité des échantillons ainsi obtenus était déjà encourageante. Comme on peut le voir sur les résultats du NanoDrop™ sur la Figure 15 les valeurs des rapports A260/A280 sont supérieurs à 1,80, ainsi il n'y a pas de contaminations notables par des protéines. Et les rapports de A260/A230 sont proches de 2 ce qui signifie que la contamination par des sucres ou des solvants est également faible. Seul point négatif, les concentrations en ADN obtenues sont relativement faibles par rapport aux quantités nécessaire. Pour autant le rendement de l'extraction est bon. En effet pour 46 mg de matière fraîche au départ, nous en avons récupéré 76,3 ng/μL avec 70 μL élués soit 5,3 μg extrait. Si on pose R, le rendement de l'extraction correspondant à la quantité d'ADN extraite par rapport à la quantité d'algue de départ on a alors :

$$R = \frac{5341}{46} * 1000, \text{ Soit } R = 115 \mu\text{g/g}$$

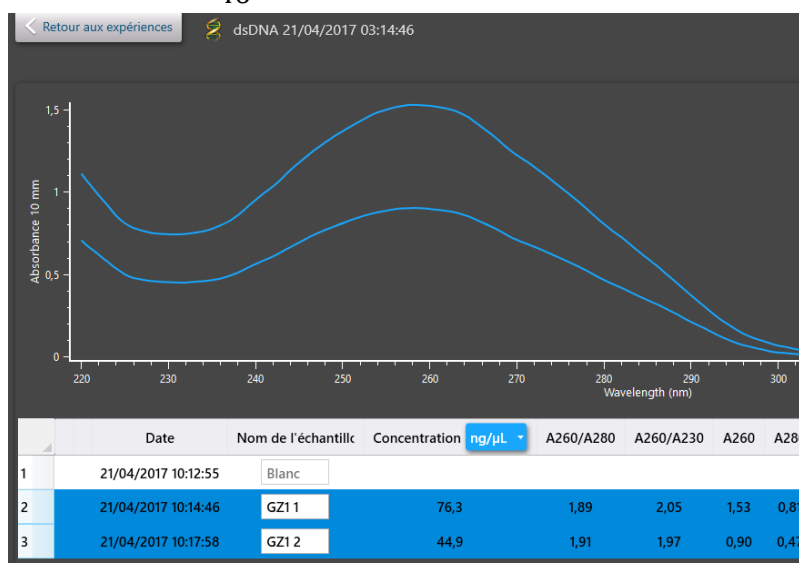


Figure 15 : Résultats obtenus au NanoDrop™ pour la première extraction d'ADN.

D'autres expériences réalisées ensuite sur des échantillons secs cette fois se sont avérées inexploitable, en effet après avoir obtenu des résultats étonnants nous nous sommes aperçus que lors de la lyophilisation un utilisateur externe avait ouvert la cloche du lyophilisateur et l'avait mal refermée, ainsi le vide n'était pas fait et la lyophilisation n'a pas été complète. Nous avons donc recommencé les étapes de lyophilisation avant de répéter les expériences.

Après différentes tentatives avec des modifications en certains points du protocole comme décrit en partie I-B-6 nous avons parfois obtenu des résultats très insatisfaisants, avec soit de fortes contaminations soit des quantités d'ADN extraite bien trop faibles. Nous avons en revanche obtenu des résultats très encourageants, avec des concentrations d'échantillons fortes et une qualité satisfaisante comme le montre le graphique de la Figure 16.

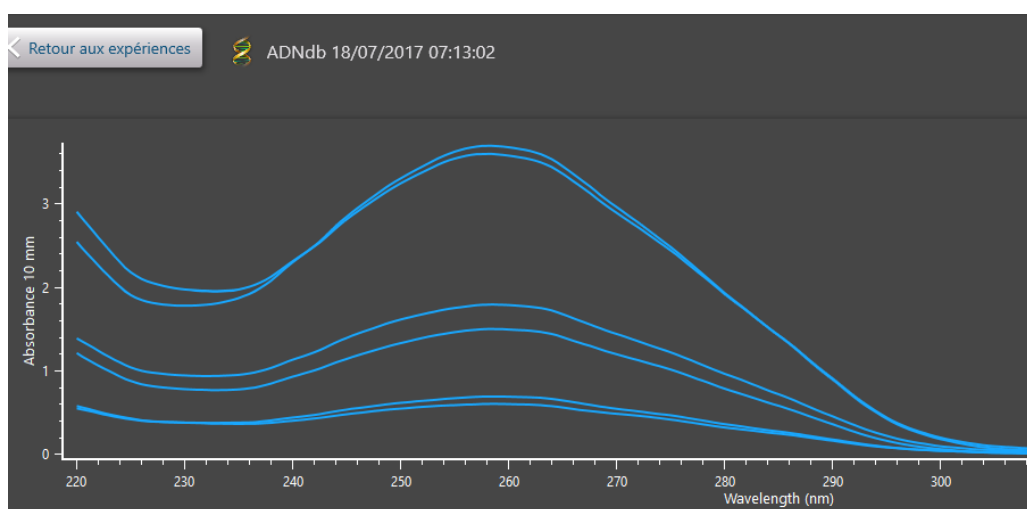


Figure 16 : Résultats de l'analyse par spectrométrie réalisée avec le NanoDrop™ pour les échantillons SLG 1 à 6.

Tableau 5 : Valeurs de concentrations et rapports d'absorbances obtenus par spectrométrie au NanoDrop™ pour les extractions des individus lyophilisés SLG 1 à 6.

Echantillon	Concentration en ng/μL	Rapport A260/A280	Rapport A260/A230
<b>SLG 1</b>	183,9	1,90	2,06
<b>SLG 2</b>	34,5	1,90	1,81
<b>SLG 3</b>	75,2	1,89	1,90
<b>SLG 4</b>	89,2	1,85	1,89
<b>SLG 5</b>	30,1	1,87	1,59
<b>SLG 6</b>	178,9	1,86	1,81

Ainsi en partant de 20 mg d'échantillons lyophilisés broyés au Lyser à billes à 30 Hz et 20 Hz plusieurs fois, en augmentant le temps de lyse de 5 min et en insistant sur la phase de mélange lors de la fixation de l'ADN nous avons obtenu de bons résultats. Hormis pour les individus SLG 2 et SLG 5 les concentrations obtenues sont assez satisfaisantes surtout pour les individus 1 et 6. Par ailleurs tous les rapports d'absorbance A260/A280 sont supérieurs à 1,80 et seul le rapport A260/A230 du SLG 5 est vraiment très éloigné de 2, autrement dit les extraits sont d'assez bonne qualité à première vue comme le confirme le gel d'électrophorèse présenté en Figure 17. Il serait cependant souhaitable d'améliorer les concentrations de certaines extractions.

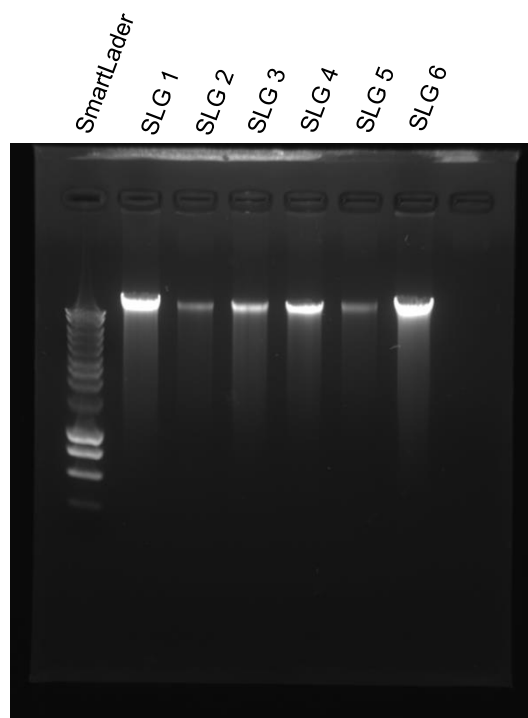


Figure 17 : résultats de l'électrophorèse réalisée sur les extraits d'ADN de SLG 1 à 6

Nous avons donc réalisé une nouvelle extraction cette fois sur des individus de Sainte Barbe (SB 1 à 6). Les phases des lyses sont à nouveau modifiées : le tampon de lyse est placé dans les tubes Eppendorf avant le dernier broyage au lyser. L'ARNase est ensuite ajoutée et l'incubation est cette fois réalisée sur 18 min au lieu de 10 min initialement. Les concentrations obtenues sont cette fois ci très satisfaisantes. En effet comme on peut le voir dans les résultats de la spectrométrie dans le Tableau 6 toutes les concentrations sont supérieures à 100 ng/μL, atteignant même parfois plus de 200 ng/μL (pour SB 1, 2, 4 et 5). Par ailleurs les échantillons présentent des rapports d'absorbance A260/A285 compris entre 1,80 et 1,86 donc effectivement supérieurs à 1,80. Seuls les rapports A260/A230 des individus 2 et 3 respectivement de 1,74 et 1,67 sont éloignés des valeurs de référence

Tableau 6 : Valeurs de concentrations et rapports d'absorbances obtenus par spectrométrie au NanoDrop™ pour les extractions des individus SB 1 à 6.

Echantillon	Concentration en ng/μL	Rapport A260/A280	Rapport A260/A230
SB 1	248,3	1,86	2,05
SB 2	204,0	1,85	1,74
SB 3	100,2	1,84	1,67
SB 4	281,6	1,86	1,97
SB 5	213,3	1,85	1,96
SB 6	178,7	1,84	1,95

### III. Discussion

#### A. Maintien de cultures unialgales.

Les expériences réalisées ont montré que le maintien de cultures unialgales pouvait s'avérer délicat. Outre l'apparition de contaminations nécessitant un travail de lavage relativement long, nous avons constaté que certaines algues semblent mieux s'adapter à la mise en culture que d'autres. Pour autant il n'est pas encore possible de dire de façon certaine si cela est conséquent aux contaminations ou si cela provient de ce qui serait une forme de prévalence intrinsèque à chaque individu. En effet dans certains cas ce sont des individus peu voire pas contaminés qui ont dégénéré, dans d'autres cas au sein d'un même lot certains individus sont morts et d'autres ont résisté, enfin dans le cas d'individus contaminés, voire fortement contaminés, il arrivait que certains individus résistent bien quand d'autres finissaient par mourir.

Une expérience complémentaire avec plusieurs lots issus de mêmes individus dans des conditions similaires pourrait permettre, en cas de contaminations, d'établir si statistiquement les individus sont plus résistants en fonction de leur lignée génétique ou non. En outre il serait également pertinent de tester plusieurs lots issus de mêmes individus dans des conditions différentes afin de comprendre quels seraient les paramètres optimaux de mise en culture, favorisant la croissance d'une part et la résistance aux contaminations d'autre part. Ainsi le milieu SFC pourrait être utilisé à différentes concentrations et avec des renouvellements plus ou moins espacés. Dans le cas où ce milieu favoriserait effectivement la prolifération des contaminants on aurait ainsi la possibilité de fournir des nutriments à un rythme optimal assurant la bonne croissance des algues tout en stabilisant les proliférations.

Pour autant nous avons pu valider les conditions de cultures à 13°C et à photopériode constante P = 12 : 12. Ces conditions permettent un bon maintien des algues sans observer de différenciation de sporocystes non voulue. Des études réalisées sur l'influence de la photopériode ont montré qu'une interruption de nuit longue par une heure d'éclairage permettait de stimuler des jours longs et de réduire les chances de maturation (Pang, Lüning, 2006) de telles conditions pourraient être testées à l'avenir sur les cultures unialgales pour vérifier ce photopériodisme.

La mise en place de ces cultures est un point important du développement en aquaculture de *P. palmata*, elle permettrait bien entendu de disposer tout au long de l'année d'individus de ploïdie connue, facilitant leur étude tant biologique que génétique. De plus lorsque les techniques d'induction de la maturation seront fiables et maîtrisées il sera alors possible de fournir à la demande des ensemencements de spores d'une part mais aussi de sporophytes issus de la fécondation de spermaties et de trichogynes d'autre part. Les résultats obtenus sont encourageants en ce sens et ouvrent ces perspectives, même s'il est encore nécessaire d'améliorer les techniques de maintien de ces cultures, afin de tendre vers un système plus facile à utiliser en routine, en facilitant la manutention par exemple.

#### B. Expériences de sporulations.

Les résultats obtenus nous permettent de valider le protocole de sporulation proposé par Line LE GALL. En effet les algues soumises à celui-ci ont bien plus sporulé qu'avec l'autre protocole. Cependant un très grand nombre de spores n'ont pas montré de signe de développement et une majorité d'entre elles ne se sont soit pas fixées soit ont rapidement dégénéré. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces résultats. En premier lieu la qualité du support qui pourrait contenir des substances nocives entraînant la mort rapide des spores. En second lieu il n'est pas improbable que certaines spores aient été émises avant d'être tout à fait matures. En effet le protocole utilisé constitue un stress engendrant une ouverture plus rapide des parois cellulaires de *Palmaria palmata*, sans pour autant que la viabilité des spores soit garantie. D'autre part, la survie des spores pourraient aussi être diminuée en fin de période de maturité des tétrasporocystes comme c'est le cas en fin de printemps (mars-avril).

Il en vient que la maîtrise de la sporulation doit être encore étudiée afin de déterminer d'abord laquelle de ces hypothèses est vérifiée en démarrant ces expériences dès le début de la saison de maturation en automne. Ensuite il faudra lever les points de blocages identifiés, soit en travaillant sur les supports utilisés soit en tentant de déterminer des facteurs pouvant améliorer la viabilité des spores avant la sporulation par exemple.

Il serait également intéressant d'identifier des techniques qui permettraient de séparer les spores femelles des spores mâles afin de constituer par la suite des cultures monosexuelles. Ainsi les gamétophytes femelles pourraient être mises à la reproduction avec des gamétophytes mâles déjà matures afin de palier au décalage temporel de la maturité évoqué en partie I-A-3. Des expériences de tri de cellules pourraient être tentées au cytomètre de flux (FACsort), mais les capacités d'adhésion de ces spores pourraient poser des problèmes dans le cytomètre.

Enfin il semble ici important de rappeler l'importance de maîtriser cette étape de sporulation, en effet c'est entre autre la maîtrise de ce point du cycle de développement de *Palmaria palmata* qui permettrait de fournir par la suite des supportsensemencés pour l'aquaculture. Ainsi l'étude de la fixation et de la bonne tenue sur les supports mais également de la viabilité des individus est cruciale. C'est d'ailleurs l'un des volets étudiés par nos collègues du CEVA et dont nous espérons obtenir des résultats encourageants prochainement.

### C. Analyse de la ploïdie par cytométrie de flux.

En plus de permettre l'identification de la ploïdie des individus étudiés, et de fait de distinguer les sporophytes des gamétophytes mâles, l'analyse par cytométrie de flux a soulevé quelques questions.

D'une part concernant l'individu 2 dont nous avons vu dans la partie II-C de ce rapport qu'il avait une quantité d'ADN anormalement basse pour un diploïde et anormalement élevée pour un haploïde. La question se pose alors de savoir à quoi peut être dûe une telle anomalie. En premier lieu l'erreur humaine a donc été privilégiée, c'est la raison pour laquelle l'expérience a été répétée trois fois et pour des parties différentes de l'individu. Pourtant les résultats sont restés identiques et l'individu présentait toujours un pic de ploïdie aux alentours de 140. S'en est suivie une discussion avec différents chercheurs de la SBR afin d'établir des hypothèses probables. C'est alors que Myriam VALERO de l'Unité Mixte Internationale, m'a évoqué la possibilité de trouver des individus présentant différents types d'aneuploïdie en limites de populations (Kron et al., 2007 ; Oppliger et al., 2014) Cette hypothèse semble donc pertinente, cependant pour la vérifier il faudrait réaliser des expériences de cytométrie similaire sur un plus grand nombre d'individus afin de mieux étudier ce phénomène.

D'autre part l'individu 3 présente deux pics, l'un à 100 et l'autre à 200, suggérant ainsi que l'individu soit à la fois haploïde et diploïde. Là encore plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer un tel résultat. L'erreur humaine étant là encore envisagée nous avons réalisé des expériences de vérifications à partir de différentes parties de l'individu, mais les résultats restent identiques. On a donc pensé à l'existence de plages de différenciations de tétraspores (n) au sein d'un sporophyte (2n). Cependant la période estivale de récolte laisse peu de chance à la possibilité qu'un début de différenciation ait lieu. En outre l'utilisation de différentes parties de l'individu pour les expériences de vérification réduisent aussi ces hypothèses. En effet s'il est possible que des tétrasporocystes se forment au milieu des thalles il est rarement observé que ceux-ci se forment aux extrémités des lames, et encore moins sur les régénérations marginales. Enfin une troisième hypothèse porte sur l'existence de spores d'individus haploïdes sur la surface du thalle. Une telle hypothèse aurait pu être vérifiée par observations microscopique ou en laissant certains thalles en culture pour observer l'émergence de certaines algues. Mais les observations au microscope n'ont pas été concluantes, d'autant que si des spores de *P. palmata* étaient effectivement présents sur l'algue elles auraient déjà atteint un certain stade de développement à cette époque de



l'année. S'il s'était agi de spores d'autres algues, les chances sont faibles pour que la quantité d'ADN présente dans celles-ci soit exactement égale à celle des *Palmaria palmata* haploïde.

Ces deux cas particuliers observés restent donc sans réelles explications, des expériences ultérieures concernant la ploïdie d'individus provenant des mêmes populations pourraient permettre d'écarter certaines hypothèses et de dégager une explication claire.

#### D. Identification des facteurs d'induction de la maturation.

Lors des tentatives d'induction de la maturation nous avons pu mettre en évidence une différenciation chez des individus soumis à des conditions de température faible. Par ailleurs la photopériode semble permettre d'accélérer cette différenciation. Comme on pouvait s'y attendre des individus soumis à des conditions de température trop élevées ont tendance à dégénérer rapidement. Les conditions de températures plus intermédiaires, à 13°C, permettent le maintien des individus mais n'induisent pas de différenciation. Ce résultat est intéressant pour les mises en cultures unialgales puisque dans ce cas-là, nous avons justement besoin de maintenir des algues sans risque qu'elles se différencient avant qu'on ait décidé d'induire la maturation. De telles conditions de température répondent donc à ces besoins.

Nous avons obtenu des résultats sur la sporogénèse qui vont dans le sens des résultats obtenus quelques années auparavant sur des cultures en bassins de *Palmaria palmata*, montrant également une influence de la température sur la différenciation des sporocystes (Pang, Lüning, 2006). L'obtention de tels résultats est encourageante et prometteuse pour la mise en culture de cette Rhodophyte, cela permettrait d'ores et déjà d'obtenir des spores à la demande, bien qu'il reste quelques paramètres à améliorer. En outre une telle avancée permettrait de répondre aux besoins croissants des laboratoires de recherche en spores de *Palmaria palmata*. À titre d'exemple, étant les hôtes de certains oomycètes comme *Olpidiopsis palmariae* il est nécessaire d'en avoir à disposition pour maintenir ces pathogènes en vie afin de mieux les étudier et d'identifier des techniques de luttés pour assainir les cultures (Gachon, 2017)

Malheureusement le faible nombre de gamétophytes récoltés et le manque de temps ne nous ont pas permis de réaliser la même expérience sur la gamétogénèse. Il serait intéressant de le faire afin de pouvoir disposer de spermaties pouvant féconder les gamétophytes femelles dès leur maturité, ainsi on augmenterait grandement les densités d'individusensemencés. En effet au lieu de ne récupérer que la part des gamétophytes mâles donc potentiellement 50% des spores émises, on obtiendrait en plus la part des individus femelles fécondés, devenus ainsi des sporophytes. Enfin la maîtrise de la gamétogénèse permettrait de boucler le cycle de reproduction de *P. palmata*, et ouvrirait donc la voix à des travaux de génétique quantitative par exemple.

#### E. Mise au point d'un protocole d'extraction d'ADN.

Après plusieurs tentatives nous avons pu ajuster le protocole de sorte que l'extraction d'ADN corresponde aux besoins ultérieurs d'analyse de l'ADN. Tel qu'il existe actuellement ce protocole n'est peut-être pas encore optimisé, et la pratique de celui-ci lors de nouvelles expériences d'extraction pourrait permettre d'en améliorer encore certains points. Il n'est par ailleurs pas impossible que les résultats varient selon les individus et les populations dont ils proviennent. Des individus aux parois plus épaisses nécessiteraient par exemple un temps de lyse un peu plus long, au contraire des jeunes individus plus minces demanderaient à ce que l'on réduise un peu ce temps de lyse.

Les échantillons ainsi obtenus ont été envoyés pour réaliser des analyses préliminaires de séquençage. Toutes les études génétiques préalables sur *Palmaria palmata* ont été focalisées sur des approches biogéographiques pour comprendre le rôle de l'avant-dernier maximum

glaciaire (Saale) dans la formation des populations européennes (Provan et al 2005). Ces travaux ont utilisé 33 séquences de l'ADN mitochondrial (mtDNA) *cox2-3* pour estimer le temps d'expansion des populations européennes (spécimens nord-américains / islandais exclus). Les génotypes de longueur de fragment de restriction en polymérase (PCR-RFLP) de 264 individus n'ont pas révélé de divergence génétique entre l'Atlantique de l'Est et de l'Ouest. Plus récemment, Li et al. (2015) ont collecté des spécimens de 15 populations de *P. palmata* le long des deux côtés de l'Atlantique Nord. Les marqueurs génétiques utilisés étaient les régions *cox2-3* mitochondriale et les régions plastidiales *rpl12-rps31-rpl9 (rps)* (Li et al., 2015). Les marqueurs microsatellites (SSR) n'ont pas été développés pour ces études. De même, aucune donnée de marqueurs SNPs ou IDPs n'est disponible pour l'espèce. L'objectif étant de réaliser un génotypage le laboratoire chargé de cette étude doit identifier la technique la plus appropriée. Plusieurs approches sont effectivement possibles pour étudier les polymorphismes de séquences de l'ADN. D'une part des techniques de sélection assistée par marqueurs (SAM) consistent à identifier dans le génome des séquences d'intérêt. Ces séquences peuvent être des QTLs (Quantitative Trait Loci) qui correspondent à des zones de l'ADN où sont localisés des gènes d'intérêts, car exprimant un caractère dit quantitatif. D'autres techniques peuvent permettre de différencier les individus, notamment l'étude des polymorphismes qui vise à identifier des séquences variables d'un individu à l'autre. On distingue deux types de polymorphismes : les SNP (Single-Nucleotide Polymorphisms) qui sont dus à des substitutions nucléotidiques bien localisées, et les IDP (Insertion Deletion Polymorphisms) qui cette fois sont la conséquence d'insertion ou de délétion de nucléotides à un locus donné. Enfin il existe également les marqueurs dits microsatellites ou SSR (Simple-Sequence Repeats) qui correspondent à des enchaînements de quelques nucléotides fortement répétés et très variables (Falque, 2011).

A l'heure actuelle les échantillons d'ADN obtenus lors de l'extraction ont été envoyés et sont en cours de traitements, des résultats sont attendus dans les semaines à venir.

## Conclusions et perspectives.

Bien que nous n'ayons pas pu complètement mettre au point une technique fiable de mise en culture, plusieurs éléments ressortent de cette étude.

Avant tout nous avons vu, au travers des différentes expériences réalisées, qu'il existe encore certains points de blocage à lever (Figure 18). Que ce soit concernant le maintien de cultures unialgales, la qualité et la survie des spores lors de la sporulation, mais également l'induction de la gamétogénèse par exemple. Certains de ces points de blocages sont dus au manque de connaissances biologiques à certains stades de l'algue et il apparaît nécessaire d'étudier plus en profondeur certains mécanismes de développement afin de mieux comprendre et donc de mieux maîtriser les techniques de mise en culture. On peut ici évoquer à titre d'exemple la nécessité de mieux comprendre les facteurs influençant la fixation des spores de *P. palmata*, et à ce sujet plusieurs hypothèses ont été formulées lors de réunions avec nos collaborateurs. Ainsi l'étude des influences de *Fucus serratus* ou de *Laminaria hyperborea* sur une telle fixation ont été évoqués après avoir constaté que notre Rhodophyte était bien souvent épiphyte sur ces algues. Le rôle des bactéries associés à ces algues ou à certains substrats pourraient être déterminant

Pour autant des résultats encourageants ont été observés et semblent démontrer que même si la maîtrise du cycle de *Palmaria palmata*, n'est pas encore parfaite, sa propagation en aquaculture n'est pas un objectif inatteignable. Il constitue d'ailleurs une grande ambition qui pourrait permettre de stimuler le développement de l'algoculture en Bretagne d'abord, en France et en Europe de façon plus générale. À l'heure où les ressources doivent être gérées durablement, où nourrir l'humanité devient un enjeu crucial des années à venir, et où les mentalités de consommations évoluent vers des aliments plus sains, plus locaux, plus écologiques, il apparaît clairement que les algues ont un rôle à jouer. Pourtant, malgré un potentiel important, dû à sa connaissance, sa recherche mais également ses possessions maritimes il est regrettable de voir que la France est en passe de perdre la faible avance qu'elle a sur ses concurrents européens. Il est dommage de constater que malgré une volonté affichée de l'Union Européenne de développer l'aquaculture, et en particulier l'algoculture, (en témoignent les récentes parutions des rapports du FEAMP (FEAMP, 2017)), la France reste encore empêtrée dans des lenteurs administratives, terminant de réduire à néant ce qu'il restait de motivation chez les entrepreneurs français soucieux de développer une agriculture bleue. Alors que le Brexit et les conjonctures actuelles plongent le secteur de la pêche dans une situation délicate, alors que, depuis de nombreuses années, le tissu économique des produits de la mer semble se déliter, nous avons autour de nous les outils et les personnes en mesure de refaire de la mer une des puissances économiques françaises. Maîtriser le cycle de reproduction de *Palmaria palmata*, comme d'autres algues et leurs propagations en aquaculture pourraient à terme contribuer à mettre en avant le grand potentiel qui existe dans cette filière et à inciter la classe politique à aider son développement.

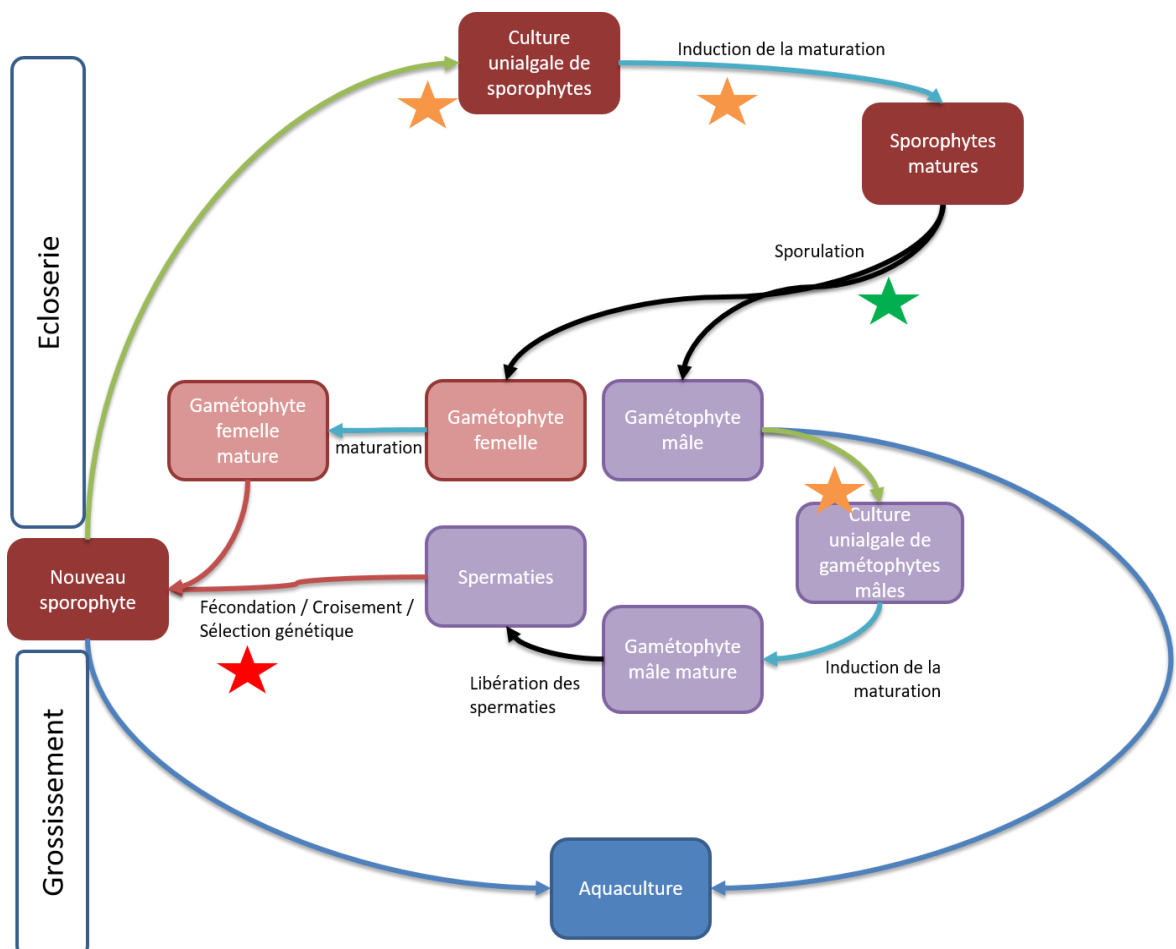


Figure 18 : Schéma Bilan reprenant le chemin technique de mise en culture. Les étoiles indiquent les différents points critiques étudiés dans ce mémoire, et leur couleur indique le niveau de maîtrise actuel : Vert = élément assez maîtrisé, Orange = en passe d'être maîtrisé, Rouge = non maîtrisé.

## Bibliographie

AUDEBERT, Christophe, 2012. Point méthodologique : le dosage d'acides nucléiques. In : *Biorigami* [en ligne]. Mai 2012. [Consulté le 22 août 2017]. Disponible à l'adresse : <http://www.biorigami.com/?p=2726>.

BOISVERT, Clotilde, 1984. *La cuisine des plantes sauvages*. Paris; New York : Dargaud. ISBN 978-2-205-02637-5.

CHOPIN, Thierry, 2017. S... S... S... In : *The Seaweed and Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) Research Laboratory of Dr. Thierry Chopin* [en ligne]. 2017. [Consulté le 29 août 2017]. Disponible à l'adresse : <http://www2.unb.ca/chopinlab/S...S...S/>.

DION, Patrick, 1987. *Stratégies écologiques chez trois algues marines Rhodophycées se distinguant par l'importance relative de leurs thalles rampant et dresse : *Palmaria palmata* (L.) O.Küntze, *Mastocarpus stellatus* (Stackhouse) Guiry et *Petrocelis cruenta* J. Agardh*. Thèse de Doctorat d'état es Sciences naturelles. Paris : Pierre et Marie Curie - Paris VI.

FALQUE, Matthieu, 2011. Evolution des méthodes de génotypage. In : *Le Sélectionneur Français* [en ligne]. 2011. Disponible à l'adresse : [https://www.researchgate.net/publication/230690734\\_EVOLUTION\\_DES\\_METHODES\\_DE\\_GENOTYPAGE](https://www.researchgate.net/publication/230690734_EVOLUTION_DES_METHODES_DE_GENOTYPAGE).

FAO (éd.), 2016. *Contributing to food security and nutrition for all*. Rome : s.n. The state of world fisheries and aquaculture, 2016. ISBN 978-92-5-109185-2.

FEAMP, 2017. FEAMP ~ Europe en France, le portail des Fonds européens. In : [en ligne]. 2017. [Consulté le 29 août 2017]. Disponible à l'adresse : <http://www.europe-en-france.gouv.fr/L-Europe-s-engage/Fonds-europeens-2014-2020/Politique-de-la-peche-et-des-affaires-maritimes/FEAMP>.

FRANGOUEDES, Katia, 2016. Présentation IDEALG. In : . S.I. 2016.

GACHON, Claire, 2017. Novel strategies for preventing diseases in cultivated seaweeds. In : *ISAP Congress (International Society for Applied Phycology)*. Keynote lecture. Nantes. Juin 2017.

GALLAND-IRMOULI, Anne-Valérie, FLEURENCE, Joël, LAMGHARI, Radia, LUÇON, Michel, ROUXEL, Catherine, BARBAROUX, Olivier, BRONOWICKI, Jean-Pierre, VILLAUME, Christian et GUÉANT, Jean-Louis, 1999. Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (dulse). In : *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 1 juin 1999. Vol. 10, n° 6, p. 353-359. DOI 10.1016/S0955-2863(99)00014-5.

GUIRY, M. D., 1974. A Preliminary Consideration of the Taxonomic Position of *Palmaria Palmata* (Linnaeus) Stackhouse *Rhodymenia Palmata* (Linnaeus) Greville. In : *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. août 1974. Vol. 54, n° 3, p. 509-528. DOI 10.1017/S0025315400022694.

IDEALG PÔLE HALIEUTIQUE AGROCAMPUS OUEST, 2015. La filière des algues Dans le monde, en Europe, en France.... In : *Les publications du Pôle halieutique AGROCAMPUS OUEST* [en ligne]. 29 septembre 2015. [Consulté le 8 août 2017]. Disponible à l'adresse : <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01343425/document>.

KAIN (JONES), Joanna M., 1982. The reproductive phenology of nine species of Rhodophyta in the subtidal region of the Isle of Man. In : *British Phycological Journal*. 1 septembre 1982. Vol. 17, n° 3, p. 321-331. DOI 10.1080/00071618200650321.

KALAYDJIAN, Regis et GIRARD, Sophie, 2017. Données économiques maritimes françaises 2016. In : [en ligne]. 1 janvier 2017. [Consulté le 7 août 2017]. Disponible à l'adresse : <http://archimer.ifremer.fr/doc/00388/49962/>.

KERRISON, Philip D., LE, Hau Nhu, TWIGG, Gail C., SMALLMAN, Duncan R., MACPHEE, Rory, HOUSTON, Fiona A. B. et HUGHES, Adam D., 2016. Decontamination treatments to eliminate problem biota from macroalgal tank cultures of *Osmundea pinnatifida*, *Palmaria palmata* and *Ulva lactuca*. In : *Journal of Applied Phycology*. décembre 2016. Vol. 28, n° 6, p. 3423-3434. DOI 10.1007/s10811-016-0873-9.

KRON, Paul, SUDA, Jan et HUSBAND, Brian C., 2007. Applications of Flow Cytometry to Evolutionary and Population Biology. In : *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. décembre 2007. Vol. 38, n° 1, p. 847-876. DOI 10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095504.

LE GALL, Line, 2002. *Etudes biologiques, biochimique et cellulaires de Palmaria palmata (Rhodophyta) - applications biotechnologiques à l'aquaculture* -. Thèse de Doctorat. Caen : Université de Caen / Basse Normandie.

LE GALL, Line, DENIAUD, Estelle et RUSIG, Anne-Marie, 2004. Etude de la phénologie de la reproduction de la Rhodophyceae *Palmaria palmata* le long des côtes françaises de la Manche. In : *Cahiers de Biologie Marine*. 1 janvier 2004. n° 45, p. 269-275.

LE ROUX, Solène, 2010. France Haliotis élève l'ormeau. In : *Cultures MARINES*. décembre 2010. n° 242, p. 30-34.

LI, Jing-Jing, HU, Zi-Min et DUAN, De-Lin, 2015. Genetic data from the red alga *Palmaria palmata* reveal a mid-Pleistocene deep genetic split in the North Atlantic. In : ROCHA, Luiz (éd.), *Journal of Biogeography*. mai 2015. Vol. 42, n° 5, p. 902-913. DOI 10.1111/jbi.12464.

LÜNING, Klaus, 1985. *Meeresbotanik: Verbreitung, Ökophysiologie u. Nutzung der marinen Makroalgen*. Stuttgart : Thieme. ISBN 978-3-13-667501-4.

MACHEREY-NAGEL, 2014. *Genomic DNA from plant - User Manual NucleoSpin Plant II* [en ligne]. 2014. S.l. : s.n. [Consulté le 14 avril 2017]. Disponible à l'adresse : [http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM\\_gDNAPlant\\_NSPlant II.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM_gDNAPlant_NSPlant II.pdf).

MAI, Kangsen, MERCER, John P. et DONLON, John, 1994. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. In : *Aquaculture*. 1 décembre 1994. Vol. 128, n° 1, p. 115-130. DOI 10.1016/0044-8486(94)90107-4.

MARIE, Dominique, SIMON, Nathalie, GUILLOU, Laure, PARTENSKY, Frédéric et VAULOT, Daniel, 2001. DNA/RNA Analysis of Phytoplankton by Flow Cytometry. In : ROBINSON, J. Paul, DARZYNKIEWICZ, Zbigniew, DOBRUCKI, Jurek, HYUN, William C., NOLAN, John P., ORFAO, Alberto et RABINOVITCH, Peter S. (éd.), *Current Protocols in Cytometry* [en ligne]. Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc. [Consulté le 18 août 2017]. ISBN 978-0-471-14295-9. Disponible à l'adresse : <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142956.cy1112s11>.

MESNILDREY, Lucile, JACOB, Céline, FRANGOUEDES, Katia, REUNAVOT, Mélanie et LESUEUR, Marie, 2012. La filière des macro-algues en France. Rapport d'étude. NETALGAE-Interreg IVb. In : [en ligne]. 2012. [Consulté le 8 août 2017]. Disponible à l'adresse : [https://hal.archives-ouvertes.fr/docs/00/84/05/26/PDF/Rapport\\_WP1\\_FR\\_1.pdf](https://hal.archives-ouvertes.fr/docs/00/84/05/26/PDF/Rapport_WP1_FR_1.pdf).

MORGAN, Keith C., WRIGHT, Jeffrey L. C. et SIMPSON, F. J., 1980. Review of chemical constituents of the red alga *Palmaria palmata* (dulce). In : *Economic Botany*. 1 janvier 1980. Vol. 34, n° 1, p. 27-50. DOI 10.1007/BF02859553.

MORONEY, Natasha C, WAN, Alex HL, SOLER-VILA, Anna, FITZGERALD, Richard D, JOHNSON, Mark P et KERRY, Joe P, 2015. Inclusion of *Palmaria palmata* (red seaweed) in Atlantic salmon diets: effects on the quality, shelf-life parameters and sensory properties of fresh and cooked salmon fillets: Inclusion of *Palmaria palmata* (red seaweed) in Atlantic salmon diets. In : *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 30 mars 2015. Vol. 95, n° 5, p. 897-905. DOI 10.1002/jsfa.6753.

MOURITSEN, Ole G., DAWCZYNSKI, Christine, DUELUND, Lars, JAHREIS, Gerhard, VETTER, Walter et SCHRÖDER, Markus, 2013. On the human consumption of the red seaweed dulce (*Palmaria palmata*

(L.) Weber & Mohr). In : *Journal of Applied Phycology*. 1 décembre 2013. Vol. 25, n° 6, p. 1777-1791. DOI 10.1007/s10811-013-0014-7.

OPPLIGER, Luz Valeria, VON DASSOW, Peter, BOUCHEMOUSSE, Sarah, ROBUCHON, Marine, VALERO, Myriam, CORREA, Juan A., MAUGER, Stéphane et DESTOMBE, Christophe, 2014. Alteration of Sexual Reproduction and Genetic Diversity in the Kelp Species *Laminaria digitata* at the Southern Limit of Its Range. In : SOTKA, Erik (éd.), *PLoS ONE*. 14 juillet 2014. Vol. 9, n° 7, p. e102518. DOI 10.1371/journal.pone.0102518.

PANG, Shao Jun et LÜNING, Klaus, 2006. Tank cultivation of the red alga *Palmaria palmata*: Year-round induction of tetrasporangia, tetraspore release in darkness and mass cultivation of vegetative thalli. In : *Aquaculture*. mars 2006. Vol. 252, n° 1, p. 20-30. DOI 10.1016/j.aquaculture.2005.11.046.

PANG, Shaojun et LÜNING, Klaus, 2004. Tank cultivation of the red alga *Palmaria palmata*: Effects of intermittent light on growth rate, yield and growth kinetics. In : *Journal of Applied Phycology*. 1 mars 2004. Vol. 16, n° 2, p. 93-99. DOI 10.1023/B:JAPH.0000044779.30182.d8.

POTIN, Philippe, 2010. UEB - Idealg : Projet Investissement d'Avenir - Organisation. In : [en ligne]. 2010. [Consulté le 23 août 2017]. Disponible à l'adresse : <http://www.idealg.ueb.eu/themes/organisation/>.

PROVAN, Jim, WATTIER, Remi A. et MAGGS, Christine A., 2005. Phylogeographic analysis of the red seaweed *Palmaria palmata* reveals a Pleistocene marine glacial refugium in the English Channel. In : *Molecular Ecology*. 1 mars 2005. Vol. 14, n° 3, p. 793-803. DOI 10.1111/j.1365-294X.2005.02447.x.

SAGERT, Sigrid et SCHUBERT, Hendrik, 2000. Acclimation of *Palmaria Palmata* (rhodophyta) to Light Intensity: Comparison Between Artificial and Natural Light Fields. In : *Journal of Phycology*. 14 décembre 2000. Vol. 36, n° 6, p. 1119-1128. DOI 10.1046/j.1529-8817.2000.99156.x.

SANDERSON, J Craig, 2015. *Final Report to MASTS under Visiting Fellowship Scheme 2015 - Maximising Production of Palmaria palmata (Linnaeus) Weber & Mohr, 1805*. S.I.

SASI NAYAR AND KRISTON BOTT, 2014. Current Status of Global Cultivated Seaweed Production and Markets. In : *World aquaculture*. Juin 2014.

SKJERMO, Jorunn, 2017. Cultivation of Dulse (*Palmaria palmata*). In : *SINTEF* [en ligne]. 2017. [Consulté le 29 août 2017]. Disponible à l'adresse : <https://www.sintef.no/en/projects/cultivation-of-dulse-palmaria-palmata/>.

VAN DER MEER, J. P., 1976. A contribution towards elucidating the life history of *Palmaria palmata* (=Rhodymenia palmata). In : *Canadian Journal of Botany*. 15 décembre 1976. Vol. 54, n° 24, p. 2903-2906. DOI 10.1139/b76-312.

VAN DER MEER, J. P. et CHEN, L. C-M., 1979. Evidence for sexual reproduction in the red algae *Palmaria palmata* and *Halosaccion ramentaceum*. In : *Canadian Journal of Botany*. 1 novembre 1979. Vol. 57, n° 21, p. 2452-2459. DOI 10.1139/b79-289.

VAN DER MEER, John P. et TODD, Edna R., 1980. The life history of *Palmaria palmata* in culture. A new type for the Rhodophyta. In : *Canadian Journal of Botany*. 1 juin 1980. Vol. 58, n° 11, p. 1250-1256. DOI 10.1139/b80-155.

WERNER, Astrid et DRING, Matthew, 2011. Cultivating *Palmaria palmata*. In : *Aquaculture Explained Issues* [en ligne]. 2011. n° 27. [Consulté le 24 août 2017]. Disponible à l'adresse : [http://epub.sub.uni-hamburg.de/epub/volltexte/2013/18813/pdf/Aquaculture\\_Explained\\_Issue\\_27\\_Cultivating\\_Palmaria\\_palmata.pdf](http://epub.sub.uni-hamburg.de/epub/volltexte/2013/18813/pdf/Aquaculture_Explained_Issue_27_Cultivating_Palmaria_palmata.pdf).

## Annexes

Rappel du sommaire ;

Annexe 1 : Protocole de préparation du milieu SFC .....	ii
Annexe 2 : Protocole de préparation du milieu Von Stosch .....	iii
Annexe 3 : Identifications des diatomées et traitement (2 pages) .....	iv
Annexe 4 : Préparation d'antibiotiques liquides .....	vi
Annexe 5 : Résultats complets de l'analyse de ploïdie par cytométrie de flux .....	vii

## Annexe 1 : Protocole de préparation du milieu SFC

# Milieu de culture SFC

### Solutions Stocks :

#### 1. Fer

Préparer 367mg/L de sels de sodium ferrique éthylène diamine acide tétra-acétique dans de l'eau distillée

#### 2. Phosphates

Préparer 50mM de ( $\text{NAH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) dans de l'eau distillée.

#### 3. Nitrates

Préparer 1M de  $\text{NANO}_3$  dans de l'eau distillée.

#### 4. Métaux

Dans de l'eau distillée, préparer séparément des solutions de :

- 14mg/mL de ( $\text{MnCl}_2$ ,  $4\text{H}_2\text{O}$ )
- 1mg/mL de  $\text{ZnCl}_2$
- 47  $\mu\text{g/mL}$  de ( $\text{CoCl}_2$ ,  $6\text{H}_2\text{O}$ )
- 0,04  $\mu\text{g/mL}$  de ( $\text{CuCl}_2$ ,  $2\text{H}_2\text{O}$ )

50 mL de chacune de ces solutions est ensuite ajouté à une solution de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (4,36 g/L)

Bouillir l'ensemble pendant 10 min.

Ajouter 1L d'eau distillée et ajuster le pH à 7,5.

Filtrer à 0,2  $\mu\text{m}$ .

#### 5. Vitamines

Dans de l'eau distillée, préparer séparément des solutions de :

- Biotine 0,5 g/L
- Acide Folique 1g/L
- Thiamine  $\text{B}_1$  1,5g/L
- Vitamine  $\text{B}_{12}$  0,5 g/L

Ajouter 1,25 mL de chaque solution à 250 mL d'eau de mer filtrée à 0,2  $\mu\text{m}$ .

➔ Un Volume de 2 mL de chacune de ces 5 solutions stocks (Fer, Phosphates, Nitrates, Métaux et Vitamines) est ajouté à 1 litre d'eau de mer filtrée à 0,2  $\mu\text{m}$ .



## Annexe 2 : Protocole de préparation du milieu Von Stosch

### Appendix 2 – Recipes for culture media

#### 2.1 Von Stosch (Grund) Medium (after Guiry and Cunningham 1984)

This enriched seawater medium was modified from Grund Medium by von Stosch in 1963 and further modified by Guiry and Cunningham (1984). It is suitable for growing many red seaweeds.

Prepare stock solutions in distilled or deionised water (dH<sub>2</sub>O). The stock solution should be autoclaved. The vitamin stock solution is prepared separately and is not autoclaved. For final concentration add 10 ml of stock solution to 1 litre of the final medium.

Component	Stock solution (g L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Quantity used for final medium	Concentration in final medium (µmol)
Na <sub>2</sub> β-glycerol PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	5.36	10 ml	248
NaNO <sub>3</sub>	42.52	10 ml	5000
FeSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O	0.28	10 ml	10
MnCl <sub>2</sub> *4 H <sub>2</sub> O	1.96	10 ml	100
Na <sub>2</sub> EDTA* 2 H <sub>2</sub> O	3.72	10 ml	100
Vitamins stock solution	See recipe below	10 ml	

#### *Vitamins stock solution*

For the vitamins stock solution, dissolve the thiamine\*HCl in 950 ml of dH<sub>2</sub>O. Then add 1ml of each of the two other stock solutions. The final vitamins stock solution should be partitioned and kept in the freezer until use.

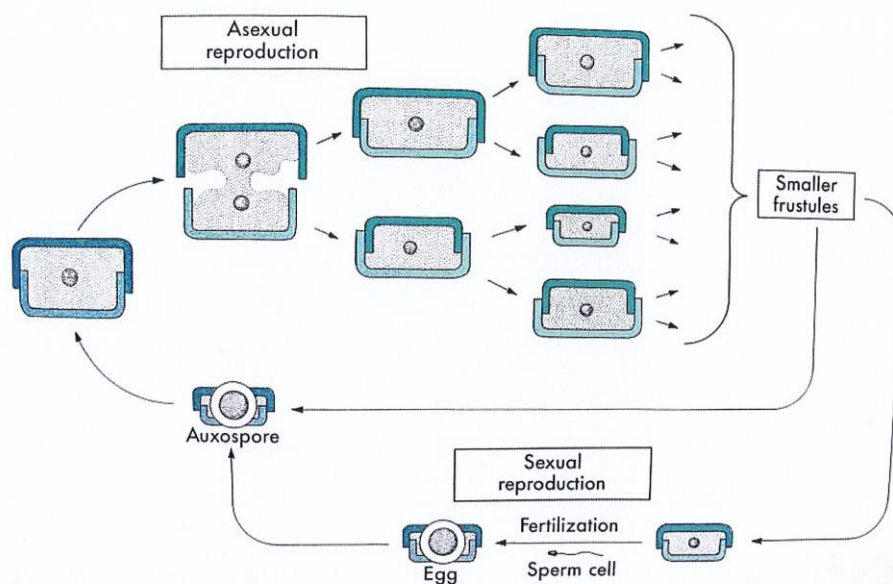
Component	Stock solution (g L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Quantity used for final medium	Concentration in final medium (µmol)
Thiamine * HCl (vitamin B <sub>1</sub> )	-	200 mg	5.9
Biotin (vitamin H)	0.1	1 ml	0.0041
Cyanocobalamin (vitamin B <sub>12</sub> )	0.2	1 ml	0.0015

## Annexe 3 : Identifications des diatomées et traitement (2 pages)

### PROTOCOLE N°17

#### IDENTIFICATION DES DIATOMEES ET TRAITEMENT

- Cycle de reproduction des diatomés :



- cycle diplobiontique, relativement court (quelques heures à quelques jours selon espèces et caractéristiques du milieu),
- 2 modes de reproduction distincts :
  - o les diatomées se reproduisent principalement par mitose (*multiplication végétative*) : chaque cellule donne naissance à 2 cellules filles, par écartement des 2 valves et régénération de nouvelles valves de plus petite taille. Ce processus conduit à la réduction progressive de la taille des cellules au fil des générations jusqu'à l'atteinte d'une taille minimale. Ce phénomène peut prendre un temps très long (plusieurs années) et lorsqu'elles atteignent 30% de leur taille initiale, elles font la méiose et des gamètes dépourvus de frustules sont formés,
  - o la *reproduction sexuée*, induite par la réduction de taille de la cellule mais aussi par des facteurs environnementaux (lumière, température, nature du substrat, etc.), permet la restauration d'individus de taille normale. Les modalités de cette reproduction sexuée varient selon les espèces, mais l'auxosporulation (production d'auxospore ou cellule "oeuf ") est toujours observée.



- **le Dioxyde de Germanium, inhibiteur de la croissance des diatomées :**

- Le squelette extérieur ou frustules est en silice. Après multiplication végétative, le germanium s'insère à la place de la silice dans les frustules.
- Préparation du dioxyde de germanium :
  - dissoudre 300 mg de dioxyde de germanium dans 1 litre d'eau milliQ,
  - autoclaver et conserver au réfrigérateur,  
Attention : il est possible qu'il reste des particules de dioxyde de germanium non dissoute dans l'eau.
- Utilisation : 10 ml par litre d'eau de mer (concentration finale : 3-5 mg par litre d'eau de mer)

(Référence Dioxyde de Germanium  $\text{GeO}_2$  : Sigma Aldrich réf 483702-5G - flacon verre 5g - prix 77 €)

## Annexe 4 : Préparation d'antibiotiques liquides

### PROTOCOLE N°7

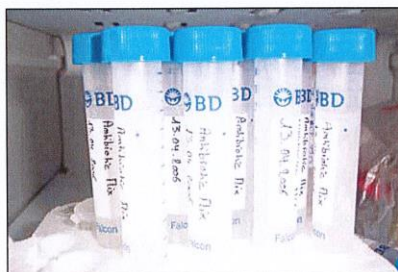
#### PREPARATION D'ANTIBIOTIQUES LIQUIDES

Afin de limiter la propagation des bactéries dans une culture, il est possible de mettre des antibiotiques dans le milieu de culture.

Substances	Quantité
Penicilline G	1 g
Streptomycine	0.5 g
Chloramphenicol (dissous dans 10 ml d'éthanol)	0.1 g

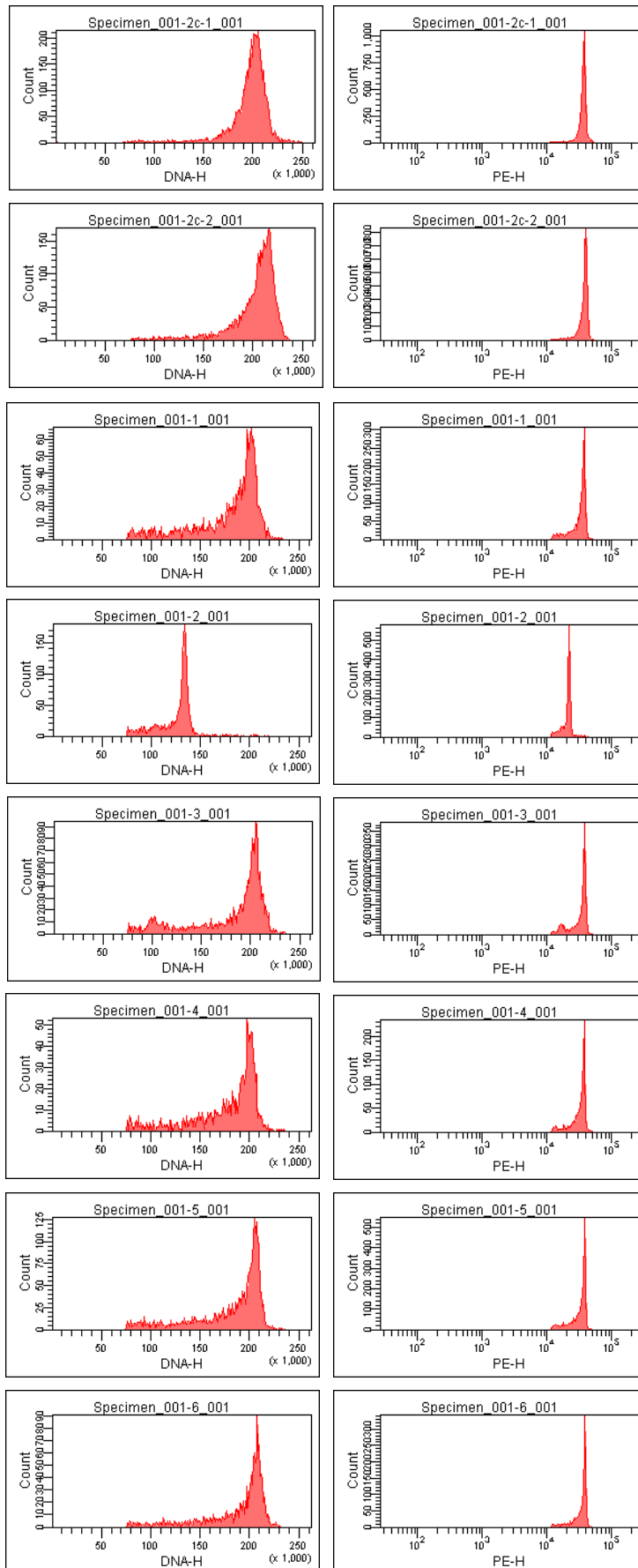
- dissoudre 1 g de Penicilline G et 0.5 g de Streptomycine dans 100 ml d'eau milliQ,
- ajouter 0.1 g de Chloramphenicol dissout dans 10 ml d'éthanol,
- filtrer avec une membrane à 0.22  $\mu\text{m}$  (seringue + filtre),
- aliquoter à 5 ml et stocker à - 20°C.

Utilisation: 5 ml d'antibiotique pour 1 litre de milieu de culture




\* voir fiche 24 – Substances / mélanges de substances chimiques

## Annexe 5 : Résultats complets de l'analyse de ploïdie par cytométrie de flux





	Diplôme : Ingénieur Agronome Spécialité : Sciences Halieutiques Spécialisation / option : Aquaculture Enseignant référent : Hervé Le Bris
Auteur(s) : Augustin DRION	Organisme d'accueil : Station biologique de Roscoff, CNRS-UMPC-INSU
Date de naissance : 25 Janvier 1993	Adresse : Place Georges Tessier
Nb pages :                      Annexe(s) :	29680 Roscoff
Année de soutenance : 2017	Maître de stage : Philippe POTIN
Titre français : De la maîtrise de la reproduction à la sélection génétique, les enjeux de la propagation en aquaculture d'une Rhodophyte : <i>Palmaria palmata</i> . Titre anglais : From the control of reproduction to genetic selection, the stakes of the propagation in aquaculture of a Rhodophyte : <i>Palmaria palmata</i> .	
Résumé (1600 caractères maximum) : <p><i>Palmaria palmata</i> est une Rhodophyte très répandue dans l'hémisphère Nord. Son utilisation en alimentation humaine et animale, en cosmétique et en pharmaceutique lui confère un intérêt économique de choix. Mais la ressource est instable et sa récolte ne permet pas de répondre à la demande grandissante du marché. Sa mise en culture serait un bon moyen de répondre à ce problème. Cependant son cycle de reproduction n'est encore que partiellement maîtrisé et peu d'études ont déjà été menées sur sa génétique. Ce travail vise donc à montrer quels sont les points de blocage existant encore dans la maîtrise de son cycle de développement au travers de l'étude de la sporulation et de l'induction de la maturation. Ils ont permis de mettre en place des cultures unialgales et de montrer qu'il était possible d'induire de la sporogénèse chez des individus non matures en manipulant les conditions de photopériode et de température des cultures. D'autres expériences ont par ailleurs permis d'établir un protocole d'extraction d'ADN en vue de son génotypage. Des travaux exploratoires sont en cours pour envisager d'utiliser les nouvelles approches de génotypage par séquençage massif sur cette espèce. Le but étant à terme d'ouvrir les possibilités d'une sélection génétique.</p>	
Abstract (1600 caractères maximum) : <p><i>Palmaria palmata</i> is a common Rhodophyte in along both sides of the North Atlantic Ocean, from the Arctic to cold-temperate regions. Its use in human food and animal feed, cosmetics and pharmaceuticals gives it a strong economic interest. But its resource is unstable and its harvest does not meet the growing demand of the market. Its mass cultivation, which has met some success for tank and rope cultivation is a good way to meet consumption needs. However, its reproductive cycle is still only partially controlled and few studies have already been done on its genetics. This work has been put in place to identify issues that remain in the control of its developmental cycle through the study of sporulation and the induction of maturation. It has allowed to establish unialgal cultures and to show that sporogenesis can be induced in non-mature individuals by manipulating photoperiod and temperature conditions. Other experiments allowed us to establish a protocol of DNA extraction in order to proceed on its genotyping. Exploratory work is underway to consider using new approaches for genotyping by massive sequencing of this species. The goal is to open multiple options for genetic selection.</p>	
Mots-clés : Aquaculture, génotypage, macroalgues, maturation sexuelle, <i>Palmaria</i> , <i>Rhodophyceae</i> , sporulation, Key Words: Aquaculture, genotyping, seaweed, sexual maturation, <i>Palmaria</i> , <i>Rhodophyceae</i> , sporulation	