Projet « graines d’explorateurs » TARA :

Du bateau au laboratoire.

**Présentation du projet :**

* Présentation individuelle et de la classe.
* Cadre d’étude :
* Différentes visites : Bateau puis GENOSCOPE
* Heures d’accompagnement personnalisé : activité pratique et mise au point des productions.

1. Visite du bateau TARA (17 janvier 2013) :

Partie présentée par Lucy et Pierre

Nous avons visité le bateau en janvier 2013, lors de son passage à Paris.

De septembre 2009 à mars 2012, il a navigué dans différents océans mondiaux au cours de l’expédition « TARA OCEANS ». Les différents lieux de récolte du plancton sont déterminés par repérage satellite, données physico-chimiques, ...

Qu’est-ce que le plancton ?

Le nom **plancton** vient du grec ancien *planktós*, qui veut dire « errer » : **C’est l'ensemble des organismes vivant dans les eaux douces ou salées, le plus souvent en suspension et incapables de lutter contre le courant**.

Ils sont **très variés** : bactéries, virus, larves, petits animaux (crustacés planctoniques et méduses), végétaux et algues microscopiques.

**Le plancton est souvent classé selon sa taille**, liée au **type de filtre utilisé pour le recueillir** :

*mégaplancton : 20-200 cm (ex : grosses méduses)*

*macroplancton : 2-20 cm*

*mésoplancton : 0,2 mm-2 cm (visible à l'œil nu)*

*Microplancton : 20-200 μm (filtre en toile)*

*Nanoplancton : 2-20 μm (filtre à café)*

*picoplancton : 0,2-2 μm (bactéries et eucaryotes)*

*femtoplancton : <0,2 μm (essentiellement des virus)*

**Le nanoplancton et les planctons de tailles inférieures ont seulement été découverts dans les années 1980**.

Le plancton de grande taille ne renferme que des espèces animales (zooplancton), alors que les espèces végétales (phytoplancton) dominent les plus petites classes de taille.

Quels sont les intérêts de cette étude ?

* Par la richesse du plancton en **organismes chlorophylliens**, aptes à la photosynthèse, les océans fournissent **50% de l’O2 atmosphérique** et **pompe 50% du CO2 et joue un rôle fondamental dans l’effet de serre**. Il est donc utile de suivre son évolution face aux changements climatiques.
* **Etude de la biodiversité** : 27 000 échantillons ont été prélevés. Si 500 000 espèces planctoniques animales, de grande taille ont été à ce jour démasquées, 95 % des micro-organismes restent à découvrir…

**On estime que seul 30% du plancton est actuellement connu.**

Les études génétiques effectuées dans les différents laboratoires permettent d’évaluer la présence de certaines espèces déjà connues et répertoriées, mais aussi de mettre en évidence des fractions d’ADN d’espèces non répertoriées (inconnues).

Comment collecte-t-on le plancton sur le bateau ?

* **Recueil par des dispositifs de maillage différents** : un filet « 200 µm » pour les prélèvements de protistes, puis un autre filet à 5 µm…
* **Conditions physiques et chimiques enregistrées sur le lieu de recueil** : les échantillons sont stockés et envoyés aux laboratoires de **Villefranche**, Paris VI et Roscoff pour mesurer respectivement les concentrations en **pigments**, en carbonate ou en nutriments.
* Analyse du **FLOWCAM** consiste à faire passer un échantillon de plancton dans un capillaire. Chaque organisme qui passe devant la cellule photoélectrique est imagé. Les images sont envoyées dans un studio d’étude.
* Les échantillons passent sur des **filtres de diamètres différents**. Ceux-ci sont **conservés dans l’azote liquide** et envoyés toutes les 6 semaines dans différents **laboratoires**.
* **La génétique des protistes se fait notamment au GENOSCOPE (séquençage)** et à Roscoff (identification, phylogénie). La fraction bactérienne est envoyée à Barcelone, celle des virus, en Arizona, etc.

Comment les études génétiques permettent-elles d’évaluer la biodiversité ?

1. L’ADN, origine de la biodiversité :

Partie présentée par Zara et Alexis

En relation avec notre programme de S sur la **variabilité génétique**, nous avons pensé à réaliser une **électrophorèse pour visualiser la diversité des allèles** :

* **Etapes de la manipulation** : digestion par des enzymes de restriction, préparation avec du bleu cobalt (coloration et alourdissement), solution à pH 8 pour charger l’ADN négativement puis mise sous tension pour créer le champ électrique.
* **Résultats** : sens de migration vers le bas, les fragments d’ADN les plus légers migrent le plus loin. On observe deux allèles différents, deux « empreintes » différentes.
* **Interprétation avec ANAGENE** : historique et origine des enzymes de restriction, site de coupure spécifique. Lorsque les séquences sont différentes, le nombre et la place des sites de coupure sont différents. Les fragments obtenus sont différents et occupent des places différentes sur l’électrophorèse.

**Ceci n’est qu’une étude qualitative permettant de visualiser le lien entre la séquence d’ADN et le polymorphisme.**

Les filtres recueillis sur le bateau contiennent le matériel génétique de nombreuses espèces. Ils sont envoyés au GENOSCOPE

Comment le séquençage des acides nucléiques permet-il de reconnaître différentes espèces ?

1. Visite du GENOSCOPE :

Partie présentée par Thomas et Alexandre

Dans la fraction recueillie, il n’y a pas que de l’ADN, mais aussi desARN***:***

* L’ADN est composé de **gènes**. Certains **codent** pour la synthèse d’ARN ribosomal, responsable de la production des ribosomes. D’autres **codent** pour des protéines cellulaires, fabriquées via l’ARN messager.
* La synthèse débute au niveau de séquences particulières : **codons initiateurs**.

Le séquençage de ces molécules présente des intérêts différents, en général, on commence par les ARNr puis, ARNm et enfin ADN.

Visite au GENOSCOPE :

* Les échantillons reçus du bateau sont **stockés et conservés** à - 80°C. Les filtres sont ensuite **broyés** et on en **extrait** l’ADN et les ARN.
* Les molécules sont ensuite **cassées pour séquencer de petites séquences**. L’ADN est **dénaturé** (séparation des deux brins). On réalise une **évaluation** quantitative et qualitative des ADN et ARN.
* **Présentation de deux générations de séquenceurs** : code couleurs pour la 1ère, intérêts des autres (vitesse globale de séquençage de 1.000 nucléotides par seconde).
* On nous a fourni une série de séquences **Travail préalable** sur un échantillon de 10 espèces donné par le laboratoire de ROSCOFF, puis sur les échantillons TARA.

Comment traiter ces données pour déterminer les espèces présentes dans le plancton recueilli ?

* **1er outil informatique** : ANNOTATHON = recherche des ORF (Open Reading Frame) = région d’ADN limitée par deux codons STOP. S’il y a dans cet ORF une séquence codante, elle commencera par un codon initiateur AUG.
* On y copie les séquences données, si elle ne présente pas d’ORF, on conclut « non codant » et on ne l’utilise pas pour déterminer les espèces. Si elle présente des ORF, par convention, on continuera l’étude avec la séquence la plus longue. **Le logiciel nous donne la séquence protéique codée**.
* **2ème étape**: la séquence protéique trouvée peut contenir des domaines ayant une fonction connue. Le site **INTERPROSCAN** est une banque de données et permet de **rechercher les domaines de fonction connue de notre séquence**.
* **3ème étape**: Une fois que nous avons trouvé des séquences protéiques avec des domaines de fonction connue, on recherche les espèces chez qui elles sont présentes. Sur le site du NCBI, on réalise des **PROTEIN BLAST** (Basic Local Alignement Search Tool). Le logiciel blast permet de **comparer une séquence, nucléique ou protéique, dite requête, à une banque de séquences, nucléiques ou protéiques**. Il affiche aussi **les espèces chez qui on les retrouve**.
* Nous avons ainsi étudié une centaine de séquences sur les échantillons TARA. Certaines espèces trouvées n’avaient aucun rapport avec le plancton (ver de farine), mais d’autres le constituent.
* **Etude statistique**: après sélection des espèces océaniques, on comptabilise le nombre de fois où on a retrouvé telle ou telle espèce sur l’ensemble des séquences étudiées.
* **Présentation** des deux espèces, dont la cyanobactérie apte à réaliser la photosynthèse. Bien sûr, nos résultats ne sont qu’une **première approche** de l’étude réellement menée dans les différents laboratoires. Il a fallu déjà comprendre les données moléculaires et l’utilisation des outils informatiques. Nous n’avons pu étudier qu’une centaine de séquences lors de nos heures d’accompagnement, mais l’objectif majeur était de mettre en place une stratégie pour comprendre les principes de recherche.
* **Les 1ers résultats de l’expédition** montrent que de nombreuses photos correspondent à des espèces inconnues. Il faut aussi confronter ces données aux résultats de séquençage d’ADN. On considère qu’il faudra 5 ans pour tout répertorier et 10 ans pour l’analyse totale des échantillons.

Bilans personnels :

?

Remerciements :

* Xavier pour la coordination et l’organisation des visites.
* Julie et Nathalie pour leur accueil au GENOSCOPE
* Sabine et Vincent pour leur patience dans l’attente et la relecture des productions.