

Notes académiques de l'Académie d'agriculture de France



Volume 2 (2016)



Notes académiques de l'Académie d'agriculture de France

18, rue de Bellechasse 75007 Paris, France

Tél. : +33 (0)1 47 05 10 37 Fax : +33 (0)1 45 55 09 78

<https://www.academie-agriculture.fr>

Soumission électronique : notes-academiques@academie-agriculture.fr

Rédaction : Académie d'agriculture de France - 18, rue de Bellechasse, 75007 Paris, France

Objet de la revue : Les *Notes académiques de l'Académie d'agriculture de France* sont un journal semestriel d'information et de formation scientifiques, sous la direction du Secrétaire perpétuel de l'Académie d'agriculture de France.

La revue - avec ses éditoriaux, articles originaux, articles d'actualité, notes de conjoncture, publication de fond, revues de la littérature, synthèses, rapports, commentaires critiques d'ouvrage, opinions, textes de conférences, lettres à la rédaction, etc.- donne une information actualisée ayant trait à tous les domaines couverts par les dix sections de l'Académie d'agriculture de France.

Soumissions électroniques : notes-academiques@academie-agriculture.fr

Directeur de la publication : le Secrétaire perpétuel de l'Académie d'agriculture de France

Secrétaires éditoriaux : Yves Brunet, Noëlle Dorion, Hervé This, Nadine Vivier

Comité éditorial : Claude Allo (Secrétaire de section), Bernard Ambolet (Secrétaire de section), Catherine Aubertin (Secrétaire de section), Guilhem Bourrié (Secrétaire de section), Yves Brunet, Noëlle Dorion, Michel Dron (Secrétaire de section), Christian Ferault, André-Jean Guérin (Secrétaire de section), Malcolm Hadley, Bruno Hérault, Philippe Kim-Bonbled, Gilles Lemaire, Nicole Mathieu, Marie-Claude Maurel, Jean-Claude Mounolou, Alain Pavé, Jean-Marie Pierre-Guy, Agnès Ricroch (Secrétaire de section), Bernard Roman-Amat (Secrétaire de section), Jean-Marie Séronie (Secrétaire de section), Hervé This, Sophie Villers (Secrétaire de section), Nadine Vivier.

Informations à l'attention des auteurs : Pour toute question relatives à la soumission des articles , les auteurs peuvent consulter les conseils aux auteurs disponibles à :

<https://www.academie-agriculture.fr/publications/notes-academiques/les-notes-academiques-de-lacademie-dagriculture-de-france-n3af-sont>

ISSN 2966-702X (printed)/ eISSN 2967-2139 (electronic),

DOI : <https://doi.org/10.58630/pubac.not.17611>

Academic Notes of the French Academy of Agriculture

18, rue de Bellechasse 75007 Paris, France

Tel: +33 (0) 1 47 05 10 37 Fax: +33 (0) 1 45 55 09 78

<https://www.academie-agriculture.fr>

Electronic submission: notes-academiques@academie-agriculture.fr

Publication: French Academy of Agriculture - 18, rue de Bellechasse, 75007 Paris, France

Purpose of the review: The *Academic Notes of the French Academy of Agriculture* is a journal of information and scientific training, under the direction of the Permanent Secretary of the Academy of Agriculture of France.

The journal - with its editorials, original articles, news articles, business reports, background publications, literature reviews, summaries, reports, critical reviews, opinions, conference texts, letters to the editor, etc. - gives an updated information relating to all the fields covered by the ten sections of the French Academy of Agriculture.

Electronic Submissions: notes-academiques@academie-agriculture.fr

Director of the publication: Perpetual Secretary of the French Academy of Agriculture

Associate Editors: Yves Brunet, Noëlle Dorion, Hervé This, Nadine Vivier

Editorial Committee: Claude Allo (Secrétaire de section), Bernard Ambolet (Secrétaire de section), Catherine Aubertin (Secrétaire de section), Guilhem Bourrié (Secrétaire de section), Yves Brunet, Noëlle Dorion, Michel Dron (Secrétaire de section), Christian Ferault, André-Jean Guérin (Secrétaire de section), Malcolm Hadley, Bruno Héroult, Philippe Kim-Bonbled, Gilles Lemaire, Nicole Mathieu, Marie-Claude Maurel, Jean-Claude Mounolou, Alain Pavé, Jean-Marie Pierre-Guy, Agnès Ricroch (Secrétaire de section), Bernard Roman-Amat (Secrétaire de section), Jean-Marie Séronie (Secrétaire de section), Hervé This, Sophie Villers (Secrétaire de section), Nadine Vivier.

Information for authors: For any questions regarding the submission of manuscripts, authors may consult the advice to authors available at:

<https://www.academie-agriculture.fr/publications/notes-academiques/les-notes-academiques-de-lacademie-dagriculture-de-france-n3af-sont>

ISSN 2966-702X (printed)/ eISSN 2967-2139 (electronic),

DOI : <https://doi.org/10.58630/pubac.not.17611>

Notes académiques de l'Académie d'agriculture de France

Académie d'agriculture de France

Volume 2, 2016

DOI : <https://doi.org/10.58630/pubac.not.v28000>

- This, H. 2016. La question des bonnes pratiques en sciences de la nature : comment exprimer des incertitudes de mesure / The issue of best practices in sciences of nature : how to express uncertainties, *Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture (N3AF)*, 2(1), 1-8. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a204666>
- Hocquette J.-F. 2016. La viande artificielle : utopie ou future réalité ?, *Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture (N3AF)*, 2(2), 1-6. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a144685>
- Job D. 2016. Commentaire à propos de la note de Jean-François Hocquette, La viande artificielle : utopie ou future réalité ?, *Notes académiques de l'Académie d'agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture (N3AF)*, 2(3), 1-6. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a505824>
- This H. 2016. What can “Artificial Meat” be? Note by note cooking offers a variety of answers, *Notes académiques de l'Académie d'agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture (N3AF)*, 2(4), <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a196614>
- Alabouvette C, Saiz-Jimenez C. 2016. Ecologie microbienne de la grotte de Lascaux, *Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture (N3AF)*, 2(5), 1-21. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a372706>
- This H. 2016. Methodological Advances in Scientific Publication, *Notes académiques de l'Académie d'agriculture de France /*

Academic Notes from the French Academy of Agriculture (N3AF), 2(6), 1-26. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a150459>

- Job D, Zongo C, Villegente M, Le Pessot L, Job C, Strub J-M, Van Dorsselaer A, Schaeffer-Reiss C, Bernier F, Berna A, Belghazi M, Jacques MA, Amir H, Burtet-Sarramégn V, Rabier J, Fogliani B, Job D. 2016. Analyse protéomique des graines de *Psychotria gabriellae* (Baill.) Guillaumin, une plante endémique de la Nouvelle-Calédonie, en relation avec la tolérance au nickel, *Notes académiques de l'Académie d'Agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture (N3AF)*, 2(7), 1-37. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a264492>
- Zongo C, Villegente M, Le Pessot L, Job C, Strub J-M, Van Dorsselaer A, Schaeffer-Reiss C, Bernier F, Berna A, Belghazi M, Jacques MA, Amir H, Burtet-Sarramégn V, Rabier J, Fogliani B, Job D. 2016. Analyse protéomique des graines de *Psychotria gabriellae* (Baill.) Guillaumin, une plante endémique de la Nouvelle-Calédonie, en relation avec la tolérance au nickel, *Notes académiques de l'Académie d'Agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture (N3AF)*, 2(8), 1-11. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a667246>
- Poulet S. 2016. Tératogenèse induite par les diatomées : un modèle d'interaction proie-prédateur transgénérationnelle, *Notes académiques de l'Académie d'agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture (N3AF)*, 2(9), 1-11. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a551012>
- Houdebine LM. 2016. Production de protéines thérapeutiques par des animaux transgéniques. *Notes académiques de l'Académie d'agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture, (N3AF)*, 2(10), 1-16. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a435750>

Documents didactiques

La question des bonnes pratiques en sciences de la nature : comment exprimer des incertitudes de mesure

Hervé This^{1,2}

¹ UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, Inra, Université Paris-Saclay, 91300 Massy, France

² Groupe de gastronomie moléculaire, Inra-AgroParisTech International Centre for Molecular Gastronomy, F-75005, Paris, France

Correspondance :

herve.this@agroparistech.fr

Abstract : The scientific community could usefully adopt best practices rules, for the various steps of its works. Here a numerical example is used in order to discuss such rules for the composition of uncertainties.

Résumé : Il a été proposé que la recherche scientifique se dote de règles de bonnes pratiques pour les diverses étapes de ses travaux. Ici, on discute sur un exemple numérique les règles de composition des incertitudes de mesure, telles qu'elles ont été retenues par le *Bureau International des Poids et Mesures*.

Keywords :

Uncertainties, best practices, GUM, composition, Monte-Carlo

Mots clefs :

Incetitudes, bonnes pratiques, GUM, composition, Monte-Carlo

Introduction

Dans la *Lettre de l'Académie d'agriculture de France* (This, 2015), la question des "bonnes pratiques de la recherche scientifique" a été esquissée. En effet, les professions où l'obligation de résultats n'est pas pertinente, telle la médecine, se donnent généralement des obligations de moyens, et, notamment, règlent le travail des praticiens par des "règles de bonnes pratiques" (HAS, 2016). Pour les sciences de la nature, où l'obligation de résultats semble difficile à imposer, la question des bonnes pratiques se pose donc également, mais on peut observer que les règles édictées par les institutions scientifiques ne portent principalement que sur la méthodologie de l'analyse, ciblant la qualité et la traçabilité des travaux de recherche, ainsi que la fiabilité des résultats mesurables (Inra, 2016a), sur la déontologie (Inra, 2016 b) ou sur l'éthique de la publication (Wiley, 2016). La question des calculs est peu

Documents didactiques

envisagée. Pourtant, toutes les étapes de la recherche scientifique semblent pouvoir être formalisées, à savoir l'identification des phénomènes, la caractérisation quantitative de ces derniers, la réunion des données en lois (équations), la réunion des lois en théories, ou modèles, assorties de propositions de mécanismes, la recherche de conséquences testables des théories, et le test expérimental de ces conséquences (This, 2011).

Ici on se limite à discuter la question de l'expression des incertitudes sur les résultats de mesure et de calcul, afin de mieux montrer l'intérêt des procédures actuellement admises par la collectivité scientifique pour la composition des incertitudes.

Il ne s'agit pas de paraphraser les documents officiels, vers lesquels on renvoie (Eurachem/CITAC Guide CG4, 2012 ; River et Balère, 2003), mais on veut montrer sur des exemples l'intérêt de la constitution d'un "Guide de bonnes pratiques scientifiques", par une institution scientifique qui pourrait être le CNRS, l'Inra, l'Académie d'agriculture de France, l'Académie des sciences, par exemple. En particulier, la caractérisation quantitative des phénomènes, qui est la deuxième étape de la recherche scientifique (Bacon, 1620), conduit à des résultats de mesure que le bon sens et les règles de bonnes pratiques doivent conduire à valider (ACS, 1980).

La répétition des expériences et des mesures ("validation") est une des façons de procéder, mais la production des résultats (le plus souvent différents, à chaque répétition) doit alors être assortie de leur comparaison, ce qui impose de calculer la dispersion des valeurs déterminées (This, 2013). Pour ce calcul, diverses méthodes sont possibles (Saporta, 2006), selon les circonstances expérimentales.

La composition des incertitudes

Une première façon consiste à répéter une expérience complète (laquelle peut être complexe, avec l'enchaînement de

nombreuses étapes élémentaires) et à calculer un estimateur de l'écart-type s_{n-1} de la grandeur x visée par l'expérience (un dosage, par exemple) :

$$s_{n-1} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (1)$$

où n est le nombre de répétitions de l'expérience, x_i la valeur trouvée à l'issue de la i -ième répétition, et la moyenne des n valeurs $x_{i, i=1..n}$ (Harris, 2007).

Toutefois cette méthode n'est pas toujours praticable, notamment quand l'expérience détruit les échantillons qui font l'objet d'une détermination quantitative. Pour apprécier l'incertitude sur la grandeur d'intérêt x , on doit alors "propager des incertitudes" (on dit aussi "composer des incertitudes"), en se fondant sur une détermination des incertitudes élémentaires pour chacune des étapes de l'expérience.

Considérons, par exemple, le cas très élémentaire où l'on prépare une solution en dissolvant une masse m d'un soluté (obtenue par pesée, donc) dans une masse M de solvant (également pesée), et où la grandeur visée est la concentration massique $c = m/M$ (on observera que la pratique qui consiste à peser des solutés et des solvants pour déterminer des concentrations -massiques en l'occurrence- est bien meilleure que celle qui consiste à mesurer des volumes, les précisions des balances de laboratoire étant le plus souvent bien meilleures que celles des micropipettes ; on en prendra pour preuve que le contrôle des pipettes se fait par pesée). Puisque les masses m et M sont incertaines (l'incertitude pourra être l'écart-type de plusieurs pesées, ou bien la précision de la balance, quand la dispersion des pesées est inférieure à la précision), la concentration massique c l'est aussi, et la question est ainsi d'exprimer l'incertitude Δc sur la concentration massique c en fonction des incertitudes Δm et ΔM avec lesquelles on connaît respectivement m et M .

Autre exemple, également fréquent lors

Documents didactiques

d'analyses chimiques : si l'on mesure une aire A d'un signal (par exemple, l'aire d'un signal de chromatographie ou de spectroscopie), alors l'utilisation d'une courbe d'étalonnage (en anglais *calibration curve*) d'équation $A = a \cdot c + b$ permet de remonter à la concentration c par l'utilisation de l'égalité :

$$c = \frac{A - b}{a}$$

Les aires étant connues avec incertitude, il y a lieu d'exprimer la concentration c en l'assortissant d'une incertitude, qui doit donc être déterminée à partir des incertitudes sur la courbe d'étalonnage (exprimée par les coefficients a et b) et sur l'aire A .

Dans tous les cas, il s'agit de considérer le paramètre que l'on cherche (la concentration massique, la concentration d'une solution dosée par spectroscopie...) comme une valeur d'une fonction de plusieurs variables, et le problème de la composition des incertitudes est le suivant : connaissant les incertitudes sur les variables, comment déterminer l'incertitude sur la valeur de la fonction de toutes les variables ?

La réponse conventionnelle de la communauté et deux pratiques erronées

Il y a d'innombrables façons de faire des caractérisations, et chacune d'elle est légitime, si elle est rationnelle et explicite. En l'occurrence, pour la question de la composition des incertitudes, une réponse collective a été élaborée par le Bureau international des poids et mesures (BIPM) : le *Joint Committee for Guides in Metrology* (JCGM) du BIPM a publié un document intitulé *Évaluation des données de mesure — Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure* (GUM) (JCGM, 2015) qui décrit très généralement les bonnes pratiques en matière de détermination d'incertitudes de mesure et de composition de ces incertitudes. Il y a donc lieu de se reporter à ces règles déterminées par convention, mais on se propose ici de les présenter sur des exemples numériques simples, parce que la

pratique de l'enseignement supérieur semble montrer que les étudiants comprennent souvent mieux quand des exemples sont fournis avant les résultats généraux (un fait qui reste à établir quantitativement). On évoquera également les limites d'application des règles retenues.

Considérons donc, par exemple, la détermination de l'incertitude sur le calcul d'une concentration massique c , connaissant l'incertitude sur les masses m et sur M du soluté et du solvant. Que ces incertitudes soient données par un écart-type expérimental ou par la précision d'un instrument de mesure, il est formellement juste de reconnaître que la concentration massique c est une fonction continue et dérivable des deux variables m et M , de sorte que :

$$dc(m, M) = \frac{\partial c(m, M)}{\partial m} dm + \frac{\partial c(m, M)}{\partial M} dM \quad (2)$$

Soit ici :

$$dc(m, M) = \frac{1}{M} dm - \frac{m}{M^2} dM \quad (3)$$

Évidemment, dans de telles expressions analytiques, les différentielles sont des infiniment petits, et non les incertitudes (finies) qui seraient déterminées (Piskounov, 1980). Des documents antérieurs au GUM proposaient de passer aux incertitudes en écrivant :

$$\Delta c(m, M) = \left| \frac{\partial c(m, M)}{\partial m} \right| \Delta m + \left| \frac{\partial c(m, M)}{\partial M} \right| \Delta M \quad (4)$$

Cette expression correspond à une distance que l'on nomme « distance de Manhattan » (Verley, 1997), et les valeurs absolues tiennent compte du fait que les erreurs sont aléatoires, en plus ou en moins. Toutefois, le JCGM a plutôt retenu l'expression qui met en œuvre la distance euclidienne :

$$\Delta c(m, M) = \sqrt{\left(\frac{\partial c(m, M)}{\partial m} \right)^2 \Delta m^2 + \left(\frac{\partial c(m, M)}{\partial M} \right)^2 \Delta M^2} \quad (5)$$

On observe que ces deux pratiques sont voisines, mais mettent en œuvre des

Documents didactiques

distances mathématiques différentes. De surcroît, le choix retenu par le JCGM impose que le modèle du processus de mesure ne présente pas de non-linéarité significative. Les dispersions doivent être faibles pour chacune des variables du processus de mesure, comparables du point de vue de leur ordre de grandeur, et elles doivent présenter des répartitions symétriques.

Quand ces hypothèses ne sont pas vérifiées, le JCGM propose la mise en œuvre de la méthode de Monte-Carlo, présentée dans un supplément (JCGM, 2008 ; Robert et Casella, 2010). Le principe n'est alors plus de propager l'incertitude *via* le modèle, mais la fonction de densité de probabilité des grandeurs d'entrées. Cette fonction étant connue ou supposée pour chacune des grandeurs d'entrées, la formule de Markov peut alors être utilisée (les méthodes de Monte-Carlo par chaînes de Markov consistent à générer un vecteur x_i uniquement à partir de la donnée du vecteur x_{i-1} ; ce sont des processus « sans mémoire »). *A contrario*, il convient d'éviter deux pratiques que l'on rencontre parfois. Tout d'abord, on évitera la pratique suivante :

- mesure de plusieurs valeurs pour chaque variable (par exemple, m_1, m_2, m_3 , et M_1, M_2, M_3) ;
- puis calcul des valeurs de la relations fonctionnelle pour des paires de valeurs, par exemple :

$$\frac{m_i}{M_i}, i=1..3$$

et détermination d'un écart-type à partir de ces paires de valeurs (sans attendre, on notera qu'il n'y a pas de raison *a priori* à associer m_i à M_i plutôt qu'à un $M_j, j \neq i$). Cette pratique correspond au calcul d'une grandeur $s'(c)$:

$$s'(c) = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_1^n \left(\frac{m_i}{M_i} - \frac{1}{n} \left(\sum_1^n \left(\frac{m_i}{M_i} \right)^2 \right) \right)}$$

(6)

On évitera également la pratique suivante :

- mesure de plusieurs valeurs pour chaque variable (par exemple, m_1, m_2, m_3 , et $M_1, M_2,$

M_3) ;

- puis détermination de toutes les valeurs croisées m_i/M_j ;
- et calcul de l'écart type sur ces valeurs croisées.

Une comparaison numérique à visée pédagogique

Dans ce paragraphe, commençons par signaler que les étudiants français du niveau de la Licence apprennent majoritairement à composer les incertitudes pour les seules sommes, différences, produits et quotients : pour la somme et la différence, ils apprennent que l'incertitude est la somme des incertitudes ; pour le produit et le quotient, ils apprennent à prendre la dérivée logarithmique des incertitudes. On observera que, quand des expressions mêlent sommes, produits et autres fonctions analytiques, cette technique devient inopérante.

D'autre part, on peut montrer que, pour les deux pratiques non conformes aux règles du JCGM que nous avons examinées précédemment, les incertitudes sont sous-estimées : dans ce qui suit, on présente des résultats numériques réellement obtenus, pour la détermination d'une concentration massique.

Pour cette comparaison, trois valeurs de la masse d'un soluté et trois valeurs de la masse d'un solvant ont été déterminées (en g, à l'aide d'une balance de précision Mettler Toledo AG153) :

- pour m : 1,0001 ; 1,0002 ; 1,0002
- pour M : 10,0001 ; 10,0001 ; 9,9998.

Pour ces deux variables m et M , on calcule les moyennes (en g), soit respectivement $moy_m = 1.00017$ et $moy_M = 10,0$, et les écarts-types, soit respectivement $ecart_{pm} = 6.10^{-5}$ et $ecart_{pM} = 2.10^{-4}$). Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel *Maple 18* (Maplesoft, Waterloo Maple Inc, Ontario, Canada).

Avec la règle du GUM, l'écart-type de la

Documents didactiques

concentration massique est :

$$s_c = \sqrt{\left(\frac{1}{\text{moym}}\right)^2 \cdot \text{ecartpm}^2 + \left(\frac{-\text{moym}}{\text{moyM}^2}\right)^2 \cdot \text{ecartpM}^2}$$

(7)

La valeur numérique trouvée pour cette estimation de l'incertitude est 6.10^{-5} .

Avec une distance de Manhattan (Verley, 1997) à la place de la distance euclidienne, on aurait :

$$sM_c = \left(\frac{1}{\text{moym}}\right) \cdot \text{ecartpm} + \left(\frac{-\text{moym}}{\text{moyM}^2}\right) \cdot \text{ecartpM}$$

(8)

pour laquelle, la valeur numérique est également 6.10^{-5} . On observe que, avec les règles des arrondis des écarts-types (Taylor, 1997), les deux valeurs sont égales.

Par la méthode de Monte-Carlo, enfin, une hypothèse doit être explicitement faite sur la répartition des valeurs de m et de M , puisqu'il s'agit de tirer au hasard des valeurs et de calculer les valeurs correspondantes de c , pour, finalement, déterminer l'écart-type.

Le GUM spécifie les conditions d'application de la technique, mais on observera que, pour des mesures courantes, le théorème central limite (Suquet, 2005) stipule qu'un bruit résultant de l'action indépendante de différents facteurs physiques obéit à la loi de probabilité normale.

Pour cette troisième méthode, on commence par créer une population expérimentale gaussienne de moyenne 1,00017 et d'écart type 0,00006 pour m . Puis on crée, pour M , une population expérimentale de moyenne 10 et d'écart-type 0,0002. On tire maintenant au hasard un grand nombre N de fois des valeurs de m et de M (le GUM préconise d'effectuer 10^6 tirages), et, pour chaque tirage, on calcule la concentration conc , la moyenne des concentrations meanConc et l'écart-type sdConc .

Sur cet exemple, on observe que la valeur obtenue (6.10^{-6}) est plus petite d'un ordre de grandeur que celles qui sont calculées par la méthode qui utilise les dérivées partielles. Cela n'est pas inadmissible, étant donné que l'écart-type d'un échantillon ne donne qu'un ordre de grandeur de l'écart-type réel, comme on le

verra plus loin, mais on observe que si l'on avait pris une autre répartition, on aurait obtenu une autre valeur : par exemple, pour une distribution uniforme, l'écart-type calculé est de 1.10^{-5} , ce qui justifie que le JCGM recommande une étape d'optimisation entropique. Cet exemple montre, de surcroît, les précautions à prendre lors de l'utilisation d'une méthode de Monte-Carlo, pour laquelle un soin particulier doit être apporté à la recherche d'une répartition des valeurs (Bédiat, 2006). Notamment on ne doit sélectionner qu'une loi de répartition qui ne donne pas plus d'information que l'on en a : si la seule information sur une variable est une valeur minimale ou une valeur maximale, on doit utiliser une loi uniforme.

Comparons maintenant ces valeurs à celle qui serait obtenue la première méthode fautive. L'écart-type serait 7.10^{-6} , plus petit que ce qui est trouvé par la méthode préconisée. Pour la méthode – également fautive- qui consiste à produire 9 valeurs de la concentration massique en prenant tous les couples pour les 3 valeurs de m et pour les 3 valeurs de M , là encore le résultat (5.10^{-6}) est plus petit d'un ordre de grandeur de celui qui est préconisé par le JCGM.

Pour ces deux valeurs, on pourrait considérer qu'elles ne sont pas plus mauvaises que celles qui sont données par la méthode de Monte-Carlo sans optimisation entropique, mais on observera que le JCGM préconise explicitement de procéder à une telle optimisation. En outre, il faut éviter des estimations qui donneraient des valeurs plus petites que celles qui sont recommandées par le JCGM, car s'il est vrai que l'écart-type est une description conventionnelle de la dispersion des données, il n'en reste pas moins qu'on doit tenir compte des valeurs maximales.

Pour illustrer le fait que l'écart-type, calculé par les techniques du JCGM, est un indicateur de la dispersion des données qui vaut principalement par son ordre de grandeur (tout ce qui suit se démontre : voir Verley,

Documents didactiques

1997), créons une population normalement distribuée autour d'une valeur 100, avec un écart-type égal à 1 ; puis à 200 reprises, tirons trois échantillons (ce qui correspond à une pratique courante de laboratoire) et calculons leur écart-type. L'affichage de ces 200 écarts-types est représenté sur la figure 1.

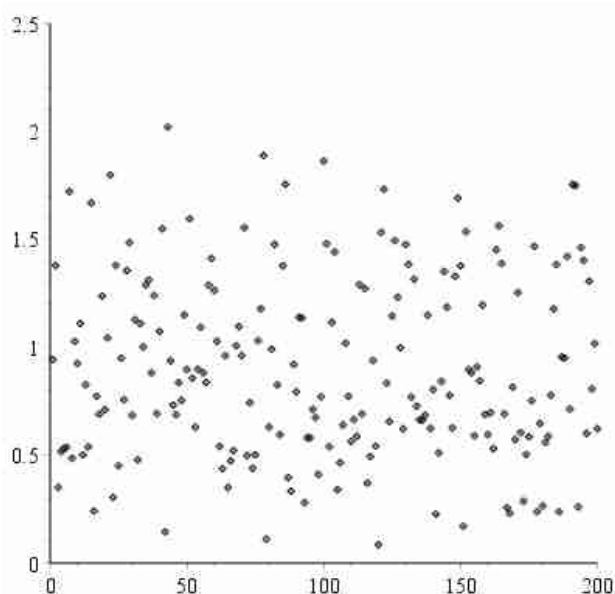


Figure 1. L'écart-type n'est qu'une estimation (ordre de grandeur) de la dispersion de données autour de la moyenne. Ici répétition de 200 tirages de 3 valeurs dans une population gaussienne conduit à des écarts-types très dispersés autour de la valeur moyenne. On ne peut s'étonner d'une telle dispersion, car la population d'où proviennent les échantillons était ici une distribution normale d'écart-type égal à 1.

Sans surprise, la variabilité est considérable : alors que l'écart-type est fixé à 1, par construction du problème, les écarts-types expérimentaux sont répartis entre 0 et 2. A titre d'exercice, on peut ainsi proposer à des étudiants de reprendre ces valeurs pour vérifier les lois statistiques. Évidemment une détermination d'un écart-type expérimental sur plus de 3 valeurs donne un meilleur résultat.

Par exemple, sur la figure 2a, on a représenté le même résultat, mais avec 6 valeurs, et sur la figure 2b avec 15 valeurs.

Pourquoi des pratiques qui ne sont pas les bonnes restent-elles parfois utilisées ? On a signalé en introduction que l'on ne trouve pas sur *Internet* de guide centralisé de bonnes pratiques scientifiques (même si l'on trouve des documents qui cadrent les pratiques, tel le GUM ou le *Guide Eurachem*), couvrant la totalité de ces pratiques, ce qui semble devoir être une condition au moins nécessaire pour que les scientifiques en aient connaissance, les discutent, et les appliquent le cas échéant. D'autre part, les guides relatifs aux incertitudes des mesures expérimentales ne sont pas toujours connus des étudiants, lesquels ne sont guère familiers des publications du *Laboratoire national d'essai* ou du *Bureau international des étalons et mesures*. Bien sûr, on pourrait regrouper dans un site « universitaire » de tels documents, mais il demeurera que la lecture de textes tels que le GUM (50 pages) pour le Guide CG4 (131 pages) n'est guère pédagogique, d'autant que ces documents sont produits à l'attention de professionnels : l'application d'un sain principe de réalité conduit à la production de documents simplifiés, à l'usage d'étudiants en premier cycle des universités.

Indiquons d'autre part que, ici, on n'a considéré qu'un détail de l'activité scientifique : la description des résultats expérimentaux, et seulement sur l'exemple, sans entrer dans des considérations théoriques indispensables, mais on propose de considérer qu'il est sans doute préférable, pour les premières années de l'enseignement supérieur, de faire venir la théorie après l'exemple, parce que les apprenants comprennent mieux, alors, l'intérêt des formalismes qu'ils devront ensuite découvrir.

Les académies pourraient jouer le rôle de dépositaires de documents utiles à l'activité scientifique, puisque c'est un fait que les institutions scientifiques ne se sont pas donné cette mission.

Documents didactiques

Références

ACS. 1980. *ACS Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry*. *Anal. Chem.*, 52, 2242-2249.

Bacon F. 1988. *Novum Organum*, P.F. Collier and son, New York, 1902, Cité dans *Bacon, inventer la science*, Editions Belin, Paris, collection Un savant une époque.

Bédiat N. 2006. *Méthode numérique de propagation des incertitudes de mesure (Méthode de Monte-Carlo)*, NTV 06/022, Note technique internet CETIAT.

Eurachem. 2012. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/quantifying-uncertainty-in-measurement>, dernier accès 1 juillet 2016.

Harris D. C. 2007. *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman and Co, New York, USA. 7e ed.

HAS. 2016. http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1101438/fr/tableau-des-recommandations-de-bonne-pratique, dernier accès 16 mars 2016.

Inra Mission Qualité. 2016 a. *Référentiel Qualité Inra*, Mission Qualité 2003-2005, https://www6.bordeaux-aquitaine.inra.fr/st_pee/.../referentiel-inra1.pdf, dernier accès 16 mars 2016.

Inra. 2016 b. <http://inra-dam-front-resources-cdn.brainsonic.com/ressources/afile/246617-c621b-resource-charte-de-deontologie.html>, dernier accès 16 mars 2016.

JCGM. 2015. www.bipm.org, dernier accès 6 avril 2015.

JCGM. 2008. *Evaluation of measurement data. Supplement 1 to the "Guide to the expression*

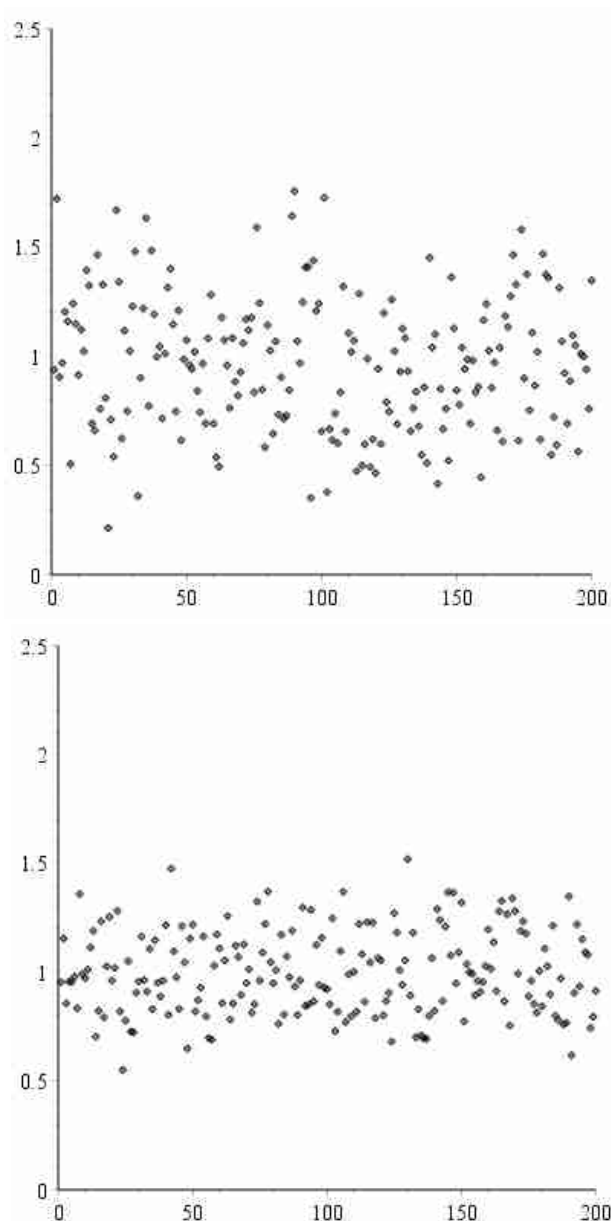


Figure 2. Écart-types calculés pour des répétitions de 6 tirages (a) et de 15 tirages (b).

of uncertainty in measurement". BIPM 101.

Piskounov N. 1980. *Calcul différentiel et intégral*, Edition Mir, Moscou.

Rivier C, Balère B. 2003. *Guide*

Documents didactiques

méthodologique pour l'estimation des incertitudes en chimie analytique, Laboratoire national d'essais, LNE C370 X18, http://www.lne.fr/publications/metreau_guide_incertainitudes.pdf, dernier accès 1 juillet 2016.

Robert C, Casella G. 2010. *Monte-Carlo Statistical Methods*. Springer-Verlag, coll. « Springer Texts in Statistics ».

Saporta G. 2006. *Probabilités, Analyse des données et Statistiques*. Éditions Technip, Paris.

Suquet C. 2005. <http://math.univ-lille1.fr/~suquet/Polys/TLC.pdf>, dernier accès 16 mars 2016.

Taylor J. R. 1997. *Error analysis: The study of uncertainties in physical measurements*. University Science Books (2nd ed.), Sausalito, CA.

This H. 2015. Aidez les enfants !, *Lettre de l'Académie d'agriculture de France*, N°27, 15 février 2015, 8-9.

This H. 2011. *Cours de gastronomie moléculaire N°1 : Science, technologie, technique (culinaires) : Quelles relations ?* Editions Quae/Belin, Paris.

This, H. 2013. *Cours de gastronomie moléculaire N°2 : Les précisions culinaires*. Editions Quae/Belin, Paris.

Verley J.-L. 1997. *Espaces métriques*, in *Dictionnaire des mathématiques ; algèbre, analyse, géométrie*. Albin Michel, Paris, 652-653.

Wiley, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-1241.2006.01230.x/full>, dernier accès 15 mars 2016.

Edité par :

Dominique Job, CNRS, Membre de l'Académie d'agriculture de France.

Rapporteurs :

Jean-Marc Boussard, Membre de l'Académie d'agriculture de France
Jérôme Vial, Maître de conférence ESPCI Paris

Rubrique :

Cet article a été publié dans la rubrique « Enseignement » des *Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France*

Reçu : 8 février 2016

Accepté : 6 juillet 2016

Publié : 6 juillet 2016

Citation : This, H. 2016. La question des bonnes pratiques en sciences de la nature : comment exprimer des incertitudes de mesure, *Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture (N3AF)*, 2(1), 1-8. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a204666>



Hervé This est physico-chimiste Inrae (UMR 0702 SayFood), professeur consultant à AgroParisTech, directeur de l'*Inrae-AgroParisTech International Centre for Molecular and Physical Gastronomy*. Il est membre de l'Académie d'agriculture de France.

Note de lecture

La viande artificielle : utopie ou future réalité ?

Artificial meat : utopia or future reality ?

Jean-François Hocquette¹

¹ UMR1213 Herbivores, INRA, Vetagro Sup, 63122, Saint-Genès-Champanelle, France

Correspondance :

jean-francois.hocquette@inrae.fr

Résumé :

Notre société est confrontée à des défis majeurs : augmenter la production de protéines pour nourrir la population humaine en augmentation, réduire la dégradation de l'environnement et l'inconfort des animaux dans certains élevages. Pour ces raisons, les substituts de viande ont de plus en plus de succès, parmi lesquels la viande artificielle fabriquée à partir de cellules souches qui génère régulièrement l'intérêt des médias.

Un numéro spécial du *Journal of Integrative Agriculture* ainsi que d'autres articles scientifiques ont décrit les avantages et les inconvénients de la viande artificielle. Cet article résume les principales conclusions de la littérature sur ce sujet.

Les principaux défis pour la viande artificielle sont d'être produite à grande échelle et à un prix abordable, mais la difficulté majeure est aujourd'hui son acceptation par les consommateurs. D'autres solutions, qui seront de sérieux concurrents de la viande artificielle, existent déjà pour nourrir l'humanité, réduire les émissions de gaz à effet de serre et répondre aux attentes sociales.

Abstract:

Our society is facing major challenges: increasing protein resources for the increased human population, reducing environmental degradation and discomfort of animals in some farms. For these reasons, alternatives to conventional meat from livestock production have more and more success.

One meat substitute which regularly generates media interest is artificial meat made from stem cells. A special issue of the *Journal of Integrative Agriculture* plus other scientific papers described pros and cons of artificial meat.

This article summarises the major conclusions of the literature on this subject. The major challenges for cultured meat is to be produced at a large scale and at an affordable price but its major difficulty nowadays will be its acceptance by consumers. Other solutions for feeding humankind, for reducing greenhouse gas emissions and for meeting social expectations already exist and will be strong competitors of artificial meat.

Note de lecture

Keywords :

artificial meat, stem cells, cell culture, consumer science

Mots clefs :

viande artérielle, cellules souches, culture de cellules, science des consommateurs

Notre société moderne est face à d'importants défis agro-alimentaires, qui sont principalement de réduire la faim dans le monde tout en augmentant le niveau des ressources alimentaires, afin de satisfaire les besoins d'une population humaine toujours croissante. A cet objectif général s'ajoute la nécessité de répondre aux nouvelles attentes des pays développés, telles que réduire le mal-être des animaux pouvant être constaté dans certains élevages modernes, voire ne pas tuer les animaux pour les manger, et réduire la dégradation de l'environnement par les différentes activités humaines, notamment l'élevage (Scollan *et al.*, 2011).

Le marché des substituts de viande se développe

Pour l'ensemble de ces raisons, le marché des substituts de viande (à base de protéines végétales ou de champignons) est en expansion. Par ailleurs, différentes alternatives à la production de viande par l'élevage traditionnel ont été proposées, parmi lesquelles la production de viande *in vitro*. Le principe de cette nouvelle technique est de produire une grande quantité de muscle dans des incubateurs de grande taille, en favorisant la multiplication de cellules souches, puis leur différenciation en cellules musculaires, assurant ainsi une production importante de viande (Post, 2012). Selon leurs promoteurs, cette technique, inspirée des techniques médicales pour réparer les muscles lésés,

présente plusieurs avantages : la possibilité de produire de grandes quantités de protéines musculaires (et donc de « viande ») en raison du potentiel quasi infini de reproduction des cellules souches, un impact environnemental supposé être inférieur, un respect de la vie animale et des conditions de vie des animaux meilleures, en raison d'une activité d'élevage réduite, voire nulle. La « preuve de concept » aurait été apportée par une équipe hollandaise, qui a produit le premier *burger* artificiel dans ses laboratoires. Le prix élevé de ce prototype (de l'ordre de 250 000 euros) est actuellement un frein à sa commercialisation. Toutefois sa dégustation dans un grand restaurant londonien, en août 2013, a été largement signalée par les médias.

La production de viande artificielle à partir de cellules souches ne fait pas l'unanimité

Une première expertise sur la viande artificielle par des chercheurs francophones, essentiellement de l'Inra, a conduit à différentes conclusions. Certes la viande artificielle a effectivement la capacité de réduire le mal-être des animaux potentiellement lié à l'élevage, et elle permettrait, de surcroît, de ne pas abattre les animaux en grand nombre pour les manger. En revanche, l'impact environnemental de la viande artificielle est difficile à mesurer, car aucune usine de production de viande artificielle n'existe à ce jour. Toutefois les hypothèses sur le sujet laissent penser que la viande *in vitro* présenterait un intérêt modéré pour réduire les gaz à effet de serre et la pollution par les nitrates, un intérêt limité quant à l'utilisation des énergies fossiles, voire très limité pour limiter les besoins en eau ; elle libérerait des terres cultivables, mais des résidus de composés de synthèse nécessaires pour la production de viande artificielle (hormones, facteurs de croissance, antibiotiques, etc.) se retrouveraient

Note de lecture

probablement dans les eaux usées (Hocquette *et al.*, 2013). Enfin il est possible qu'il soit nécessaire de revenir régulièrement vers les animaux pour renouveler les cellules souches. Récemment, le *Journal of Integrative Agriculture* a publié 10 articles sur le sujet, qui ont été écrits par des auteurs de différents pays de tous les continents.

Les trois premiers articles ont notamment considéré les aspects techniques. Moritz *et al.* (2015), auteurs des Pays-Bas et de Norvège, qui font par ailleurs la promotion de la viande artificielle, ont décrit les enjeux technologiques, qui sont de développer des techniques efficaces pour une production de masse de viande artificielle à moindre coût. Alors que ces auteurs sont optimistes quant à la possibilité de produire, dans le futur, de grandes quantités de viande *in vitro* à un prix raisonnable, le Polonais M. Orzechowski (2015) estime que cela ne sera possible que si une véritable rupture technologique apparaît. Cette opinion est partagée par Kadim *et al.* (2015), groupe d'auteurs du Moyen-Orient et de Nouvelle Zélande qui soulignent par ailleurs les questions *a priori* difficiles d'acceptation sociale et d'ordre éthique.

Quatre autres articles se sont intéressés au potentiel de la viande *in vitro* pour résoudre les enjeux de société mentionnés précédemment. Une équipe d'auteurs chinois (Sun *et al.*, 2015) a indiqué que la Chine est particulièrement concernée par ces enjeux, en raison de sa population humaine importante et de la nécessité de protéger l'environnement. De ce fait, du point de vue de cette équipe chinoise, des substituts de viande sont nécessaires, et, parmi eux, la production de viande artificielle a le potentiel d'être profitable pour la Chine. Une équipe de la République indienne (Bhat *et al.*, 2015) reconnaît également les avantages potentiels de la viande artificielle (la sécurité alimentaire, un impact carbone supposé plus faible, un respect plus grand de la vie animale, mais, aussi, une nutrition humaine supposée optimisée), mais reconnaît en même temps que de nombreux problèmes doivent tout d'abord

être résolus, que ce soit sur le plan technique, économique ou social, pour développer une production de masse de viande *in vitro* à moindre coût et qui soit acceptée par les consommateurs. Un groupe d'auteurs des États-Unis (Mattick *et al.*, 2015) partage les avantages potentiels de la viande artificielle, mais insiste sur le caractère incertain de ces avantages. En effet, comme avec la plupart des nouvelles techniques, le développement commercial de la viande *in vitro* sera accompagné de problèmes imprévus et, donc, non anticipés. Le degré d'incertitude associé aux nouveaux produits d'ingénierie est toujours élevé, et, de ce fait, des évaluations en continu (notamment environnementales) seront nécessaires en préalable à tout développement commercial.

La principale difficulté pour la viande *in vitro* est son acceptation par la société

Les trois derniers articles du numéro spécial du *Journal of Integrative Agriculture* se sont intéressés à la dimension sociale de la problématique de la viande artificielle. M. Hopkins, du Centre de bioéthique de l'Université du Mississippi, considère que la presse occidentale a présenté une vision biaisée du potentiel de la viande *in vitro* en sous-estimant les problèmes de son acceptation par la société ou en surévaluant son acceptation potentielle par les végétariens (Hopkins, 2015). Une enquête effectuée par des auteurs français (Hocquette *et al.*, 2015) auprès de scientifiques et d'étudiants de tous les pays du monde souligne également que la perception de la viande *in vitro* par les consommateurs-citoyens est une problématique complexe. La majorité des personnes interrogées considère, en effet, d'une part, que la technique pour la production de viande *in vitro* est réaliste et faisable et que, d'autre part, les enjeux de société mentionnés ci-dessus auxquels la filière viande doit faire face (nourrir l'humanité,

Note de lecture

réduire l'impact carbone et respecter le bien-être animal) sont réels. Pour autant, malgré des différences de perception entre hommes et femmes, aucune majorité ne se dégage pour penser que la viande *in vitro* sera satisfaisante sur le plan sensoriel ou nutritionnel (mis à part pour le groupe de personnes en faveur de la viande *in vitro*) ou que la viande *in vitro* va réellement contribuer à résoudre les problèmes de dégradation de l'environnement ou de bien-être animal. Seuls 10 % environ des personnes interrogées seraient prêtes à consommer de la viande artificielle, les personnes interrogées préférant dans leur grande majorité réduire leur consommation de viande. Dans le dernier article, Verbeke *et al.* (2015b) soulignent que l'acceptation de la viande *in vitro* renvoie à des critères d'ordre technologique, économique et psychologique, qui dépendent eux-mêmes en partie de la couverture médiatique, de l'attention des consommateurs et de leur degré de confiance dans la science, la politique et, plus généralement, la société. Seuls environ 10 % des consommateurs sont vraiment opposés à la viande *in vitro*, la grande majorité ayant une attitude plutôt hésitante. Le prix et la qualité sensorielle apparaissent comme les principaux obstacles potentiels.

Dans une autre étude récente, Verbeke *et al.* (2015a) ont mis en évidence trois séquences de réactions chez les consommateurs quand ils s'approprient la problématique de la viande *in vitro* : (i) des réactions initiales de dégoût liées à l'absence de naturalité de cette nouvelle forme de viande, (ii) des réactions plus lentes concernant surtout les atouts potentiels de la viande *in vitro* pour le collectif (sécurité alimentaire, protection de l'environnement) et les inconvénients possibles au niveau individuel (santé personnelle) ou collectif (perte des traditions, moins d'éleveurs et d'activité agricole en milieu rural) et (iii) des réactions plus approfondies traduisant un certain scepticisme concernant les conséquences des progrès scientifiques, des questionnements au sujet des mécanismes de contrôle et de gouvernance de la production de viande *in vitro*

et, enfin, un besoin adapté de régulation et d'étiquetage.

D'autres leviers d'action plus faciles à mettre en œuvre existent : il ne faut pas les oublier !

Un groupe d'auteurs en majorité australiens (Bonny *et al.*, 2015) considère qu'aujourd'hui les protéines de plantes et de champignons sont les plus grands compétiteurs de la viande traditionnelle, produite à partir des animaux d'élevage, pour résoudre les enjeux de société mentionnés en introduction. En revanche, la viande artificielle ou le clonage des animaux ne présentent pas d'avantages comparatifs dans notre société actuelle. Dans le futur, les substituts de viande ont potentiellement la capacité de conquérir au moins en partie le marché de masse, réservant la viande traditionnelle, issue d'animaux d'élevage, pour un marché de plus haute gamme, d'autant plus si son coût pour le consommateur continue d'augmenter. En parallèle, d'une part, l'élevage traditionnel est invité à évoluer en s'inspirant des concepts d'agroécologie pour être plus durable (Dumont *et al.*, 2013) et, d'autre part, de nouvelles technologies (clonage, animaux génétiquement modifiés) sont susceptibles de se développer au moins dans certains pays. Dans ce contexte, l'avenir de la viande *in vitro* apparaît incertain en raison de ces nombreuses autres pistes d'évolution du marché des produits carnés.

Pour résumer, les enjeux agro-alimentaires auxquels notre société doit faire face sont réels. Ainsi, nourrir la population humaine actuelle en réduisant la faim dans le monde et la pollution humaine future d'environ 9 milliards de personnes en 2050 est effectivement un enjeu considérable. Toutefois de nombreux experts estiment que les causes de la malnutrition actuelle de certaines populations sont multiples (guerres, gouvernance politique insuffisante, non

Note de lecture

solvabilité des gouvernements, catastrophes naturelles, etc.) et ne sont pas directement liées à un manque de ressources alimentaires. De surcroît, nous disposons de plusieurs leviers d'action, ne serait-ce qu'en réduisant le gaspillage alimentaire, en modifiant nos pratiques d'élevage ou en consommant d'autres sources de protéines (protéines végétales, insectes, etc.) (Hocquette, 2016).

Bien que la culture de cellules soit connue de la science depuis les années 1990, tous les experts s'accordent pour penser qu'il existe des verrous techniques importants à lever pour une éventuelle production à grande échelle de viande *in vitro* à un coût raisonnable.

De nombreux experts soulignent également les difficultés d'acceptation de la viande *in vitro* qui renvoient, d'une part, à des questions d'ordre moral ou éthique concernant la technologie et les inquiétudes qu'elle soulève, et, d'autre part, à des préoccupations classiques relatives aux nouveaux produits alimentaires (prix, qualité, naturalité...). Par le passé, plusieurs nouveaux produits alimentaires ne se sont pas développés, en raison, notamment, de contraintes économiques, du temps nécessaire pour l'acceptation par les consommateurs et pour la délivrance des autorisations de mise sur le marché.

En conclusion, face aux enjeux importants autour de l'élevage, la production de viande *in vitro* ne présente donc pas aujourd'hui d'avantages majeurs par comparaison à la viande naturelle ou à d'autres alternatives possibles telles que rééquilibrer notre alimentation en diversifiant les sources de protéines végétales et animales. Une autre alternative sur laquelle travaille l'Inra est le développement de systèmes d'élevage plus respectueux des animaux et de l'environnement. Poser la question de la viande *in vitro* a au moins le mérite d'être un bon prétexte pour aborder et traiter les questions de fond liées à l'élevage et abordées en introduction (nourrir l'humanité, réduire l'impact carbone et respecter le bien-être animal).

Références

Bhat ZF, Kumar S, Fayaz H. 2015. *In vitro* meat production: Challenges and benefits over conventional meat production. *Journal of Integrative Agriculture*, 14, 241–248.

Bonny SPF, Gardner GE, Pethick DW, Hocquette J-F. 2015. What is artificial meat and what does it mean for the future of the meat industry, *Journal of Integrative Agriculture*, 14, 255–263.

Dumont B, Fortun-Lamothe L, Jouven M, Thomas M. 2013. Prospects from agroecology and industrial ecology for animal production in the 21st century. *Animal*, 7, 1028-1043.

Hocquette J.-F., 2016. Is *in vitro* meat the solution for the future?, *Meat Science*, in press.

Hocquette A, Lambert C, Sinquin C, Peterloff L, Wagner Z, Bonny S P F, Lebert A, Hocquette J-F. 2015. Educated consumers don't believe artificial meat is the solution to the problems with the meat industry, *Journal of Integrative Agriculture*, 14, 273–284.

Hocquette JF, Mainsant P, Daudin J D, Cassar-Malek I, Rémond D, Doreau M, Sans P, Bauchart D, Agabriel J, Verbecke W, Picard B, 2013. La viande du futur sera-t-elle produite *in vitro* ?, *INRA Productions Animales*, 26 (4), 363-374.

Hopkins PD. 2015. Cultured meat in western media: The disproportionate coverage of vegetarian reactions, demographic realities, and implications for cultured meat marketing, *Journal of Integrative Agriculture*, 14, 264–272.

Kadim IT, Mahgoub O, Baqir S, Faye B, Purchas R. 2015. Cultured meat from muscle stem cells, *Journal of Integrative Agriculture*, 14, 222–233.

Note de lecture

Mattick CS, Landis AE, Allenby BR. 2015. A case for systemic environmental analysis of cultured meat. *Journal of Integrative Agriculture*, 14, 249–254.

Moritz MSM, Verbruggen SEL, Post MJ. 2015. Alternatives for large-scale production of cultured beef: A review, *Journal of Integrative Agriculture*, 14, 208–216.

Orzechowski A. 2015. Artificial meat? Feasible approach based on the experience from cell culture studies, *Journal of Integrative Agriculture*, 14, 217–221.

Post MJ. 2012. Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects, *Meat Science*, 92, 297–301.

Scollan ND, Greenwood PL, Newbold CJ, Yáñez Ruiz DR, Shingfield KJ, Wallace RJ, Hocquette JF. 2011. Future research priorities for animal production in a changing world, *Animal Production Science*, 51, 1–5.

Sun ZC, Yu QL, Han L. 2015. The environmental prospects of cultured meat in China, *Journal of Integrative Agriculture*, 14, 234–240.

Verbeke W, Marcu A, Rutsaert P, Gaspar R, Seibt B, Fletcher D, Barnett J. 2015a. 'Would you eat cultured meat?': Consumers' reactions and attitude formation in Belgium, Portugal and the United Kingdom. *Meat Science*, 102, 49–58.

Verbeke W, Sans P, Van Loo EJ. 2015b. Challenges and prospects for consumer acceptance of cultured meat. *Journal of Integrative Agriculture*, 14, 285–294.

Edité par :

Dominique Job, CNRS, Membre de l'Académie d'agriculture de France.

Rapporteurs :

1. Louis-Marie Houbebine, Membre de l'Académie d'agriculture de France
2. Anonyme

Rubrique :

Cet article a été publié dans la rubrique « Notes de lecture » des *Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France*, 6, 1-6

Reçu:

8 février 2016

Accepté:

2 juillet 2016

Publié :

13 juillet 2016

Citation:

Hocquette J.-F. 2016. La viande artificielle : utopie ou future réalité ?, *Notes académiques de l'Académie d'agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture (N3AF)*, 2(2), 1-6. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a144685>.



Jean-François Hocquette est directeur de recherche à l'Inrae.

A propos de l'article de Jean-François Hocquette : *La viande artificielle : utopie ou future réalité ?*

Dominique Job ¹

¹ Directeur de recherche émérite au CNRS

Correspondance :

job.dominique@gmail.com

Je souhaiterais réagir à l'article *La viande artificielle : utopie ou future réalité ?* de Jean-François Hocquette par quelques commentaires, notamment quant à une vision plus optimiste concernant les développements futurs de la viande artificielle.

L'auteur dit en effet en conclusion « Face aux enjeux importants autour de l'élevage, la production de viande in vitro ne présente donc pas aujourd'hui d'avantages majeurs par comparaison à la viande naturelle ou à d'autres alternatives possibles telles que rééquilibrer notre alimentation en diversifiant les sources de protéines végétales et animales. » Mais si l'on tient compte du contexte de la recherche fondamentale, par exemple sur les cellules souches et leur différenciation (Jacob, 2002), des recherches approfondies ne permettraient-elles pas des avancées encore insoupçonnées dont les retombées seraient multiples, dépassant d'ailleurs le seul cadre de l'alimentation ? Certes, on avance qu'un burger artificiel a coûté la bagatelle de 250 000 euros, mais peut-on prévoir l'état des connaissances et des progrès technologiques dans 10 ou 20 ans ?

Je partage sans réserve l'optimisme de Mark Post (2012), l'inventeur de la viande artificielle, qui déclare: « *In order to serve as a credible alternative to livestock meat, lab or factory grown meat should be efficiently produced and should mimic meat in all of its physical sensations, such as visual appearance, smell,*

texture and of course, taste. This is a formidable challenge even though all the technologies to create skeletal muscle and fat tissue have been developed and tested. The efficient culture of meat will primarily depend on culture conditions such as the source of medium and its composition. Protein synthesis by cultured skeletal muscle cells should further be maximized by finding the optimal combination of biochemical and physical conditions for the cells. Many of these variables are known, but their interactions are numerous and need to be mapped. This involves a systematic, if not systems, approach. Given the urgency of the problems that the meat industry is facing, this endeavor is worth undertaking. As an additional benefit, culturing meat may provide opportunities for production of novel and healthier products. »

Et, dans un domaine proche, que penser des développements basés sur les technologies de bioimpression 3D (Patra *et al.*, 2016) et 4D (Poietis, 2016) qui ont d'ores et déjà fait leurs preuves dans la fabrication de divers tissus biologiques ; voir également à ce sujet (3D Food Printing Conference, 2016). Enfin je voudrais citer l'exemple de la jeune société Impossible Foods (2016) fondée par Patrick O. Brown, un éminent biochimiste américain (Wikipedia, 2016), membre de l'Académie des sciences des USA, et qui a réussi à fabriquer et commercialiser un burger entièrement à base de plantes. Cette réussite concrétise un

Notes académiques de l'Académie d'agriculture de France (N3AF)
Academic Notes from the French Academy of Agriculture
Commentaire

travail considérable de recherche sur les protéines et métabolites synthétisés par les plantes, notamment les hémoprotéines (procurant le fer) présentes en grandes quantités dans la viande naturelle. Ces découvertes ouvrent la voie à de nouveaux schémas de sélection des plantes.

Pour conclure, je parierais sur une coexistence de différents systèmes de production de protéines et vitamines : animaux, plantes/champignons/insectes, et pourquoi pas alimentation de synthèse (chimique ou biologique grâce à la biologie de synthèse⁹), sans exclure la viande artificielle. Je réalise que nous sommes dans une spéculation sur le futur qui est largement débattue. J'espère toutefois que ces commentaires et observations permettront d'encourager le développement d'une recherche fondamentale forte apte à lever les verrous conceptuels et méthodologiques dans ce secteur vital.

Références

Jacob, F. 2002. The world of stem cells. *Comptes Rendus Biologie*, 325, 999-1002.

Wikipedia. 2016. https://en.wikipedia.org/wiki/Cultured_meat, dernier accès 6 juillet 2016.

Post MJ. 2012. Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects, *Meat Science*, 92, 297-301.

Patra S, Young V. 2016. A review of 3D printing techniques and the future in biofabrication of bioprinted tissue, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 74, 93-98.

Poietis M. 2016. <https://www.poietis.com>, dernier accès 6 juillet 2016.

3D Food Printing Conference. 2016. <http://3dfood-printingconference.com>, dernier accès 6 juillet 2016.

Impossible Foods. 2016. <https://impossiblefoods.com>, dernier accès 6 juillet 2016.

Tyagi A, Kumar A, Aparna SV *et al.* 2016. Synthetic biology: Applications in the food sector, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 1777-1789.

Wikipedia. 2016. https://en.wikipedia.org/wiki/Patrick_O._Brow, dernier accès 6 juillet 2016.

Edité par :

Dominique Job, CNRS, Membre de l'Académie d'agriculture de France.

Rapporteurs :

Louis-Marie Houbépine, Membre de l'Académie d'agriculture de France
xxx, Membre de l'Académie d'agriculture de France

Rubrique :

Cet article a été publié dans la rubrique « Notes de lecture » des *Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France*, 6, 1-6

Reçu :

8 février 2016

Accepté :

2 juillet 2016

Publié :

13 juillet 2016

Citation :

Hocquette J.-F. 2016. *La viande artificielle : utopie ou future réalité ?*, *Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture (N3AF)*, 2(3), 1-6. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a505824>



Dominique Job est directeur de recherche émérite au CNRS et membre de l'Académie d'agriculture de France.

Note de recherche

What can “Artificial Meat” be? Note by note cooking offers a variety of answers

Hervé This^{1, 2}

¹ UMR SayFood, AgroParisTech, Inrae, Université Paris-Saclay, 91300 Massy, France

² Groupe de gastronomie moléculaire, Inrae-AgroParisTech International Centre for Molecular and Physical Gastronomy, F-75005, Paris, France

Correspondance:

herve.this@inrae.fr

Résumé :

L'analyse du système “viande” du point de vue physique et chimique permet d'envisager de nombreuses possibilités de reproduction de ce système, en vue de faire ce qui doit être nommé de la “viande artificielle”. La technique nommée “cuisine note à note”, qui consiste à produire des aliments à partir de composés purs (plutôt que des ingrédients alimentaires traditionnels que sont principalement les tissus animaux et végétaux) permet bien d'autres possibilités de reproduction que la seule culture *in vitro* de cellules musculaires. On examine comment la cuisine note à note peut élaborer les aliments, et quelles questions scientifiques et technologiques elle pose. Notamment on envisage la possibilité de construire la viande (en particulier la “viande artificielle”) à toutes les échelles, de l'échelle moléculaire à l'échelle macroscopique.

Abstract:

The physical and chemical analysis of “meat” leads to many different options for making

“artificial meat”, depending on which aspects of natural meat is chosen for the reproduction. “Note by note” cooking, i.e. making food from pure compounds rather than from traditional food ingredients such as plant and animal tissues, offers many more possibilities than simply growing muscular fibers *in vitro*. It will be explained here why this new culinary technique was suggested for creating artificial meat, how NbN dishes can be elaborated, and which new scientific and technological issues NbN raises. In particular, the possibility of elaborating food at any scale is discussed, and new varieties of gels are discussed.

Keywords:

molecular gastronomy; note by note cooking; bioactivity; dynagels; statgels; DSF; artificial meat.

Mots clefs :

Gastronomie moléculaire, cuisine note à note, bioactivité, dynagels, statgels, DSF, viande artificielle.

Note de recherche

Introduction

The predicted increase in the world population creates new challenges, one of which being the threat of worldwide food shortage (United Nations, 2004). In order to feed 9 to 10 billion human beings in 2050, some new technologies such as genetically modified organisms have been suggested, but though they may allow for an increase in the productivity of agriculture (Tilman *et al.*, 2002), their sustainability is the object of some amount of controversy (Fresco, 2001).

Another promising way of improving the efficiency of food production could be the curbing of food spoilage, possibly reaching 30 % in some countries (FAO, 2013) and perhaps up to 45 % in developed countries (NRDC, 2013): even if such figures are discussed, more food would be available if we could avoid damage to food ingredients during transportation from farms to homes (Gustavsson *et al.*, 2001) or during storage before consumption (FAO, 2013).

Because food ingredients are physical and chemical systems (This, 2013a), "spoilage" may include an alteration either in their physical structure at particular physical levels – macroscopic, microscopic, nanoscopic or molecular – or in the chemical nature of the compounds present in food ingredients (Jamet, 2016). Moreover, traditional food ingredients being mainly made of a large quantity of water (up to 99 % in some) (Belitz *et al.*, 2009), their transportation can be considered a needless waste of energy: if water were removed from food ingredients at the farm (by fractionation and cracking), the energy spent in transportation would be reduced drastically (Yoshikawa, 2016).

As well the chemical integrity of food ingredients would be preserved, as dry products are much more resistant to micro-organisms (New Zealand Food Safety Authority, 2005). Of course, at the other end of the food chain, cooks (in homes or in restaurants) and food industries would have to

reconstitute dishes, starting from the various compounds produced during water removal. Here "water removal" is not restricted to drying in air or by heating, or even to freeze-drying. Because of the high latent heat of water (The Physics Hypertextbook, 2013), drying food ingredients is energy-consuming, but filtration techniques (nanofiltration, microfiltration, direct or reverse osmosis...) can be helpful in removing water from food ingredients efficiently, as well as making fractions at the same time (Gésan-Guiziou, 2007; Van Audenhaege *et al.*, 2014).

Such filtration techniques are already in use for milk and wheat (Van Audenhaege *et al.* 2012), but they could be applied to any plant or animal tissues, leading to new fractions, such as total phenolic fractions already produced under an INRA license ("Provinols") by some companies (INRA, 2013). Depending on the level of purity needed, sequential filtration and cracking could allow for more and more different fractions, which could in turn be used as new food ingredients for the culinary technique called "note by note cooking" (NbNC) cooking (This, 2013b).

A new culinary technique

NbNC was first introduced in 1994, when "molecular cooking" was spreading in the professional culinary world (Ashley, 2013). It is different, as the goal is no longer to introduce new tools (siphons, rotary evaporators, water heating circulators, liquid nitrogen...) for transforming traditional food ingredients (Inicon, 2016), but rather to make food with new ingredients, i.e. pure compounds (there is also a clear difference between NbNC and the scientific discipline called "molecular gastronomy", as NbNC is producing food, whereas molecular gastronomy is the scientific study of phenomena occurring food production and consumption) (DIT, 2013). Producing food using pure compounds or new fractions obtained by fractionation or cracking

Note de recherche

of plant or animal tissues can lead to new dishes, which is indeed what many creative cooks are looking for (ESCF, 2013). In particular, the issue of “artificial meats” has to be discussed (below) in view of times when meat production will become insufficient (Combris, 2012) or if animal consumption becomes socially unacceptable.

A comparison of NbNC with electro-acoustic music could be helpful in order to better appreciate the potential interest of NbNC for the culinary art practitioners: electronic music, developed mainly after the middle of the twentieth century (Dunn, 1992), when musicians and acousticians used computerized and electronically-generated sound waves of specific wavelengths to compose music, but it only became popular when user-friendly technologies were developed; synthesizers are widely used today (a *Google* search on the word “music+synthesizer” yields more than 30 million results).

The same kind of development could occur with NbNC: today, cooks find it difficult and time consuming to use pure compounds (“pure NbNC”) in order to build up food in all its aspects (nutrition, shape, consistency, color, taste, smell, etc.), but in the future some particular mixtures of compounds could be used more easily (“practical NbNC”).

Whatever the particular technique (pure NbNC ou practical NbNC) being used, tests already carried out with chefs showed that it is probably easier to design first the shape, then to choose the consistency of the product, and only later to add “bioactive compounds”, i.e. compounds acting on receptors for color, taste, smell and trigeminal sensations (This, 2012).

The compounds used can be chosen in the list of already consumed compounds, which are part of traditional food ingredients or food, and from this technical point of view, it is not important that such compounds are produced by fractionation of plant or animal tissues, or by chemical synthesis; all what is needed is that the compounds are “food grade”, which means edible with no harmful impurities (of

course, the issue of price and sustainability of the production of such compounds will have to be considered in the future) (AFSCA, 2011; FDA, 2016).

For example, for consistency, water, polysaccharides, proteins, lipids are of primary choice. For taste, mineral salts, saccharides or amino-acids can be used in lower concentrations, but some interactions between consistency and taste have to be considered, as shown by the experiment of adding sucrose to dough made of flour and water (Feillet, 2000). For odor and color, the choice is easier as essential oils or flavorings, and colorants have long been in use by food companies (Surburg and Panten, 2006).

However the advantage offered by NbNC would be to provide cooks with the possibility to make up their own mixtures, from pure odorant compounds dissolved in the appropriate (edible) solvent (e.g. oil). Let us observe immediately that a mixture of the main compounds present in meat would already be “artificial meat”. Of course, this would lack many characteristics of real meat, but similarly, a photographic reproduction of a painting lacks the texture of the painting, varnishes, and other characteristics of the real painting.

Building new food

The fact that dishes are physical and chemical systems with “bioactivity” means that during consumption dishes release compounds having receptors in the body (nutrition, sensory appreciation, etc.) (This, 2012). For the exploration of such release, quantitative parameters called absolute (potential and actual) bioactivity, dynamic bioactivity, matrix effects have been introduced. The particular organization of compounds in food determines these bioactivity indexes as well as matrix effects, so that the study of NbNC involves looking for the relationship between multi-scale organization of compounds and

Note de recherche

bioactivity parameters (Axelos, 2013). Contrary to traditional food, where the consistency is often obtained by a modification of the consistency of the food ingredients, the consistency of NbN food can be designed entirely. In this regard, the formalism proposed for the description of dispersed systems (DSF) is a key tool as it considers both the dimension of the constituents which appear at any scale, as well as the nature of the phases; operators describe the geometrical relationship of the objects (This, 2007; This, 2009; This *et al.*, 2013).

Using this formalism, building food at any scale (rather than simply a multi-scale built food) is possible. For example, let us consider the making of a dish P_1 using several macroscopic parts $P_{1,1}, P_{1,2}, \dots, P_{1,n(1)}$, themselves made of

parts on the next scale, and so on. Using the operators of DSF, this dish could be described by the formula:

$$P_1 = P_{1,1} \text{ op}_{1,1} P_{1,2} \text{ op}_{1,2} P_{1,3} \dots \text{ op}_{1,n(1)-1} P_{1,n(1)} \quad (1)$$

where $\text{op}_{i,j}$ are chosen in the list of DSF operators and any $P_{1,j}$ is itself made of parts:

$$P_{1,i} = P_{2,i,1} \text{ op}_{2,i,1} P_{2,i,2} \text{ op}_{2,i,2} \dots \text{ op}_{2,i,n(2,i)-1} P_{2,i,n(2,i)} \quad (2)$$

And so on for any "part", until the molecular scale is reached.

From this description, many observations can be made. For example, at the microscopic level (between 10^{-6} m and 10^{-3} m ; this covers more than one scale), the parts are generally colloids (IUPAC, 2013). Moreover, not all scales need to be considered. For example, when the first "reference size" ranges from $2 \cdot 10^{-2}$ to $2 \cdot 10^{-1}$ m, the second scale should be













Same structure and composition	Same kind of composition (proteins, water...)			Same microstructure
 Raw meat				 "fibres"
 NbN meat system	 terrine	 In vitro system	 NbN "dirac"	 NbN "fibres"

Figure 1. Many different systems can be made when the meat composition and/or structure is "reproduced". In vitro systems obtained by cultivation of muscular fibres is only one possibility among many.

Note de recherche

between $2 \cdot 10^{-3}$ and $2 \cdot 10^{-2}$ m, the third one between $2 \cdot 10^{-4}$ and $2 \cdot 10^{-3}$ m, and so on down to $2 \cdot 10^{-10}$ and $2 \cdot 10^{-9}$ m (molecular level). It is perhaps not useful to describe the dish in all these scales (9 orders of magnitudes), because some objects span over two scales, and we suggest to consider only sizes instead, ranging from 10 cm to 1 mm ("macroscopic", scale 1), then from 0.1 mm to 0.001 mm (= 1 μ m) ("microscopic", scale 2), then from 1 μ m to 0.01 μ m ("nanoscopic", scale 3), and then from 10 nm to 0.1 nm ("molecular", scale 4) (Sci-Tech Dictionary, 2003).

The downward analysis of food is a preliminary step for the understanding of the behavior of food systems that would be built from molecular up to macroscopic level, at all scales. Using the right compounds, and the known physical and chemical laws, it is possible to envision a wealth of possibilities, among which "artificial meats" are one possibility.

Artificial meat

The previous discussion showed that the scope of possible systems that can be built from pure compounds is very large. In particular, systems reproducing various aspects of meat can be produced. However the terminology "artificial meat" has to be discussed first. On the one hand, meat is defined as "the flesh of an animal when it is used as food", the flesh being "the soft part of the body that is between the skin and the bones" (Cambridge Dictionary, 2016); for the Codex alimentarius, the definition is slightly different ("all parts of animal that are intended for, or have been judged safe and suitable for, human consumption") (Codex alimentarius, 2016). On the other hand, "artificial" means "made by people, often as a copy of something natural". We shall not discuss here the fact that most animals used as food are seldom "natural" strictly speaking, because they were selected by the human kind after domestication (Digard, 2009); rather the discussion is focused on "artificial", because

there can be copies of different kinds, physical or chemical, and with different degrees of similarity compared to the original meat. The muscular tissue of animals is made of muscle fibers, i.e. elongated cells grouped in bundles and superbundles by the collagenic tissue, with vessels and fat deposits (Listrat *et al.*, 2016). The muscular fibres include water and proteins such as actins and myosins. This system can be reproduced physically, chemically, or from both points of view simultaneously (Figure 1).

Firstly, from the chemical point of view, any system having a chemical composition close to the one of meat can be considered as "artificial meat". For example, a 20 % dispersion of proteins in water is not so far from real meat, even if it is lacking many properties of it, and in particular iron inside the heme group, which is important for nutrition (Pizarro, 2016). It is easy to improve the quality of the reproduction by adding various compounds such as lipids, glycogen, lactic acid, minerals, vitamins, etc. (De Castro and Dos Reis, 2013).

In such improvements, the classification of nutrients as macronutrients and micronutrients is helpful. How many compounds should be used to make an artificial meat? The question can be analyzed from many different points of view: nutrition, odor, taste, trigeminal, color...

Each particular aspect can be more or less similar to real meat, but anyway perfect copies do not exist, because it would first need a perfect knowledge of the original system, and even if such knowledge were at hand, the goal of making such copy should be discussed. Also as "meat" is very diverse, with influences of the age of the animals, their diet, the condition of slaughtering, the post mortem treatments, a large variety of different "originals" has to be considered (Przybylski and Hopkins, 2016). In this discussion, one has to take into account that the order of importance, from the composition point of view, has little to do with the order in taste,

Note de recherche

odor or color. For a good reproduction, the most important compounds of each aspect of meat have to be considered first.

From where should the compounds come? It is true that chemistry can now synthesize many



Figure 2. A "fibre": this system is formally comparable to meat, from a physical point of view, as it is made from tubes (instead of muscular fibres) full of water and proteins.

food compounds, but one should not forget that an important collaboration was needed for the chemical synthesis of vitamin B12 (a dozen years, hundreds of chemists) (SCF, 2016), and even today a large scale production is hardly possible. Even for simple compounds such as methionine, the chemical production is not a solution today (Jiang *et al.*, 2016), and fractionation and cracking plant tissues would be easier. One has to note that in the future GM plants or micro-organisms could well express particular compounds that would be useful for food diet, but this is prospective (Reynolds and Martirosyan, 2016).

As the physical structure is concerned, other "copies" can be made, one already very popular being "surimi", i.e. fibrous systems made from thermal coagulation of solutions of water and proteins, followed by scraping the sheets produced, and rolling into tubes (Fuller, 2011). Such systems are fibrous, as is meat, even if the fibres are not hollow, and full of water and proteins, among compounds.

Another very simple reproduction of meat can be done with other compounds. For example, Figure 2 shows a system that was called "fibre" as early as 2001: it is made of "tubes" (from starch) glued together by proteins, and full of water and proteins, as in meat (Loew, 2016).

Finally, mix of systems can be made, for increasing closeness to meat. This discussion shows that "in vitro meat", as grown since 1991 (Levenberg *et al.*, 2005; Post, 2012), are nothing but one kind of artificial meat, and one should ask why it could be useful to grow such tissues, when more simple systems can be made. Indeed the current discussions about meat consumption should not forget to focus on the real interest of meat consumption.

Conclusions and perspectives

The possibility of making various "artificial meats" being established, the issue of food security should be discussed taking into accounts the many questions relative to food, from the production of food ingredients at the farm to nutrition.

First, if compounds can be used instead of whole plants or animal tissues, then agriculture could be in for a change, but so could the food regulation, which would then require some adaptation to allow for dealing with the ingredients adequately, as recently discussed at the European Customs Chemists meeting (CECC, 2013).

Further in the food chain, the questions raised by building food are many, because all sensory aspects of food could be subject to choice: color, taste, smell, consistency, etc. And nutrition also is important, because the new environment of bioactive compounds will be different. In particular, the relevant question is: how should we build NbN food if we had to eat it every day?

The issue of sustainability is obviously important, and different questions are raised depending on whether artificial meat is only a way to replace real meat for some people or if

Note de recherche

the humankind is to be fed with such systems. This question is Manichean, and there is no reason to imagine that real food will not be consumed in the future, as certain places such as mountains cannot be used for agriculture. But prospective issues should be discussed from quantitative scenarios. NbNC has to be included among the various possibilities taken into account.

References

- AFSCA. 2011. *Avis 13-2011 du Comité scientifique de l'Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire*. http://www.afsca.be/denreesalimentaires/circulaires/documents/2013_03_13_annexe3_avis_13-2011_FR.pdf, last access 26 July 2016.
- Atwood JL, Davies JED, MacNicol DD, Vogtle F, Lehn JM. 1996. *Comprehensive supramolecular chemistry*. Oxford, Perammon Press, Oxford, UK.
- Axelos M. 2013. Du nano au macro : quelles structures pour quelles fonctionnalités, *Cahiers de formulation*, 16, 102-112.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. 2009. *Food Chemistry*. Springer Verlag, New York.
- Boonen K M, Post M J. 2008. *The muscle stem cell niche: regulation of satellite cells during regeneration*, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14(4), 419-431.
- Cambridge Dictionary. 2016. <http://dictionary.cambridge.org/>, last access 2016-07-26.
- Cazor A, Deborde A, Moing A, Rolin D, This H. 2006. Sucrose, Glucose and Fructose Extraction in Aqueous Carrot Root Extracts Prepared at Different Temperatures by Means of Direct NMR Measurements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4681-4686.
- Codex alimentarius. 2016. <http://www.fao.org/docrep/010/ai407e/ai407e00.htm>, last access 26 July 2016.
- Combris P. 2012. *Tendances et limites du modèle alimentaire: que peut apporter la cuisine note à note?*, Séance publique, Académie d'agriculture de France, 17 décembre 2012, <http://www.academie-agriculture.fr/seances/la-cuisine-note-note?191212>, last access 9 January 2014.
- De Castro Cardoso Pereira P M, Dos Reis Baltazar Vicente A F. 2013. Meat nutritional composition and nutritive rôle in the human diet. *Meat Science*, 23, 586-592.
- Digard JP. 2009. *L'homme et les animaux domestiques. Anthropologie d'une passion*. Fayard, Paris.
- DIT. 2013. <http://www.dit.ie/catalogue/Modules/Details/TFCS4025>, last access 30 Sept 2013.
- Dunn D. 1992. A History of Electronic Music Pioneers, *Catalog of the exhibition Eigenwelt der Apparatenwelt : Pionneers of Electronic Art*, Linz (Austria).
- ESCF. 2013. <http://www.ferrandi-paris.fr/ecole/labo-de-creativite-culinaire>, last access 2 October 2013.
- FAO. 2013. <http://www.fao.org/docrep/x0039e/x0039e01.htm>, last access 2013-10-02.
- FDA. 2016. *Determining the Regulatory Status of a Food Ingredient*. U.S. Food and Drug Administration, U. S. Department of Health and Human Services, <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm228269.htm>, last access 26 Juillet 2016.
- Feillet P. 2000. *Le grain de blé*, Editions Quae, Paris.
- Fresco L O. 2001. *Genetically Modified*

Note de recherche

- Organisms in Food and Agriculture: Where are we? Where are we going?*, Keynote address of the Conference on « Crop and Forest Biotechnology for the Fuller GW. 2011. New Food Product Development, from Concept to Marketplace (3rd Edition). CRC Press, Boca Raton, USA.
- Gésan-Guiziou G. 2007. Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT) – Applications en agroalimentaire, *Dossier Techniques de l'Ingénieur*, j2795, 10/12/2007.
- Van Audenhaege M, Pezennec S, Gésan-Guiziou G. 2013. Ultrafiltration membrane cut-off impacts structure and functional properties of transmitted proteins: Case study of the metalloprotein α -lactalbumin, *Separation and Purification Technology*, 56, 325-365.
- Gustavsson J, Cederberg C, Sonesson U, Van Otterdijk R, Meybeck A. 2001. *Global Food Losses and Food Waste*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, 2001, www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e00.pdf, last access 2 October 2013.
- Inicon. 2016. <http://www.ttz-bremerhaven.de/en/research/food/research-projects/893-inicon.html>, last access 26 July 2016.
- INRA. 2013. <http://brevets-patents.ic.gc.ca/opic-cipo/cpd/eng/patent/2437970/summary.html>, last access October 2013.
- IUPAC. 2013. http://old.iupac.org/reports/2001/colloid_2001/#fn, last access 2 October 2013.
- Jamet JP. 2016. Gaspillage alimentaire, entre mystifications et démarches solidaires, *Paysans*, 352, 1-10.
- Jiang C, Wang Q, Zhang Y, Li Y, Wang Y, Xu T. 2016. Separation of methionine from the mixture with sodium carbonate using bipolar membrane electro dialysis, *Journal of Membrane Science*, 498, 48-56.
- Lehn J M. 1995. *Supramolecular chemistry: concepts and perspectives*, VCH, Weinheim.
- Lehn J M. 2002. Toward complex matter: supramolecular chemistry and self-organization, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 4763–4768.
- Levenberg S, Rouwkema J, Macdonald M, Garfein E S, Kohane D S, Marini R, Van Blitterswijk C A, Listrat A, Leuret B, Louveau I, Astruc T, Bonnet M, Lefaucheur L, Picard B, Bugeon J. 2005. How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality, *The Scientific World Journal*, Article ID 3182746, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3182746>.
- Loew C. 2016. Review: Note by Note Cooking: The Future of Food, *Gastronomica: The Journal of Critical Food Studies*, 16(1), 105.
- Mulligan R C, D'Amore P A, Langer R. 2005. Engineering vascularized skeletal muscle tissue, *Nature Biotechnology*, 23, 879-884.
- McQuarrie D A. 2007. *Quantum Chemistry*, University Science Books, Dulles (VA, USA).
- NRDC. 2013. The Dating Game, *NRDC Report*, New York, R:13-09A.
- New Zealand Food Safety Authority. 2005. *A Guide to Calculating the Shelf Life of Foods*, February 2005, <http://www.nzfsa.govt.nz>, last access 2 October 2013.
- Pizarro F, Olivares M, Valenzuela C, Brito A, Weinborn V, Flores S, Arredondo M. 2016. The effect of proteins from animal source foods on heme iron bioavailability in humans, *Food Chemistry*, 196, 733-738.
- Post M J. 2012. Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects, *Meat*

Note de recherche

Science, 92, 297-301.

Przybylski W, Hopkins D. 2016. *Meat Quality. Genetic and Environmental Factors*, CRC Press, Boca Raton, FL USA.

Reynolds T, Martirosyan D M. 2016. *Nutrition by design: a review of biotechnology in functional food of plant origin*, *Functional Foods in Health and Disease*, 6(2), 110-120.

Sci-Tech Dictionary. 2003. McGraw-Hill *Dictionary of Scientific and Technical Terms*, McGraw-Hill Companies, Inc., New York.

SCF. 2012. <http://www.societechimique.defrance.fr/vitamine-b12>, last access 26 July 2016.

Surburg H, Panten J. 2006. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses* (5th Revised and Enlarged Edition), Wiley, Weinheim, Germany.

Tabeling P, Chabert M, Dodge A, Jullien C, Okkels F. 2004. Chaotic mixing in cross-channel micromixers, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A*, 362, 1818, 987-1000.

The physics Hypertextbook. 2013. <http://physics.info/heat-latent/>, last access 2 October 2013.

This H, Vauvre JM, Dulauroy M. 2013. Formalism and new dishes, *Cahiers de formulation*, 16, 5-21.

This H. 1996. Can a cooked egg white be uncooked?, *The Chemical Intelligencer*, 10, 51.

This H. 2007. Formal descriptions for formulation, *International Journal of Pharmaceutics*, 344, 1-2, 4-8.

This H. 2009. Molecular Gastronomy, a

chemical look to cooking, *Accounts of Chemical Research*, 42, 5, 575-583.

This H. 2012. Solutions are solutions, and gels are almost solutions, *Pure and Applied Chemistry*, 1-20. <http://dx.doi.org/10.1351/PAC-CON-12-01-01>.

This H. 2013a. Molecular gastronomy is a scientific discipline, and note by note cuisine is the next culinary trend, *Flavor*, 2, 1-8.

This H. 2013b. *Note by Note Cooking*. Columbia University Press, New York.

This H. 2013c. Vers des aliments dynamiques ?, *L'Actualité chimique*, 380, 11-14.

This H. 2013d. 5th Conference of European Customs Chemists, 10-12 July 2013.

Tilman D, Cassman K G, Matson P A, Naylor R, Polasky S. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices, *Nature*, 418, 671-677.

United Nations. 2004. *World Population to 2300*, UN, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. New York, ST/ESA/SER.A/236

Van Audenhaege M, Lambrouin F, Piot M, Gesan-Guiziu G. 2012. *Unexpected displacement of the equilibrium between the apo and the holo form during ultrafiltration of the metalloprotein alpha-lactalbumin*, *Journal of Membrane Science*, 401-402, 183-203.

Yoshikawa N, Fujiwara N, Nagata J, Amano K. 2016. Greenhouse gases reduction potential through consumer's behavioral changes in terms of food-related product selection, *Applied Energy*, 162, 1564-1570.

Édité par :

Note de recherche

Dominique Job, CNRS, Membre de l'Académie d'agriculture de France.

Rapporteurs :

1. Dominique Job, Membre de l'Académie d'agriculture de France.
2. Louis-Marie Houbépine, directeur de recherche honoraire à l'Inra, membre de l'Académie d'agriculture de France.

Rubrique :

Cet article a été publié dans la rubrique « Notes de recherche » des *Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France*.

Reçu :

8 février 2016

Accepté :

29 juillet 2016

Publié :

29 juillet 2016

This H. 2016. What can "Artificial Meat" be? Note by note cooking offers a variety of answers. Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture (N3AF), 2(4), 1-10. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a196614>.



Hervé This est directeur du Centre International de Gastronomie moléculaire AgroParisTech-Inrae, et membre de l'Académie d'agriculture de France.

Citation :

Note de recherche

Écologie microbienne de la grotte de Lascaux

Microbial ecology of the Lascaux cave

Claude Alabouvette¹, Cesareo Saiz-Jimenez²

¹ Directeur de recherche honoraire à l'Inra

² Instituto de recursos Naturales y Agrobiologia, IRNAS-CSIC, Avda. Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla, Espagne

Correspondance:

c.ala@free.fr

Résumé :

La grotte de Lascaux, universellement connue pour ses peintures rupestres, a connu, depuis sa découverte, plusieurs épisodes de développement microbien qui menaçaient la conservation des peintures murales. A partir de 2005, un programme de recherches a été développé afin d'identifier les micro-organismes présents et de mettre en évidence les processus de successions microbiennes qui se produisent dans la grotte. Celle-ci constitue un écosystème dynamique où les communautés microbiennes évoluent au cours du temps et sous l'influence des traitements biocides destinés à contrôler la prolifération de certaines espèces jugées envahissantes. Ces travaux ont permis d'identifier deux nouvelles espèces fongiques : *Ochroconis lascauxensis* et *O. anomala*. Le développement de ces champignons formant des taches noires sur la paroi de la cavité a vraisemblablement été favorisé par l'utilisation de produits biocides dont les résidus constituent des sources de carbone et d'azote utilisables par certaines espèces microbiennes, bactériennes et fon-

giques. Ces résultats montrent que, pour assurer la conservation des peintures murales, il convient de prendre en considération l'ensemble des communautés d'organismes présents dans la grotte avant d'entreprendre tout traitement visant à contrôler une population donnée.

Abstract:

Since its discovery the Lascaux cave has suffered several events of uncontrolled microbial development, which have been dangerous for the conservation of the wall paintings. Starting in 2005, a research program has been aiming at identifying the microbial populations present in the cave and describing the microbial successions. The Lascaux cave constitutes a dynamic ecosystem in which the microbial communities evolve with time and under the effects of the biocide treatments used to control proliferating microbial species. This study permitted to

Note de recherche

identify two new fungal species *Ochroconis lascauxensis* and *O. anomala*, apparently original in Lascaux. The development of these fungi, forming black spots on the walls of the cave, was probably favored by the use of biocide products which transformed residues can be used by several microorganisms as carbon and nitrogen sources. These results point out the necessity to consider all the communities of organisms living in the cave before using biocide treatments to try to control a given microbial species.

Keywords :

microbial communities, bacteria, fungi, protozoa, arthropods, biocide treatments

Mots clefs :

communautés microbiennes, bactéries, champignons, protozoaires, arthropodes, traitements biocides

Avant-propos

Les principaux résultats présentés ci-dessous ont été obtenus lors des travaux réalisés entre 2005 et 2011, dans le cadre de deux projets de recherche financés par le Ministère de la Culture via la DRAC d'Aquitaine, à savoir :

- le projet « Microbiologie/micro-climat », qui visait à corréliser (1) la colonisation fongique visible à la surface des substrats, (2) la nature de ces substrats et (3) les conditions micro-climatiques qui règnent à l'interface substrat/atmosphère ;
- le projet « Écologie microbienne », dont le principal objectif était d'étudier les processus de successions microbiennes qui se produisent dans la grotte.

Ces projets associaient plusieurs équipes de plusieurs pays européens. Les résultats obtenus par l'ensemble des participants ont fait

l'objet de comptes rendus réguliers, présentés devant le Comité Scientifique International de la Grotte de Lascaux, et de publications scientifiques, parues dans des revues internationales à comité de lecture. Nous présentons ici une synthèse des principaux résultats obtenus par les équipes de l'INRA de Dijon et de IRNAS-CSIC (Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología-Consejo Superior de Investigaciones Científicas) de Séville, en nous inspirant largement du rapport final du projet « Écologie microbienne » publié en 2011 (Alabouvette et Saiz-Jimenez, 2011). Les illustrations de cet article ont toutes été déjà présentées dans ce rapport final. Les méthodes utilisées sont décrites dans les publications scientifiques correspondantes dont les références sont citées à la fin de cet article.

Nos recherches se sont interrompues en 2011, car la poursuite de ce travail a été confiée à une autre équipe, qui, à notre connaissance, n'a pas encore communiqué ses résultats. Cette synthèse ne concerne donc que les résultats acquis avant juin 2011.

Nous tenons à remercier ici, tous les chercheurs qui, outre les deux auteurs de cet article, ont contribué à ces travaux :

Pedro M. Martín-Sánchez (IRNAS-CSIC, Espagne)
Fabiola Bastian (INRA-Dijon, France)
Valme Jurado (IRNAS-CSIC, Espagne)
Alena Nováková (ISB, Ceske Budejovice, République tchèque)
Estefanía Porca (IRNAS-CSIC, Espagne)
Santiago Sánchez-Cortés (IEM-CSIC, Espagne)
Angela García-Sánchez (IRNAS-CSIC, Espagne)
Concepción Ariza (Facultad de Farmacia, Séville, Espagne)

Note de recherche

1. Historique des épisodes de développement microbien dans la grotte de Lascaux

Depuis sa découverte, la grotte de Lascaux a connu plusieurs épisodes de développement microbien qui ont menacé la préservation des peintures pariétales pour lesquelles elle est célèbre. Le premier événement (1962, 1963), qualifié de « maladie verte », a conduit à la fermeture de la grotte aux visites touristiques, car cette première « contamination » était très probablement une conséquence des aménagements importants effectués pour permettre les visites (Lefèvre, 1974). Ce sont vraisemblablement les modifications climatiques engendrées par le flux de visiteurs et l'apport de lumière, pendant plusieurs heures chaque jour, qui ont favorisé le développement d'algues vertes, photosynthétiques. Le second événement (2001) s'est manifesté à la suite de travaux qui ont eu pour conséquence de perturber le « climat » de la grotte et de favoriser la prolifération de moisissures blanches attribuées à un champignon d'origine tellurique : *Fusarium solani*.

Le dernier événement en date (2007), celui du développement de « taches noires » attribuées au champignon mélanisé *Ochroconis lascauxensis*, peut être corrélé à des déséquilibres microbiens provoqués par l'application de traitements biocides destinés à lutter contre les moisissures blanches.

En effet, pour préserver les peintures rupestres, chaque épisode de développement microbien a été suivi d'une période plus ou moins longue de traitements biocides destinés à juguler la prolifération microbienne. Ainsi la maladie verte a été traitée par application de méthanal (formol), mais l'application de ce composé sur les sédiments constituant les sols s'est poursuivie pendant de nombreuses années, sans que ses effets à long terme aient été évalués.

La prolifération de *F. solani*, en septembre 2001, nécessitait une intervention d'urgence,

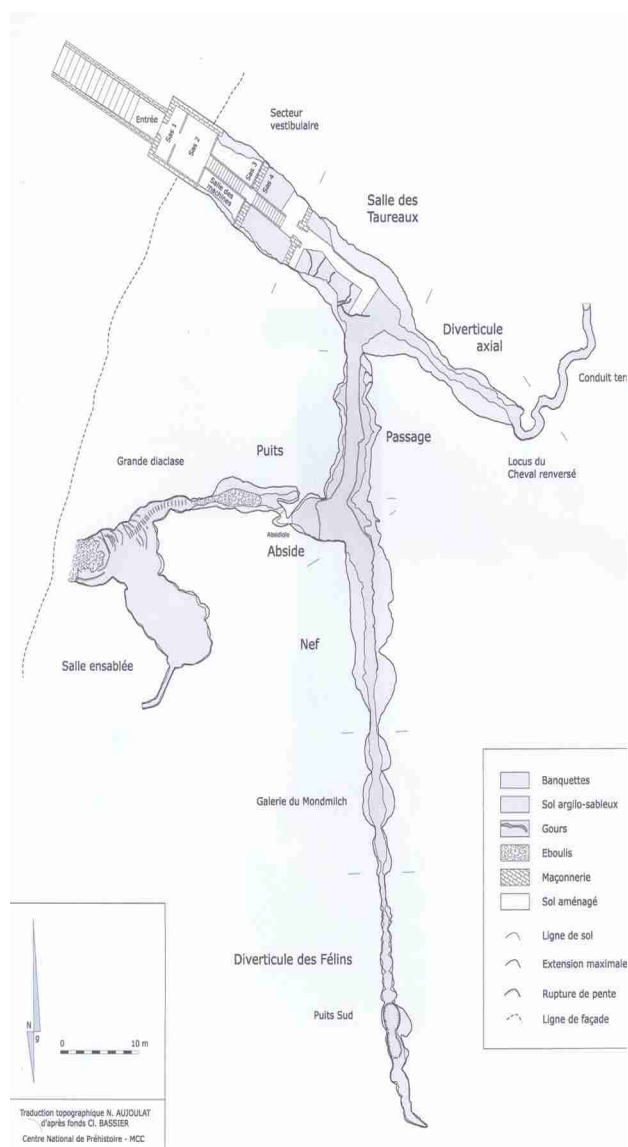


Figure 1. Schéma présentant les différents compartiments de la grotte de Lascaux (source Centre National de la Préhistoire).

qui s'est traduite par un traitement des sols à la chaux vive et des traitements des parois à l'aide d'ammoniums quaternaires, en particulier de chlorure d'alkyl-diméthyl-benzyl-ammonium, associés ou non à des antibiotiques (sulfate de streptomycine et polymyxine) mis en suspension dans l'eau ou dans l'alcool. Ces traitements se sont

Note de recherche

poursuivis à des fréquences relativement élevées jusque fin 2003.

Parallèlement des procédés mécaniques d'élimination des colonies fongiques à la surface des zones non ornées ont été mis en œuvre, en vue d'éradiquer *F. solani*. Le développement des « taches noires », en juillet 2007, a conduit à appliquer un traitement expérimental à base d'ammoniums quaternaires associés à un fongicide (octylisothiazolinone). Plusieurs applications de différents produits ont été effectuées entre janvier 2008 et février 2009, avant une mise au repos de la grotte pendant trois mois.

A chaque épisode, l'attention s'est focalisée uniquement sur les organismes identifiés comme responsables des désordres et qui ont fait l'objet des traitements biocides. L'effet de ces derniers n'a été apprécié que par observation du comportement des organismes visés, sans que le microbiote ne soit pris en compte dans sa globalité. Or tout traitement a des effets non intentionnels sur des populations non-cibles et perturbe les équilibres microbiens.

Ces perturbations peuvent avoir des conséquences néfastes plusieurs mois, voire plusieurs années, après l'application du traitement. Il était donc indispensable d'identifier l'ensemble des communautés microbiennes de la grotte de Lascaux et d'étudier leurs interactions afin d'éviter des proliférations microbiennes dangereuses pour la conservation des œuvres d'art.

Il convient de préciser ici que le terme de « contamination », qui a été employé pour décrire la prolifération des algues vertes, puis de *F. solani*, est inapproprié. Il est plus exact de parler de colonisation apparente et potentiellement dangereuse pour la sauvegarde des peintures rupestres. En effet, le champignon *F. solani* qui a proliféré à l'automne 2001 n'est pas à proprement parlé un contaminant ; il n'a pas été introduit dans la grotte, mais préexistait certainement à la prolifération observée en 2001.

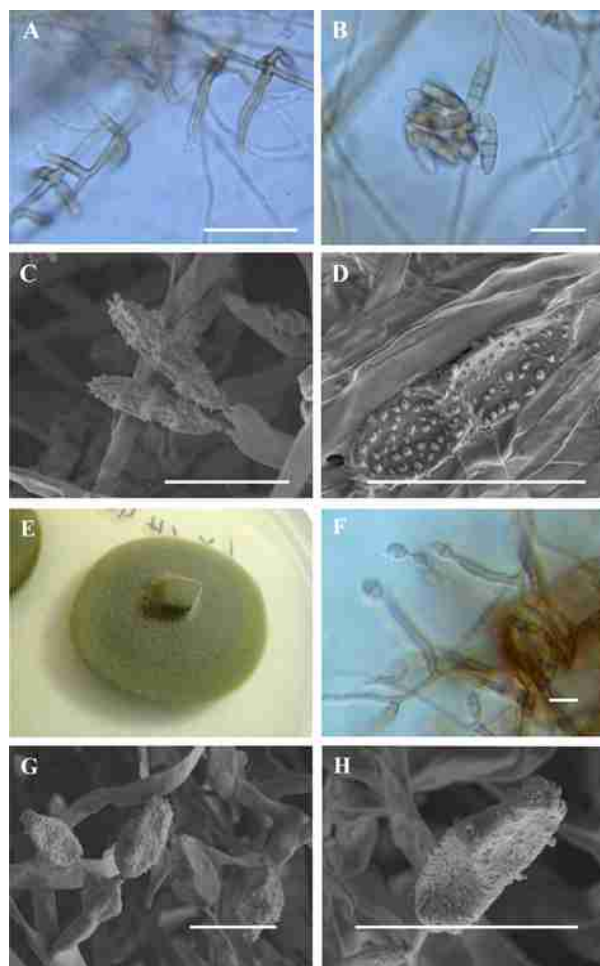


Figure 2. Structures microscopiques des souches d'*Ochroconis* spp. isolées de la grotte de Lascaux. *Ochroconis lascauxensis* : cellules conidiogènes (A) et conidies (B, C et D). *Ochroconis anomala* : colonie après 1 mois de culture (E), cellules conidiogènes (F) et conidies (F, G et H). Barre d'échelle 10 μ m.

Les *Fusarium*, et l'espèce *F. solani* en particulier, sont des constituants habituels de la microflore des sols. Ils représentent, selon les auteurs, 10 à 20 % des champignons cultivables isolés des sols agricoles où ils ont été cherchés. Ce sont des champignons saprophytes se développant aux dépens des matières organiques. Cependant ils peuvent

Note de recherche

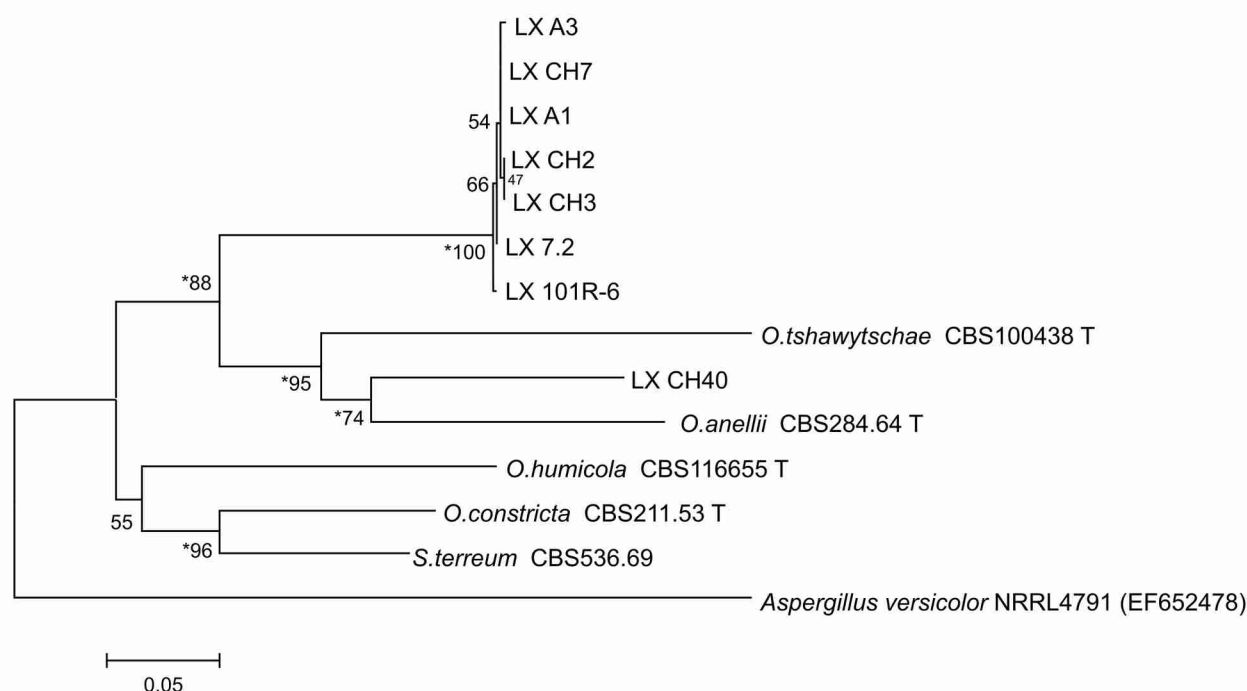


Figure 3. Relations phylogénétiques entre les isolats d'*Ochroconis* spp. de la grotte de Lascaux et les isolats de référence. Analyse fondée sur l'alignement multiple de la région internal transcribed spacer (ITS), réalisé en comparant 680 nucléotides. L'arbre a été établi par la méthode de neighbour-joining utilisant 10000 répliques. Les astérisques indiquent les nœuds de l'arbre, obtenus en utilisant l'algorithme d'Evolution Minimale et Parcimonie Maximale (UPGMA). La barre représente 0,05 changement de nucléotides par position.

également se conserver sous forme de chlamydo-spores (spores de conservation) inactives pendant plusieurs années. Il est donc vraisemblable que *F. solani* a toujours été présent dans les sédiments et à la surface des supports rocheux de la grotte.

De plus, une étude de caractérisation des souches (Dupont *et al.*, 2007) a montré que la population isolée de la grotte n'est pas homogène ; elle présente une diversité qui permet de caractériser plusieurs sous-espèces de *F. solani*. Cela montre que la colonisation de l'automne 2001 ne résulte probablement pas de l'introduction accidentelle d'une souche, mais bien de conditions environnementales particulières qui ont favorisé le développement mycélien de ce champignon à la surface des substrats.

Signalons enfin que *F. solani* est un champignon imparfait, qui produit deux types de conidies : des microconidies unicellulaires et des macroconidies pluricellulaires, en forme de croissant, qui sont produites dans des gouttelettes de mucus. Ces dernières ne sont donc pas transportables par le vent. Leur dissémination est assurée par les gouttes de pluie, par des insectes ou, encore, par des particules de sol ou des résidus végétaux. Dans les conditions confinées de la grotte de Lascaux, la dissémination des spores de *F. solani* est donc *a priori* très limitée et l'apparition de colonies en divers points suggère une germination de chlamydo-spores préexistantes.

Comme tous les champignons, *F. solani* est hétérotrophe, c'est-à-dire qu'il ne peut se

Note de recherche

développer qu'aux dépens de matières organiques. Le développement important observé dans la grotte suppose donc l'existence d'une source de carbone organique disponible pour la croissance des hyphes de ce champignon.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées : les matières organiques ont pu être apportées par les eaux de percolation ; elles pourraient aussi provenir des résidus des traitements biocides appliqués au cours des années qui ont précédées l'infestation ; enfin elles pourraient résulter de l'association de ce champignon avec des bactéries.

Il est très difficile d'examiner ces différentes hypothèses. Nous savons, pour l'avoir vérifié, que les champignons du genre *Fusarium* sont capables d'utiliser des sources de carbone variées : ils peuvent utiliser l'éthanol comme le formol, et nous avons montré que les souches de *F. solani* isolées de la grotte sont toutes résistantes au formol utilisé régulièrement pendant plus d'une vingtaine d'années à titre de traitement préventif.

L'éthanol a également été utilisé pour mettre en solution certaines des molécules biocides utilisées pour traiter la cavité. Or, à faible concentration, l'éthanol constitue une source de carbone facilement utilisable par les *Fusarium* spp.

Enfin il est apparu que les colonies de *F. solani* étaient souvent associées à des colonies de *Pseudomonas* spp. : cette association pourrait expliquer la résistance des *Fusarium* aux traitements biocides. Certaines souches de *Pseudomonas* spp. sont en effet capables de détoxifier les molécules d'ammonium quaternaires qui, une fois transformées, servent de substrat pour la croissance des *Fusarium* spp.

Il est clair, pour l'écologiste microbien, qu'il est impossible de tenter de comprendre les raisons du développement de ces *F. solani* sans prendre en considération les autres micro-organismes qui se développent à la surface des substrats de la grotte. Les recherches

devaient donc s'orienter vers la description des biofilms et des interactions entre micro-organismes, champignons et bactéries qui constituent ces biofilms.

2. Brève revue bibliographique relative aux communautés microbiennes des grottes

Avant d'aborder les recherches consacrées à l'écologie microbienne de la grotte de Lascaux, il convient de rappeler que des micro-organismes sont présents dans tous les habitats de la biosphère, y compris dans les habitats souterrains. Ces habitats sont caractérisés par l'absence de lumière, une quantité limitée, voire l'absence, de nutriments organiques, une température et un degré hygrométrique relativement constants et une grande surface de minéraux à coloniser.

La bibliographie traitant des communautés microbiennes des grottes est peu abondante et limitée à un petit nombre de grottes. Plus rares encore sont les travaux qui présentent une étude complète de l'ensemble des micro-organismes d'une grotte, incluant l'identification des espèces les plus fréquentes et les plus abondantes et l'étude du rôle de ces communautés dans les processus biogéochimiques.

La plupart des articles sont consacrés à des aspects spécifiques, tel l'existence de champignons (Rutherford et Huang, 1994), de bactéries (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2002) ou de cyanobactéries et d'algues dans des grottes présentant des ouvertures exposées à la lumière (Abdelahad et Bazzichelli, 1988 ; Aboal *et al.*, 1994 ; Hernandez Marine et Canals, 1994).

De nombreux résultats publiés sont contradictoires, et il est possible de résumer les données de la littérature en concluant que les communautés microbiennes présentes dans les grottes sont le reflet des caractéristiques de chaque écosystème où les substrats, les niveaux de matière organique et

Note de recherche

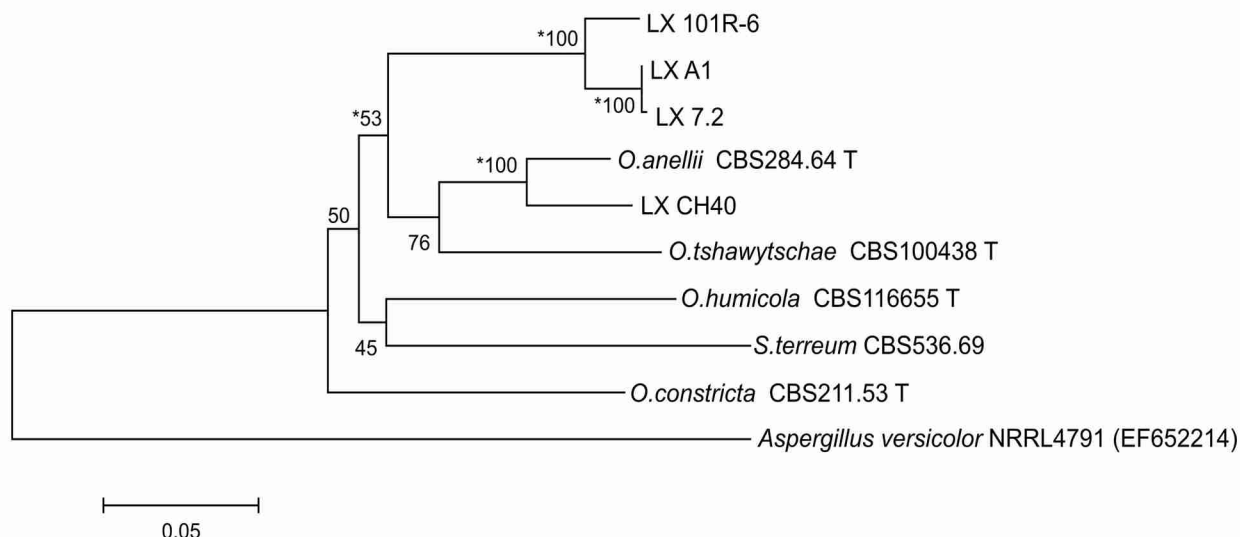


Figure 4. Relations phylogénétiques entre les isolats d'*Ochroconis* spp de la grotte de Lascaux et les isolats de référence. Analyse fondée sur l'alignement multiple de la région RPB2 (RNA polymérase 2 gene), réalisé en comparant 704 nucléotides. L'arbre a été établi par la méthode de neighbour-joining utilisant 10 000 répliques. Les astérisques indiquent les nœuds de l'arbre, obtenus en utilisant l'algorithme d'Evolution Minimale et Parcimonie Maximale (UPGMA). La barre représente 0,02 changement de nucléotides par position.

les conditions climatiques sont différentes. En conséquence, les communautés microbiennes forment des biofilms différents selon la grotte considérée (Wimpenny *et al.*, 2000).

Il convient donc d'aborder l'étude des écosystèmes souterrains de manière globale, en prenant en considération l'ensemble des variables et non de façon fragmentaire, en ne ciblant qu'un aspect particulier.

3. Diversité des espèces bactériennes et fongiques présentes sur les parois de la grotte de Lascaux.

Lorsque nous avons commencé ce travail, comme indiqué ci-dessus, la microbiologie et l'écologie de la grotte de Lascaux étaient très mal connues. Les seuls travaux facilement accessibles aux scientifiques étaient les travaux de Lefèvre (Lefèvre, 1974), qui présentaient les effets de la maladie verte, et

ceux de Dupont *et al.* (2007), qui ont identifié les souches de *F. solani* isolées de la grotte en 2001. Nous n'avons aucune connaissance des communautés microbiennes présentes dans la grotte ; les seuls paramètres pris en compte pour juger de l'efficacité des interventions chimiques et mécaniques de désinfection avaient été l'extension ou la régression des colonies « blanches ».

C'est pourquoi notre premier objectif visait à dresser un inventaire des principales espèces bactériennes et fongiques présentes sur les parois et les sols dans les différents compartiments de la grotte de Lascaux. En effet, celle-ci est divisée en plusieurs compartiments (Figure 1) qui présentent des caractéristiques différentes, les développements microbiens étant plus fréquents dans certains compartiments que dans d'autres. Il était donc important de dresser un inventaire des populations de micro-organismes de chacun de ces

Note de recherche

compartiments, afin de pouvoir éventuellement établir des corrélations entre diversité microbienne et caractéristiques environnementales des différents secteurs de la grotte.

Une contrainte propre à la grotte de Lascaux est l'interdiction de toucher aux gravures rupestres et, donc, de prélever des échantillons à la surface des parois ornées. Nous avons cependant été autorisés à réaliser, d'une part, des prélèvements au coton tige à la surface de zones visiblement colonisées par des micro-organismes et, d'autre part, des prélèvements de « substrat » à la surface des sols ou des banquettes.

A partir de ces échantillons, nous avons d'une part réalisé des mises en culture sur différents milieux gélosés, afin de constituer une collection de micro-organismes issus de la grotte, et nous avons d'autre part extrait l'ADN, soit directement à partir des échantillons de substrat, soit à partir des micro-organismes en culture pour réaliser une identification moléculaire des micro-organismes par séquençage des régions codant l'ARN ribosomique. Les méthodes employées sont décrites dans les publications consacrées respectivement à l'inventaire des bactéries et des champignons de la grotte (Bastian *et al.*, 2009 a, b et c).

Qu'il s'agisse des champignons ou des bactéries, nos résultats ont révélé une grande diversité de génotypes et montrent que les *F. solani* et les *Pseudomonas* fluorescents qui avaient précédemment retenu l'attention n'étaient absolument pas dominants sur les parois de la cavité, et cela quel que soit le compartiment considéré.

Parmi les 696 clones bactériens obtenus, les plus représentés correspondent aux espèces suivantes : *Ralstonia mannitolilytica*, *Ralstonia pickettii*, suivies par *Pseudomonas saccharophila*, *Escherichia coli*, *Achromobacter xylosoxidans* et *Pseudomonas lanceolata*. Moins fréquemment représentées sont des espèces appartenant aux genres *Afipia* et

Legionella, suivies de *Stenotrophomonas maltophilia* et *Acquicella* spp. Enfin un petit nombre de clones correspondent à *Pseudomonas fluorescens*, *Inquilinus* spp, *Escherichia albertii*, *Bordetella ansorpii* et *Sighella sonnei* (Bastian *et al.*, 2009 a,b).

Il faut attirer l'attention sur le fait que ces espèces bactériennes sont fréquemment détectées dans les systèmes de distribution de l'eau dans les hôpitaux, dans les systèmes de climatisation des immeubles, et sont très souvent associées à des protozoaires.

Ces résultats sont cohérents avec l'identification parmi les 607 clones d'eucaryotes isolés de la grotte, d'espèces d'amibes telles que *Nuclearia delicatula* et *Acanthamoeba* spp, amibes dont les bactéries constituent la principale ressource trophique.

Pour tenter d'expliquer l'abondance de *Ralstonia*, de *Pseudomonas* et d'autres espèces bactériennes potentiellement pathogènes, il faut se souvenir que la grotte a été soumise, après la prolifération de *F. solani* en juillet 2001, à de nombreux traitements biocides à base d'ammoniums quaternaires et d'antibiotiques.

Or, dans certaines conditions, les bactéries Gram négatif sont capables de s'adapter pour résister à de fortes concentrations de chlorure de benzalconium (Patrauchan et Oriel, 2003). Ces bactéries organisées en biofilms à la surface des parois peuvent résister à des concentrations 1500 fois supérieures à celles auxquelles elles sont sensibles en culture pure. Les résultats de laboratoire ne sont donc pas extrapolables au comportement des bactéries *in situ* à la surface des parois de la grotte.

Pour ce qui concerne les champignons, nous avons amplifié la séquence 18S de l'ADN ribosomique et nous avons partiellement séquencé 607 clones, afin d'identifier les phylotypes par comparaison des séquences à celles qui figuraient dans des bases de données. Les dix phylotypes les plus fréquents représentent 59 % des clones isolés

Note de recherche

et correspondent aux espèces *Geosmithia* (= *Penicillium*) *namylslowskii*, *Isaria farinosa*, *Aspergillus versicolor*, *Tolyposcladium cylindrosporium*, *Geomyces pannorum*, *Geosmithia putterillii*, *Engyodontium album*, *Tricholoma saponaceum*, *Kraurogymnocarpa trochleospora* et une *Clavicipitaceae* sp. (Bastian *et al.*, 2009 c).

Parmi ces dix champignons, 8 sont répertoriés comme entomophiles, c'est-à-dire associés à des arthropodes, lesquels sont susceptibles de jouer un rôle important dans leur dissémination. Il est intéressant de noter que les espèces du genre *Geosmithia*, qui représentent 17 des clones identifiés dans la grotte, sont au contraire peu représentées dans d'autres environnements. Les espèces du genre *Geosmithia* sont fréquemment associées à des arthropodes, en particulier à des scolytes présents sous les écorces des arbres. Or la grotte de Lascaux est située, à faible profondeur, sous un couvert forestier de chênes et de pins.

De même, *Isaria farinosa* et *Aspergillus versicolor* sont des espèces parasites d'arthropodes. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse d'un rôle des arthropodes dans la dispersion de ces champignons à l'intérieur de la grotte.

Enfin notons que *F. solani*, qui avait proliféré dans la cavité en 2001, n'a été retrouvé qu'à une très faible fréquence quatre ans plus tard. Il en est de même pour des espèces appartenant aux genres *Chrysosporium*, *Paecilomyces*, et *Trichoderma*, qui avaient été préalablement identifiés comme formant des colonies visibles à la surface des parois de la grotte.

Ces résultats montrent que les communautés bactériennes, comme les communautés fongiques, évoluent au cours du temps et interagissent avec des communautés de protozoaires et/ou d'arthropodes, nous invitant à considérer l'écologie de la grotte dans sa globalité et à évaluer les conséquences des interventions humaines sur l'ensemble des

communautés d'organismes vivant dans la grotte.

4. Identification de deux nouvelles espèces d'*Ochroconis*

Alors que les traitements biocides avaient cessé depuis 2005 et que la présence humaine dans la grotte était strictement limitée, des « taches noires » de nature inconnue sont apparues, puis se sont développées, à partir de 2007, en particulier au niveau du Passage (Figure 1), ce qui avait suscité des traitements biocides à base d'ammoniums quaternaires associés à un fongicide (octylisothiazolinone).

Comme précédemment pour les développements mycéliens « blancs », nous avons d'une part tenté des mises en culture, et d'autre part réalisé de petits prélèvements de substrat afin d'extraire l'ADN et d'identifier le ou les micro-organismes associés à ces taches noires. Nous avons constitué une collection de 29 souches fongiques isolées de taches noires de la grotte.

Ces souches ont été caractérisées au niveau morphologique et au niveau moléculaire (Martin-Sanchez *et al.*, 2012a).

Cinq souches de référence appartenant à différentes espèces des genres *Scolecobasidium* et *Ochroconis*, provenant d'une collection internationale, ont été incluses dans cette étude. Ce sont quatre souches de référence des espèces *O. tshawytschae*, *O. constricta*, *O. humicola* et *S. terreum* choisies en fonction des données bibliographiques disponibles, et une souche de l'espèce *O. anellii* isolée d'une grotte italienne, où elle est à l'origine de « taches noires » sur des stalactites (Graniti, 1962). Ces cinq souches de référence montrent sur le milieu de culture à l'extrait de malt une morphologie similaire, avec cependant de petites différences de couleur, texture et vitesse de croissance.

Note de recherche

4.1. Caractérisation morphologique

Toutes les souches isolées de la grotte de Lascaux forment des colonies de caractéristiques morphologiques similaires (Figure 2). Sur milieu gélosé les colonies sont rases ; elles présentent une surface veloutée ou cotonneuse, se développent lentement et atteignent un diamètre identique. L'observation au microscope optique montre que toutes les souches, à l'exception de la souche LX CH40, ont des caractéristiques similaires (Figure 2 A-D). Les hyphes, sub-hyalines, sont de couleur marron clair. Les conidiophores droits, de forme cylindrique, sont formés d'une ou de plusieurs cellules, de couleur olive clair, de taille comprise entre 12,6-14,4 x 1,8-2,25 µm.

Les conidies sont produites à la partie supérieure du conidiophore. Elles sont de forme cylindrique et présentent deux ou trois cloisons et une base légèrement apiculée. Elles sont de couleur vert olive clair, présentent une surface verruqueuse, et leurs dimensions sont comprises entre 10,2-12,6 x 2,8-4,2 µm. Il n'a pas été observé de chlamydo-spores.

Ces caractéristiques morphologiques permettent d'identifier ces souches comme appartenant au genre *Ochroconis* (de Hoogh et von Arx, 1973 ; de Hoogh, 1985). Morphologiquement les espèces les plus proches décrites dans la bibliographie, sont *O. tshawytschae* (Doty et Slater) (Kirilenko et Al-Achmed, 1977) et *O. anellii* (Graniti) (de Hoog et von Arx, 1973). En revanche, ces espèces présentent des conidies plus longues. Les conidies d'*O. tshawytschae* possèdent généralement trois cloisons et les conidies de *O. anellii* sont plus larges que celles qui sont produites par les souches isolées de Lascaux.

Un isolat (LX CH40) présente des caractéristiques particulières qui permettent de le différencier des autres souches isolées de la grotte de Lascaux. Les conidiophores sont droits ou courbés, généralement simples, mais quelques uns sont ramifiés. Les conidies présentent entre une et quatre cloisons, mais,

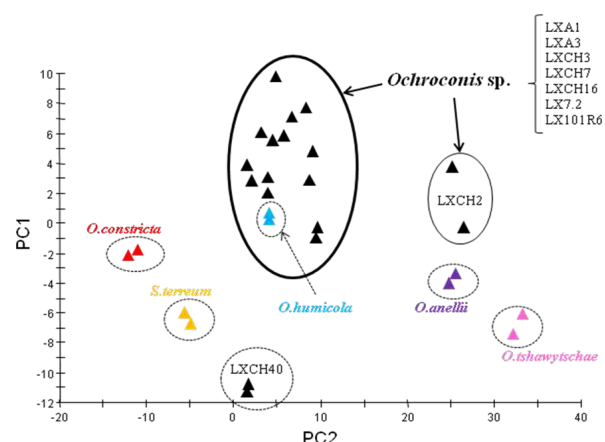


Figure 5. Analyse en composantes principales des profils d'acides gras des isolats d'*Ochroconis* de la grotte de Lascaux et des isolats des espèces de référence.

le plus souvent, seulement une ou deux cloisons et mesurent 7,8 x 2,4 µm. Elles présentent une surface rugueuse reconnaissable en microscopie électronique à balayage (Figure 2 G-H).

Les caractéristiques microscopiques des isolats de la grotte de Lascaux permettent de conclure que nous sommes en présence de deux nouvelles espèces du genre *Ochroconis*, ce qu'ont confirmé les études moléculaires.

4.2. Caractérisation moléculaire

Deux régions variables du génome d'*Ochroconis* sp. ont été étudiées : les régions inter-géniques de l'ADN ribosomique (ITS) et la sous-unité 2 de l'ARN polymérase B (RPB2). Les résultats obtenus ont permis de confirmer l'identification des souches analysées, d'établir leurs relations phylogénétiques avec les espèces de référence et d'apprécier la variabilité qui affecte la population présente dans la grotte de Lascaux.

Les séquences ITS et RPB2 de 28 des 29 souches d'*Ochroconis* sp. isolées de la grotte de Lascaux sont identiques et présentent le

Note de recherche

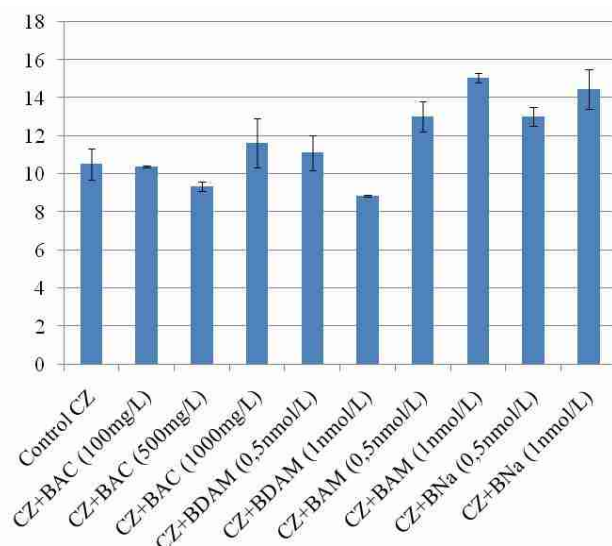


Figure 6. Évaluation de l'utilisation des différents composés testés comme source de carbone pour la croissance d'*Ochroconis lascauxensis*. La biomasse est exprimée en mg de poids sec. Le témoin, milieu CZ, ne contient pas de source de carbone ajoutée. BAC : chlorure de benzyl-diméthyl-alkyl-ammonium ; BDAM : benzyl diméthylamine ; BAM : benzylamine ; et BNa, benzoate de sodium.

plus fort pourcentage d'homologie avec la séquence de l'espèce *O. tshawytschae* (Figures 3 et 4).

Les pourcentages d'homologie avec les souches de référence étant assez faibles, il est possible de conclure que les souches isolées de la grotte appartiennent à deux nouvelles espèces d'*Ochroconis*. La souche la plus fréquemment isolée a été dénommée *O. lascauxensis*, alors que la souche LX CH40 qui se différencie morphologiquement et phylogénétiquement des autres souches d'*Ochroconis* a été dénommée *O. anomala*.

4.3. Caractérisation biochimique et physiologique d'*Ochroconis lascauxensis*

Profil d'acides gras : l'appartenance des isolats

de Lascaux à une nouvelle espèce d'*Ochroconis* a également été confirmée par analyse du profil d'acides gras de plusieurs isolats d'*O. lascauxensis* et des cinq espèces de référence. Les acides gras extraits des cultures fongiques ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse : tous les isolats étudiés présentent quatre types d'acides gras principaux, mais ces quatre types communs aux différents isolats sont présents dans des proportions variables qui semblent caractéristiques de l'espèce considérée.

L'analyse en composantes principales (Figure 5) montre que sept des neuf isolats de la grotte de Lascaux présentent des profils d'acides gras similaires, différents de ceux de quatre des cinq espèces de référence. Les souches LXCH2 et LXCH40 présentent chacune un profil différent des autres souches. Dans le cas particulier de LXCH40, ce résultat conforte l'idée que cet isolat appartient à une nouvelle espèce *O. anomala*.

Tolérance d'*Ochroconis lascauxensis* au chlorure de benzalconium : ayant émis l'hypothèse que les traitements biocides pratiqués antérieurement pouvaient être à l'origine du développement d'*O. lascauxensis*, il était nécessaire d'évaluer la tolérance de ce champignon au chlorure de benzalconium (BC). A cette fin, des suspensions de mycélium ont été ensemencées dans des boîtes de Petri contenant un milieu gélosé enrichi de concentrations croissantes (de 50 à 12 500 mg/L) de BC (Sigma). La croissance a été mesurée après dix jours d'incubation à 22 °C, température optimale de croissance pour ces isolats.

Le BC inhibe la croissance des isolats d'*O. lascauxensis*, mais alors que l'inhibition est totale aux fortes concentrations, elle n'est que partielle aux concentrations les plus faibles : 50 % pour les concentrations de 50 et 100 mg/L, et 75 % pour les concentrations de 250 et 500 mg/L. Les traitements biocides dans la

Note de recherche

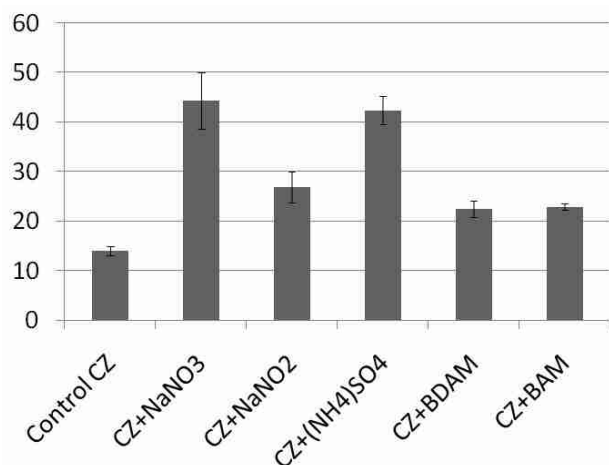


Figure 7. Évaluation de l'utilisation de différents composés comme sources d'azote pour *Ochroconis lascauxensis*. La biomasse est exprimée en mg de poids sec. CZ est le milieu Czapeck sans azote ; BDAM : benzyldiméthylamine ; BAM : benzylamine.

grotte ont été réalisés avec une solution de Devor Mousse à 5 %, correspondant à une concentration de BC comprise entre 5 000 et 12 500 mg/L, concentrations qui ne permettent pas la croissance d'*Ochroconis* dans les conditions de laboratoire.

Cependant, dans la grotte, d'autres facteurs tels que la présence de bactéries capables de dégrader le BC doivent être pris en compte. Des souches de *Pseudomonas* spp. résistantes à de fortes concentrations de BC ont été décrites (Bastian *et al.* 2009a). De plus, du fait des phénomènes d'absorption par les minéraux, la concentration effective de BC, agissant sur les micro-organismes, peut être différente de la concentration de BC appliquée à la surface de la roche.

Enfin, il a été démontré que les micro-organismes constituant des biofilms, comme c'est le cas en surface de la roche, sont plus résistants aux biocides que les micro-organismes en culture pure.

Etude des exigences nutritionnelles d'Ochroconis lascauxensis : afin de déterminer les sources de carbone qu'*Ochroconis lascauxensis* peut métaboliser, nous avons utilisé le système *Biolog* (FF-MicroPlate) qui permet de déterminer la capacité à métaboliser 95 sources de carbone différentes (de la Cruz *et al.*, 2006). Quatre souches de l'espèce *O. lascauxensis*, une souche de l'espèce *O. anomala* et les cinq souches des espèces de référence (*O. tshawytschae*, *O. anellii*, *O. constricta*, *O. humicola* et *S. terreum*) ont été comparées pour leur capacité à utiliser ces différentes sources de carbone.

Les souches de référence des espèces d'*Ochroconis* montrent un comportement similaire : elles peuvent toutes utiliser 49 molécules parmi celles proposés. Les 46 autres sources de carbone sont métabolisées ou non selon l'espèce considérée. L'espèce *O. lascauxensis* se différencie des autres par sa capacité à métaboliser l'acide D-glucuronique ; et l'espèce *O. anomala* est capable d'assimiler l'acide γ -hydroxybutyrique et le L-fucose. Les deux espèces d'*Ochroconis* de Lascaux et *O. tshawytschae* ont en commun la capacité d'utiliser le D-arabinose et l'acide sébacique.

Cette capacité des souches d'*Ochroconis* à utiliser une grande diversité de sources de carbone nous a conduits à envisager leur capacité à utiliser des produits de dégradation du chlorure de benzyl-diméthyl-alkyl-ammonium.

Capacité d'Ochroconis lascauxensis à métaboliser des produits de dégradation des ammoniums quaternaires : les produits de dégradation qui ont été testés sont ceux décrits par Patraucham et Oriel (2003) : benzyldiméthylamine (BDAM), benzylamine (BAM) et acide benzoïque (BA) ; cette dernière molécule, non soluble, a été remplacée par le benzoate de sodium (BNa) soluble dans l'eau.

Note de recherche

Le champignon est cultivé dans un milieu Czapeck liquide sans saccharose (CZ), dans lequel sont apportées les molécules à éprouver (Figure 6). Les produits étudiés sont : le BC aux concentrations de 100, 500 et 1 000 mg/L, qui inhibent 50 à 90 % de la croissance d'*O. lascauxensis* et ses produits de dégradation BDAM, BAM et BN aux concentrations de 0,5-1 mmol/L. Après un mois de culture à 22 °C, la biomasse était récupérée par filtration, puis séchée et pesée, de manière à calculer l'augmentation de biomasse en fonction du traitement.

Comme le montre la Figure 6, les différents traitements contenant BAC et BDAM ne montrent pas de différence significative de biomasse par rapport au témoin, lequel montre une croissance de $10,5 \pm 1,08$ mg, réalisée à partir des réserves accumulées dans le mycélium inoculé.

Toutefois, en présence de BAM et BNa, la biomasse atteinte est légèrement supérieure au témoin ; la croissance détectée avec BAM et BNa (13-15 mg) est donc très faible. Ces résultats démontrent cependant qu'*O. lascauxensis* est capable d'utiliser la benzylamine (BAM) et l'acide benzoïque (BA) comme source de carbone.

Nous avons également montré que *O. lascauxensis* peut utiliser des produits de dégradation du chlorure de benzyl-diméthyl-alkyl-ammonium comme source d'azote. Une souche d'*O. lascauxensis* a été cultivée dans le milieu Czapeck liquide, sans source d'azote (CZ), dans lequel les molécules à tester ont été apportées.

Différentes sources d'azote sont comparées : nitrate de sodium (NaNO_3), nitrite de sodium (NaNO_2) et sulfate d'ammonium ($[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$) ainsi que différents produits de la dégradation du chlorure de benzalconium : la benzyldiméthylamine (BDAM) et la benzylamine (BAM). La concentration des produits a été calculée de manière à apporter la même quantité d'azote (0,32 g/L). Les résultats sont présentés Figure 7.

Ils montrent que les composés étudiés sont utilisés comme source d'azote par *O. lascauxensis*. Les sources de nitrate (NaNO_3) et d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) sont assimilées avec le plus d'efficacité, alors que le nitrite (NaNO_2) permet une croissance similaire à celle des produits de dégradation du chlorure de benzalconium, BDAM et BAM, la biomasse produite est le double de celle observée dans le témoin sans azote ajouté.

Il est donc permis de conclure que *O. lascauxensis* peut assimiler certains produits de dégradation du chlorure de benzalconium, à la fois comme source de carbone et comme source d'azote. Ces résultats corroborent l'hypothèse selon laquelle les traitements biocides intensifs auxquels la grotte a été soumise ont favorisé le développement de ce champignon.

En effet, à la surface des substrats rocheux ou argileux, les champignons sont présents sous forme de biofilms associés à des bactéries, parmi lesquelles des espèces du genre *Pseudomonas* capables de survivre à de fortes concentrations en BAC (Nagai *et al.*, 1996).

Nous avons isolé de la grotte de Lascaux plusieurs espèces de *Pseudomonas* (*P. brenneri*, *P. chlororaphis*, *P. poae*, *P. fluorescens* et *P. reactans*) capables de se développer à des concentrations élevées de *Devor Mousse* (5 ml/L), ce qui est équivalent à 5 000 – 12 500 mg/L de BAC (Bastian *et al.*, 2009a).

Sur la base de nos résultats et de ceux de la littérature, il est permis de conclure que les fortes concentrations en BAC auxquelles la grotte a été soumise pendant plusieurs années ont provoqué une sélection des espèces de *Pseudomonas* résistantes à ce produit, qui sont capables de dégrader ces composants et de former des produits de dégradation susceptibles d'être utilisés par les bactéries et par certains champignons, dont *Ochroconis*, comme sources de carbone et d'azote.

Note de recherche

5. Autres communautés microbiennes associées aux taches noires

Bien que les isolaments microbiens effectués à partir de taches noires aient permis de révéler la présence de deux nouvelles espèces d'*Ochroconis*, ces dernières ne sont pas les seules à être associées aux taches noires. L'emploi de l'électrophorèse en gradient de gel dénaturant (DGGE), largement utilisée pour caractériser les communautés de bactéries et de champignons dans des échantillons naturels d'origines diverses, a permis de révéler d'autres champignons, présents à la surface des substrats présentant ces taches noires. Deux échantillons de taches noires récoltés en août 2008 et deux échantillons de sédiments prélevés dans les mêmes zones en février 2009, après les interventions de nettoyage mécanique et d'application de biocides, ont été analysés selon la méthode décrite précédemment.

Dans les échantillons de taches, avant traitement, le champignon le plus représenté est *O. lascauxensis*, mais, après les traitements, bien qu'*O. lascauxensis* soit toujours détecté, les champignons majoritaires appartiennent aux genres *Alternaria*, *Gymnascella*, *Cladosporium* et *Aspergillus*. Ces champignons ayant également été détectés dans l'air de la grotte il est permis de conclure qu'après nettoyage et application de biocide, les sédiments et les roches sont rapidement colonisés par des champignons présents dans l'air de la grotte.

Le suivi de l'évolution des communautés fongiques au cours du temps a montré que les populations de champignons de chaque zone de prélèvements apparaissent stables au cours de l'année. Cependant certains prélèvements révèlent la présence, dans les taches noires, d'autres champignons et, en particulier, de « levures noires » appartenant aux genres *Exophiala* et *Cladophialophora*. Afin d'approfondir l'étude de ces micro-organismes et de mettre en lumière leur rôle dans la

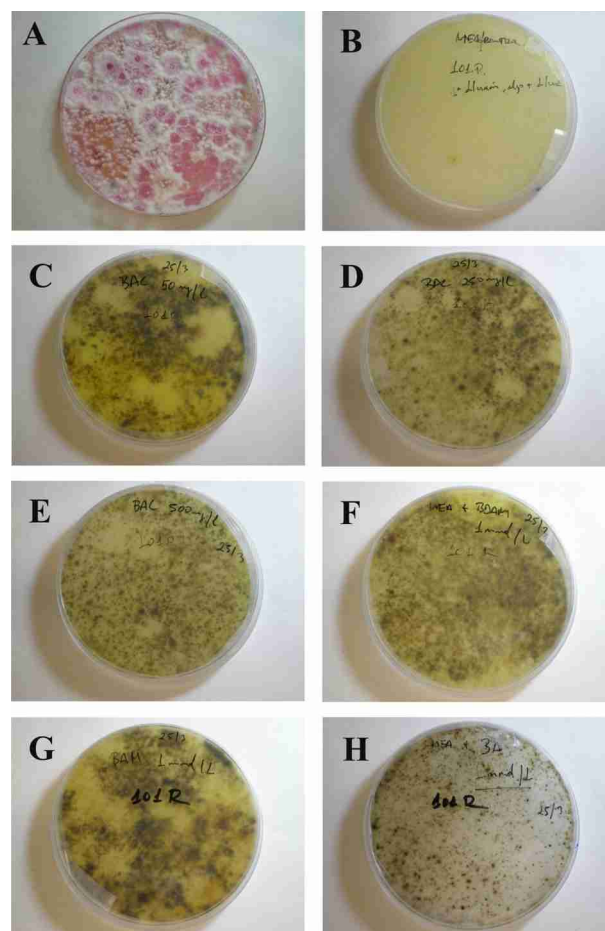


Figure 8. Boîtes de Petri inoculées avec une suspension de champignons isolés d'une tache noire après un mois d'incubation à 22°C. Milieux de culture : DRBCA (A), MEA (B), et MEA additionné de : chlorure de benzalconium (BAC) 50 mg/L (C), 250 mg/L (D) et 500 mg/L (E) ; benzyl diméthylamine (BDAM), 1 mmol/L (F) ; benzylamine (BAM), 1 mmol/L (G) ; acide benzoïque (BA), 1 mmol/L (H).

formation des taches noires, nous avons appliqué la technique DGGE à l'ARN extrait des échantillons.

Alors que l'analyse de l'ADN permet d'identifier les champignons majoritaires, qu'ils soient métaboliquement actifs ou non, l'analyse des ARN révèle uniquement les

Note de recherche

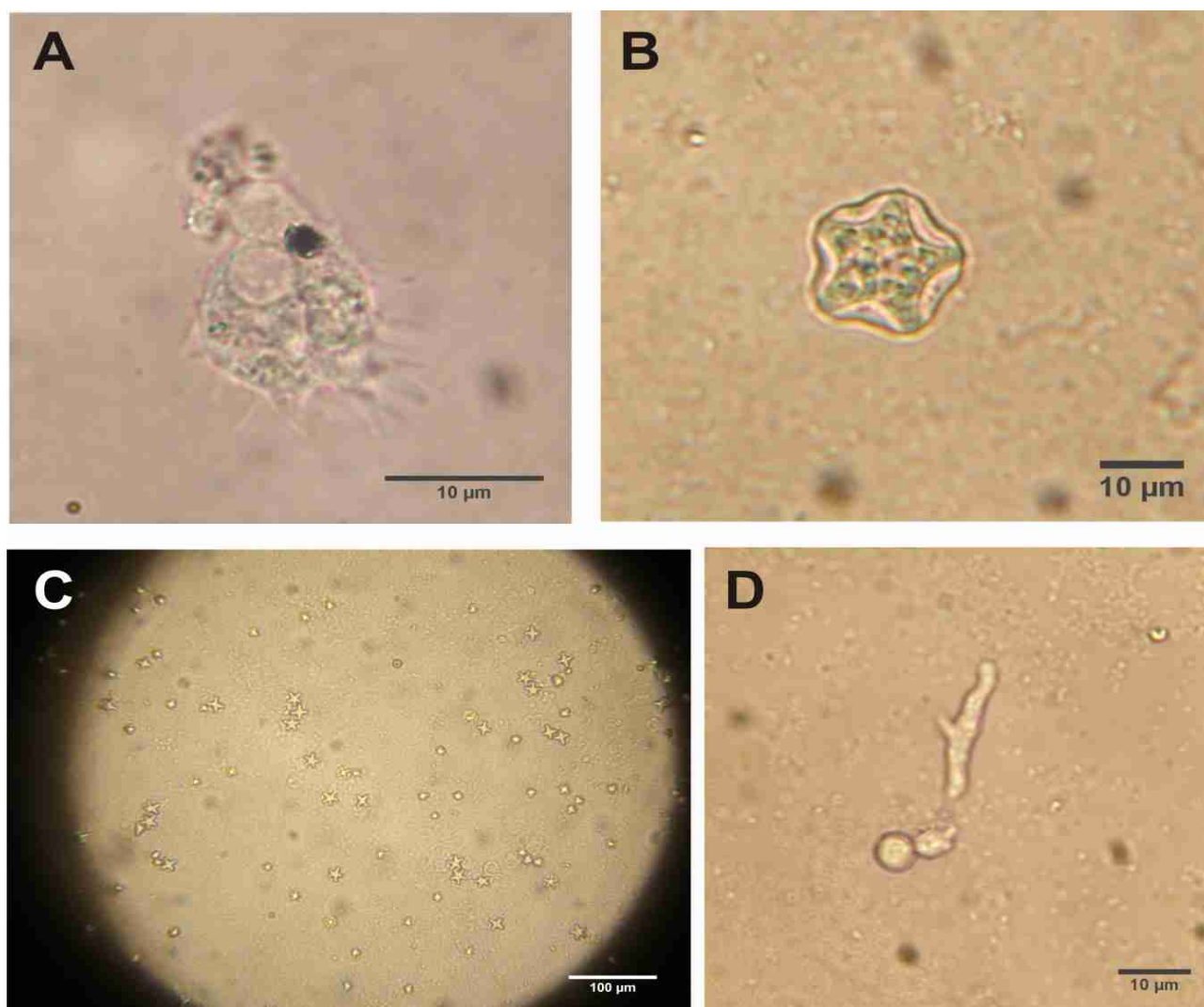


Figure 9. A. Trophozoïte d'*Acanthamoeba astronyxis* avec pseudopodes. B. Kyste à 5 branches d'*Acanthamoeba astronyxis*. C. Kystes d'*Acanthamoeba astronyxis* en surface du milieu de culture dans une boîte de Petri. D. Trophozoïtes et kystes de *Hartmannella vermiforme*.

populations de champignons métaboliquement actifs. Les résultats montrent que les échantillons analysés comportent des levures noires et des souches d'*Acremonium/Gliocladium* sp métaboliquement actives (Martin-Sanchez *et al.*, 2012b).

Ces champignons avaient fréquemment été isolés à partir de taches noires, mais nous ne

leur avons pas prêté attention, car, sur les milieux de culture classiquement utilisés, ils forment des colonies blanches. En revanche, sur d'autres milieux, ces champignons forment des colonies mélanisées dès les premiers jours de culture et prennent une couleur vert gris caractéristique (Figure 8).

Dans tous les échantillons prélevés, *Mortierella alpina*, *F. solani*, *Doratomyces* sp.

Note de recherche



Figure 10. Tache noire de l'Abside (Figure 1), montrant de nombreux individus de *Folsomia candida*.

et *I. farinosa* sont également isolés de manière récurrente. La coloration des hyphes, révélée sur certains milieux de culture, peut s'expliquer *in situ* par l'action des biocides.

6. Rôle des biocides dans la mélanisation des micro-organismes

Une observation réalisée au cours de ce travail nous a permis de montrer indirectement le rôle des biocides dans la formation de mélanine. Une suspension réalisée à partir d'une tache noire récoltée dans le Passage (Figure 1) en février 2010 a servi à ensemercer différents

milieux de culture, sans biocides ou enrichis avec les produits de dégradation du chlorure de benzalconium. Après un mois d'incubation à 22 °C, les champignons cultivés sur milieu enrichi avec du chlorure de benzalconium, de la benzyldiméthylamine, de la benzylamine et de l'acide benzoïque (Figure 8 C-H) montraient une mélanisation importante, alors que les champignons cultivés en absence de ces composants ne présentaient pas de mélanine (Figure 8 A, B).

Dans la littérature les études portant sur les processus de mélanisation chez les micro-organismes sont très anciennes et décrivent la production de mélanine par *Azotobacter*

Note de recherche

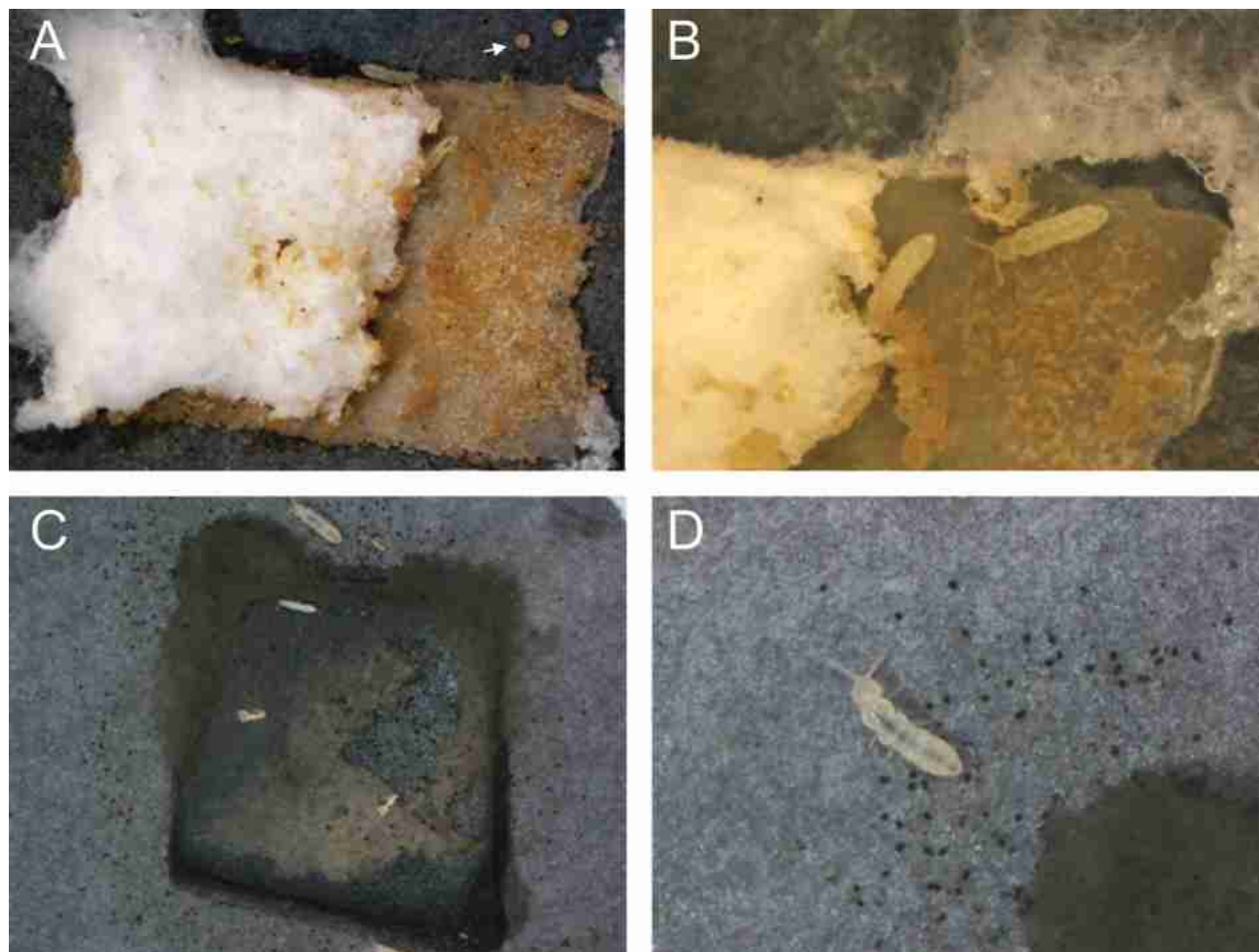


Figure 11. Individus de *Folsomia candida* s'alimentant sur des colonies des deux principaux champignons observés à Lascaux. Dans une culture de *Fusarium solani*, des œufs sont visibles (A et B). Sur une culture d'*Ochroconis* sp. dans un microcosme de sédiment de la grotte (C et D). On observe la dispersion des excréments des collemboles et le tractus digestif noirci par la consommation de mélanine du champignon.

chroococcum en présence de benzoate de sodium (Hardisson et Pochon, 1966 ; Thompson, 1989).

Les résultats que nous avons acquis suggèrent que la prolifération des taches noires et des micro-organismes capables de les produire sont directement en relation avec la présence des produits de dégradation du chlorure de benzalconium, qui favorise la croissance de ces micro-organismes

producteurs de mélanine et/ou induit le processus de mélanisation.

7. Interactions entre la microflore et la microfaune de la grotte de Lascaux

7.1. Interactions bactéries/protozoaires

L'analyse de la flore bactérienne (Bastian et al., 2009b) ayant montré que 45 % des 696

Note de recherche

clones bactériens obtenus correspondaient à des phylotypes incluant des bactéries pathogènes, nous avons cherché à identifier les protozoaires présents dans les sédiments prélevés dans les divers compartiments de la grotte. Toutes les 36-48 heures, les échantillons mis en culture à partir des prélèvements étaient examinés pour observer la croissance d'amibes grâce à un microscope inversé. L'identification des espèces d'amibes était fondée sur l'observation des différentes phases du cycle biologique de chaque espèce : les "trophozoïtes" correspondant à la phase végétative et les kystes correspondant à la phase de résistance.

Les observations directes ont permis l'identification des genres *Acanthamoeba* et *Hartmannella*. *Acanthamoeba* sp. est facilement identifiable, par ses caractéristiques morphologiques. Les trophozoïtes de 25-15 µm de long et de 15-9 µm de diamètre produisent des pseudopodes fins, parfois bifurqués, dont l'extrémité est arrondie ou pointue (Figure 9). Les trophozoïtes possèdent un seul noyau, de diamètre 4 µm et une membrane nucléaire bien délimitée. Les kystes possèdent une double paroi, qui sépare l'exocyste de l'endocyste. L'endocyste présente une forme caractéristique d'étoile. Le nombre de branches oscille entre trois et six (Figure 9, B et C).

Les trophozoïtes d'*Hartmannella vermiformis* sont monopodiaux, avec une forme allongée et cylindrique (Figure 9) de taille moyenne 10,3 µm de longueur et 2,48 de diamètre, avec très peu de variabilité entre individus. Les kystes de cette amibe sont peu caractéristiques. Ils ont une forme circulaire ou légèrement ovoïde et possèdent une paroi lisse.

La présence simultanée de *Legionella* spp., *Afipia* spp. et *Aquicella* spp. dans quelques-unes des salles de la grotte (Bastian *et al.*, 2009b), et l'identification d'*A. astronyxis*, *A. castellanii* et *H. vermiformis*, montrent l'étroite relation existant entre les pathogènes bactériens et les amibes libres de la grotte de Lascaux. En effet, de nombreuses espèces de

protozoaires hébergent de manière intracellulaire des bactéries pathogènes ; il a, en particulier, été montré que *A. castellanii* constitue une niche intracellulaire dans laquelle des souches de *Legionella* spp. peuvent proliférer.

7.2. Interactions champignons/collemboles

Après l'arrêt des traitements biocides, nous avons détecté le collembole *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) à proximité des taches noires (Figure 10).

Folsomia candida est un collembole cosmopolite, opportuniste ; il a un comportement cavernicole facultatif, qui, normalement, accomplit la totalité de son cycle dans les grottes, mais qui n'est pas strictement confiné à cet habitat.

Le collembole *F. candida* et les deux champignons les plus représentatifs de Lascaux (*F. solani* et *O. lascauxensis*) ont été utilisés pour étudier les relations entre cet arthropode et les champignons.

Placés en boîte de Petri en présence d'une culture de *F. solani* ou d'une culture d'*O. lascauxensis*, déposée sur des sédiments de la grotte, les individus de *F. candida* se nourrissent aux dépens des hyphes de *F. solani* et d'*O. lascauxensis* (Figure 11). De plus, ce collembole contribue à l'extension et à la dissémination des taches noires.

En effet, les pelotes fécales contiennent des conidies qui sont capables de germer lorsqu'elles sont déposées sur une surface humide.

Dans la grotte, la forte densité de collemboles est à l'origine d'une accumulation de pelotes fécales qui contribuent à l'extension des « taches noires ». Cette dispersion de proximité est observable sur la Figure 11.

L'ensemble de ces observations concordent avec les données publiées précédemment, Greif et Currah (2007) ayant notamment isolé, à partir de collemboles, des souches appartenant aux genres fongiques :

Note de recherche

Acremonium, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Cryptendoxyla*, *Geomyces*, *Gliocladium*, *Hormiactis*, *Leptographium*, *Oidiodendron*, *Penicillium* and *Verticillium*. La dissémination des taches noires serait donc associée à l'activité des collemboles.

8. Discussion

La grotte de Lascaux, contrairement à d'autres grottes, ne peut plus être assimilée à un écosystème oligotrophe. Les événements qu'elle a connus au cours des dernières 70 années l'ont transformée en un écosystème relativement riche en matière organique, favorable au développement des micro-organismes. Les résultats rapportés ici ont été choisis pour illustrer la complexité de cet écosystème souterrain particulier et pour montrer comment des erreurs graves peuvent être commises lorsque, de bonne foi, on ne se focalise que sur un micro-organisme à l'origine d'un dégât apparent.

La méthode de traitement choisie pour endiguer la prolifération d'un champignon a perturbé l'ensemble de l'écosystème, entraînant de nouveaux désordres et la prolifération de micro-organismes qui préexistaient mais qui ont bénéficié d'un avantage compétitif décisif lié à leur plus grande résistance aux biocides utilisés et à leur capacité à en assimiler les produits de dégradation. Ces résultats montrent aussi comment les produits biocides utilisés révèlent certaines capacités métaboliques des micro-organismes. Ainsi des champignons que le mycologue classe dans les champignons à thalle hyalin produisent des mélanines en réponse à la présence de biocides et présentent alors des hyphes et des colonies mélanisées plus résistantes aux conditions défavorables à leur survie.

Ces résultats illustrent aussi la nécessité de ne pas opposer techniques « classiques » et techniques moléculaires, mais de les associer pour mieux disséquer les interactions

microbiennes dans un écosystème complexe. Juste évoqués ici, les résultats acquis avec la technique DGGE appliquée, d'une part à l'ADN et d'autre part à l'ARN ont permis de faire la part entre les micro-organismes présents (ADN) et les micro-organismes métaboliquement actifs (ARN) et ainsi de détecter l'évolution affectant les communautés de champignons associés aux taches noires. D'autres résultats n'ont pas été présentés ici. Ils concernent la mise au point d'outils permettant la détection et la quantification spécifique de certains micro-organismes d'intérêt comme les *Ochroconis* dans des échantillons de substrat et dans l'air de la cavité (Alabouvette et Saiz-Jimenez, 2011). Ces outils ont permis d'initier l'étude de l'aérocontamination de la grotte et de suivre la dynamique des populations de champignons et de bactéries associés aux taches noires. Comme signalé en avant-propos, notre travail s'est interrompu en 2011, une nouvelle équipe ayant été choisie pour mettre en œuvre le programme de recherche élaboré à partir des résultats déjà acquis. Ce programme visait à compléter l'inventaire des communautés de micro-organismes de protozoaires et de microarthropodes présents dans la grotte en faisant appel aux méthodes de métagénomique et tenter de corréler les variations dans l'abondance et la composition des communautés bactériennes et fongiques détectées dans l'air de la grotte, en fonction des saisons, avec des paramètres micro-climatiques. Quant à la conservation de la grotte et de ses peintures rupestres, nous pensons qu'elle doit être préventive et qu'il convient de s'abstenir de tout traitement qui aurait pour conséquence de l'enrichir en matière organique propice au développement des micro-organismes.

Références

Alabouvette C., Saiz-Jimenez C. 2011. *Ecologie microbienne de la grotte de*

Note de recherche

- Lascaux, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla 118 pp. ISBN : 978-84-694-7852-3.
- Abdelahad N., Bazzichelli G. 1988. *Geitleria calcarea* Friedmann, Cyanophyceae cavernicole nouvelle pour l'Italie, *Nova Hedwigia*, 46, 265-270.
- Aboal M, Asencio AD, Prefasi M. 1994. Studies on cave cyanophytes from southeastern Spain: *Scytonema julianum* (Meneghini ex Franck) Richter, *Algological Studies*, 75, 31-36.
- Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C. 2009a. Impact of biocide treatments on the bacterial communities of the Lascaux Cave, *Naturwissenschaften*, 96, 863-868.
- Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C. 2009b. Bacteria and free-living amoeba in Lascaux Cave, *Research in Microbiology*, 160, 38-40.
- Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C. 2009c. The impact of arthropods on fungal community structure in Lascaux Cave, *Journal of Applied Microbiology*, 106, 1456-1462.
- De la Cruz TEE, Schulz BE, Kubicek CP, Druzhinina IS. 2006. Carbon source utilization by the marine *Dendryphiella* species *D. arenaria* and *D. salina*, *FEMS Microbiology Ecology*, 58, 343-353.
- Dupont J, Jacquet C, Denetiere B, Lacoste S., Bousta F, Oriol G, Cruaud C. Couloux A, Roquebert MF. 2007. Invasion of the French paleolithic painted cave of Lascaux by members of the *Fusarium solani* species complex. *Mycologia*, 99, 526-533.
- Graniti A. 1962. *Scolecobasidium anellii* n. sp., agente di annerimenti superficiali di stalattiti, *Giornale Botanico Italiano*, 69, 360-365.
- Greif MD, Currah RS. 2007. Patterns in the occurrence of saprophytic fungi carried by arthropods caught in traps baited with rotted wood and dung, *Mycologia*, 99, 7-19.
- Hardisson C, Pochon J. 1966. Synthèse de substances para-humiques par *Azotobacter chroococcum*. I. Conditions de culture et extraction de la substance, *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)*, 111, 66-75.
- Hernandez-Marine M, Canals T. 1994. *Herpyzonema pulverulentum* (Mastigocladaceae) a new cavernicolous atmophytic and lime-incrusted cyanophyte, *Algological Studies*, 75, 123-136.
- Hoog GS de, Arx JA von. 1973. Revision of *Scolecobasidium* and *Pleurophragmium*, *Kavaka* 1, 55-60.
- Hoog G.S. de. 1985. Taxonomy of the *Dactylaria* complex, IV. *Dactylaria*, *Neta*, *Subilispora*, and *Scolecobasidium*, *Studies in Mycology*, 26, 1-60.
- Kirilenko TC, Al-Achmed MA. 1977. *Ochroconis tshawytschae*, *Mikrobiologichnyi Zhurnal*, 39, 305.
- Lefèvre M. 1974. La maladie verte de Lascaux, *Studies in Conservation*, 19, 126-156.
- Martin-Sanchez PM, Novákova A, Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C. 2012a. Two new species of the genus *Ochroconis*, *O. lascauxensis* and *O. anomala* isolated from black stains in Lascaux Cave, France, *Fungal Biology*, 116, 574-589.
- Martin-Sanchez PM, Novákova A, Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C. 2012b. The use of biocides for the control of fungal outbreaks in subterranean environments: the case of the Lascaux Cave in France,

Note de recherche

Environmental Science and Technology, 46, 3762-3770.

Nagai K, Ohta S, Zenda H, Matsumoto H, Makino M. 1996. Biochemical characterization of a *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from a benzalkonium chloride solution, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19, 873-875.

Patrauchan MA, Oriel PJ. 2003. Degradation of benzyldimethylalkylammonium chloride by *Aeromonas hydrophila* sp. K, *Journal of Applied Microbiology*, 94, 266-272.

Rutherford JM, Huang LH. 1994. A study of fungi of remote sediments in West Virginia caves and a comparison with reported species in literature, *National Speleological Society Bulletin*, 56, 38-45.

Schabereiter-Gurtner C, Saiz-Jimenez C, Piñar G, Lubitz R, Rölleke C. 2002. Altamira cave paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities, *FEMS Microbiology Letters*, 211, 7-11.

Thompson, JP. 1989. Counting viable *Azotobacter chroococcum* in vertisols. II. Comparison of media, *Plant and Soil*, 117, 17-29.

Wimpenny, J, Manz W, Szewzyk U. 2000. Heterogeneity in biofilms, *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 661-671.

Édité par :

Nadine Vivier, membre de l'Académie d'agriculture de France.

Hervé This, directeur du Centre International de gastronomie moléculaire AgroParisTech-Inra, membre de l'Académie d'agriculture de France.

Rapporteurs :

1. Françoise Joset, professeur honoraire de

génétique procaryote et microbiologie –
Université Aix-Marseille
2. n.d.

Rubrique :

Cet article a été publié dans la rubrique « Notes de recherche » des *Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France*.

Reçu :

30 mai 2016

Accepté :

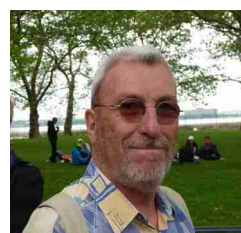
26 août 2016

Publié :

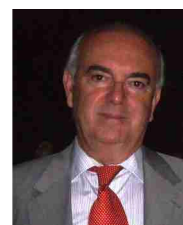
5 septembre 2016

Citation:

Alabouvette C. et Saiz-Jimenez C. 2016. *Ecologie microbienne de la grotte de Lascaux* *Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture (N3AF)*, 2(5), 1-21. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a372706>.



Claude Alabouvette est membre correspondant de l'Académie d'agriculture de France.



Cesaero Saiz-Jimenez est Research Professor au Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Documents didactiques

Methodological advances in scientific publication

Hervé This^{1,2}

¹ UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, Inrae, Université Paris-Saclay, 91300 Massy, France

² Groupe de gastronomie moléculaire, Inrae-AgroParisTech International Centre for Molecular Gastronomy, F-75005, Paris, France

Correspondance :

herve.this@agroparistech.fr

Résumé :

Un article où Antoine Laurent de Lavoisier présente ses résultats sur la confection des bouillons de viande est l'occasion de mieux voir les progrès méthodologiques effectués en communication scientifique par les sciences de la nature. C'est également l'occasion de discuter la question de "bonnes pratiques scientifiques".

Abstract:

An article in which Antoine Laurent de Lavoisier discussed his results on the making of meat broth is an opportunity for evaluating the methodological advances proposed for the communication of research results in the past centuries by sciences of nature. It is also the possibility to discuss the issue of "best practices" in science communication.

Keywords:

method, best practice, natural sciences, history, publication

Mots clefs :

méthode, bonnes pratiques, sciences de la nature, histoire, publication

Introduction

In this article, we focus on a text (Lavoisier, 1783) published by Antoine Laurent de Lavoisier (1743-1794), the father of modern chemistry (Gillispie, 1970; Crosland, 1978), who was (among other honors) a member of what became the Académie d'agriculture de France (Académie d'agriculture de France, 2016). The goal of our article is certainly not to criticize Lavoisier or the scientific work that he describes, because he did more than his contemporaries, being able to extend the realm of knowledge more than others did at his time. Indeed we use his publication for two reasons: firstly it is a way to better appreciate the methodological advances in the communication of the results of natural

Documents didactiques

sciences; and secondly this analysis gives the opportunity to admire the contribution of Lavoisier to the study of aqueous solutions obtained by the thermal processing of animal tissues in water ("meat broth").

More precisely, aiming at better understanding the rules of best practices in science communication (This, 2015), we shall discuss less the scientific results than the way Lavoisier communicated them, at a time when there was no "Guide to authors" given by scientific journals. We have the feeling that such a discussion can be useful for science education, showing how the scientific communication methods have been improving since two centuries. Seldom was the idea that we are dwarfs on the shoulders of giants more appropriate than here.

The *Memoir* and its commentaries

In all this text, the excerpts by Lavoisier (shortened L.) are in italics, in boxes that separate the original article from commentaries, in roman. These commentaries are restricted to the methodological issues, but sometimes they give information in order to appreciate the scientific question discussed by L. The original text of L. is translated personally, and the original French text is given in footnotes.

*Memoir on the strength that meat broth should have, on their specific weight and the quantity of gelatinous matter that they contain.*¹

This article was published in November 1783 (Lavoisier, 1783). At that time, L. was 40 years old. He was already a full member of the French Royal Academy of Sciences and "fermier général" (tax collector). On the painting

¹ *Mémoire sur le degré de force que doit avoir un bouillon, sur sa pesanteur spécifique et sur la quantité de matière gélatineuse solide qu'il contient*

by the French painter Jacques-Louis David (Figure 1), he appears with his wife Marie-Anne Pierrette (born Paulze), who participated to his scientific works (Poirier, 1993).



Figure 1. Antoine Laurent de Lavoisier and his wife, painted by Jacques Louis David.

Concerning the title of the article, one can observe that it is a good practice to use previously defined words. As a consequence, today's reviewers have a duty to check that no ambiguous word or expression remains in the manuscript: their remarks help the authors to improve their text, and sometimes even their work, making complementary experiments, validations, etc.

In this regard, "broth" could either be "the aqueous solution obtained by thermal processing of muscular tissues of animals", or a solution obtained from both muscular tissues and bones. It will be shown later in the memoir that the first option holds. As well, "meat" is

Documents didactiques

more precisely defined as “muscular tissue”, and even more precisely the tissue from *Bos taurus*. Later in this article, we shall use “meat broth” for “aqueous solution obtained by the thermal treatment of muscular tissue of *Bos taurus*”.

Moreover today “density” would be used instead of “specific weight”, as the International System of Units should be used (IUPAC, 2016), in part due to efforts of L. shortly after the French Revolution (“metric system”).

The Royal Society of Medicine was consulted by the Secretary of Navy about the diet that patients should have in hospitals, and it appeared, in many discussions about this question, that we were lacking precise information on the nature of the broth that is given to patients, on the proportion of water and meat that should be used for making such broth, on the quantity of gelatinous or extractive matter that they contain, on the differences that are due to the different qualities of meat, on the degree of concentration that the broth should have depending on the various states of sickness, and finally how the quality of broth can be recognized.²

The Royal Society of Medicine was the equivalent of the current National Academy of

² *La Société royale de médecine ayant été consultée, par le ministre de la Marine, sur le régime qu'on doit faire observer aux malades dans les hôpitaux, s'est aperçue, dans les conférences nombreuses qui ont été tenues à cet effet, qu'on n'avait pas de connaissance assez précise sur la nature du bouillon qu'on donne aux malades, sur la proportion d'eau et de viande nécessaire pour le composer, sur la quantité de matière gélatineuse ou extractive qu'il contient, sur les différences qu'apportent dans sa qualité les différentes espèces de viandes ; sur le degré de force que doit avoir le bouillon, suivant les différents états de maladie ou de convalescence ; enfin, sur les caractères au moyen desquels on peut reconnaître sa qualité.*

Medicine (Lavoisier, 1789), of which L. was also a member. It can be observed with L. first paragraph that at the time of L., very few references were given in scientific articles. Today, any proposal, any idea, any fact, any information have to be justified by literature references or by experimental data, along with information on how these experimental data were produced (ESF, 2000).

Finally, concerning the work on broth, the question proposed in this introduction is simple only in appearance (This and Bram, 1998): L. wanted to explore the proportion of water and muscular tissue that one “should” use in order to make meat broth. What does “should” mean? It was precisely the question asked by the ministry: how to define the diet.

Indeed meat broth is a traditional preparation of great importance for ancient diets: recipes for broths were generally given at the very beginning of culinary books (Passiranus, 1497; La Varenne, 1651; Menon, 1756; Carême and Plumerey, 1705) and they were considered as very important for invalids or people recovering from disease.

However a special care is needed about expressions such as “one should”, “it is convenient”, “it is necessary”, or “one has to”. From a technical point of view, meat broths can be obtained from any proportion of muscular tissue and water, but it is true that strongly diluted broth would not be “convenient” for human health, because they would lead to overconsumption of water, if enough nutrients are to be obtained. Anyway reading carefully L.'s article shows that the text refers implicitly to a sensory standard. Such a standard is not easy to define, as food cultures are diverse, and sensory appreciations depend on culture, as well as physiology (William, 2006).

Moreover L. immediately makes a link between this “necessary proportion” and a quantity of “gelatinous or extractive matter”. We know today that it is true that, during broth making, the muscular tissue (sometimes along

Documents didactiques

with bones, for stocks) is releasing in water various mineral and organic compounds, some of which being responsible for broth gelling after cooling (Lémercy, 1705; Wandsnider, 1997).

More precisely, in muscular samples, collagen tissue is around individual muscular fibers as well as grouping individual fibers in bundles and super-bundles (epimysium, perimysium, endomysium). It is now known that collagen tissue is made from the protein collagen, i.e. trimers of polypeptide chains (Girard, 1998). During thermal treatments, the collagen tissue is disrupted, and collagen is dissociated and partially hydrolyzed, forming peptides of various lengths from one free amino acid to very long chains (Listrat and Hocquette, 2004). The material obtained by purification and drying is called "gelatin", but one can see that this word is ambiguous, because it describes various products, depending on the purification processes that are performed during production.

When the temperature of a solution of gelatin or of a broth (containing gelatin as well as many other compounds extracted from meat) is reduced, the dissolved polymers can re-associate by their ends (Djabourov, 1986), forming a three dimensional network to which water is bound (IUPAC, 2015). There are different kinds of gels but gelatin gels have a DSF ("disperse system formulism) formula (This, 2013) defined as SxW , where S stands for the solid network, W for the aqueous solution, and the symbol "x" describes the intermixing of two continuous phases.

For the sake of the current discussion, let's say that gelatin is not the sole matter extracted from meat (Wright, 1910; Maikhuntod, 2005). Peptides and amino acids formed from collagen (Rogalinski et al., 2005) are "extracted" as well, but they are not "gelatinous" in the meaning of being able to contribute to the gel formation (Chemguide, 2015). Moreover other organic and minerals compounds move from the muscular tissue to the solution, so that one

should distinguish "extracted matter" and "gelatinous matter". Also one should make a difference between the extractable matter, i.e. the total content of compounds that could be extracted from the muscular tissue (and dissolve in water or evaporate) when the thermal treatments are longer than those that are practiced by the chefs (some hours) (Carême, 1705), and the extracted matter, which is indeed extracted (a fraction of the previous one). Of course, L. could not know all this, because chemistry at that time ignored molecules, proteins, amino acids, etc. (Jacques, 1987)

One cannot avoid being surprised, each time one thinks of the most familiar objects, of the most trivial things, to see how our ideas are often vague and uncertain, and how, as a consequence, it is important to fix them by experiments and by facts.³

This sentence is particularly important, as it states correctly that scientists have to avoid vague discourses. Sciences advance through unambiguous descriptions, experiments, measurements and precise determinations, including other tasks (This, 2009).

In 1730, M. Geoffroy communicated to the Academy of Sciences his results on the same topic, but as his goal was different from mine, we did not use the same methods, and we cannot compare the results. This chemist wanted to know, using chemical analysis, the nature of nourishing substances, either animal or from plants. In the experiments he did on meat, he boiled them successively in

³ *On ne peut s'empêcher d'être surpris, toutes les fois qu'on s'interroge soi-même sur les objets qui nous sont les plus familiers, sur les choses les plus triviales, de voir combien nos idées sont souvent vagues et incertaines, et combien, par conséquent, il est important de les fixer par des expériences et par des faits.*

Documents didactiques

*many solutions, starting each time from pure water, until the meat did not release any matter. He then evaporated the water from all the solutions, and obtained separately all the gelatinous and extractive matter that was contained initially in meat.*⁴

Again modern scientific journals would include references for the various sentences. In particular, the reference to the work of M. Geoffroy would be useful, as this missing information makes it difficult today to know who exactly "M. Geoffroy" was. It could have been Etienne François Geoffroy, also called Geoffroy l'Ainé (Paris, 1672-1731), or Claude Joseph Geoffroy, called Geoffroy le Cadet (Paris, 8 août 1685 – Paris, 9 mars 1752), or his son Claude François Geoffroy (1728-1753), who succeeded him and was elected to the Academy of Sciences in 1752 (Geoffroy, 1733). Historical research is needed to know that L. refers to Geoffroy le Cadet (This and Bram, 1998). Finally let's observe that L. makes correctly a difference between science and technology: natural sciences are looking for the mechanisms of phenomena (This, 2009), whereas technology aims at improving technique.

L. explains well that his study is of

4 M. Geoffroy a communiqué à l'Académie des sciences, en 1730, un travail sur le même objet ; mais, comme son but était différent du mien, nous ne nous sommes rencontrés ni dans les moyens, ni dans les résultats. L'objet de ce chimiste était de connaître, par l'analyse chimique, la nature des différentes substances nourissantes, soit animales, soit végétales ; en conséquence, dans les expériences qu'il a faites sur les chairs des animaux, il les a successivement fait bouillir dans un grand nombre d'eaux différentes, qu'il renouvelait jusqu'à ce que la viande fût entièrement épuisée de toute matière extractive ; alors il faisait évaporer toute l'eau qui avait passé sur la viande, et il obtenait ainsi séparément toute la parties gélatineuse et extractive qu'elle contenait.

technological nature: the question is to produce broth, and to improve broth production. He is not interested in this article in the composition of meat, but only in the techniques implemented in broth production. Anyway it can be observed that his results could have been improved when he had made a difference between the content in "gelatinous and extractive matter" and when he had explored the duration of the thermal process, as proteins hydrolysis increases the quantity of the "part given to water". Today, we would observe that such differences can be made more easily if adjectives and adverb ("slow", "long"...) were replaced by the answer to the question "how much?". This sole observation shows not only how scientific communication improved, but also how scientific research evolved, when the true nature of science was more clearly defined (This, 2009).

*In order to get some information on the most convenient proportion of meat and water, according various cases, I produced broths changing the doses, from 4 onces per pound of water [4. 30.59375000 = 122.3750000 g], up to one pound of water per pound of meat.*⁶

Here, in the original text, a calculation is added between brackets: in our own text, the eighteenth century units were translated into modern units (g). The results of calculation are in brackets, and the number of digits given is

5 Mon objet, au contraire, était d'acquérir des connaissances purement pratiques et de déterminer, non ce que la viande contient de substance gélatineuse et extractive, mais ce qu'elle peut en communiquer, par une ébullition lente et longtemps continuée, à une quantité donnée d'eau.

6 Pour acquérir d'abord des connaissances sur la proportion de viande et d'eau la plus convenable suivant les différents cas, j'ai fait différents bouillons en variant les doses, depuis 4 onces par livre d'eau jusqu'à livre pour livre.

Documents didactiques

always (arbitrarily) chosen to be 10, because there is no way to determine how much it is really, from the original text. Accordingly one should not consider that the figures given are significant, as it is the modern rule.

In order to translate the units, official data are used (Métrologie française, 2016) as well as intern validations (the French rule is not followed, however, concerning the use of commas and dots; instead the English rule is applied for separating the integer part and decimal digits): later in the text, it is explained that 0.5 "livres" (the English word could be "pound", but the word "livre" will be kept because it is not the same as the current English pound) corresponds to 8 "onces". The livre of Paris, before the 7 April 1795, was equal to 489.5 g. It was divided into 16 onces of 8 "gros", each gros being equal to 72 "grains":

1 livre = 489.5 g;

1 once = $489.5/16 = 30.593375000$ g;

1 gros = $30.593375000 / 8 = 3.824218750$ g;

1 grain = $3.824218750 / 72 = 0.05311414931$ g.

I say in advance, once for all, that whereas my experiments were done with large quantities, I decided to display the results with a common reference because I wanted to facilitate comparisons; I calculate for one livre of broth the results that I am presenting.⁷

Again, the word "large" (adjective) could have been usefully replaced by quantitative information. Because of the particular style of scientific writing in the eighteenth century, the calculation that L. is announcing is creating doubts concerning the use of significant digits. Indeed let us assume that L. considered 3 livres of broth, where he would measure 20 g of "extractive matter" (precision 1 g). If he had

⁷ *Je préviens d'avance, une fois pour toutes, que, quoi que mes expériences aient été faites en assez grand, j'ai cru, pour les rendre comparables, devoir les ramener à une mesure commune, et en conséquence, je réduirai par calcul à une livre de bouillon les résultats que j'aurai à présenter.*

divided by 3, he would have obtained $20/3 = 6.6666666667$, with 10 significant numbers, which is not fair, as he could not know the value with a precision higher than 1 g.

More generally, a big advance in science and science communication was performed when a clear use of significant digits was introduced. Let us also observe that today's scientific journals are calling for statistics, which were not available at that time (for example, the Student test was introduced only in 1908 by the British statistician William Sealy Gosset (1876-1937))(Pearson, 1990).

I first observed that one livre of broth, prepared from one livre of water [489.5 g] and 4 onces [30.59375000. 4 = 122.3750000 g] of meat produced a very weak broth, whose specific weight was, relative to water, in the ratio of 1002322 to 1000000; by evaporation, one could recover only 35 grains 1/2 [35.0.05311414931 = 1.885552301 g] of gelatinous matter after reduction to stock tablets. I used thick flank in this experiment and in the two next.⁸

⁸ *J'ai d'abord reconnu qu'une livre de bouillon, faite avec une livre d'eau [489.5 g] et 4 onces de viande, ne formait qu'un bouillon très-faible, dont la pesanteur spécifique était, à celle de l'eau, dans le rapport de 1002322 à 1000000, et qu'on en obtenait, par évaporation seulement 35 grains 1/2 de matière gélatineuse réduite à la consistance de tablettes de bouillon. C'est de la tranche qui a été employée dans cette expérience et dans les deux suivantes.*

Documents didactiques

The only thing that one can know for sure from this paragraph is that a broth was prepared with 1 part of meat for 4 parts of water, and that it was "weak". Why did L. choose this particular proportion? In a modern scientific article, this would be explained, and the adjective "weak" would be defined, preferably quantitatively when possible. Also it is not said which animal tissue was chosen, and this is the opportunity to observe that scientific advance since the eighteenth century makes it possible to be more precise, using the international rules: today the imprecision of "thick flank" would be avoided by the use of *obliquus extremus*, or *pinalis gracilis*, *quadriceps femoris*, *semimembranosus* (Delmas, 2006).

Was the meat cut parallel to muscular fibers, or transversally? This could be important, as the release from the muscular fibers could be modified when the fibers are open. From which animal was the meat: which variety, sex, age, breeding conditions, slaughtering conditions, maturation? We know today that all this is important for the quality of meat broth.

Today's "Materials and Methods" sections would also include a description of the preparation of the broth. Was the meat put in hot or in cold water (the coagulation of proteins at the surface could change the extraction)? Was the pot covered by a lid? How long was the meat thermally processed in water?

For masses, the precision with which they were measured would also be given in the "Material and Method" section. About this particular aspect of the work, it has to be observed that L. is known for being one of the first to have used extensively weighing scales in chemistry (Gillespie, 1970), and the scales he used were very precise (as can be observed in the article that we discuss here, see below); the "Fortin scale" that we know L. was using for some researches could measure masses with a precision of 25 mg for a mass reaching 10 kg (UQAC, 2015).

Based on advances due to L., new best practices were later introduced. Today the

weighing scales have to be controlled and checked regularly, and at least three measurements have to be made for each sample (in order to calculate a standard deviation). Modern "Materials and Methods" would also include indications that samples are cooled down to "room temperature" (to be more precise) before weighing because hot samples can heat air around, so that the sample are sucked upwards, giving wrong results (AOAC, 2016). Finally, today different scales (described by name of brand, model, precision, etc.) would be probably used for large (~ 1000 g) and small (~1 g) masses, because of ISO rules about mass measurement, so that different significant figures would be given (Radwag, 2016).

Table 1. Variation of the density of water in function of temperature.

Temperature	Density
5	1.000
10	1.000
25	0.999
20	0.998
25	0.997
30	0.995
35	0.993
40	0.991
50	0.990
65	0.980

For density, there is also a question of significance of figures. Without a "Materials and Methods" section, one cannot guess if the

Documents didactiques

7 figures displayed by L. are really significant. This is very important, as the density of water (and broth) changes with temperature, as shown on Table 1 (ASCE Manuel 25, 1995). Using these data, one can see that the difference of density of water is changing by more than

$$100. \frac{0.988 - 0.980}{\frac{1}{2} \cdot (0.988 + 0.980)} = 0.81200081301$$

% between 20 °C and 65 °C, for example: in other words, the densities can be wrong after the third digit if the density measurements are not performed at the same temperature.

This is important, because mass measurements are not always performed in temperature controlled rooms, and the temperature changes by more than 1°C during a day (the sole presence of scientists in rooms can increase the temperature), one can calculate that, at best, the density of broth could be determined with a precision of $0.001/3 = 0.000333333333$ (indeed this should be written 0.0003) at "room temperature", if best practices for mass measurement were applied.

By evaporation, one would have obtained about 2 g of solid matter, but the remaining doubt about L.'s practice would be suppressed with modern methods. In passing, it can be observed that one cannot be sure about the nature of these 2 g: L. writes "reduced to the consistency of meat tablets", but this is not clear, because it could depend on how the broth was "reduced" to tablets, and how much water remained in these tablets. What are "tablets", indeed?

According to culinary books of the time, they are gels obtained by a slow drying of broth, but this is not enough as different temperatures and air humidity can lead to different equilibrium, so that different quantities of water remain in the final product. Today, the "Materials and Methods" section would include a paragraph defining tablets or giving information on how much water such tablets can keep (after some particular analysis).

One livre of broth prepared from 8 onces or one 'demi-livre' of meat [489.5/2 = 244.7500000 g], had a specific weight of 1003080; evaporation reduced the mass to 47 grains ½ [47.5 . 0/05311414931 g] of gelatinous matter reduced to a consistency of tablet. This broth could be considered as weak, but enough for sick people.

Finally one livre of broth made from one livre of meat had a specific weight of 1007347; it was strong and delicious, and its masse was 116 grains [116 . 0.05311414931 = 6.161241320 g] after reduction to dry gelatinous substance.⁹

The same observations as before can be made here, but as the adjective "delicious" is added to "weak" or "strong", an interesting question arises, as how such broth would be appreciated today. The question is important, as the history of cooking shows that recipes evolved with time: for example, at the beginning of the twentieth century, custards were made from 16 egg yolks (*Gallus gallus*) for 1 L of milk (Gilbert et al., 1901), but today only 8 yolks are used for the same quantity of milk (Cardinale et Van Sevenant, 2010). Let us observe that, for a modern article, the description could be usefully given in a table (Table 2).

9 Une livre de bouillon dans lequel il était entré 8 onces ou une demi-livre de viande, s'est trouvée avoir, pour pesanteur spécifique, 1003080 ; il a laissé, par évaporation, 47 grains ½ de matière gélatineuse réduite à consistance de tablettes. Ce bouillon pouvait être encore regardé comme faible, mais suffisant cependant pour le cas de maladie. Enfin une livre de bouillon, formé avec une livre de viande, avait pour pesanteur spécifique 1007347 ; il était fort et succulent, et a laissé par évaporation 116 grains de substance gélatineuse desséchée.

Documents didactiques

Table 2.

Quantity of water (g)	Quantity of muscular tissue (g)	Mass of gelatinous substance (g)
489.5000000	122.3750000	1.885552301
489.5000000	244.7500000	2.522922092
489.5000000	489.5000000	6.161241320

Such a table is more succinct, but it can be even improved by transforming tables in diagrams, avoiding methodological pitfalls that we shall now consider.

Let us begin with a "naive" display (Figure 1).

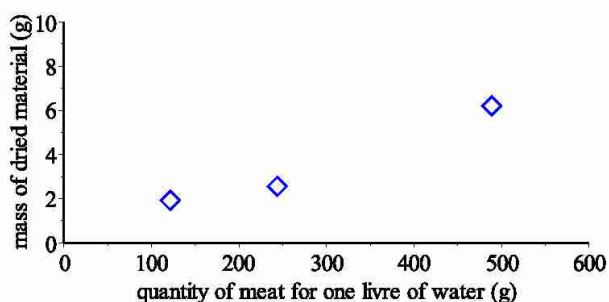


Figure 2. A naive display of data: the size of the symbols is arbitrary, and this is not said.

In this bad picture, nothing is said of the size of displayed symbols: it is a good practice that this size takes into account experimental uncertainties or standard deviation based on more 3 measurements (Harris, 2010).

Here let us assume that L. did not divide his data in order to compare to 1 livre, and that data are really the one he could measure. We observe that he announces values down to 1/2 grains, i.e. $0.05311414931/2 = 0.02655707465$ g; this should be written: 0.03 g.

In other words, the previous table should be

given as Table 3.

Table 3.

Quantity of water (g)	Quantity of muscular tissue (g)	Mass of extracted substance (g)
489.50	122.38	1.89
489.50	244.75	2.52
489.50	489.50	6.16

The experimental results should be shown as in Figure 3.

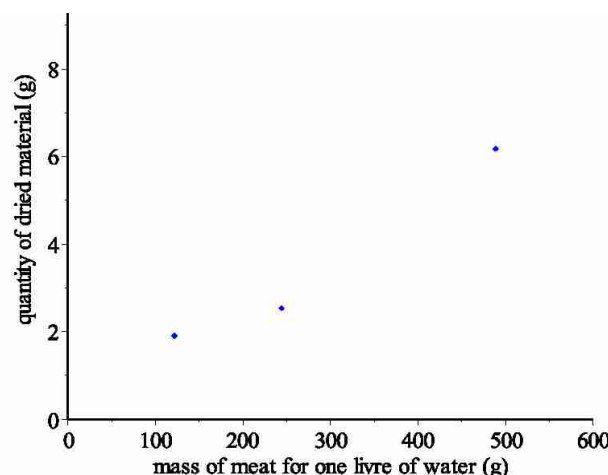


Figure 3. The size of symbols is based on the determination of measurement uncertainties.

In particular it can be observed that the size of symbols in Figure 2 was too big. In Figure 3, it is correct, and the caption should say something about the relative sizes of uncertainties and displayed dots.

These first experiments taught me three

Documents didactiques

things:

1. the convenient proportion for making broth

being used for sick people is about two parts of water for one part of meat,¹⁰

Again, with the word “convenient”, we can observe that the scientific work and communication are improved when adjectives and adverbs are replaced by quantitative information. It is doubtful if “convenient” is culturally defined in terms of flavour (This and Gagnaire, 2010). Another interpretation of “convenient” could be in terms of nutrition, as broth and meat tablets were considered as nutritionally important in the eighteenth century (This, 2008). It could be also a question of cost effectiveness: L. seeks the healthiest broth and a solution the hospital can afford since they need huge quantities of broth.

2° that there is a quite exact ratio between the quantity of gelatinous substance in the broth and the specific weight, so that one can determine one from the other,¹¹

Here again, the adverb “quite” is ambiguous, and giving a quantitative estimation of the ratio is better. Moreover a non established fact is given. Indeed the “proof” of it is given later in the text, but the impression that a non-proved fact was introduced would be avoided today with the general structures of articles, made of (1) Introduction, (2) Materials and Methods, (3) Results, (4) Discussion, (5) References. Without looking further at L.'s text now, let us

10 *Ces premières expériences m'ont appris trois choses : 1° que la proportion convenable pour faire du bouillon à l'usage des malades est d'environ deux parties d'eau contre une de viande ;*

11 *2° qu'il existe un rapport assez exact entre la quantité de substance gélatineuse contenue dans le bouillon et la pesanteur spécifique, de sorte qu'on peut conclure l'une de l'autre ;*

try to determine the announced ratio quantitatively, using the diagram of the density in function of the quantity of gelatinous substance, assuming that this quantity was correctly determined (Figure 4).

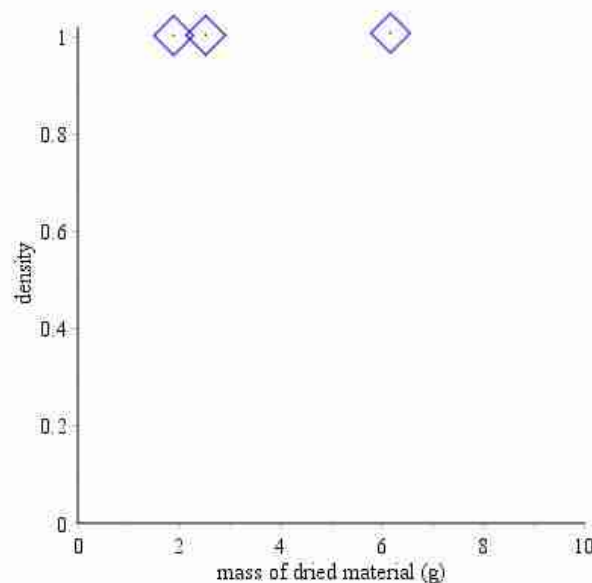


Figure 4. The density of broth in function of the mass of extracted matter. The size of symbols is arbitrary.

Here the size of the symbols on the diagram was arbitrarily chosen, because we do not know the uncertainty on density, as no clear information is given (at this stage of L.'s text) on how he made the measurements. As values such as 1.002322 are displayed, we should (today) think that the last digit is significant.

It should be added that the display is only an illustration of the calculus of the ratio of the dried matter by the density. For the 3 measurements, the ratios are 0.5303291005; 0.3980476190; 0.1635303571. This calculation does not show the announced constant ratio, strictly speaking. At this point, we can add that things would be clearer today, as advances in mathematics would lead to give a different name to

Documents didactiques

proportionality ($y = k x$) and affinity ($y = a x + b$). Let us look, for example, whether the experimental data are along a line, calculating a regression line (Harris, 2010). For such a regression, it is a good practice to calculate both the correlation coefficient and the residues, i.e. the differences between the fitted line and the experimental data. Again we have to decide how to display the results. On Figure 5, we purposely gave a bad display of data (Tufte, 1985).

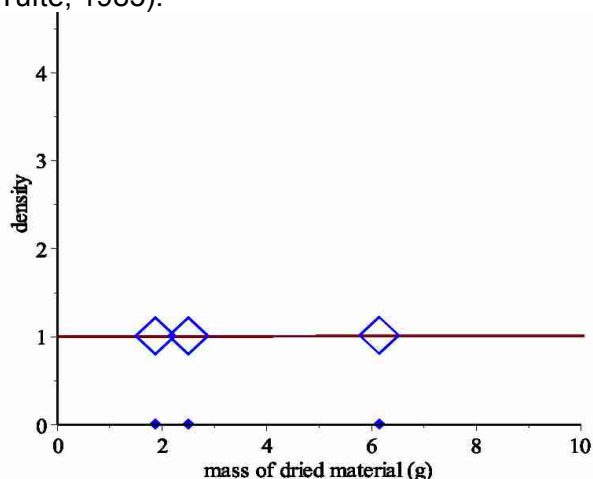


Figure 5. On this purposely wrong display, the data and the residues (difference between fitting and data) are simultaneously shown.

Here, the equation of the fitted line obtained by linear regression is $1.00010887964955 + 0.0011752472443 x$, with a correlation coefficient equal to 0.9999946264. On Figure 4, the range used for ordinates is compressing both residues and the fitted line. It would have been better to use two different scales, or to make two different displays (Figure 6). On Figure 6a, it is now easier to see a "quite exact" ratio or more precisely a "good" fitting by a linear relationship. More precisely, the residuals are less than 0.05 and the correlation coefficient is almost equal to 1... which is strange, when one considers the difficulty of making precise measurements of density. It is true that, having this fitting, the abscissa can be determined from the ordinates, or vice versa... but

the question of uncertainties remains.

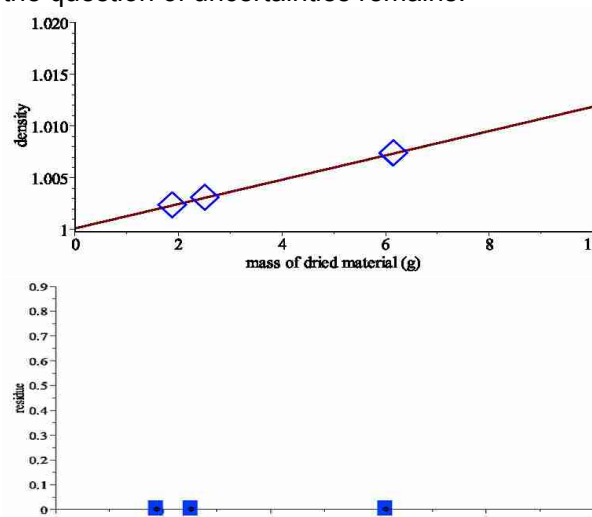


Figure 6. (a) Density in function of the mass of dried material. (b) Residues obtained by fitting.

It is true that, having this fitting, the abscissa can be determined from the ordinates, or vice versa... but the question of uncertainties remains.

3° that when meat is boiled in a large quantity of water, more extractive matter is extracted proportionally, than when meat is boiled in a small quantity of water. It was observed indeed that 4 onces of meat led to 35 grains 1/2 of gelatinous matter; a livre, in this proportion, would have given 142 grains, but only 116 grains were obtained; about one sixth can be recovered more when boiling with a large quantity of water.¹²

12 3° qu'en faisant bouillir la viande à grande eau, on extrait, proportion gardée, plus de matière extractive que quand on la fait bouillir à courte eau. On a vu, en effet, que 4 onces de viandes ont donné 35 grains 1/2 de matière gélatineuse, ; une livre, dans cette proportion, aurait dû donner 142 grains, et cependant on n'en a obtenu que 116 ; il y a donc un sixième environ à gagner à faire du

Documents didactiques

Now there is the question of the non linearity of extracted matter in function of the proportion of water and meat. Again the display of the Figure 6 is bad, because symbols seems on a line, but the eye cannot distinguish correctly a possible non linearity; calculating a coefficient is more appropriate.

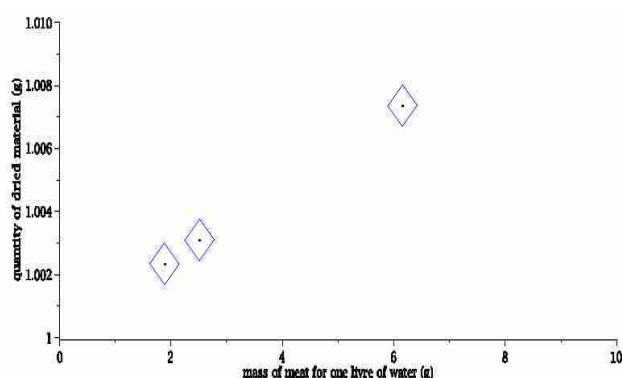


Figure 7. On this figure, the trend followed by experimental data is not easy to detect.

The Figure 8, where the abscissa range was reduced, shows better the variation of the quantity of dried matter in function of the proportion of meat.

Now it appears more clearly that the ratio of the mass of extracted matter by the mass of meat is not constant. Indeed L. himself, later in his memoir, proposes a way of calculating the variations, using first differences and second differences (Piskounov, 1980). Here we could compare the slopes of lines going through the first two dots, and by the last two dots:

$$C1 = \frac{Mg[2] - Mg[1]}{Mv[2] - Mv[1]} = 0.005148320667$$

$$C2 = \frac{Mg[3] - Mg[2]}{Mv[3] - Mv[2]} = 0.01487232869$$

The slope increases by 65.4 %: this is more than half the value, so that L. (assuming again that the uncertainty issue is solved) was indeed allowed to write what he wrote (it would be

bouillon à grande eau.

better to say how much, anyway).

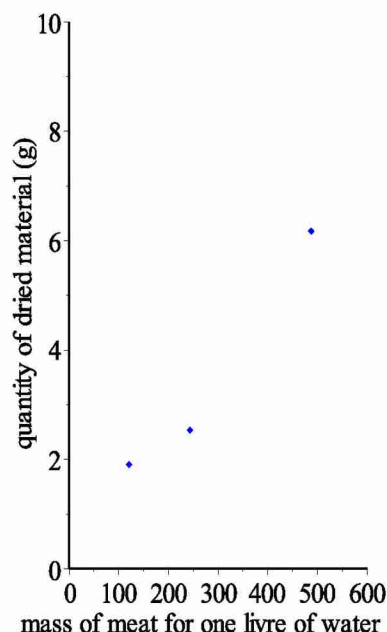


Figure 8. On this figure, the trend followed by experimental data appears better.

After having observed what the proportion of water and meat was roughly necessary to make the broth of hospitals, I wanted to examine if the different kinds of meat would make differences on strength and quality of broth.¹³

Here, an inter-title would be useful, as a new result is given. Some scientific journals allow the authors to use such subdivision. This is not a detail, as scientific publications have the duty to communicate clearly the ideas. On the other hand, the goal of the work is clearly said.

¹³ *Après avoir reconnu quelle était, à peu près, la proportion de viande et d'eau nécessaire pour former le bouillon d'un hôpital, j'ai voulu examiner si les différentes espèces de viandes apporteraient de grandes différences dans la force et dans la qualité du bouillon.*

Documents didactiques

*As a consequence, I used one livre of the different pieces of beef meat: the meaty part of legs; the meaty part of butt; brisket; cheek; outside flat, which is considered to be the best for broth making; neck with bone; part of blade, i.e. shoulder; round; rib; hindquarter flank: these are cartilaginous parts at the anterior part of brisket, at the end of ribs.*¹⁴

It is only here, well behind the first results, that L. indicates that he used muscular tissue from *Bos taurus*. However some uncertainty remains, because it is not sure that the old names for meat pieces are the same as today, as said before. This gives another opportunity to see how the methods for scientific communication improved and why the works of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and from other standard agencies (*Bureau international des poids et mesures, Agence française de normalisation, Association of Official Agricultural Chemists*, etc.) are useful for proper scientific communication: today there would be less ambiguity, because the usual French names would be explained by international Latine names. Of course, the sole existence and usefulness of such institutions calls for proper information of students, during their studies (Boesdorfer, 2015).

This part is more like the modern "Materials and methods" section. It is a very important

14 *J'ai pris, en conséquence, une livre des différentes espèces de viande de bœuf ci-après, savoir : du trumeau, qui est le jarret ; de la culotte, qui est la partie charnue des cuisses ; de la poitrine ; de la joue ; du gîte à la noix, qui est réputé le meilleur morceau pour le bouillon ; du collier ou col avec l'os ; du paleron, c'est-à-dire de l'épaule ; du cimier, qui est le morceau pris sur la croupe ; de la côte ; enfin du flanchet : ce sont les portions cartilagineuses qui sont à la partie antérieure de la poitrine, à l'extrémité des côtes.*

part because it gives to reviewers a possibility to ascertain the results, but also because it shows to readers how the results were acquired. As said before, many modern scientific journals properly impose to put this section before giving the results, as it is only when one knows how results were produced that one can accept to appreciate them. More generally, it is a good practice to structure scientific articles as Table 4.

Table 4.

1. Title
2. Authors
3. Abstract
4. Keywords
5. Introduction
6. Materials and methods
7. Results
8. Discussion
9. Conclusions and perspectives
10. Acknowledgements
11. Declaration of interests
12. References

Coming back to the article of L., let us observe that the description given could be improved by the information on the duration of the thermal processing. Here it is said that it was between 7 and 8 hours, but how much precisely? And why was this duration chosen? Was the meat put in cold water, or in hot water? How did the temperature change in function of time? What is "simmering"? How was the pan (dimensions, material)? Was

15 *Toutes ces viandes étaient désossées, à l'exception du collier, auquel tenait l'os, la cuisson a duré sept à huit heures, avec une ébullition douce, et les dimensions ont été prises de manière à former juste deux livres de bouillon. Lorsque tout a été refroidi, on a séparé la graisse surnageant, qu'on a pesée ; on a ensuite déterminé la pesanteur spécifique de chaque bouillon. Enfin, on les a fait évaporer pour obtenir la partie gélatineuse, et cette dernière a été réduite à consistance de tablettes de bouillon.*

Documents didactiques

there a lid? How much was the heating power? L. wanted to make broth, but how did he do: did he take a known mass of meat, in order to add water and finally get 2 livres? For sure, the fat was weighted, but where is the information? How was the fat recovered? How much was lost during recovering? Was the fat dried? How was the broth evaporated? Why was it decided to stop the experiment at this particular consistency of "tablet" assuming these are well defined products? All these questions should have an answer in a modern publication.

*The table given in this memoir shows the results:*¹⁶

Here, L. publishes a table for which we give a translation in modern units, as today's publication would probably do.

Tables are one way to display scientific results, but one can observe that graphs would have made the presentation of results clearer. Moreover the dashed lines in the column giving the mass of fat seems to show that this mass was nil for thick flank, but a doubt remains and it could also be possible that the quantity was not measured. It would today be asked to write "0" or "n.d." (non determined), indicating also the signification of the acronym being used (in the caption).

Let us rather make the Table 5 (top of next page). This table is not homogeneous, as it contains the report of experiments of two different natures: modification of extraction depending on the proportion of water and meat, for thick flank only, and results for different kinds of pieces of meat.

For the first result, it would not be accepted today to give twice the same result; a good scientific practice is to synthesize as much as possible (in the same order of ideas, results should be published only once).

By the way, one could ask if L. repeated his

¹⁶ La table jointe à ce mémoire présente les résultats qu'on a obtenus ;

experiments, determining a standard deviation. If we only keep the results on the comparison of the different muscular tissues, L. gives a proportion meat/water equal to 0.5000000. It is very surprising that, for such an experiment, a proportion with as many digits as wanted was really used. If it were the case, by an extraordinary luck, the reviewers and readers should be told.

*it will be seen that the differences in density change by one half, depending on the kind of meat being used, albeit coming from the same animal;*¹⁷

The expression "change by one half" is ambiguous. It can be seen on the histogram of Figure 9 that the different densities are very close.

Hence, in order to show more clearly the differences in densities of parts, it would have been better to display the differences, compared to the first data, for example (Figure 10).

*that the quantity of gelatinous part contained in the broth changes about in the same proportion ;*¹⁸

¹⁷ on y verra que les différences de pesanteur spécifique varient de plus de moitié, suivant l'espèce de viande employée, quoique toutes du même animal ;

¹⁸ que la quantité de matière gélatineuse contenue dans le bouillon varie à peu près dans la même proportion

Documents didactiques

Table 5.

Quality of meat used	Quantity of meat used (en g)	Quantity of broth produced (en g)	Density (compared to water at a temperature of 20 °C ??)	Quantity of fat floating at the surface of the broth (en g)	Quantity of dried gel after evaporation (to be explained) (en g)
thick flank	1 <i>livre</i> + 4 <i>once</i> = 611.8750000	489.5	1.002322	?	36.5 <i>grain</i> = 1.93866450
thick flank	8 <i>once</i> = 244.7500000	489.5	1.003080	?	47.5 <i>grain</i> = 2.522922092
thick flank	1 <i>livre</i> = 489.5	489.5	1.007347	?	1 <i>gros</i> + 44 <i>grain</i> = 6.161241320
leg		489.5	1.005003	1 <i>gros</i> + 30 <i>grain</i> = 5.417643229	1 <i>gros</i> + 7 <i>grain</i> = 4.196017795
butt		489.5	1.004824	4 <i>gros</i> + 30 <i>grain</i> = 16.89029948	1 <i>gros</i> + 3 <i>grain</i> = 3.983561198
brisket		489.5	1.004391	4 <i>gros</i> + 55 <i>grain</i> = 18.21815321	68.25 <i>grain</i> = 3.625040690
cheek		489.5	1.004320	5 <i>gros</i> + 10 <i>grain</i> = 19.65223524	67 <i>grain</i> = 3.558648004
outside flank		489.5	1.003872	3 <i>gros</i> + 36 <i>grain</i> = 13.38476562	60 <i>grain</i> = 3.186848959
neck		489.5	1.003654	4 <i>gros</i> + 20 <i>grain</i> = 16.35915799	56.5 <i>grain</i> = 3.000949436
part of blade		489.5	1.003633	5 <i>gros</i> = 19.12109375	56 <i>grain</i> = 2.974392361
round		489.5	1.003304	2 <i>gros</i> + 2 <i>grain</i> = 7.754665799	51 <i>grain</i> = 2.708821615
rib		489.5	1.002937	3 <i>gros</i> + 53 <i>grain</i> = 14.28770616	45.25 <i>grain</i> = 2.403415256
hind quarter flank		489.5	1.002229	1 <i>once</i> + 3 <i>gros</i> + 55 <i>grain</i> = 44.98768446	34 <i>grain</i> = 1.805881077

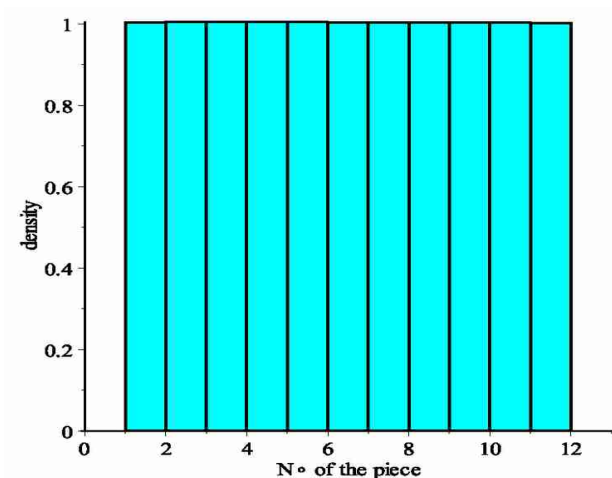


Figure 9. Histogram of densities (ordinates) depending on the particular piece of meat (the 11 pieces are given in Table 6).

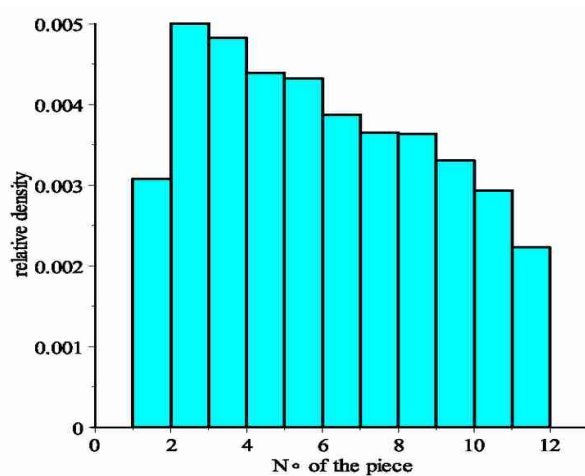


Figure 10. An improved representation for density (ordinate) for the various pieces (see Table 6).

Documents didactiques

Table 6. The pieces are numbered from top to bottom.

Quality of meat	density (compared to water at 20 °C ??)	Quantity of fat floating (en g)	Quantity of dried gel, after evaporation (en g)
thick flank	$d_1 := 1.003080$?	$Qg_1 := 2.522922092$
thick flank	$d_2 := 1.005003$	$QGS_2 := 5.417643229$	$Qg_2 := 4.196017795$
leg	$d_3 := 1.004824$	$QGS_3 := 16.89029948$	$Qg_3 := 3.983561198$
brisket	$d_4 := 1.004391$	$QGS_4 := 18.21815321$	$Qg_4 := 3.625040690$
cheek	$d_5 := 1.004320$	$QGS_5 := 19.65223524$	$Qg_5 := 3.558648004$
outside flank	$d_6 := 1.003872$	$QGS_6 := 13.38476562$	$Qg_6 := 3.186848959$
neck	$d_7 := 1.003654$	$QGS_7 := 16.35915799$	$Qg_7 := 3.000949436$
part of blade	$d_8 := 1.003633$	$QGS_8 := 19.12109375$	$Qg_8 := 2.974392361$
round	$d_9 := 1.003304$	$QGS_9 := 7.754665799$	$Qg_9 := 2.708821615$
rib	$d_{10} := 1.002937$	$QGS_{10} := 14.28770616$	$Qg_{10} := 2.403415256$
hind quarter flank	$d_{11} := 1.002229$	$QGS_{11} := 44.98768446$	$Qg_{11} := 1.805881077$

The "quantity of gelatinous part" is what we called Qg. Let us display the values (Figure 11).

Another representation of the same data is given in Figure 12.

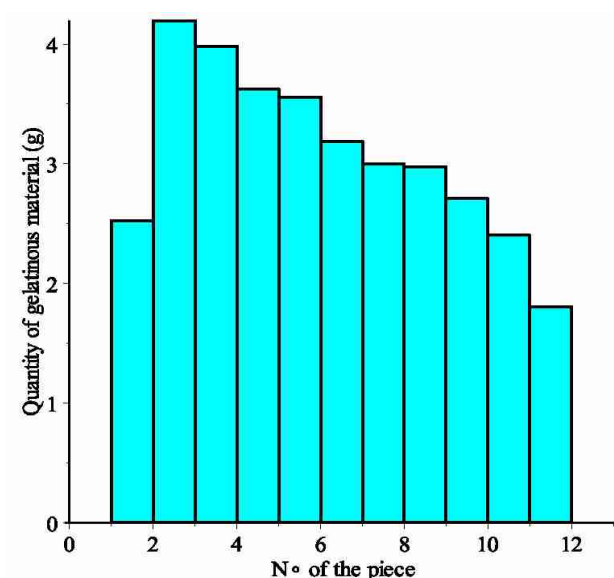


Figure 11. Mass of gelatinous material in function of the pieces (for the numbering of pieces, see Table 6).

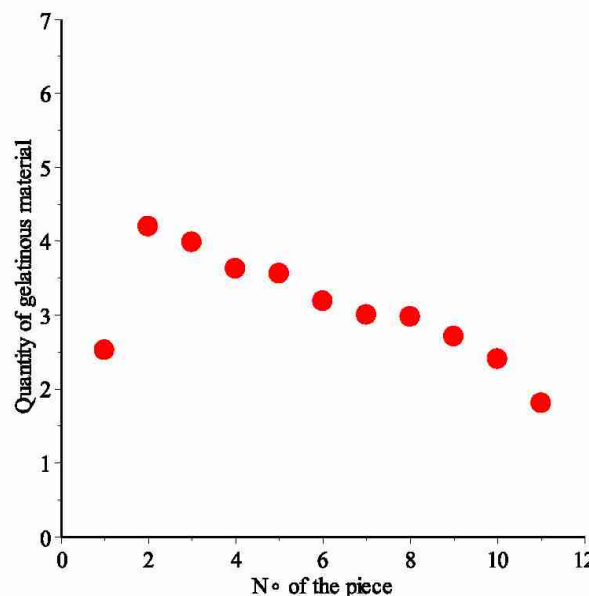


Figure 12. A different representation of data. Here again, the uncertainties are missing. For the numbering of pieces, see Table 6.

Documents didactiques

The quantity of “gelatinous matter” would change in the same proportion that density? It is a good practice to display such a trend, because pictures give a clear idea, synthesizing the results at the same time (Figure 13).

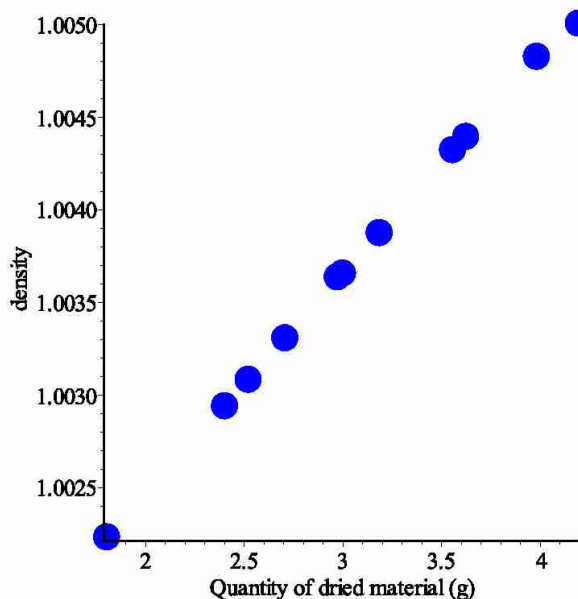


Figure 13. A linearity appears better on this diagram.

Now the Figure 13 shows clearly that it is right to say that the density is following a “relationship” (almost linear, the “almost” being to be quantified) in function to the quantity of dried matter. However, if this graphical presentation of results is fine, the quantification is better. Today many students use softwares for this purpose, and they display a regression line, with a R^2 coefficient (Harris, 2010). This is not wrong, if one knows what one is doing, and how the R^2 coefficient is calculated.

Let us begin by drawing a regression line:
 $1.00011858299045 + 0.00117594067357360 x$
 Then let us calculate the Bravais-Pearson correlation coefficient (Nogge, 1993):
 0.9997249859.

but in general a broth made from two parts of water for one part of meat should have a specific weight of 1003800, without taking into account the increase due to the addition of salt and vegetables; it should contain 1 gros 1/2 per livre of gelatinous matter when reduced as a tablet.¹⁹

It is surprising that L. now writes something less precise than before.

Because the large number of experiments that I did on the specific weight of broth, and on the quantity of gelatinous matter that they contain showed me the ratio of one with another, it was not difficult to recognize that the law followed was quite regular, and I succeeded to calculate it.²⁰

Again, there is a repetition. And in particular, what does “calculus” mean, when there is none, except a long table which is full of extrapolations (probably)?

I did some particular experiments with broths from more meat than in the previous experiments, and I realized with more precision than I thought before, a table in which the quantity of gelatinous mater is in relationship with the specific weight.²¹

¹⁹ *mais qu'en général un bouillon résultant de deux parties d'eau contre une de viande doit avoir une pesanteur spécifique de 1003800, sans compter l'augmentation résultant de l'addition du sel et des légumes, et qu'il doit contenir un gros 1/2 à 2 gros par livre de matière gélatineuse à consistance de tablettes de bouillon.*

²⁰ *Le grand nombre d'expériences que j'avais faites sur la pesanteur spécifique des bouillons, et sur la quantité de matière gélatineuse qu'ils contenaient, m'ayant mis à portée de comparer le rapport de l'une avec l'autre, il ne m'a pas été difficile de reconnaître qu'il suivait une loi assez régulière, et je suis parvenu à la soumettre au calcul.*

Documents didactiques

Here the text is ambiguous. Does L. want to say that he did only some experiments and that he extrapolated? If so, it would not be surprising that he could find a "very" linear relationship.

In order to use this table more easily, I calculated by 6 grains. If one wanted to have more precision, and get the precision of 1 grain of gelatinous matter, one could use proportional parts, and on such small quantities there would be no sensitive error. Those who would like to go deeper in this direction will observe that the first differences of specific weight decrease as the broth is stronger, that the second differences decrease also, but that after 6 gros of gelatinous matter per livre of water, they reach a constancy.²²

It is obvious that if the interpolation is made from smaller intervals, variations will be smaller. Here modern best practices would have improved this part, including a discussion of uncertainties or significant numbers. However it

21 *J'ai fait d'ailleurs quelques expériences particulières sur des bouillons plus chargés que les précédents, et je me suis vu en état de former, avec beaucoup plus d'exactitude que je ne m'y étais attendu d'abord, une table qui exprime la quantité de matière gélatineuse contenue dans un bouillon d'une pesanteur spécifique donnée.*

22 *Pour faciliter l'usage de cette table je l'ai calculée de 6 en 6 grains. Si l'on voulait pousser plus loin l'exactitude et avoir, par exemple, jusqu'à la précision du grain la quantité de matière gélatineuse, on pourrait prendre des parties proportionnelles, et, sur d'aussi petites quantités, il n'en résulterait aucune erreur sensible. Ceux qui voudront approfondir les lois que suit cette table s'apercevront que les différences premières de la pesanteur spécifique vont en diminuant à mesure que le bouillon est plus chargé, que les différences secondes deviennent également plus petites à mesure que le bouillon se charge, mais que, vers 6 gros de matière gélatineuse par livre d'eau, elles arrivent à l'uniformité avec cette table.*

can be admired that even at his times L. gives a good method (Piskounov, 1980) for the exploration of experimental results on discrete data: when a derivative cannot be calculated, a finite difference can be determined.

A scrupulous physician who would like to know how much nutritive matter he gives could do it easily; he just needs to determine the specific weight of broth, water being supposed to have a value of 1000000; when this specific weight is, for example 1009426, he will find in the table that 1 livre of this broth contains 4 gros 6 grains of gelatinous matter after reduction to the consistency of tablets.²³

Why the scientific work was remarkable

Up to here, we almost forgot to admire the scientific work reported. It was not said here that after L. scientific and technological studies (in particular in nutrition science) went considerably backwards, perhaps because this particular memoir was forgotten (L. was guillotined in 1794). Scientists such as François Magendie (1783-1855) tried to demonstrate that gelatin has no nutritional properties, as dog fed with meat tablets died after weeks of exclusive diet. And it was forgotten that density is indeed an excellent indicator of the quantity of dissolved matters, in particular gelatin (Cadet de Vaux, 1818;

23 *Un médecin scrupuleux, qui voudra connaître ce qu'il donne de matière nourrissante à son malade, le pourra facilement ; il ne s'agira que de déterminer la pesanteur spécifique du bouillon, l'eau étant supposée 1000000 ; si cette pesanteur spécifique se trouve, par exemple, être de 1009426, il trouvera dans la table que 1 livre de ce bouillon contient 4 gros 6 grains de matière gélatineuse, à consistance de tablettes sèches. On observe qu'il est toujours question ici de bouillon non salé.*

Documents didactiques

Darcet, 1830; Liebig, 1852; This, 2008). Also the method devised by L. is remarkable, in order to get an idea of the quality of broth.

The usefulness of the table depends on the particular ways for the precise determination of specific weight. Indeed the differences, from one broth to another, being very small, one would commit large errors if the instruments were not precise for measuring small differences; as a consequence, I shall explain which tools I am using.²⁴

Now, L. discusses the issue of precision, and this shows that the modern practices of putting the "Materials and Methods" section before the results is a good one. This would have allowed the calculation of experimental uncertainties, and an improved display of results.

The hydrometer that I use is a hollow cylinder made of a thin silver sheet, strong enough to avoid bending when the instrument is cleaned. This cylinder is weighted at the bottom with tin, and it has a stem on top, made from a silver thread of 3/4 line of diameter, to which is adapted a small cup in which weights can be

put; I made a mark on the stem at the place where the level of the liquid should be.²⁵

This description is now a good indicator of the precision of the studies performed by L.: technical details are given, and some methodological cleverness is obvious. This hydrometer, as the Fortin balance, became later important in chemistry (Crosland, 1978).

When this tool is made and when weights are added to the cylinder so that the whole instrument is slightly lighter than the volume of water it displaces, it is weighted on a very precise balance, then it is dipped in distilled water, and a certain number of grains and fractions of grains are added on the top cup so that the hydrometer goes down until the level of the liquid reaches the mark on the stem; the same process is performed with the liquor for which specific weight is to be determined, and from the masses the specific weight can be determined in millionth.²⁶

25 Le pèse-liqueur dont je me sers est un cylindre creux formé d'une feuille d'argent mince, assez forte cependant pour ne pas plier et se déformer quand on essuie l'instrument. Ce cylindre est lesté par le bas avec de l'étain fin, et il est surmonté, à son extrémité supérieure, par une tige de fil d'argent de 3/4 de ligne environ de diamètre, à laquelle est adapté un petit godet destiné à recevoir des poids ; j'ai fait une marque sur la tige à l'endroit jusque auquel le pèse-liqueur doit être enfoncé.

26 Lorsque cet instrument est construit et qu'il est lesté de manière à être un peu plus léger que le volume d'eau qu'il déplace, on le pèse à une balance très-exacte, on le plonge dans de l'eau distillée, puis on ajoute, sur le petit bassin supérieur, le nombre de grains et de fractions de grain nécessaire pour le faire enfoncer jusqu'à la marque pratiquée sur la tige ; on fait la même opération avec la liqueur dont on veut déterminer la pesanteur spécifique, et par le rapport du poids total, tant du pèse-liqueur que des grains qui y ont été ajoutés, on conclut la pesanteur spécifique en millionnièmes.

24 L'utilité qu'on peut retirer de la table ci-dessus suppose qu'on a des moyens très-exacts pour déterminer la pesanteur spécifique. En effet, les différences d'un bouillon à l'autre étant très-petites, on commettrait de grosses erreurs si l'on n'avait des instruments assez délicat pour saisir de très petites différences ; je vais, en conséquence, exposer ceux que j'emploie.

Documents didactiques

Here the text is perfectly clear. Moreover this part of the text shows that L. used the "method of zero" before Louis-Marie Ampère, to which the method is attributed by James Clark Maxwell (Traçon, 1997). What is this method? Let us explain it using an example from electricity: when the variations of the intensity of a electric current of average intensity 1000 A are to be determined precisely, a good way is to avoid measuring directly the intensity, because if fluctuations are for example 1 A, then the quantity to be determined would be too small; however if a signal of constant intensity - 1000 A is added to the first, the sum of the two signals is at the maximum of 1 A, so that the variation is 100 %.

Here it is what L. is doing: instead of directly reading the density on a graduated stem, he puts the system at constant level, and improves the precision, as we shall calculate below.

How did L. do? Let us observe that he used a hydrometer for which the stem is very thin: this is important, because the following calculation shows that the variations of depth are increased.

Let us first observe that the hydrometer is in equilibrium in distilled water because it is submitted to forces whose resultant is nil. These forces are the weight and the buoyancy force, i.e. the resultant of pressure forces.

The weight P is proportional to the mass M :

$$P = m \cdot g \quad (1)$$

The proportionality constant g is the acceleration of gravity.

On the other hand, the buoyancy force is equal to the weight of water displaced by the immersed volume of the hydrometer. If this tool is made from a cylinder of volume v (entirely in water) with a cylindrical stem of radius r , the stem is at a height h_w . The volume of the hydrometer inside water is:

$$V = v + \pi \cdot r^2 \cdot h_w \quad (2)$$

The displaced volume of water is linked to the mass of displaced water M_w by the definition of

specific weight (for water):

$$\rho_w = \frac{M_w}{V} \quad (3)$$

Finally the equilibrium condition in pure water is:

$$M g = (v + \pi \cdot r^2 \cdot h_w) \cdot \rho_w \cdot g \quad (4).$$

If the specific weight changes by $\Delta\rho$, from ρ_w to $\rho_w + \Delta\rho$, the question is: how much does the hydrometer sink? The equilibrium equations can be written for the two conditions (water and broth):

$$M g = (v + \pi \cdot r^2 \cdot (h_w + \Delta h)) \cdot (\rho_w + \Delta\rho) \cdot g \quad (5)$$

By subtraction:

$$(v + \pi \cdot r^2 \cdot h_w) \cdot \rho_w \cdot g = (v + \pi \cdot r^2 \cdot (h_w + \Delta h)) \cdot (\rho_w + \Delta\rho) \cdot g$$

(6)

Let us suppress the same terms from both sides; we find:

$$\Delta h = \frac{v \cdot \Delta\rho + \pi \cdot r^2 \cdot h_w \cdot \Delta\rho}{-\rho_w \pi \cdot r^2 - \pi \cdot r^2 \Delta\rho} \quad (7)$$

This function is of the kind

$$y = \frac{-(1+r^2)}{-r^2} \quad (8).$$

For small values of r , the variation $y(r)$ is very large (in $1/r^2$; it is negative because the hydrometer goes up when the density increases, as in a broth). This observation shows how the work by L. is smart.

How useful is the method of zero for stock density determination? We shall now calculate the uncertainty of the direct method, and the method of zero.

In order to calculate the uncertainty on density as determined by the direct method, let us begin by writing the equilibrium equation in pure water: the hydrometer is in equilibrium when its weight is equal to the Archimedes lift, a force equal to the the weight of the volume of displaced water.

Here we assume that the mass of the hydrometer is M , with a cylinder of volume v and a cylindrical stem of radius r . The stem is

Documents didactiques

in water by the height h_w and again the specific weight of water is ρ_w .

Using these variables, the equilibrium equation is:

$$Mg = (v + \pi \cdot r^2 \cdot h_w) \cdot \rho_w \cdot g \quad (9)$$

In broth, the equation is the same, but the specific weight of pure water is replaced by the broth specific weight ρ_b :

$$Mg = (v + \pi \cdot r^2 \cdot h_b) \cdot \rho_b \cdot g \quad (10)$$

How much is the density of the broth? Let us observe that it is equal to the ratio of the volumic mass by the one of pure water:

$$d = \frac{\rho_b}{\rho_w} \quad (11)$$

The volumic mass of broth appears in equation 9, and the one for water in equation 10. So that:

$$d = \frac{\frac{M}{v + \pi r^2 h_b}}{\frac{M}{v + \pi r^2 h_w}} \quad (12)$$

Here the volume appears. This one is difficult to measure precisely, but is linked to mass, the latter being known with much better precision, so that:

$$d = \frac{\left(\frac{M}{\rho_w} - \pi r^2 h_e\right) + \pi r^2 h_e}{\left(\frac{M}{\rho_w} - \pi r^2 h_e\right) + \pi r^2 h_b} \quad (13)$$

Or :

$$d = \frac{M}{M - \pi r^2 h_w \rho_w + \pi r^2 h_b \rho_b} \quad (14)$$

It can be observed that the density depends on M , the specific weight of water, the radius, the sinking depth in water, the sinking depth in the broth. Finally the uncertainty on density can be calculated. It is equal to 0.00529, with the values given by L.

On the other hand, in order to determine the uncertainty using the method of zero, one has

again to express the equilibrium condition in pure water:

$$M_w g = (v + \pi \cdot r^2 \cdot h_w) \cdot \rho_w \cdot g \quad (15)$$

Then in the broth, the depth does not change, but the mass is changing, because small masses are added in the upper part:

$$M_b g = (v + \pi \cdot r^2 \cdot h_w) \cdot \rho_b \cdot g \quad (16)$$

One has again to make a ratio, so that:

$$d = \frac{\frac{M_b}{v + \pi r^2 h}}{\frac{M_w}{v + \pi r^2 h}} \quad (17)$$

One can immediately observe that the causes for uncertainties are reduced. And the uncertainties are on masses, known with much more precision than distances (in particular in presence of a meniscus). Numerically it can be calculated that the uncertainty is equal to 0.0002, i.e about 20 times smaller than before. Obviously the work of L. is remarkable, even if his article is not done according to modern criteria.

Was Lavoisier's method precise enough to distinguish broth from density?

Finally could really L. distinguish the quantity of extracted matter with a small proportion of water and with a large quantity of water? The reproduction of L. experiments showed that the answer is yes: the Figure 14 shows the quantity of dried matter of a broth in a function of the duration of thermal processing, for two meat/water proportions. In our experiments, we replaced the silver stem by a small capillary tube (Hirschmann Laborgeräte 5 μ L, length 7.642 cm, external diameter 1.3 mm, $R \leq 0.3$ %) that was glued at the top of a fishing float; at the bottom of the float, weights were adapted so that the system was partially in the liquid whose density was measured. As for L. experiments, a small cup was adapted at the

Documents didactiques

top of the stem, and small masses were added, in order to keep always the same sinking depth. This system was calibrated by using ultrapure water and a solution obtained by dissolution of known quantities of gelatin (previously dried in an oven at 95 °C until three constant measurement, then stored for two days in a desiccator with phosphorus pentoxide P₂O₅). Our experiments were performed at the temperature of 18°C (± 0.1 °C), in order to avoid variations of density with temperature. In the Figure 14, measurements uncertainties are smaller than the size of experimental data points: one can now see very clearly that a large quantity of water (red dots) is extracting more than a small quantity of water.

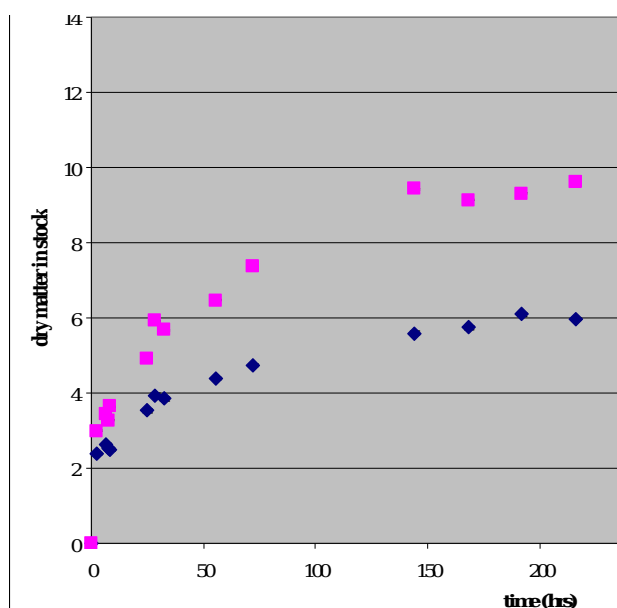


Figure 14. Dried matter of broth in function of time of thermal processing for two different proportions of meat and water.

The hydrometer that I am using is displacing slightly more than 9 ounces of distilled water.²⁷

²⁷ Le pèse-liqueur que j'emploie déplace un peu plus de 9 onces d'eau distillée.

Here one should ask why L. is providing information that seems useless. In a modern publication, as said before, anything useless should be dropped (this will perhaps change with free open journals, on line, where there is more space than on printed documents). On the other hand, one can see the methodological advance: if the rule is to avoid useless information, it invites the readers to consider that any given information is useful. Here, L. would have been invited by the reviewers to explain why he gave this information.

I gave detailed information on the hydrometer because it can be useful in a large number of processes in pharmacy, and, whereas I am using it for many experiments, I did not describe it before.²⁸

It is strange that L. used this hydrometer in previous works and that he did not describe it before: today, he would have had to explain the system on the first time he was publishing a result obtained with it. Then, in following articles, he would have had to give the reference of the article where he gave the description.

Because the work presented here was motivated by discussions on the quantity of broth that one should give in hospitals, it is natural to examine now the application of these results for humankind.²⁹

²⁸ Je suis entré dans quelques détails sur cet instrument, parce qu'il peut être d'un usage commode dans un grand nombre d'opérations de pharmacie, et que, d'ailleurs, quoi que je m'en serve habituellement, je n'en ai donné la description dans aucun autre mémoire.

²⁹ Les conférences sur la quantité de bouillon qu'on doit donner dans les hôpitaux ayant été l'occasion du travail dont je viens de rendre compte, il est naturel d'examiner maintenant les applications qu'on peut en faire à un objet aussi intéressant pour l'humanité.

Documents didactiques

This statement is important, because the work was done for technological reason: if such a work is useless, it is paradoxical.

*The king is giving, in hospitals of the Navy, one livre of meat per person, whatever the degree of sickness or of recovery. One can ask: 1° is this quantity enough? ; 2° whether it is necessary or possible to increase it, how can we get the best from it?
One will find easily the answer to these two questions in the experiments discussed here.*³⁰

All this is clear... but why is it in a conclusion, and not as an introduction? This can be discussed.

*Table of quantities of solid jelly reduced to the consistency of meat tablets*³¹

This table is at the end of the article, as an annexe. Modern scientific publications follow this rules. In recent years, such information was given sometimes in "supplemental materials", but the online publication will allow readers to find it as it was in the past.

Let us conclude now: with this work, L. obtained more information than many scientists before or after him. Historians discussed the importance of L. for the design of precise balances, but the precision of his hydrometer was less analyzed. Even if we amply discussed

³⁰ *Le roi accorde, dans les hôpitaux de la marine, une livre de viande un malade, l'un portant l'autre, quel que soit le degré de convalescence ou de maladie. On peut demander, 1° si cette quantité est suffisante ; 2° dans la supposition où il ne serait pas nécessaire ni même possible de l'augmenter, quel est le meilleur parti qu'on peut tirer de cette quantité ? On trouvera facilement dans les expériences ci-dessus la réponse à ces deux questions.*

³¹ *Table des quantités de gelée solide réduite à consistance de tablettes*

the publication given here, it remains that, with early methodology, L. got results of remarkable quality.

Références

Académie d'agriculture de France. 2016. <https://www.academie-agriculture.fr/nous-connaître/histoire>, last access 24 August 2016.

AOAC. 2016. *Official Methods of Analysis of AOAC International* (20th edition), AOAC, Rockville, USA.

ASCE Manuel 25. 1995. Quoted by Giles RV, Evett JB, Liu C. 1995. *Mécanique des fluides et hydraulique* (Shaum collection), McGraw Hill, Paris.

Boesdorfer SB. 2015. *Chemistry Education: Best Practices, Opportunities and Trends*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

Cadet de Vaux AA. 1818. *De la gélatine et de son bouillon*, L. Colas fils, Paris.

Cardinale B, Van Sevenant R. 2010. *Analyse des phénomènes et transformations culinaires : technologie appliquée*, Editions Jacques Lanore, Paris.

Carême A, Plumerey M. 1705. *L'Art de la cuisine française au XIXe siècle*, Carême, Paris, 1981.

Chemguide, 2015. *Introducing amino acids*, <http://www.chemguide.co.uk/organicprops/aminoacids/background.html>, last access 30th March 2016.

Crosland M. 1978. *Gay-Lussac, scientist and*

Documents didactiques

- bourgeois*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 334 p.
- Darcet JJP. 1830. *La gélatine extraite des os et les diverses applications qu'on peut en faire à l'économie domestique*, M. Moleon, Paris, 16.
- Delmas V. 2006. *Dictionnaire d'anatomie*, Elsevier Masson, 2006, 389 p.
- Djabourov M. 1986. *La gélification réversible du système eau-gélatine*, Thèse d'état de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.
- ESF (European Science Foundation). 2000. *Good scientific practice in research and scholarship*, http://www.esf.org/fileadmin/Public_documents/Publications/ESPB10.pdf, last access 21/10/2016
- Geoffroy le Cadet M. 1733. *Mémoires de l'Académie royale*, Histoire de l'Académie royale des sciences, Année MDCCXXX, Pierre Mortier, Amsterdam, MDCCXXXIII, 312.
- Gilbert Ph, Fetu E, Escoffier A. 1901. *Le Guide culinaire*, Flammarion, Paris.
- Gillispie CC. 1970. *Dictionary of Scientific Biography*, vol II, Scribner's.
- Girard JP. 1998. *Technologie de la viande et des produits carnés*, Tec et Doc, Paris.
- Harris DC. 2010. *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman and Company, New York, USA.
- IUPAC. 2016a. *The Gold Book*. <http://goldbook.iupac.org/D01590.html>, last access 30th March 2016.
- IUPAC. 2016b. *The Gold Book*. <http://goldbook.iupac.org/G02600.html>, last access 29th February 2015.
- Jacques J. 1987. *Berthelot, autopsie d'un mythe*. Belin, Paris.
- La Varenne PF. 1651. *Le cuisinier français*, Pierre David, Paris, 1651.
- Lavoisier AL, 1783. *Oeuvres complètes*, Imprimerie Nationale, Paris, t. III, p. 563-578.
- Lavoisier AL. 1789. *Traité élémentaire de chimie*, Paris, Cuchet, 1789, http://fr.wikisource.org/wiki/Trait%C3%A9_%C3%A9l%C3%A9mentaire_de_chimie, last access 20/10/2016
- Liebig J. 1852. *Nouvelles Lettres sur la chimie*, Charpentier, Paris, 193.
- Listrat A, Hocquette JF. 2004. Analytical limits of total and insoluble collagen content measurements and of type I and III collagen analysis by electrophoresis in bovine muscles, *Meat Science*, 68, 127-136.
- Maikhuntod B, Intarapichet KO. 2005. Heat and ultrafiltration extraction of broiler meat carnosine and its antioxidant activity, *Meat Science*, 71, 364-374.
- Menon. 1756. *La cuisinière bourgeoise à l'usage de tous ceux qui se mêlent de dépenses de maisons*, Guillyn, Paris.
- Métrologie française. 2016. <http://www.metrologie-francaise.fr/fr/histoire/histoire-mesure.asp>
- UQAC. 2015. http://classiques.uqac.ca/contemporains/boulad_ajoub_josiane/grandes_figures_monde_moderne/grandes_figures_PDF_originaux/Ch19.pdf, last access 30th March 2016.
- Noggle JH. 1993. *Practical Curve Fitting and Data Analysis*, Ellis Horwood-PTR Prentice Hall.

Documents didactiques

- Passiranus de Asula, J. 1497. *L'Art culinaire (De Re Coquinaria)*, Les belles lettres, Paris, 1987.
- Pearson ES. 1990. 'Student', *A Statistical Biography of William Sealy Gosset*. Oxford University Press.
- Piskounov N. 1980. *Calcul différentiel et intégral*, Editions Mir, Moscou.
- Poirier JP. 1993. *Lavoisier*, Pygmalion / Gérard Watelet, Paris.
- Radwag. 2016. *Good weighing practice in pharmaceutical industry (pharmacy risk assessment for mass measurement processes)*. http://radwag.com/pliki/artykuly/good_weighing_practice_in_pharmaceutical_industry.pdf, last access 24 August 2016.
- Rogalinski T, Herrmann S, Brunner G. 2005. Production of amino acids from bovine serum albumin by continuous sub-critical water hydrolysis, *Journal of Supercritical Fluids*, 36, 49-58.
- This H, Bram, G. 1998. *C R Acad Sci, Iic*, 675.
- This H. 2008. Une histoire chimique du bouillon. In *Mémoires de l'Académie de Stanislas*, Nancy, Année 2007-2008, 8e série, Tome XXII, 175-215.
- This H. 2009. *Science, technologie, technique : quelles relations*, Quae/Belin, Paris.
- This H. 2013. Formulation and new dishes, *Cahiers de Formulation 2013*, 16, EDP Science/Société des chimistes français, 5-21.
- This H. 2015. Aidez les enfants, *La Lettre de l'Académie d'agriculture de France*, 27, 15 février 2015, 8-9.
- This H, Gagnaire P. 2010. *La cuisine, c'est de l'amour, de l'art, de la technique*, Editions Odile Jacob, Paris.
- Trapon G. 1997. Méthodes du zéro en courant continu, *Techniques de l'ingénieur*, Ref 42417210.
- Tufte ER. 1985. *The Visual Display of Quantitative Information*, Graphic Press, Cheshire, Connecticut, USA.
- Wandsnider LA. 1997. The Roasted and the Boiled: Food Composition and Heat Treatment with Special Emphasis on Pit-Hearth Cooking, *Journal of Anthropological Archaeology*. 16(1), 1-48.
- William JL. 2006. *Gene Technology for Meat Quality*, Advanced Technologies for Meat Processing (Leo M L, Nollet L, Toldra F Eds). CRC Press, Florence, USA.
- Wright AM. 1910. *The chemical composition of meat extract*, *Transactions and Proceedings of the Royal Society of New Zealand*, 1868-1961, 43, 1-6.

Edité par :

Nadine Vivier, membre de l'Académie d'agriculture de France.

Rapporteurs :

1. Nadine Vivier, membre de l'Académie d'agriculture de France, professeur émérite des universités, Université du Maine

2. anonyme.

Documents didactiques

Rubrique :

Cet article a été publié dans la rubrique « Enseignement » des *Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France*, 2(6), 1-26.

Reçu :

30 mai 2016

Accepté :

26 août 2016

Publié :

5 septembre 2016

Citation:

This H. 2016. Methodological Advances in Scientific Publication. Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture, 2(6), 1-26.
<https://doi.org/10.58630/pubac.not.a150459>.



Hervé This est physico-chimiste dans le Groupe Inrae de gastronomie moléculaire, à AgroParisTech et directeur de l'Inrae-AgroParisTech Centre for Molecular and Physical Gastronomy. Il est membre de l'Académie d'agriculture de France.

Note de recherche

Analyse protéomique des graines de *Psychotria gabriellae* (Baill.) Guillaumin, une plante endémique de la Nouvelle-Calédonie, en relation avec la tolérance au nickel

Charly Zongo^{1,§,‡}, Matthieu Villegente^{1,§}, Laurence Le Pessot², Claudette Job², Jean-Marc Strub^{3,4}, Alain Van Dorselaer^{3,4}, Christine Schaeffer-Reiss^{3,4}, François Bernier⁵, Anne Berna⁵, Maya Belghazi⁶, Marie-Agnès Jacques⁷, Hamid Amir¹, Valérie Burtet-Sarramegna^{1,*}, Jacques Rabier⁸, Bruno Fogliani^{1,9,*}, Dominique Job^{2,*}

¹ Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement (LIVE – EA 4243), Université de la Nouvelle-Calédonie, Nouvelle-Calédonie

² Laboratoire mixte CNRS / Université Claude Bernard Lyon 1 / INSA / Bayer CropScience (UMR CNRS 5240), Lyon, France

³ Université de Strasbourg, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC – UMR CNRS 7178), Strasbourg, France

⁴ ProFI: Proteomic French Infrastructure, Strasbourg site (<http://www.profi-proteomics.fr/>)

⁵ Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (UPR CNRS 2357), Strasbourg, France

⁶ Centre d'Analyse Protéomique de Marseille (CAPM), Faculté de Médecine, Marseille, France

⁷ Institut de Recherche en Horticulture et Semences (UMR 1345 IRHS), INRA, AGROCAMPUS-Ouest, Université d'Angers, SFR 4207 QUASAV Beaucouzé, France

⁸ Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (IMBE, UMR Université Aix Marseille / CNRS 7263 / IRD 237 / Avignon Université), Marseille, France

⁹ Institut Agronomique néo-Calédonien (IAC), « Diversités biologique et fonctionnelle des écosystèmes terrestres », Païta, Nouvelle-Calédonie.

§ Contributions égales

‡ Cet article est dédié à la mémoire de Charly Zongo

* Correspondance : job.dominique@gmail.com ; vandors@unistra.fr ; valerie.sarramegna@univ-nc.nc ; fogliani@iac.nc

Contributions des auteurs :

Conception de l'étude : DJ, BF, VS, AVD

Réalisation des expériences : CZ, MV, LP, CJ, HA, MAJ, JR

Spectrométrie de masse : JMS, AVD, CSR, MB

Production des anticorps : AB, FB

Rédaction de l'article : tous les auteurs, coordination DJ

Abréviations :

ABC, ATP Binding Cassette, cassette de fixation à l'ATP ; BLAST, basic local alignment search tool ; CHAPS, (3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate) ; DTT, 1,4-dithiothréitol ; GLP, Germin-like protein ; HIV, human immunodeficiency virus, virus de

Note de recherche

l'immunodéficience humaine ; HPBP, Human phosphate binding protein ; LC, chromatographie liquide ; Ma, million d'années ; MS, spectrométrie de masse ; ORF, Open Reading Frame, cadre de lecture ouvert ; PCR, Polymerase Chain Reaction, Réaction en chaîne par polymérase ; protéines LEA, Late Embryogenesis Abundant proteins, protéines abondantes de l'embryogenèse tardive ; ROS, reactive oxygen species, espèces réactives oxygénées ; TCA, acide trichloracétique

Résumé

La Nouvelle-Calédonie possède une flore riche et diverse. Sa forte endémicité en plantes vasculaires (75,1 %) résulte en partie de l'origine gondwanienne de la flore et de la forte pression de sélection exercée par les sols ultramafiques, riches en éléments traces métalliques, dont le nickel. Si cet élément fait la richesse de l'archipel par son exploitation minière, cette dernière, ainsi que l'anthropisation du territoire, engendrent une détérioration des écosystèmes. Dans le cadre de la dynamique mondiale de conservation, de protection et de restauration de la biodiversité, il convient de caractériser au mieux la flore néo-calédonienne. Cette caractérisation passe notamment par l'étude des graines de cette flore, puisque ces dernières sont à la fois un des points clés du succès de la conquête de la planète par les plantes et un outil indispensable à la restauration écologique. Notre étude s'est attachée à caractériser par une approche biochimique la biologie des graines d'une plante endémique exceptionnelle, *Psychotria gabriellae*, une des plantes au monde contenant le plus de nickel dans ses feuilles. L'étude du protéome des graines de *P. gabriellae* (Baill.) Guillaumin a révélé la présence de protéines particulières nommées DING, notamment impliquées dans l'homéostasie d'éléments minéraux via leur interaction avec des transporteurs de type ABC (*ATP-binding cassette*) ou encore par séquestration du phosphore. Leur identification est corrélée avec l'observation d'un gradient de

nickel dans la graine, et une co-localisation du nickel et du phosphore dans la partie externe de l'albumen, visant probablement à protéger l'embryon du caractère toxique de ce dernier (Zongo, 2010). Toutefois l'origine eucaryotique des protéines DING reste mystérieuse du fait de l'absence de gènes codant de telles protéines dans les génomes séquencés d'eucaryotes. Pour répondre à cette question, nous avons cherché à identifier la présence de bactéries dans la graine mature sèche. Plusieurs bactéries endophytes de graine ont été identifiées, mais aucune d'entre elles ne semble produire de protéines DING. Le rôle de ces protéines DING dans la physiologie de la graine de *P. gabriellae* et dans l'adaptation au nickel est discuté. Ces résultats permettent d'approfondir les mécanismes impliqués dans la mise en place de l'hyper-accumulation de nickel dans les plantes, mécanismes qui pourront un jour se révéler utiles pour répondre à des questions de phytoremédiation ou de phytoextraction d'éléments-traces métalliques.

Abstract

New Caledonia possesses one of the world's richest, diverse and unique flora, and it is recognized as a biodiversity hotspot. Its high endemism in vascular plants (75.1 %) is partly due to the Gondwanan origins of its flora and to the high speciation induced by the ultramafic soils, which are rich in heavy metals, including nickel (and poor in essential nutrients, especially N, P, K). If this element is the source of the country richness, its mining exploitation and human colonization of the land induce ecosystems degradation. For these two main reasons, the study and comprehension of the new Caledonian flora is essential to be able to preserve, protect and restore its rich biodiversity. Preservation and restoration both depend on seeds. They are the unit of dispersal of higher plants, and are hence probably responsible of their world domination on flora. In the present work, we focused our study on the biochemical

Note de recherche

characterization of the seeds of *Psychotria gabriellae* (Baill.) Guillaumin, one of the world most nickel hyperaccumulating plant.

A proteomics characterization of the seed revealed a high representation of DING proteins that are known to be involved with ABC (ATP-binding cassette) type transporters or to bind phosphorus. This observation was associated with the presence of a nickel gradient inside the seed, presumably being established in order to protect the embryo from its toxicity. However, the existence of genes encoding these proteins remains a subject of discussions. To address this question we assessed the existence of bacteria in the dry mature seeds of *Psychotria gabriellae*. Endophytic bacteria were identified but none of them seems to produce such proteins.

This work will allow a better understanding of the mechanisms involved in nickel hyperaccumulation, and may highlight novel tools for phytoremediation or phytoextraction of heavy metals..

Keywords

seeds, proteomics, nickel, hyperaccumulation, *Psychotria gabriellae*, New Caledonia, DINGGG

Mots clefs

graines, protéomique, nickel, hyperaccumulation, *Psychotria gabriellae* (Baill.) Guillaumin, Nouvelle-Calédonie, DINGGG

Introduction

Dans l'archipel de Nouvelle-Calédonie, la plus grande île, la Grande-Terre (Figure 1), s'est détachée du Gondwana il y a environ 83 millions d'années (Ma) suite à l'ouverture de la Mer de Tasman. Ce mouvement, lié à la tectonique des plaques, et qui a abouti à la position actuelle de l'archipel a été marqué par



Figure 1. Répartition des populations de *Psychotria gabriellae* étudiées sur la Grande-Terre de Nouvelle-Calédonie. Monts Koghi - Dumbéa (longitude, 166.508 ; latitude - 22.176), Forêt Desmazures - Mont-Dore (longitude, 166.624 ; latitude, -22.192), Nétéa - Poya (longitude, 165.200 ; latitude, - 21.231).

des événements géologiques prédominants. Au cours de cette dérive, la Grande-Terre a subi une période d'immersion d'environ 20 Ma (65-45 Ma), provoquant l'accumulation de nombreux sédiments (Grandcolas *et al.*, 2008) notamment pélagiques, ce qui témoigne des fortes profondeurs de l'immersion (Cluzel *et al.*, 2012).

La subduction de la Grande-Terre sous la plaque Pacifique a ensuite été associée à un événement majeur d'obduction. L'orogénèse a donc commencé par le charriage d'une partie de la lithosphère océanique sur la Grande-Terre. La Nouvelle-Calédonie est ainsi un des complexes ophiolitiques les plus importants au monde (Pelletier, 2007). La mise en place de ce complexe est à l'origine

Note de recherche

des sols dits ultramafiques¹. Finalement l'émersion de la Grande-Terre, la situant dans sa position actuelle, est estimée à 37 Ma (Pelletier, 2007). L'érosion post-émersion a permis la réapparition de la multitude des sols de l'île, ainsi que son relief. Les roches ultramafiques recouvrent aujourd'hui un tiers de la surface de la Grande-Terre, sols peu propices au développement des plantes. En effet, les teneurs en azote, phosphore et potassium y sont faibles, alors que les teneurs en nickel, chrome, cobalt, manganèse, etc. y sont élevées et la biodisponibilité de l'eau est faible (L'Huillier *et al.*, 2010).

La nature de ces sols semble avoir joué un rôle primordial dans l'évolution de la flore de la Grande-Terre (Isnard *et al.*, 2016). D'une part, les espèces australasiennes présentes rapidement après l'émersion ont pu s'adapter à ces sols, leur créant ainsi une niche écologique et les séparant des autres espèces tropicales plus compétitives, mais non adaptées. D'autre part, l'induction d'une forte pression de sélection a abouti à la richesse actuelle (Jaffré *et al.*, 1994). La Nouvelle-Calédonie fait ainsi partie des dix plus importants hot-spots mondiaux en termes de biodiversité (Myers *et al.*, 2000 ; Mittermeier *et al.*, 2004 ; Wulff *et al.*, 2013 ; Gâteblé, 2015), avec en particulier un taux d'endémicité en plantes vasculaires de 75,1 % pour 3389 espèces répertoriées au total (Munzinger *et al.*, 2016).

Certains métaux de transition (Ni, Fe, Mn et Cu) sont des composants intrinsèques de certaines enzymes et protéines et sont ainsi essentiels à la survie des organismes vivants (Brown *et al.*, 1987). Le nickel peut en effet se

¹ Les roches ultramafiques ont pour origine la partie supérieure du manteau terrestre et contiennent de fortes quantités de Mg et de Fe. En effet, plus de 70 % de leurs minéraux sont ferromagnésiens, ce qui explique le terme d'ultra (beaucoup)-ma (magnésium)-f (fer)-ique. Les éléments minéraux sidérophiles tels Fe, Co, Cr et Ni sont en fortes quantités dans ces roches. En revanche, les éléments Ca, N, P et K sont en faibles quantités, peut-être en raison de leur faible affinité avec les minéraux ferromagnésiens.

lier à diverses enzymes comme cofacteur indispensable à leur activité (Vignais et Colbeau, 2004), comme c'est le cas avec l'uréase (EC 3.5.1.5) (Eskew *et al.*, 1984 ; Seregin et Kozhevnikova, 2006 ; Yusuf *et al.*, 2011 ; Sharma et Dhiman, 2013). Présente chez les bactéries, les levures et certaines plantes, cette enzyme est indispensable à la dégradation de l'urée, qui devient toxique quand elle n'est pas éliminée. En particulier, une forme de l'uréase des plantes est exprimée spécifiquement et abondamment dans l'embryon des graines (soja (*Glycine max*), *Arabidopsis*) (Sirko et Brodzik, 2000). D'autres observations indiquent, de surcroît, que le nickel appliqué à faible dose stimule la germination du riz, du blé, ou du soja, notamment en activant certaines enzymes. Cependant les mécanismes moléculaires de cette régulation germinative restent à éclaircir (Seregin et Kozhevnikova, 2006 ; Yusuf *et al.*, 2011).

Néanmoins les propriétés physicochimiques des métaux de transition en font également de redoutables ennemis moléculaires à forte concentration. En effet, en se fixant aux groupes carboxyles, imidazoles, sulfhydriles et aux amines aliphatiques des protéines, ils engendrent des modifications de la structure tridimensionnelle de ces macromolécules pouvant altérer, voire inhiber, leur activité biochimique (Seregin et Kozhevnikova, 2006 ; Yusuf *et al.*, 2011 ; Sharma et Dhiman, 2013). Dans ce cadre, il a été démontré que le nickel provoque une diminution de l'activité d'enzymes telles que la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (EC 4.1.1.39), la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (EC 1.2.1.12), ou encore l'aldolase (EC 4.1.2.13) pour n'en citer que quelques unes à titre illustratif, probablement via une interaction avec les groupes -SH ou les résidus d'histidine de ces protéines (Seregin et Kozhevnikova, 2006). L'inactivation d'enzymes impliquées dans les chaînes de transfert d'électrons peut notamment aboutir à la production d'espèces

Note de recherche

activées de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) (Sharma et Dietz, 2009). Ainsi, lors d'un stress nickélique, la plupart des enzymes de détoxification cellulaire sont activées ou réprimées (Sirhindi *et al.*, 2016 ; Takur et Sharma, 2016).

Afin de faire face à ces contraintes édaphiques et, plus particulièrement, aux quantités importantes de nickel dans les sols, les espèces de la flore ultramaïique ont développé des mécanismes adaptatifs qui leur permettent de croître sur ces types de milieux. Gaspar *et al.* (2002) discutent l'existence de deux principaux types de réaction physiologique aux stress métallifères, une réaction de tolérance et une réaction d'exclusion.

Concernant la réaction de tolérance, Brooks *et al.* (1977) ont défini deux classes d'espèces selon leurs facultés à tolérer des concentrations importantes en nickel. Ainsi les espèces accumulatrices ont des concentrations en nickel comprises entre 100 et 1000 mg Ni/kg de matière sèche, alors que les espèces hyper-accumulatrices présentent des concentrations en nickel supérieures à 1000 mg Ni/kg de matière sèche. Une troisième classe fut en outre créée pour les plantes contenant plus de 10000 mg de nickel par kg dans leurs feuilles, les plantes hyper-nickelophores (Jaffré et Schmid, 1974 ; Sagner *et al.*, 1998 ; Boyd et Jaffré, 2009 ; Callahan *et al.*, 2012).

Les mécanismes physiologiques régissant l'hyper-accumulation de nickel sont encore mal compris. La plante doit être capable d'absorber l'ion métallique, de le transporter et de le stocker sous une forme non toxique pour la cellule, généralement sous une forme complexée à un ligand (Kersten *et al.*, 1980 ; Reeves et Baker, 1984 ; Callahan *et al.*, 2012). Les zones de stockage les plus probables sont la paroi végétale, le cytosol et la vacuole (Clemens *et al.*, 2002).

L'hyper-accumulation aurait une signification écologique importante, et plusieurs hypothèses ont été formulées pour l'expliquer. Elle permettrait de protéger la plante des herbivores et des attaques

fongiques (Davis *et al.*, 2001 ; Hanson *et al.*, 2004), bien que certains insectes semblent avoir développé des stratégies de tolérance au nickel (Boyd *et al.*, 2006).

L'hyper-accumulation dans les feuilles pourrait également provoquer un enrichissement localisé de l'élément métallique autour de la plante, lorsque les feuilles sénescentes chutent au sol. La plante augmenterait ainsi localement la concentration en nickel au niveau du sol, limitant la germination et le développement d'autres espèces moins tolérantes (Boyd, 2004 ; Zhang *et al.*, 2007).

Au plan moléculaire des progrès récents ont été enregistrés. Ainsi, il a été montré que chez l'hyper-accumulateur endémique des sols ultramaïiques de Nouvelle-Calédonie, *Psychotria gabriellae* (Baill.) Guillaumin, antérieurement désigné *Psychotria douarrei* (*Rubiaceae*) (Barrabé *et al.*, 2013), le transporteur de métal tonoplastique PglREG1 était très vraisemblablement impliqué dans la très grande tolérance de cette plante envers le nickel. Cette étude a, en particulier démontré que l'expression ectopique de PglREG1 augmente la tolérance au nickel de la levure et de plantes transgéniques (Arabette des dames ou Arabette de Thalius ; *A. thaliana*) (Merlot *et al.*, 2014).

La Nouvelle-Calédonie possède, avec Cuba, la plus grande concentration au monde d'espèces hyperaccumulatrices de nickel (Reeves, 1992 ; Brooks *et al.*, 1998). Les deux cas les plus connus sont *Pycnantha acuminata* (*Sapotaceae*), dit arbre à sève bleue ou arbre à nickel, dont le latex de couleur bleu-vert peut contenir jusqu'à 25 % de son poids en nickel (Perrier *et al.*, 2004), et *P. gabriellae* dont les feuilles peuvent contenir jusqu'à 4,7 % (par rapport à la matière sèche) de nickel (Jaffré et Schmid, 1974 ; Callahan *et al.*, 2012), en accord avec d'autres résultats chez *P. grandis*, une espèce hyperaccumulatrice de nickel native de Puerto Rico (McAlister *et al.*, 2015).

La caractérisation minérale de plantes de *P.*

Note de recherche

gabriellae se développant sur un sol contenant environ 4000 mg Ni/kg a montré que les racines, tiges, feuilles et graines contiennent respectivement 3000, 9800, 18000 et 9300 mg Ni/kg, confirmant ainsi le caractère hypernickelophile de l'espèce (Zongo, 2010). Une approche de microscopie électronique a révélé l'existence d'un gradient de nickel dans la graine. Ce gradient semble concentrer le métal dans les parties externes de la graine, le nickel étant très peu présent au voisinage immédiat de l'embryon (Zongo, 2010), suggérant l'existence d'un mécanisme particulier de protection de l'embryon envers la toxicité du métal.

Grâce à la puissance des technologies post-génomiques actuelles, il est maintenant possible d'analyser finement, et de manière globale, les mécanismes moléculaires qui contrôlent les différentes étapes du développement de la plante. Dans le cas des graines, l'activité transcriptionnelle n'est pas nécessaire pour l'accomplissement de la germination des graines d'*A. thaliana*, alors que l'activité traductionnelle est essentielle, mettant en évidence l'importance des protéines stockées dans les graines matures ou synthétisées *de novo* à partir des ARNm stockés pour la germination (Rajjou *et al.*, 2004, 2012 ; Galland *et al.*, 2014).

Par conséquent, la protéomique (Wilkins, 2009) est particulièrement bien adaptée pour étudier les mécanismes des processus de développement des graines (Miernyk et Hajduch, 2011 ; Corbineau, 2012 ; Rajjou *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2015). En outre, le développement massif d'outils pour les approches protéomiques fournit une multitude de données permettant l'étude du protéome, même pour les espèces pour lesquelles la séquence du génome n'est pas encore établie (Bradshaw et Burlingame, 2005 ; Castellana *et al.*, 2008 ; Gallien *et al.*, 2009 ; Rabilloud *et al.*, 2010 ; Schulze et Usabel, 2010 ; Nesvizhskii, 2014 ; Faini *et al.*, 2016).

Pour ces raisons, une approche d'analyse protéomique a été développée au cours de ce

travail afin de mettre en évidence des protéines qui pouvaient être potentiellement impliquées dans un tel mécanisme de tolérance au nickel dans les graines.

Matériels et Méthodes

Matériel végétal et récolte des graines :

Le site d'étude principal des collectes de graines de *P. gabriellae* (Baill.) Guillaumin a été la forêt humide du Mont Koghi (Grande-Terre, Nouvelle-Calédonie), où ces plantes se développent sur un sol ultramafique (Figure 1).

Un suivi mensuel des plants a été réalisé afin de suivre le développement des fruits pour assurer une récolte des graines au meilleur moment, c'est-à-dire lorsqu'elles atteignent leur stade final de maturité. Les graines ont été récoltées à plusieurs stades de développement afin d'étudier l'évolution du protéome : le stade 1, pour lequel les téguments sont encore photosynthétiquement actifs (Nakajima *et al.*, 2012) ; le stade 2, montrant des graines dures et séparables du fruit et chez lesquelles les chlorophylles commencent à être dégradées (Johnson-Flanagan et McLachlan, 1990) ; le stade 3, où les graines sont capables de germer et où les chlorophylles sont complètement dégradées ; et le stade 4, pour lequel la pulpe est riche en pigments de type caroténoïdes ou flavonoïdes impliqués dans l'aptitude à la conservation et la survie à l'état sec des graines (Lepiniec *et al.*, 2006).

Par ailleurs, deux autres populations de *P. gabriellae* ont également été étudiées (Figure 1). Après récolte les fruits ont été placés dans des sachets en papier le temps du transport jusqu'au laboratoire. Ils ont ensuite été dépulpés manuellement et les graines ainsi obtenues ont été séchées à l'air ambiant et à la lumière pendant 3 à 4 h, le temps que

Note de recherche

l'endocarpe redevient sec. Les graines ont ensuite été conservées à + 4 °C dans des tubes hermétiques en plastique (Greiner Bio-One – CellStar – 227.261).

Des graines de *P. baillonii* Schltr. (famille des Rubiaceae) ont également été récoltées au Mont Koghi (Figure 1), dans les mêmes conditions que ci-dessus.

Bactéries endophytes de *Psychotria gabriellae* :

Pour caractériser les bactéries naturellement présentes chez les graines matures de *P. gabriellae*, les bactéries non endophytes, mais présentes à la surface des graines, ont été éliminées par incubation pendant 5 min dans une solution d'eau distillée stérile contenant 5 % d'hypochlorite de sodium sous agitation. Les graines ont ensuite été rincées trois fois pendant 5 min dans des bains d'eau distillée stérile. Les graines désinfectées ont ensuite été broyées à l'aide d'un pilon et d'un mortier stériles, sous hôte à flux laminaire vertical. Le broyat de cinq graines ainsi obtenu a alors été remis en suspension dans 10 mL d'eau distillée stérile. Puis le mélange a été agité avec un agitateur mécanique à bras (Bioblock Scientific, Agitest 86212) pendant 5 min à 7 Hz. Une dilution au dixième du mélange obtenu a ensuite été réalisée dans de l'eau distillée stérile.

Des milieux riches ont été utilisés pour isoler les micro-organismes, par exemple les milieux « viande-foie » (Bio-Rad – 64564) et « malt glucosé » (Panreac - 403690.1210) pH 6,0. Les bactéries ont été isolées à partir de 200 µL des deux dilutions étalées sur des boîtes de Pétri (diamètre 8 cm) remplies de milieu de culture puis incubées à 28 °C à l'obscurité.

L'apparition de colonies a été observée quotidiennement. Les souches bactériennes ainsi obtenues ont ensuite été conservées à – 80 °C dans des tubes Microbank™ (Pro-Lab diagnostic – PL.170/M).

Le séquençage du gène codant la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal a été réalisé chez les souches bactériennes isolées par l'entreprise

Macrogen en Corée (<http://www.macrogen.com/eng/>). Les colonies ont été récupérées avec un cure-dent stérile, et mises en suspension dans une solution saline stérile. Après centrifugation, les culots ont été repris dans la matrice InstaGene (Bio-Rad, USA), incubés à 56 °C pendant 30 min, puis chauffés à 100 °C pendant 10 min. Les amorces suivantes ont été utilisées pour la réaction de PCR (*Polymerase Chain Reaction* ; Réaction en chaîne par polymérase) : 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') et 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'). Les séquences obtenues ont ensuite été identifiées par alignement avec l'algorithme BLAST² (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Dans une autre approche, nous avons extrait l'ADN de graines matures sèches de *P. gabriellae* et directement recherché la présence de bactéries par séquençage de l'ARN 16S, comme décrit (Jacques *et al.*, 2012). Les graines de *P. gabriellae* ont été macérées pendant 12 h à 4 °C sous agitation puis le macérât a été porté à ébullition pendant 10 min où l'ADN a été extrait avec un kit commercial. L'ADN 16S a ensuite été amplifié par PCR à l'aide des amorces universelles A1 (5'-GAGTTTGATCATGGC TCAG-3') et B6 (5'-TTGCGGGACTTAACCC AACAT-3') puis séquencé.

Préparation des extraits protéiques :

L'endocarpe des graines (*P. gabriellae* et *P. Baillonii* ; environ 50 graines, trois réplicats) a été ôté, et les graines ont été placées à la température de – 80 °C pendant 20 min avant un broyage fin avec un broyeur à billes, chaque tube de broyage contenant deux billes

2 BLAST (acronyme de *basic local alignment search tool*) : méthode de recherche heuristique utilisée en bio-informatique permettant de trouver les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences de nucléotides ou d'acides aminés et de réaliser un alignement de ces régions homologues.

Note de recherche

en acier inox (Retsch, MM 301) pendant 2 min à pleine puissance (30 Hz). Le broyat obtenu a ensuite été lyophilisé toute la nuit, placé dans des tubes scellés, pesé, puis mélangé avec de l'eau Milli-Q (Merck-Millipore) contenant des inhibiteurs de protéases (Roche complete – 1 pastille pour 10 mL) à raison de 1 mL pour 250 mg de broyat. Après agitation pendant 15 min en chambre froide, la suspension a été centrifugée (Sigma type 3K30) pendant 15 min à 15000 *g* à 4 °C, puis le surnageant contenant les albumines (Osborne, 1924) a été récupéré. Le culot a alors été de nouveau solubilisé avec du NaCl 0,5 M à raison de 1 mL de solution pour 250 mg de broyat, sous agitation pendant 15 min en chambre froide. Après centrifugation (15000 *g* ; 15 min ; 4 °C), le surnageant contenant les globulines (Osborne, 1924) a été recueilli.

La troisième extraction a été réalisée comme les deux précédentes, mais avec un mélange éthanol / eau (70 / 30). Le surnageant obtenu contenant les prolamines (Osborne, 1924) a été récupéré, le culot lavé trois fois avec de l'éthanol 70 % puis solubilisé dans une solution de NaOH à 0,2 % (p / v). Après centrifugation (15000 *g* ; 15 min ; 4 °C), le surnageant contenant les glutélines (Osborne, 1924) a été récupéré.

Pour concentrer les protéines et éliminer des contaminants pouvant interférer avec l'électrophorèse (par exemple, polyphénols, lipides) les quatre fractions protéiques obtenues ont été précipitées pendant la nuit à – 20 °C après ajout d'un volume d'un mélange contenant acide trichloracétique (TCA) 20 % / acétone 80 % et 1,4-dithiothréitol (DTT) à 1 mM final. Après précipitation, les échantillons ont été centrifugés (15000 *g* ; 15 min ; 4 °C) puis les culots ont été lavés deux fois avec 500 µL d'une solution d'acétone contenant 1 mM de DTT. Les culots ainsi lavés ont été séchés sous hotte, puis repris dans un volume de tampon de réhydratation permettant d'obtenir une concentration finale en protéine d'environ 5 µg/µL.

Le tampon de réhydratation contenait de l'urée (7 M), de la thio-urée (2 M), du CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propane -sulfonate) à 4 % (m / v), 0,5 mL d'ampholytes 1 % (m / v), 1 mL de Triton 100X et de quelques gouttes de bleu de bromophénol afin de suivre le front de migration. Le DTT a été ajouté extemporanément (1 g / 50 mL de tampon).

Electrophorèse bidimensionnelle et révélation des protéines :

Les analyses électrophorétiques (2D-SDS-PAGE) ont été réalisées comme décrit par Catusse *et al.*, (2008) en utilisant des échantillons correspondant à environ 100 µg de protéine. Après une première migration électrophorétique selon leur charge (isoélectrofocalisation), les protéines ont été séparées selon leur masse moléculaire par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Pour chaque condition analysée, les gels 2D ont été réalisés en triplicata (réplications biologiques). Suite à la révélation des protéines par coloration au nitrate d'argent, l'analyse d'image des gels 2D numérisés a été réalisée avec le logiciel Image Master 2D Elite (Amersham Biosciences), comme décrit par Catusse *et al.* (2008).

Les protéines caractérisées dans ce travail ont été identifiées par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (nano LC-MS/MS). Les « spots » protéiques détectés sur les gels 2D (taches colorées sur les gels 2D) ont été excisés avec des embouts stériles et placés dans des tubes stériles de 1,5 mL. Chaque spot a été rincé, les protéines qu'ils contenaient réduites en présence de DTT (10 mM), alkylées en présence d'iodoacétamide (55 mM), et incubées pendant une nuit à 37 °C en présence de trypsine (12,5 ng / mL ; Promega V5111) comme décrit (Schevchenko *et al.*, 1996).

Les fragments tryptiques ont été extraits avec

Note de recherche

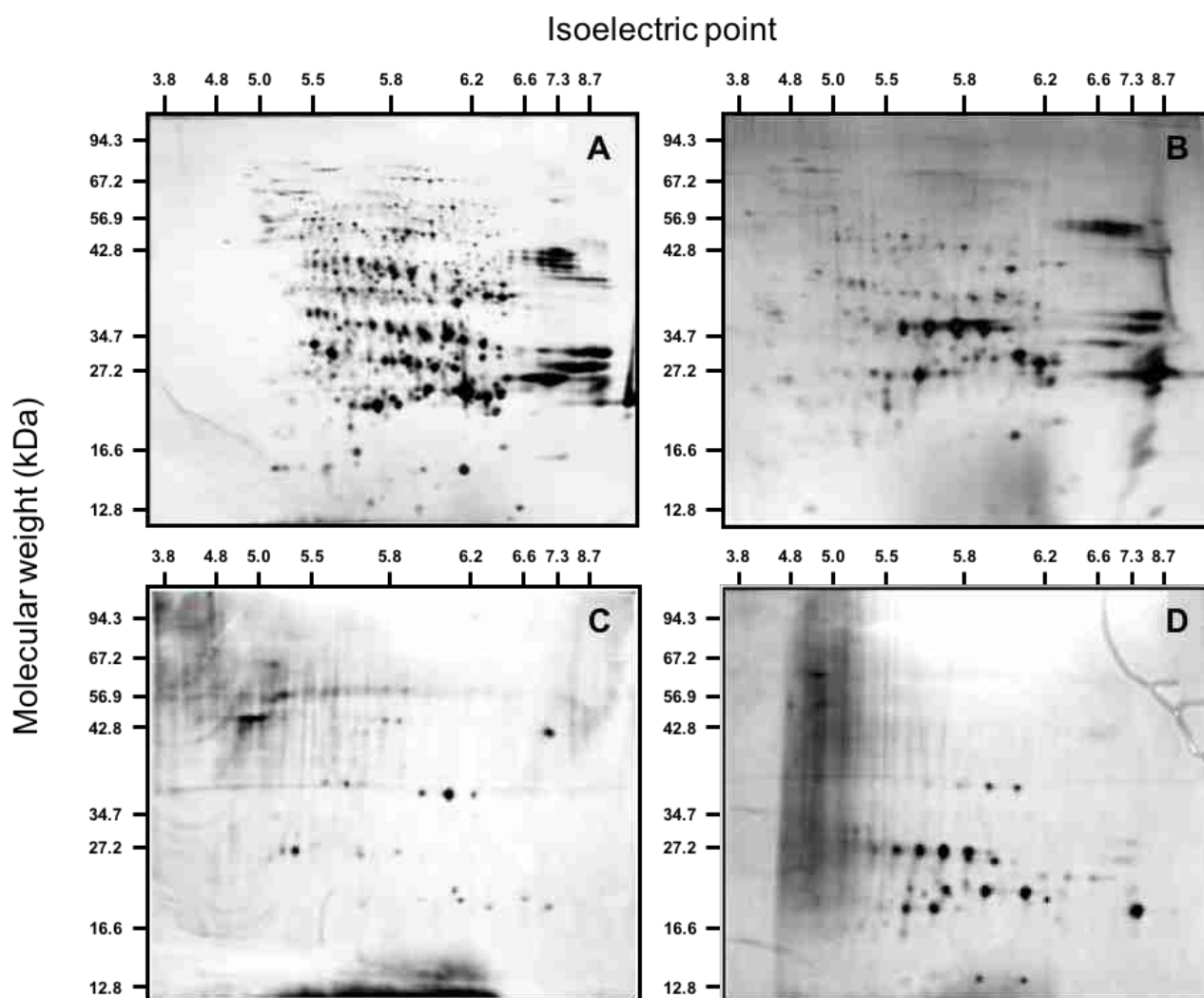


Figure 2. Protéome de la graine entière sèche de *Psychotria gabriellae*. Les différentes classes de protéines de graines (Osborne, 1924) ont été extraites des graines matures sèches de *P. gabriellae* (récoltées au Mont Koghi en 2006, 2009 et 2010 ; Figure 1), puis analysées par électrophorèse bidimensionnelle 2D-SDS-PAGE comme décrit dans les Matériels et Méthodes. A : fraction albumines, B : fraction globulines, C : fraction prolamines, D : fraction glutélines.

un mélange H₂O / acétonitrile (40 / 60 ; v / v) acidifié par l'acide formique (0,1 % ; v / v). Les extraits peptidiques ont ensuite été analysés par nano LC-MS/MS (Catusse *et al.*, 2008). L'ensemble des données de MS/MS a été exploré par le moteur de recherche Mascot (<http://www.matrixscience.com>) de la banque

protéique non redondante de NCBIInr téléchargée sur le site de National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) en mai 2011.

Les protéines ainsi identifiées ont été classées fonctionnellement en utilisant la classification ontologique décrite par Bevan *et al.*, (1998).

Note de recherche

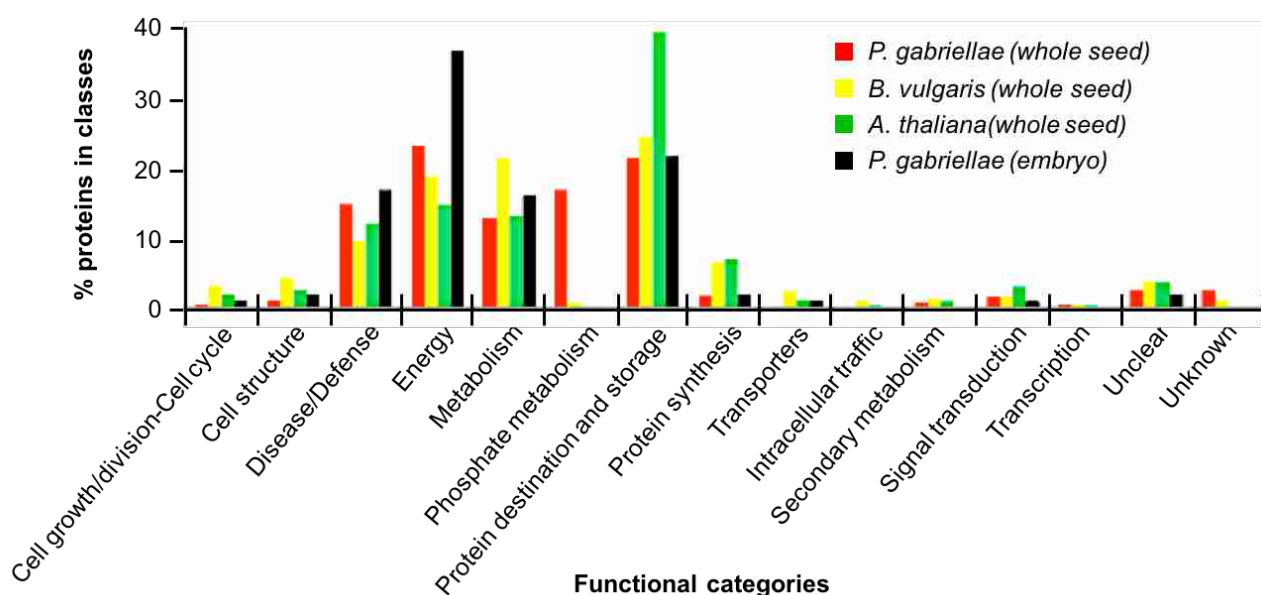


Figure 3. Classes fonctionnelles selon Bevan et al., (1998) des protéines de la fraction albumine caractérisées à partir de la graine entière ou de l'embryon isolé de *Psychotria gabriellae* (graines récoltées au Mont Koghi en 2006, 2009 et 2010 ; cf. Figure 1). Barres rouges : protéome de la fraction albumine des graines matures sèches entières de *P. gabriellae* (Tableau supplémentaire S1) ; barres jaunes : protéome de la fraction albumine des graines matures sèches entières de *B. vulgaris* (Catusse et al., 2008) ; barres vertes : protéome de la fraction albumine des graines matures entières d'*A. thaliana* (Galland et al., 2012, 2014) ; barres noires : protéome de la fraction albumine des embryons isolés des graines matures sèches entières de *P. gabriellae* (Tableau supplémentaire S1).

Western blotting :

Les protéines des échantillons de graines, séparées par migration SDS-PAGE en gels bidimensionnels ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose par un transfert semi-sec (Towbin et al., 1979).

Après incubation (1 h) des membranes de cellulose avec des anticorps anti-protéine DING de tabac (*Nicotiana tabacum*) (Perera et al., 2008), la révélation des Western Blots a été réalisée à l'aide du Kit « BM Chemiluminescence Blotting Substrate Roche » selon les instructions du fabricant (Roche Applied Science - 11500708001), en chambre noire, en plaçant les membranes dans la solution de révélation

additionnée du substrat de la peroxydase pendant 1 min. L'émission de la fluorescence a été enregistrée sur film photographique.

Résultats

Fractions protéiques des graines matures sèches de *Psychotria gabriellae* :

A partir de 50 graines représentant environ 1,8 g de matière fraîche, l'extraction des protéines selon Osborne (1924) conduit aux quatre fractions albumines, globulines, prolamines et glutélines. Les albumines correspondent aux protéines cellulaires solubles dans l'eau alors

Note de recherche

que les trois autres fractions contiennent essentiellement des protéines de réserve de la graine (Shewry *et al.*, 1995). Afin de caractériser le protéome des graines, ces quatre fractions ont été soumises à une électrophorèse 2D SDS-PAGE (Figure 2), puis à une identification des protéines contenues dans les spots par nano LC-MS/MS et recherche Mascot (cf. Matériels et Méthodes). Cela a permis l'identification de 599 albumines, de 40 globulines, de 13 prolamines et de 29 glutélines (Tableau supplémentaire S1).

Les albumines identifiées ont été associées à des catégories fonctionnelles en utilisant la classification ontologique de Bevan *et al.*, (1998), puis l'abondance des protéines dans ces catégories a été comparée avec celle obtenue pour les graines d'*A. thaliana* (Galland *et al.*, 2012, 2014) et de betterave à sucre (*B. vulgaris*) (Catusse *et al.*, 2008). En premier lieu, on peut noter que, globalement, le protéome de la graine mature sèche de *P. gabriellae* est très similaire à ceux de la graine de *B. vulgaris* (Catusse *et al.*, 2008) et d'*A. thaliana* (Galland *et al.*, 2012, 2014) (Figure 3). En effet, les principales composantes fonctionnelles du protéome des graines de ces deux plantes se retrouvent bien dans le protéome de la graine de *P. gabriellae*. Il s'agit notamment des catégories « Disease/Defence », « Energy », « Metabolism », « Protein destination and storage » qui sont les classes majoritaires chez les graines des trois espèces (Figure 3).

Malgré cette similitude globale des protéomes des graines de *P. gabriellae*, *B. vulgaris* et *A. thaliana*, un fait marquant concerne les protéines du métabolisme du phosphate qui sont exceptionnellement représentées chez les graines de *P. gabriellae* (Tableau supplémentaire S1 ; Figure 3). En effet, sur les 599 albumines caractérisées chez la graine mature sèche de *P. gabriellae*, 103 (17,2 %) d'entre elles interviennent dans le métabolisme du phosphate, ce qui représente 58 % des protéines du métabolisme (Tableau supplémentaire S1 ; Figure 3).

Fait plus remarquable encore, l'analyse par BLAST de cette classe fonctionnelle révèle que les 103 protéines identifiées appartiennent à une seule et même famille, les protéines nommées DING (Berna *et al.*, 2002, 2008 ; 2009a,b) (Tableau supplémentaire S1). Chez *P. gabriellae*, on retrouve ces protéines sous deux noms : la protéine *Germin-like-proteins* (GLP) *binding protein 1a* d'*A. thaliana* et la protéine p27SJ de millepertuis (*Hypericum perforatum*) (Tableau supplémentaire S1). Les protéines DING sont un ensemble de protéines bien conservées et largement distribuées (Berna *et al.*, 2002, 2009a,b), caractérisées par une séquence N-terminale de type DINGGG (aspartate-isoleucine-asparagine-glycine-glycine-glycine), d'où l'origine de leur nom (Berna *et al.*, 2002 ; Pantazaki *et al.*, 2008 ; Bernier, 2013).

Toutefois, leur origine chez les eucaryotes reste toujours à expliquer compte-tenu de l'absence de gènes codant ces protéines dans tous les génomes séquencés en entier d'espèces chez lesquelles des protéines DING ont été identifiées (Bernier, 2013).

Pour approfondir cette question, nous avons réalisé plusieurs expériences afin de mieux préciser leur présence et leur origine dans les graines de *P. gabriellae*. Les résultats sont présentés dans les paragraphes suivants.

Etude protéomique comparative des différents tissus des graines mures sèches de *Psychotria gabriellae* :

L'analyse du protéome de la graine entière a livré des indications sur l'existence de mécanismes nouveaux probablement impliqués dans la protection de l'embryon face au stress nickel. Pour mieux comprendre ces mécanismes, nous avons disséqué les graines entières pour isoler des fractions pures contenant uniquement l'albumen ou l'embryon.

Des électrophorèses 2D SDS-PAGE ont ensuite été réalisées sur les fractions

Note de recherche

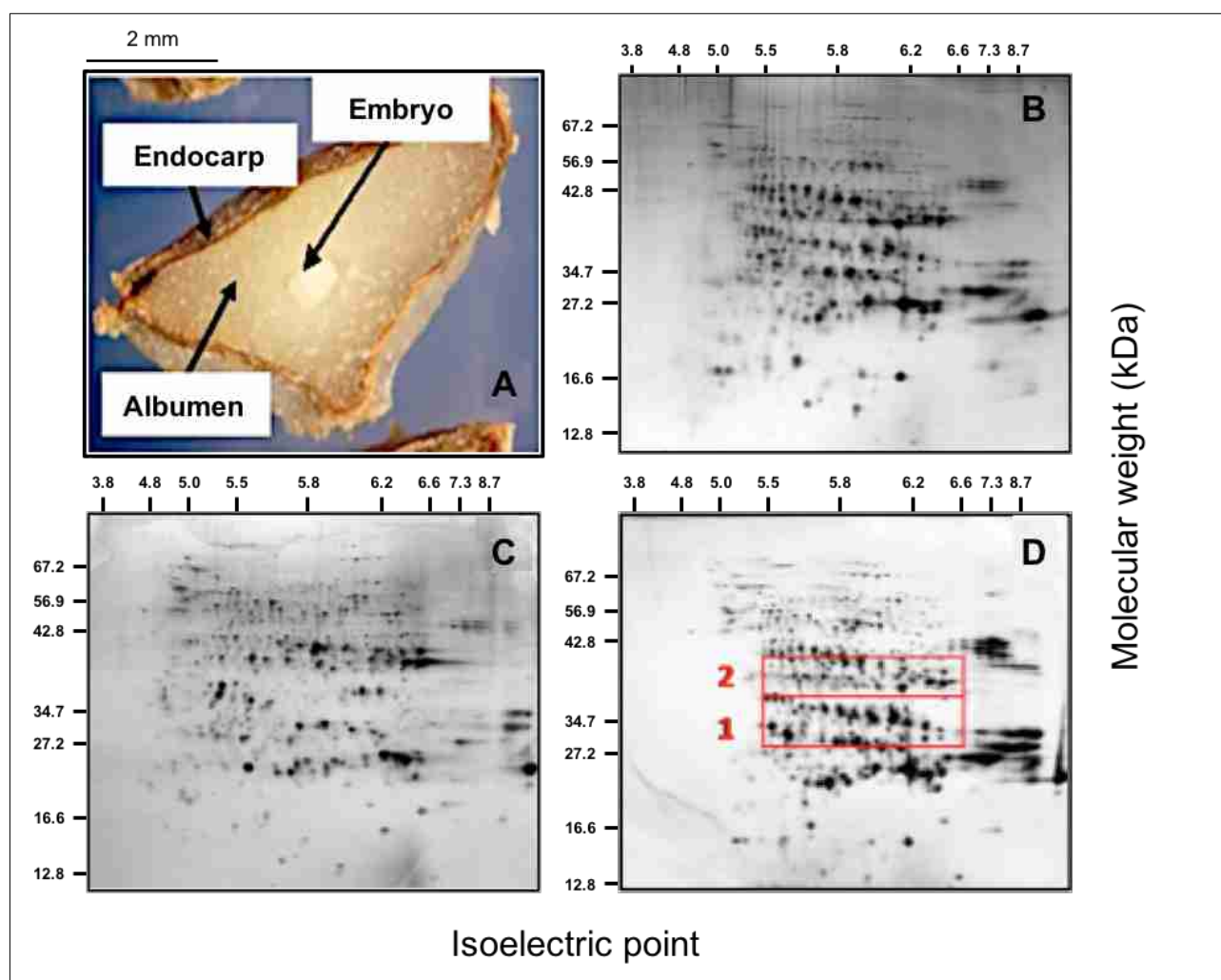


Figure 4. Comparaison tissulaire des différents profils de la fraction albumine de la graine mature sèche de *Psychotria gabriellae* (graines récoltées au Mont Koghi en 2006, 2009 et 2010 ; cf. Figure 1). A : coupe d'une graine montrant l'embryon zygotique (Embryo), le tissu de réserve triploïde (Albumen) et la partie interne du péricarpe (Endocarp) ; B : Albumines de l'albumen ; C : Albumines de la partie embryo ; D : Albumines de la graine entière. Les encadrés en rouge correspondent à des zones du gel 2D où les différences d'accumulation des protéines de l'albumen (et donc de la graine entière) et de l'embryo sont très visibles (notamment la zone 1).

protéiques de l'albumen et de l'embryo isolés (Figure 4) et les protéines contenues dans les spots ont été identifiées par nano LC-MS/MS suivie d'une recherche Mascot, comme décrit dans les « Matériels et Méthodes » (Tableau supplémentaire S1).

Les gels 2D de la Figure 4 montrent bien que le profil des albumines de l'embryo isolé est radicalement différent de celui de la graine entière principalement représentée par l'albumen. Nous avons identifié 106 albumines dans l'embryo (Tableau

Note de recherche

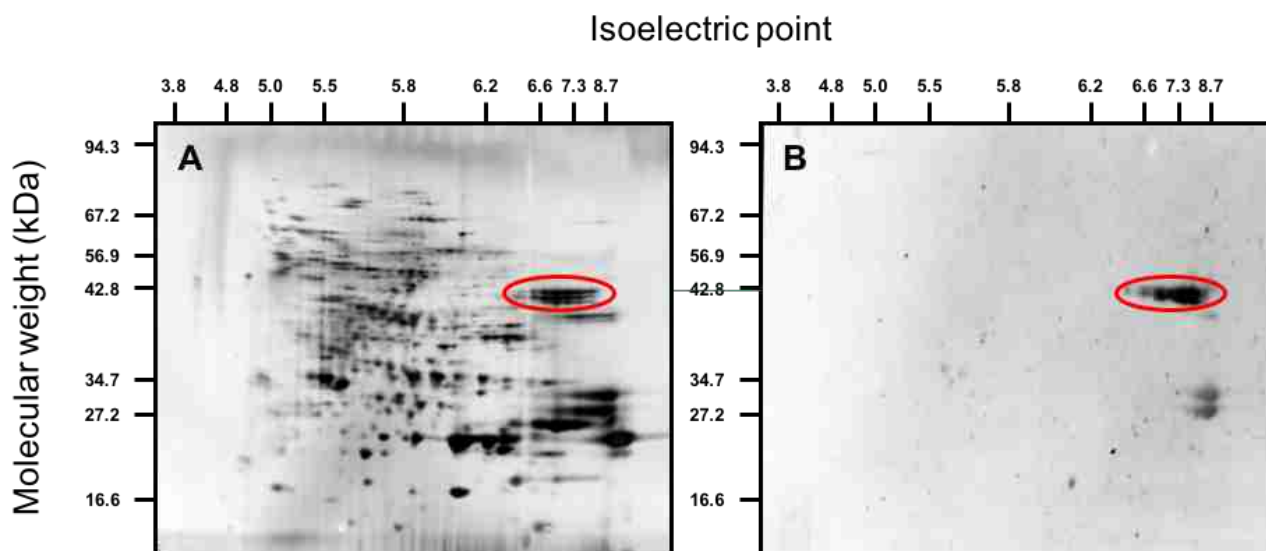


Figure 5. Caractérisation immunologique des protéines de la fraction albumine isolée des graines matures sèches entières de *Psychotria gabriellae* (graines récoltées au Mont Koghi en 2006, 2009, 2010 et 2011 ; cf. Figure 1). Gels d'électrophorèse bidimensionnelle (2D-SDS-PAGE) des fractions albumines des graines matures sèches de *P. gabriellae* colorés à l'argent (A) et après Western blot avec l'anticorps anti-DING de tabac (Perera et al., 2008) (B). Les spots protéiques de 40 kDa environ spécifiquement reconnus par l'anticorps anti-DING sont entourés par un ovale rouge.

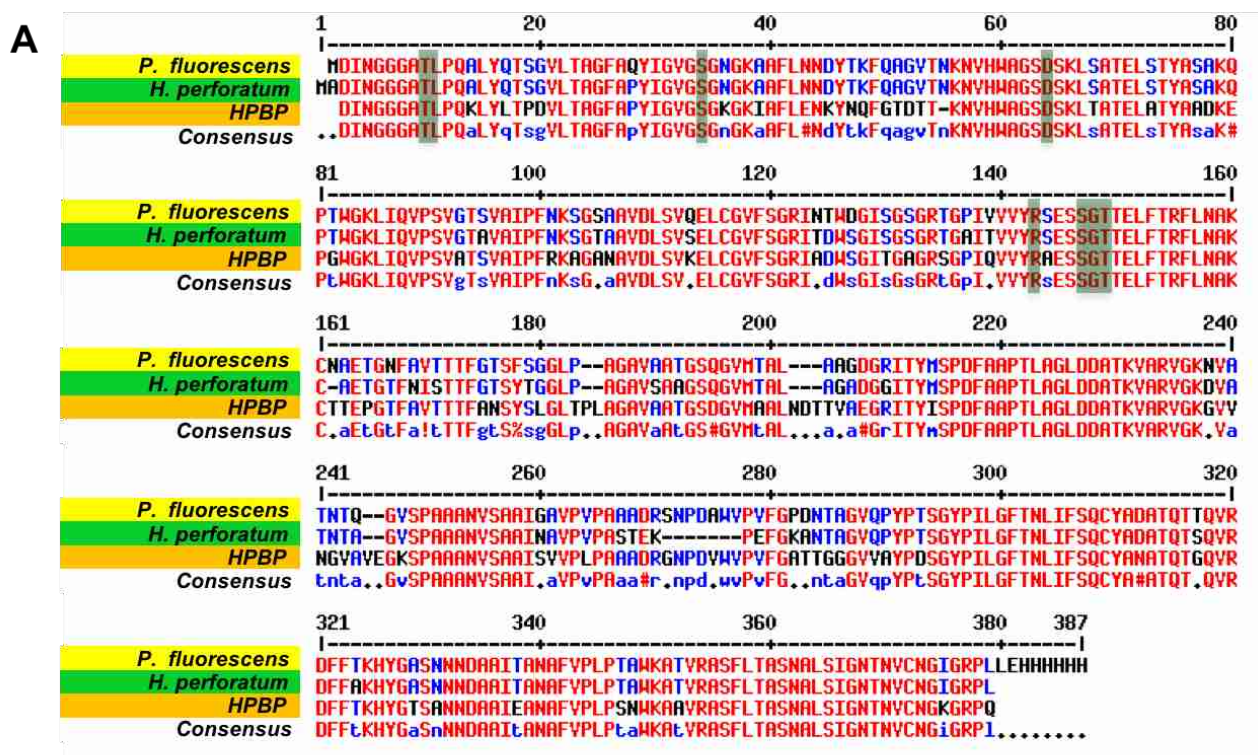
supplémentaire S1), dont la répartition en classes fonctionnelles est présentée dans la Figure 3. Les principales caractéristiques du protéome de l'embryon sont un nombre élevé de protéines dans la classe «Energy» et une totale absence des protéines du métabolisme du phosphate (*GLP-binding protein 1a* et *p27SJ*) (Figure 3 ; Tableau supplémentaire S1). Cette abondance accrue des enzymes de la production d'énergie dans l'embryon suggère l'existence d'un tissu métaboliquement très actif, prêt à enclencher les différents processus de la germination et de la croissance radriculaire. Par ailleurs, l'absence des protéines du métabolisme de phosphate (*GLP-binding protein 1a* et *p27SJ*) dans l'embryon (Figure 3 ; Tableau supplémentaire S1) renforce l'idée selon laquelle l'albumen procure à l'embryon une protection efficace envers le stress nickel. Ces résultats suggèrent ainsi que ce

mécanisme particulier de tolérance joue probablement un rôle prépondérant lors de la maturation de la graine pour assurer l'intégrité de l'embryon nécessaire à l'émergence d'une plantule vigoureuse à l'issue de la germination.

Analyses immunochimiques :

Nous avons cherché à confirmer la présence de ces protéines DING dans les graines de *P. gabriellae* en utilisant une approche immunochimique et en faisant appel au plus grand nombre de graines provenant de lieux et de dates de récoltes différents. Dans ces expériences fondées sur l'utilisation d'un anticorps dirigé contre une protéine DING de tabac (Perera et al., 2008), des graines récoltées au Mont Koghi (Figure 1) en 2006, 2007, 2009, 2010 et 2011, couvrant ainsi une période de six

Note de recherche



B >gi|190613370|pdb|2Q9T|A Chain A, High-Resolution Structure Of The Ding Protein From *Pseudomonas fluorescens*

MDINGGGATLPQALYQTSGLVLTAGFAQYIGVGSNGKAFLNNDYTKFQAGVTNKNVHWAGSDSKLSATELSTYASAKQPTWNGKLIQVPSVGTSAVAIPFNKSGSAAVDLSVQELCGVFSGRINTWDGISGSGRTGPIVVVYRSESSGTELFTRFLNAK
 CNAETGNFAVTTTTFTGTSFSGGLPAGAVAATGSQGVMTALAAGDGRITYMSPDFAAPTLAGLDDATKVARVGKNVATNTQGVSPAAANVSAARIQAVVPVPAADR
 SNPDAAWVVPFGPDNTAGVQPYPYTSGYPIILGFNTLIFSQCADATQTTQVRDFFTKHYGASNNNDAAITANAFVPLPTAWKATVRASFLTASNALSIGNTNCNGIGRPLLEHHHHHHH

Figure 6. Séquences peptidiques de diverses protéines DING. A : comparaison des séquences des protéines DING de *Pseudomonas fluorescens* (gi|190613370|pdb|2Q9T) ; masse moléculaire 38947,39 Da et pI 7,72), de millepertuis (*Hypericum perforatum* (P27SJ) ; gi|295687390|gb|AAW57408.2) ; masse moléculaire 36897,19 Da et pI 8,26) et humaine (Human Phosphate Binding Protein (HPBP) ; gi|152032648|sp|P85173.1) ; masse moléculaire 38533,31 Da et pI 7,77). Les alignements ont été générés avec le logiciel MultiAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). Les séquences en rouge sont les plus conservées. B : Les peptides expérimentaux obtenus ici à partir du spot DING majoritaire reconnu par l'anticorps anti-DING de tabac chez *Psychotria gabriellae* (poids moléculaire proche de 40 kDa, point isoélectrique moyen de l'ordre de 7,3 ; ovale rouge en Figure 5) ont été reportés sur la séquence de la protéine DING de *P. fluorescens* (gi|190613370|pdb|2Q9T). Elles sont indiquées en rouge (les données de masses sont accessibles auprès de la plate-forme de protéomique de Strasbourg Grand Est (jmstrub@unistra.fr)) et en surligné jaune (plate-forme protéomique de Marseille). Le taux de couverture de la protéine de *P. fluorescens* par ces peptides de *P. gabriellae* est de 53 %. Les acides aminés surlignés en vert en (A) et (B) sont les acides aminés conservés impliqués dans la liaison du phosphate (Berna et al., 2008).

Note de recherche

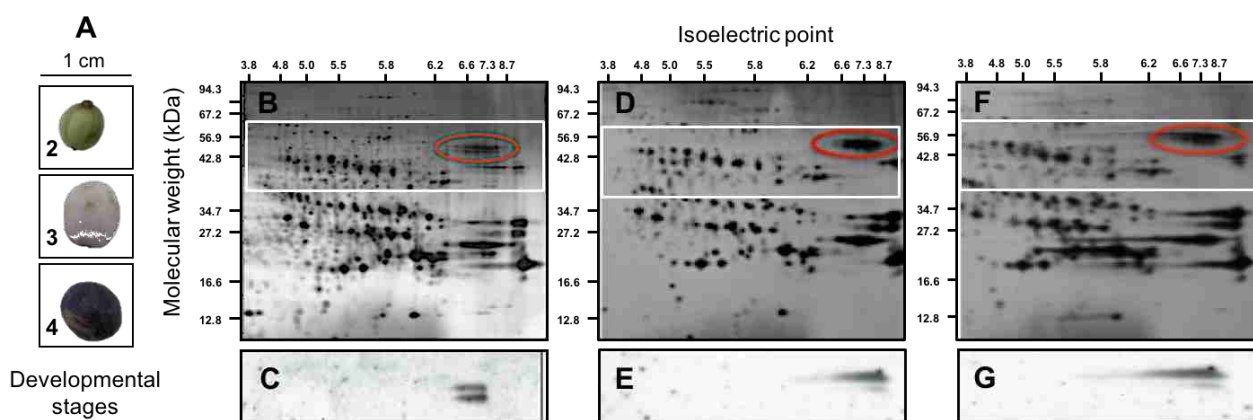


Figure 7. Protéome de la fraction albumines de la graine de *Psychotria gabriellae* à différents stades de développement de la graine (graines récoltées au Mont Koghi en 2011 ; cf. Figure 1). Les graines ont été récoltées à plusieurs stades de développement : le stade 1 (non montré) où les téguments sont encore photosynthétiquement actifs (Nakajima et al., 2012), le stade 2 présentant des graines dures et séparables du fruit et où les chlorophylles commencent à être dégradées (Johnson-Flanagan et McLachlan 1990), le stade 3 où les graines sont capables de germer et où les chlorophylles sont complètement dégradées, et le stade 4 pour lequel la pulpe est riche en pigments de type caroténoïdes ou flavonoïdes impliqués dans l'aptitude à la conservation et la survie à l'état sec des graines (Lepiniec et al., 2006). Après extraction de la fraction albumines des graines, les protéines ont été séparées par électrophorèse bidimensionnelle (2D-SDS-PAGE) comme décrit dans les Matériels et Méthodes. Le stade 1 n'a pu être étudié par analyse protéomique car les graines n'ont pu être extraites du fruit. A : stades de développement successifs utilisés pour l'analyse protéomique. B, D et F : coloration à l'argent des gels 2D obtenus avec ces fractions, respectivement pour les stades (2), (3) et (4). Les spots de 40 kDa environ reconnus par l'anticorps anti-DING de tabac (Perera et al., 2008) sont entourés d'un ovale rouge et la partie d'intérêt des westerns blots est présentée sous les photographies des gels.

années, ont été examinées pour leur contenu en protéine DING. De plus, des graines provenant de deux nouvelles populations, l'une récoltée au nord de la Grande-Terre, la population de Nétéa-Poya, et une autre récoltée au sud de la Grande-Terre, la population de la forêt Desmazures, ont également été utilisées (Figure 1).

Les *Western blots* obtenus à partir des fractions albumines ont permis la révélation d'un groupe de spots (poids moléculaire proche de 40 kDa, point isoélectrique moyen de l'ordre de 7,3 ; ovale rouge en Figure 5) spécifiquement reconnus par l'anticorps anti-

DING de tabac chez *P. gabriellae*. Ces caractéristiques de poids moléculaire et de point isoélectrique sont très proches de celles déterminées pour d'autres protéines DING isolées de bactéries, de plasma sanguin humain ou de plantes (Berna et al., 2008). L'analyse par spectrométrie de masse des protéines contenues dans les spots protéiques correspondant à la zone reconnue par l'anticorps a confirmé l'identification de protéines DING (Figure 6). Les peptides identifiés amènent à une couverture de 51 % de la séquence de la protéine DING de *Pseudomonas*

Note de recherche

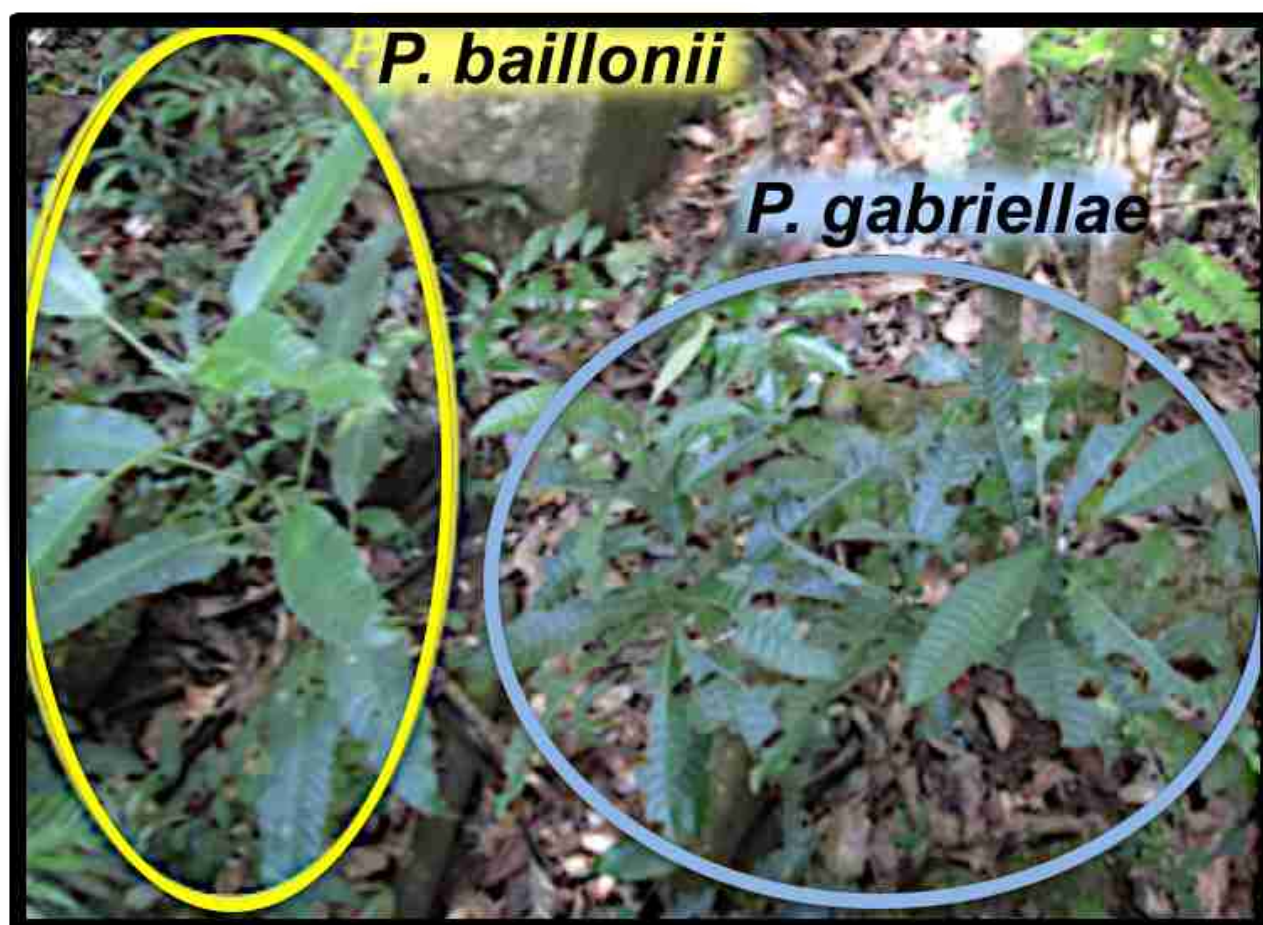


Figure 8. *Plants de Psychotria gabriellae et de Psychotria baillonii se développant côte à côte au Mont Koghi en Nouvelle-Calédonie. Plants de P. gabriellae (en bleu) et de P. baillonii (en jaune) en conditions naturelles. Pour la localisation du Mont Koghi, voir la Figure 1.*

fluorescens (Figure 6). De plus, plusieurs des acides aminés impliqués dans la liaison avec le phosphate ont été expérimentalement déterminés par analyse en spectrométrie de masse, et l'extrémité N-terminale contenant la séquence consensus DINGGG a été mise en évidence (Figure 6).

Par ailleurs, il importe de préciser que ces résultats ont été obtenus par deux plateformes de protéomique différentes (Strasbourg et Marseille), avec des expérimentateurs différents. Ces données permettent donc de conforter l'identification de la protéine DING chez *P. gabriellae* et de

rejeter la possibilité d'une contamination technique au moment du séquençage en spectrométrie de masse. Les mêmes résultats de réactivité de l'anticorps anti-DING de tabac ont été obtenus pour les graines des populations récoltées au Mont Koghi en 2006, 2007, 2009, 2010 et 2011 ainsi que pour les graines correspondant aux deux populations de la forêt Desmazure et de Nétéa-Poya (Figure supplémentaire S2). De plus, les analyses de spectrométrie de masse ont permis de confirmer que ces spots reconnus par l'anticorps correspondaient bien à des protéines DING

Note de recherche

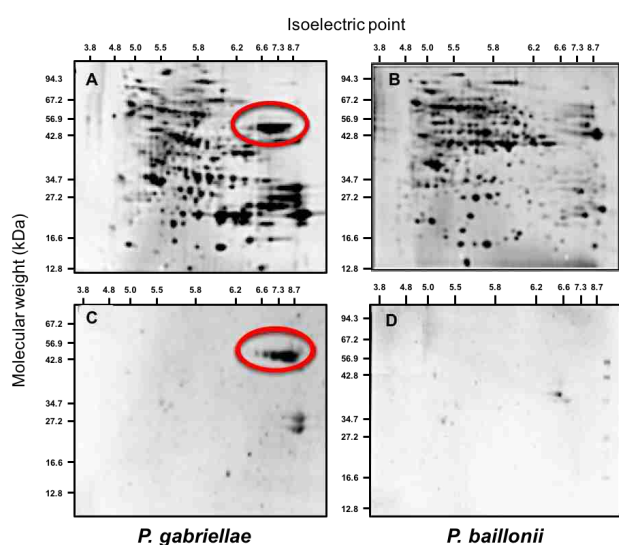


Figure 9. Caractérisation immunologique des protéines de la fraction albumine isolée des graines matures sèches entières de *Psychotria baillonii*. Gels d'électrophorèse bidimensionnelle (2D-SDS-PAGE) des fractions albumines des graines matures sèches de *P. gabriellae* (A) et de *P. baillonii* (B) colorés à l'argent et après western blot avec l'anticorps anti-DING de tabac (Perera et al., 2008) pour *P. gabriellae* (C) et *P. baillonii* (D). Les spots protéiques de 40 kDa environ spécifiquement reconnus par l'anticorps anti-DING sont entourés par un ovale rouge.

(résultats non montrés). Enfin, un contrôle supplémentaire a été réalisé à partir d'un gel 2D non chargé en protéines et ayant migré en même temps que d'autres gels contenant différents extraits riches en protéines DING. Après électrophorèse, plusieurs portions de gel ont été découpées à différentes positions dans ce gel « vide » et soumises à analyse par spectrométrie de masse après action de la trypsine. Aucune protéine de type DING n'a été révélée, permettant d'exclure une contamination de l'appareillage et des solutions utilisées pour les analyses protéomiques par des bactéries exprimant des protéines DING.

Caractérisation des protéines DING de *Psychotria gabriellae* au cours du développement de la graine :

Afin de caractériser le profil d'accumulation de ces protéines DING au cours de la formation de la graine de *P. gabriellae*, trois stades de développement ont été définis (cf. Matériels et Méthodes). Les extraits des fractions albumines ont alors été analysés par électrophorèse bidimensionnelle (Figure 7). Pour les trois stades étudiés, nous avons constaté que les spots (poids moléculaire proche de 40 kDa, point isoélectrique moyen de l'ordre de 7,3 ; ovale rouge) correspondant aux protéines DING reconnues par l'anticorps anti-DING de tabac sont toujours présents, et de même intensité, et ce, quel que soit le stade de développement de la graine. Un stade plus précoce (stade 1) a aussi été étudié, mais malheureusement les résultats n'ont pas été exploitables. En effet, à ce stade précoce, les graines sont indissociables du fruit. Un extrait des albumines sur le fruit total a été réalisé, mais les gels obtenus n'étaient pas satisfaisants. Nous ne pouvons donc pas, à ce jour, conclure sur le profil d'accumulation de ces protéines à un stade précoce du développement des graines de *P. gabriellae*.

Recherche de protéines DING chez *Psychotria baillonii* :

Afin de mieux appréhender les mécanismes de l'hyperaccumulation du nickel dans la graine de *P. gabriellae*, nous avons recherché l'existence de protéines DING chez une autre espèce du genre *Psychotria*, *P. baillonii* (famille des *Rubiaceae*) (Davis et al., 2009 ; Barrabé et al., 2013). Ces deux plantes, *P. gabriellae* et *P. baillonii*, vivent en effet dans les mêmes conditions édaphiques et climatiques au Mont Koghi, proche de Nouméa sur la Grande-Terre (Figure 8). Bien que se développant naturellement à quelques mètres l'une de l'autre, elles mettent en oeuvre deux stratégies adaptatives

Note de recherche

différentes face à l'élément nickel. La première, *P. gabriellae*, est reconnue comme étant hyperaccumulatrice de nickel (Jaffré *et al.*, 2013), alors que l'autre, *P. baillonii*, ne l'est pas (Zongo, 2010). En effet, chez *P. baillonii* les concentrations en nickel sont beaucoup plus faibles que chez *P. gabriellae*, de l'ordre de 430 mg Ni/kg dans les racines, 230 mg Ni/kg dans les tiges, 500 mg Ni/kg dans les feuilles et 40 mg Ni/kg dans les graines (Zongo, 2010).

Les albumines de la graine mature sèche de *P. baillonii* ont été extraites, séparées par électrophorèse bidimensionnelle, et les protéines DING ont été recherchées par analyse de *Western blotting* utilisant les anticorps anti-DING de tabac. La Figure 9 montre bien que ces anticorps reconnaissent des albumines de la graine mature sèche de *P. gabriellae* utilisées comme contrôle (40 kDa environ, ovale rouge) mais ne reconnaissent pas de protéines équivalentes chez *P. baillonii*. Ces résultats suggèrent que la présence de protéines DING est corrélée à l'accumulation de nickel dans la graine de *P. gabriellae*.

Caractérisation de la flore endophyte de *Psychotria gabriellae* :

Afin de tester l'hypothèse d'une origine procaryotique des protéines DING retrouvées dans la graine de *P. gabriellae*, l'identification de bactéries endophytes a été entreprise. Quatre souches bactériennes ont été isolées et caractérisées par séquençage de leur ARN 16S (cf. Matériels et Méthodes ; Tableau supplémentaire S2), *Staphylococcus pasteuri*, *Methylobacterium populi*, *Bacillus cereus* et *Vagococcus fluvialis*. Par ailleurs, nous avons observé que ces bactéries se développent parfaitement dans un milieu de culture contenant 100 mg/L de nickel, mettant en évidence la tolérance de ces micro-organismes envers le nickel (résultats non montrés).

Les protéines totales solubles ont été extraites de ces différentes bactéries, analysées par électrophorèse bidimensionnelle et testées

pour leur réactivité vis-à-vis de l'anticorps anti-DING de tabac. L'anticorps n'a montré aucune réactivité spécifique dans les zones des poids moléculaires et points isoélectriques des protéines DING des graines de *P. gabriellae* (résultats non montrés).

Dans une approche complémentaire, nous avons cherché à caractériser des bactéries endophytes de la graine de *P. gabriellae* en faisant macérer les tissus végétaux, puis séquençage de l'ARN 16S. Cette approche nous permettait ainsi d'isoler la présence éventuelle de bactéries non cultivables chez les graines de *P. gabriellae*, en complément des bactéries cultivables que nous avons isolées à Nouméa (cf. ci-dessus). Cette approche a ainsi permis l'identification d'une bactérie du genre *Ralstoniae*, de la famille des *Burkholderiaceae*. Les résultats de séquences et de BLAST correspondants sont présentés dans le Tableau supplémentaire S2.

Les séquences génomiques et plasmidiques de plusieurs de ces bactéries étant disponibles (Tableau supplémentaire S3), une analyse par BLAST nous a permis de confirmer l'absence de protéines comportant une séquence DINGGG en position N-terminale chez ces organismes.

Discussion

Afin de mettre en évidence les mécanismes de tolérance au nickel chez les plantes, nous avons conduit une analyse protéomique des graines de *P. gabriellae*, une plante endémique de la Nouvelle-Calédonie capable d'hyper-accumuler ce métal. Près de 600 albumines ont été caractérisées pour la première fois par électrophorèse bidimensionnelle et nano LC-MS/MS. Parmi les différentes protéines appartenant aux classes du métabolisme du stress et de la détoxification on note la présence de peroxydase (E.C. 1.11.1.7), lactoyl-glutathion lyase (E.C. 4.4.1.5) et superoxyde dismutase (EC 1.15.1.1) (Tableau supplémentaire S1), ce

Note de recherche

qui renforcerait ainsi les mécanismes nécessaires aux graines de *P. gabriellae* pour répondre au stress nickélique par détoxication des ROS générés par le nickel présent en abondance dans les graines, en accord avec des résultats précédents (Sirhindi *et al.*, 2016 ; Takur et Sharma, 2016).

Il convient également de noter l'existence de protéines de réponse au stress de dessiccation, notées *desiccation related protein (PCC13-62 like)*, retrouvées dans 25 spots de la graine de *P. gabriellae* (Tableau supplémentaire S1). Ces protéines appartiennent à la classe des protéines LEA (*late embryogenesis abundant*) décrites chez les graines de la plupart des angiospermes et qui jouent un rôle central dans la tolérance des graines au stress de dessiccation survenant en fin de maturation des graines orthodoxes (Dure *et al.*, 1989 ; Kermode, 1997 ; Tunnacliffe et Wise, 2007 ; Battaglia *et al.*, 2008). Il est intéressant de noter que les protéines LEA sont capables de fixer très fortement et spécifiquement les métaux lourds, dont le nickel avec une très forte affinité spécifique ($K_d = 1,8 \mu\text{M}$; 5 sites de fixation), ce qui laisse à penser qu'elles pourraient constituer un mécanisme de détoxication supplémentaire par rapport à cet élément métallique (Svensson *et al.*, 2000 ; Hara *et al.*, 2005).

De plus, l'histidinol déshydrogénase (E.C. 1.1.1.23), qui catalyse la dernière étape de synthèse de l'histidine chez les plantes est présente dans le protéome des albumines de la graine mature sèche de *P. gabriellae* (Tableau supplémentaire S1). Cette observation est en accord avec le fait que l'histidine est un puissant chélateur du nickel et que sa suraccumulation conduit à la tolérance envers ce métal chez les plantes (Kerkeb et Krämer, 2003 ; Ingle *et al.*, 2005 ; Zheng *et al.*, 2013).

Enfin, plusieurs enzymes du métabolisme des acides aminés soufrés, la cystéine synthase (E.C. 2.5.1.47), la méthionine synthase (E.C. 2.1.1.13) et la S-adénosyl-L-homocystéine hydrolase (E.C. 3.3.1.1), sont détectées dans la graine mature sèche de *P.*

gabriellae (Tableau supplémentaire S1). La cystéine synthase, qui catalyse la dernière étape de la synthèse de cystéine chez les plantes (Droux *et al.*, 1998), est impliquée dans la synthèse du glutathion, un acteur clé dans la détoxication des métaux lourds, dont le nickel, chez les plantes (Jozefczak *et al.*, 2012). Par ailleurs, la méthionine est impliquée dans la synthèse de la S-adénosyl-méthionine (Ravel *et al.*, 1998) laquelle sert de précurseur à la synthèse de la nicotianamine, un chélateur puissant des métaux divalents chez les plantes et dont l'accumulation est associée spécifiquement à la tolérance au nickel chez *Thlaspi caerulescens*, une plante hyperaccumulatrice de métaux (Mari *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces observations témoignent de la puissance de l'approche protéomique pour révéler les mécanismes rendant compte de l'hyperaccumulation de nickel chez *P. gabriellae*.

Toutefois un fait marquant de notre analyse concerne les protéines du métabolisme du phosphate qui sont exceptionnellement représentées chez les graines de *P. gabriellae* (Tableau supplémentaire S1 ; Figure 3), notamment divers membres de la famille des protéines DING (*GLP-binding protein 1a* et *p27SJ*). Elles constituent une énigmatique famille de protéines fixatrices de phosphate, identifiées dans les différents règnes du vivant, c'est-à-dire les procaryotes, les archaea et les eucaryotes.

Malgré leur caractère ubiquiste chez les eucaryotes, aucun locus ni ORF (*Open Reading Frame* ; cadre de lecture ouvert pour la traduction des protéines) n'a été identifié à ce jour dans les génomes eucaryotiques séquencés. Cette particularité a considérablement freiné les études structurales et fonctionnelles sur ces protéines, et a nécessité la mise en place de méthodologies innovantes, comme lors du séquençage de l'une de ces protéines par spectrométrie de masse et cristallographie aux rayons X (Elias *et al.*, 2011 ; Chabrière *et al.*, 2012).

Note de recherche

L'obtention de structures cristallographiques à très haute résolution a ainsi permis d'élucider le mécanisme moléculaire de fixation à haute affinité du phosphate chez ces protéines, notamment dans le cas de la protéine DING humaine nommée HPBP (*Human phosphate binding protein*), retrouvée en abondance dans le plasma sanguin humain (Morales *et al.*, 2006 ; 2007).

Cette protéine correspond à une apolipoprotéine dénommée *Solute Binding Protein* (SBP) qui fixe le phosphate et dont l'homologue chez les procaryotes est associé aux transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*) qui permettent le passage transmembranaire de molécules variées (Morales *et al.*, 2007). Son abondance dans le plasma sanguin y est d'ailleurs telle que la séquence protéique complète de la protéine a été obtenue par séquençage MS/MS et que la protéine a pu être cristallisée permettant d'établir sa structure tridimensionnelle et de confirmer la séquence en acides aminés déterminée par spectrométrie de masse (Diemer *et al.*, 2008). En particulier, ce séquençage a permis d'identifier le site de fixation des phosphates au niveau de la HPBP, représenté par huit acides aminés déjà caractérisés chez les SBP des procaryotes (Morales *et al.*, 2006, 2007 ; voir Figure 6).

Les premières protéines DING identifiées dans le monde végétal l'ont été fortuitement lors d'études de protéines nommées *Germin-Like Proteins* (GLP) chez *A. thaliana*. La purification des GLP menait en effet systématiquement à la co-purification de protéines de 40 kDa. Cette forte affinité leur a d'abord valu le nom de *GLP-binding proteins* avant d'être clairement associées à la famille des protéines DING (Berna *et al.*, 2009a,b). L'association physique entre une protéine DING et une GLP a récemment été aussi décrite chez le blé (Jiang *et al.*, 2016).

A l'instar des protéines DING, plusieurs fonctions sont associées aux GLP. En revanche, elles n'ont été trouvées que chez les plantes (Membré *et al.*, 2000). Le premier membre de cette famille a été observé lors de

la germination des grains de blé, d'où le nom de germine (Lane, 1991).

Il s'avère que les germes au sens strict sont des protéines spécifiques des Poacées, présentant une très forte conservation de séquences et possédant probablement toutes une activité oxalate oxydase (E.C. 1.2.3.4) (Dumas *et al.*, 1995 ; Woo *et al.*, 2000) et dont on pense qu'elles jouent un rôle important dans la défense des plantes contre les pathogènes (Lane, 2002). Les GLP, quant à elles, se retrouvent chez toutes les espèces végétales sous formes de familles comportant généralement quelques dizaines de gènes (Bernier et Berna, 2001). Plusieurs sont des superoxyde dismutases (E.C. 1.15.1.1). Elles présentent une plus grande variabilité que les germes de Poacées, soit autour de 60-70 % d'identité de séquence d'acides aminés entre elles et avec les germes.

Alors que plusieurs centaines de gènes de germes et GLP existent dans les banques de données, les programmes de séquençage systématique de génomes et d'ARNm n'ont jamais révélé de gènes de protéines DING chez les plantes, ni d'ailleurs chez les animaux et les bactéries, à l'exception du genre *Pseudomonas* (par exemple, *P. fluorescens* ; *P. aeruginosa*). Pour les eucaryotes, seuls quelques fragments de gènes ont pu être obtenus par des approches PCR (Bernier, 2013).

L'origine des protéines DING reste donc mystérieuse. La possibilité d'une contamination bactérienne a souvent été évoquée (e.g., Lewis et Crowther, 2005), mais est difficilement compatible avec plusieurs observations. Premièrement, des protéines DING ont aussi été trouvées chez des bactéries dont le génome est connu et ne comporte pas de gène correspondant (Bernier, 2013). Deuxièmement des protéines DING abondantes ont été identifiées dans des tissus ou milieux de cultures *a priori* sains, tels que le plasma humain (Morales *et al.*, 2006), un milieu de culture cellulaire (Perera *et al.*, 2008) ou encore des souris totalement

Note de recherche

dépourvues de germes bactériens (lignée *germ free*) (Collombet *et al.*, 2010).

Une des caractéristiques majeures des protéines DING chez les bactéries est la concentration et la séquestration du phosphate environnant par la protéine elle-même avant sa prise en charge par des transporteurs de la membrane cytoplasmique (Scott et Wu, 2005). Les protéines DING bactériennes peuvent ainsi jouer un rôle dans l'activation de la biosynthèse de la phosphatase alcaline. Cette activation est régulée par la concentration environnante en phosphate et le contrôle de la transduction du signal requiert l'intervention d'un système de transporteur spécifique des phosphates appartenant à la famille des transporteurs de type ABC (Pantazaki *et al.*, 2007).

Chez les plantes, des homologies ont aussi été notées entre une protéine DING identifiée chez les tubercules de topinambours (*Helianthus tuberosus*) et des phosphatases alcalines de la super famille des *Phosphate binding proteins* de *Pseudomonas* (Griffaut *et al.*, 2007). De manière intéressante, les protéines DING semblent jouer un rôle dans la biominéralisation. Ainsi Berna *et al.*, (2002) notent que les protéines DING peuvent générer et immobiliser une quantité importante de phosphates libres qui seraient à l'origine de la calcification dans les systèmes animaux. Ce mécanisme serait contrôlé par une enzyme clé du métabolisme des purines et pyrimidines, la nucléoside triphosphate pyrophosphatase (EC 3.6.1.19). La formation des cristaux d'oxalate de calcium dans des compartiments vacuolaires spécialisés serait la conséquence de ce phénomène.

Membré *et al.* (2000) montrent, dans une étude menée sur *Arabidopsis*, une faculté des protéines DING et notamment des GLP à lier un métal. En effet, la présence d'histidine, un acide aminé liant le nickel avec une haute affinité (Kramer *et al.*, 1996), dans ces protéines pourrait permettre de chélater des métaux (Hochuli *et al.*, 1987). La caractérisation d'une autre protéine DING chez les plantes provient d'une étude réalisée chez

le millepertuis (*Hypericum perforatum*) (Darbinian-Sarkissian *et al.*, 2006). Cette protéine, dénommée p27SJ, est retrouvée en abondance dans le protéome des graines de *P. gabriellae* (Tableau supplémentaire S1 ; Figure supplémentaire S1).

En effet, les homologues de p27SJ apparaissent 40 fois dans le protéome des albumines de *P. gabriellae* sur les 103 protéines du métabolisme du phosphate (Tableau supplémentaire S1). Fait remarquable, cette protéine de millepertuis se révèle capable d'entraver l'expression du génome du virus HIV-1. Dans ce mécanisme, la protéine p27SJ interagit avec l'activateur transcriptionnel C/EBP β et le transactivateur Tat en empêchant leur localisation nucléaire (Darbinian-Sarkissian *et al.*, 2006 ; Darbinian *et al.*, 2008, 2011).

Des protéines DING bactériennes et humaines bloquent également la transcription du virus de l'immunodéficience humaine HIV-1 (Cherrier *et al.*, 2011 ; Sachdeva *et al.*, 2013, 2015 ; Suh *et al.*, 2013). De plus, des patients infectés par le HIV réagissent à l'infection en sur-accumulant les protéines DING humaines dans le sérum (Djeghader *et al.*, 2012). Il serait intéressant, dans ce contexte, de mettre en place des essais visant à évaluer l'aptitude d'extraits protéiques de graines de *P. gabriellae* à inhiber la réplication du virus de l'immunodéficience humaine HIV-1.

Généralement, les mécanismes de tolérance aux conditions extrêmes de l'environnement ont pour finalité de maintenir l'intégrité d'un individu ou de sa progéniture dans des conditions de stress (Rajjou et Debeaujon, 2008).

La graine de *P. gabriellae* procure un bon exemple d'un tel mécanisme de protection de l'embryon. En effet, l'existence d'un gradient de nickel de la partie externe de l'albumen vers l'embryon suggère un rôle protecteur de l'albumen envers l'embryon (Zongo, 2010). Cette caractéristique suggère l'existence d'un mécanisme de transport symplastique du

Note de recherche

nickel. Il est intéressant de noter dans ce cadre qu'une protéine DING de *Pseudomonas fluorescens* présente de fortes homologies avec le composant fixant le phosphate inorganique du transporteur périplasmique de phosphate du type ABC (Ahn *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2007 ; Chabrière *et al.*, 2012). Il en est de même pour des protéines DING de *P. aeruginosa* (Ball *et al.*, 2012 ; Lewis et Crowther, 2005) et de *Clostridium perfringens* (Gonzalez *et al.*, 2014).

Nos observations seraient ainsi en accord avec l'hypothèse selon laquelle les protéines de type DING de *P. gabriellae* sont associées ou étroitement liées à une fonction transporteur de type ABC. De par le gradient de nickel observé en microscopie électronique à balayage, ces transporteurs ABC pourraient jouer un rôle en filtrant l'élément nickel à travers les couches cellulaires de l'albumen (Zongo, 2010).

De plus, chez les plantes, les transporteurs ABC ont été, depuis très longtemps, associés à la détoxification des métaux lourds et des métalloïdes (Kang *et al.*, 2011 ; Lee *et al.*, 2014 ; Singh *et al.*, 2015 ; Hwang *et al.*, 2016 ; Lane *et al.*, 2016). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il a été montré que le transporteur ABC YCF1 (*Yeast Cadmium Facteur 1*) contribue à la tolérance aux métaux lourds et métalloïdes (Szczyпка *et al.*, 1994 ; Li *et al.*, 1997). Chez *A. thaliana*, (1) le transporteur ABC AtABCG36/AtPDR8 localisé à la membrane plasmique est impliqué dans la résistance au cadmium et (2) des plantes transgéniques d'*A. thaliana* surexprimant AtABCG36 sont beaucoup plus tolérantes à ce métal lourd très toxique que les plantes sauvages (Kim *et al.*, 2007). De même, la surexpression du transporteur ABC mitochondrial AtABC25 d'*A. thaliana* augmente la tolérance de cette plante envers les métaux lourds alors qu'une insertion T-DNA dans ce gène conduit à une augmentation de la sensibilité (Kim *et al.*, 2006). Les protéines DING fixant le phosphate, la fixation des métaux pourrait également être médiée par ce moyen (le phosphate ayant une

grande affinité pour bon nombre de métaux).

Les protéines DING pourraient également jouer un rôle dans la formation des cristaux d'oxalate de calcium localisés dans la partie interne de l'albumen (Zongo, 2010) et/ou dans leur dégradation (par exemple, *GLP-binding protein 1a* retrouvée en abondance dans la graine (Tableau supplémentaire S1) et activité oxalate oxydase associée à certaines germinées).

Une zonation bien marquée de l'albumen comprenant ainsi une partie riche en nickel et phosphate et une partie riche en calcium et oxalate ainsi que l'occurrence d'une même famille de protéines DING intervenant dans des mécanismes utilisant ces éléments suggèrent l'existence de liens étroits. Il est par ailleurs intéressant de noter dans ce contexte que des mutants d'*A. thaliana* déficient en oxalyl-CoA synthétase (E.C. 6.2.1.8), une enzyme intervenant dans le catabolisme de l'oxalate, accumulent trois fois plus de cristaux d'oxalate dans les graines au niveau des enveloppes alors que ces cristaux sont absents dans l'embryon (Foster *et al.*, 2012).

Dans le cas des graines de *P. gabriellae*, notre étude a révélé l'existence d'une oxalyl-CoA décarboxylase (E.C. 4.1.1.8) et d'une oxalate oxydase (E.C. 1.2.3.4), toutes deux impliquées dans le catabolisme de l'oxalate (Tableau supplémentaire S1). Ces deux enzymes, ainsi que les *GLP-binding proteins 1a*, sont présentes dans l'albumen et absentes de l'embryon (Tableau supplémentaire S1). Ces observations procurent ainsi des pistes intéressantes pour comprendre les mécanismes moléculaires de l'accumulation des cristaux d'oxalate de calcium, en lien avec l'accumulation du nickel, chez les graines de *P. gabriellae*.

Comme mentionné plus haut, l'existence de gènes codant les protéines DING chez les eucaryotes reste toujours à expliquer compte-tenu de l'absence de gènes codant ce type de protéines chez ces organismes. Une hypothèse séduisante pour expliquer nos résultats serait que des bactéries particulières

Note de recherche

possédant des gènes codant des protéines DING soient capables de développer des associations commensales avec *P. gabriellae* conférant ainsi à cette plante un mécanisme original de tolérance.

Il convient de rappeler que *P. gabriellae* accumule des quantités considérables de nickel, sans commune mesure avec ce que l'on trouve dans les modèles de plantes actuellement étudiés (Verbruggen *et al.*, 2009). De fait, seul un mécanisme totalement nouveau permettrait de rendre compte d'une telle propriété exceptionnelle. Nous avons mis en évidence plusieurs bactéries endophytes de la graine de *P. gabriellae*. De manière très intéressante, ces bactéries s'avèrent très tolérantes aux stress métallifères, dont ceux causés par le nickel, confirmant ainsi une nouvelle fois la présence de fortes concentrations en nickel dans la graine de *P. gabriellae*.

Il a également été montré que ces bactéries favorisent la croissance des plantes en présence de fortes concentrations de métaux. Ce résultat est en excellent accord avec la littérature montrant que ces micro-organismes sont très tolérants aux métaux (Shakoori et Muneer, 2002 ; Madhaiyan *et al.*, 2007 ; Ma *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*, 2013). De manière intéressante, *Methylobacterium* est le genre dominant des tissus végétaux de la rhizosphère (endophytes) de *T. geosingense*, une plante hyperaccumulatrice de nickel (Idris *et al.*, 2004) et, de plus, ces bactéries sont capables de réduire la toxicité du nickel chez la tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) (Madhaiyan *et al.*, 2007).

Par ailleurs, Chen *et al.* (2013) ont montré que l'inoculation avec *S. pasteurii* permet d'augmenter l'absorption et la bioaccumulation du cadmium du sol chez *B. vulgaris*. Ma *et al.* (2009) ont également montré que *B. cereus*, une bactérie résistante au nickel isolée de sol serpentinique (sol enrichi en nickel), augmente l'accumulation de nickel chez la moutarde brune (*Brassica juncea*). Enfin *V. fluvialis* est une bactérie résistante à plusieurs métaux de

transition et dont l'utilisation est envisagée pour la remédiation des eaux polluées par les métaux lourds (Shakoori et Muneer, 2002).

Nos résultats indiquent toutefois que ces bactéries n'expriment pas de protéines de type DING (en termes de non reconnaissance par les anticorps anti-DING de tabac et d'absence de protéines comportant une séquence DINGGG en position N-terminale) et ne seraient donc pas responsables de l'accumulation de ces protéines dans la graine de *P. gabriellae*. Cependant la présence de ces bactéries chez *P. gabriellae* permettrait de renforcer la tolérance au nickel de cette plante, notamment au niveau de la graine.

Dans une approche ne visant pas à isoler des bactéries potentiellement vivantes, nous avons mis en évidence la présence d'ADN correspondant à des β -protéobactéries du genre *Ralstonia*, proche de *Burkholderia*, dans les graines de *P. gabriellae*. Certaines espèces du genre *Ralstonia* ont été rapportées comme endophytes (Jimtha *et al.*, 2014), d'autres comme nodulantes sur *Mimosa* spp. et fixatrices d'azote (Chen *et al.*, 2003 ; Verma *et al.*, 2004) et sont par ailleurs fortement résistantes aux métaux (Goris *et al.*, 2001). De plus, différentes *Burkholderiaceae* sont connues pour être endophytes des plantes (Gonin *et al.*, 2013), notamment de *Psychotria* (Lemaire *et al.*, 2012), favorisant ainsi leur croissance sur sol ultramafique (Gonin *et al.*, 2013).

Deux espèces de *Burkholderiales*, *B. vietnamiensis* et *B. tropica*, ont été décrites comme fixatrices d'azote (Santos *et al.*, 2001 ; Reis *et al.*, 2004). Ainsi, l'identification de ces bactéries dans les graines de *P. gabriellae* pourrait être un indice d'une symbiose avec la plante, permettant la fixation d'azote atmosphérique. Connaissant la pauvreté en macro-éléments des sols ultramafiques, cette symbiose serait un avantage considérable au développement de la plante. Les bactéries de ce genre sont connues pour être très tolérantes aux métaux, notamment au nickel

Note de recherche

(Grass *et al.*, 2000 ; Lazzaro *et al.*, 2008 ; Kuffner *et al.*, 2010 ; Schwager *et al.*, 2012 ; Kost *et al.*, 2014). Il est également très intéressant de souligner que, (1) chez les plantes, l'oxalate est directement impliqué dans le recrutement de bactéries symbiotiques (Kost *et al.*, 2014), et (2) que les graines de *P. gabriellae* sont exceptionnellement riches en oxalate (Zongo, 2010).

Il s'agit à notre connaissance de la première description de la présence de telles bactéries dans les graines de plantes hyperaccumulatrices de nickel. Des expériences complémentaires permettront de préciser le rôle de ces bactéries dans l'exceptionnelle tolérance de *P. gabriellae* au nickel (Visioli *et al.*, 2014). Avec les méthodes actuelles de métagénomique (Barret *et al.*, 2015 ; Midha *et al.*, 2016), une caractérisation plus fine du microbiote associé aux graines de *P. gabriellae* est envisageable. Un séquençage complet de l'ADN du microbiome permettrait également de rechercher directement la présence d'ADN codant une protéine DING dans ce microbiome.

L'adaptation des plantes aux fortes concentrations en métaux, et particulièrement au nickel, fait l'objet d'une attention grandissante pour faire face aux problèmes de pollution des sols et de leur restauration et également aborder la question de la phytoremédiation (Salt *et al.*, 1998 ; Pilon-Smits, 2005 ; Ma *et al.*, 2016), du « *phytomining* », c'est-à-dire l'extraction de métaux lourds des sols en vue de leur concentration et réutilisation (Brooks *et al.*, 1998 ; Gleba *et al.*, 1999 ; Losfeld *et al.*, 2015 ; van der Ent *et al.*, 2015).

La Nouvelle-Calédonie, qui possède une flore parmi les plus riches en plantes hyperaccumulatrices de nickel, est un site d'étude à privilégier pour mieux caractériser les mécanismes adaptatifs développés pour faire face au stress nickélique (Jaffré *et al.*, 2013 ; Merlot *et al.*, 2014).

Remerciements

Ces travaux de recherche ont été rendus possibles grâce au financement de bourses de thèse à CZ et MV par la Province Sud de Nouvelle-Calédonie ainsi qu'au soutien financier des sociétés *Koniambo Nickel SAS* et *Bayer CropScience* que nous remercions vivement. Nous remercions également les Provinces Nord et Sud de Nouvelle-Calédonie pour l'utilisation du matériel végétal et les autorisations de collecte délivrées à cet effet. Nos plus vifs remerciements vont enfin à Françoise Corbineau, Université Pierre et Marie Curie, Paris, pour de nombreuses discussions et l'accueil de CZ et MV dans son laboratoire.

Données supplémentaires :

Cette Note contient des données supplémentaires accessibles à : <http://www.academie-agriculture.fr/publication/s/n3af>

Références

- Ahn S, Moniot S, Elia M, Chabrière E, Kim D, Scott K. 2007. Structure–function relationships in a bacterial DING protein. *FEBS Letters*, 581, 3455–3460.
- Ball G, Viarre V, Garvis S, Voulhoux R, Filloux A. 2012. Type II-dependent secretion of a *Pseudomonas aeruginosa* DING protein. *Research in Microbiology*, 163, 457-469.
- Barrabé L, Mouly A, Florence J. 2013. *Psychotriacae (Rubiaceae) neocaledonicarum specierum nomenclator*. *Adansonia*, 35, 281-357.
- Barret M, Briand M, Bonneau S, Preveaux A, Valiere S, Bouchez O, Hunault G, Simoneau P, Jacques M A. 2015.

Note de recherche

- Emergence shapes the structure of the seed microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 1257-1266.
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garciarrubio A, Campos F, Covarrubias AA. 2008. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology*, 148, 6–24.
- Berna A, Bernier F, Chabrière E, Elias M, Scott K, Suh A. 2009a. For whom the bell tolls? DING proteins in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 2205–2218.
- Berna A, Bernier F, Chabrière E, Perera T, Scott K. 2008. DING proteins; novel members of a prokaryotic phosphate-binding protein superfamily which extends into the eukaryotic kingdom. *The International Journal of Biochemistry et Cell Biology*, 40, 170–175.
- Berna A, Bernier F, Scott K, Stuhlmüller B. 2002. Ring up the curtain on DING proteins. *FEBS Letters*, 524, 6–10.
- Berna A, Scott K, Chabrière E, Bernier F. 2009b. The DING family of proteins: ubiquitous in eukaryotes, but where are the genes?, *BioEssays*, 31, 570–580.
- Bernier F. 2013. DING proteins: numerous functions, elusive genes, a potential for health, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, 3045-3056.
- Bernier F, Berna A. 2001. Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly?, *Plant Physiology and Biochemistry*, 39, 545-554.
- Bevan M, Bancroft I, Bent E, Love K, Goodman H, Dean C., Bergkamp R, Dirkse W, Van Staveren M, Stiekema W, Drost L, Ridley P, Hudson S-A, Patel L, Murphy G, Piffanelli P, Wedler E, Wambutt R, Weitzenegger T, Pohl T M, Terry N, Gielen J, Villarreal R, De Clerk R, Van Montagu M, Lecharny A, Aubourg S, Gy I, Kreis M, Lao N, Kavanagh T, Hempel S, Kotter P, Entian K-D, Rieger M, Schaeffer M, Funk B, Mueller-Auer S, Silvey M, James R, Montfort A, Pons A, Puigdomenech P, Douka A, Voukelatou E, Milioni D, Hatzopoulos P, Piravandi E, Obermaier B, Hilbert H, Düsterhöft A, Moores T, Jones J D G, Eneva T, Palme K, Benes V, Rechman S, Ansorge W, Cooke R, Berger C, Delseny M, Voet M, Volckaert G, Mewes H-W, Klosterman S, Schueller C, Chalwatzis N. 1998. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*, *Nature*, 391, 485–488.
- Boyd R S. 2004. Ecology of metal hyperaccumulation, *New Phytologist*, 162, 563–567.
- Boyd R S., Jaffré T. 2009. Elemental concentrations of eleven New Caledonian plant species from serpentine soils: elemental correlations and leaf-age effects, *Northeastern Naturalist*, 16, 93-110.
- Boyd R S, Wall M A, Jaffré T. 2006. Nickel levels in arthropods associated with Ni hyperaccumulator plants from an ultramafic site in New Caledonia, *Insect Science*, 13, 271–277.
- Bradshaw R A, Burlingame A L. 2005. From proteins to proteomics, *IUBMB Life*, 57, 267–272.
- Brooks R R, Chambers M F, Nicks L J, Robinson B H. 1998. Phytomining. *Trends in Plant Science*, 3, 359–362.
- Brooks R R, Lee J, Reeves R D, Jaffré T. 1977. Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants, *Journal of Geochemical Exploration*, 7, 49–57.
- Brown P H, Welch R M, Cary E E. 1987. *Nickel*. A micronutrient essential for higher plants, *Plant Physiology*, 85, 801–803.

Note de recherche

- Callahan D L, Roessner U, Dumontet V, De Livera A M, Doronila A, Baker A J M, Kolev S D. 2012. Elemental and metabolite profiling of nickel hyperaccumulators from New Caledonia. *Phytochemistry*, 81, 80–89.
- Castellana N E, Payne S H, Shen Z, Stanke M, Bafna V, Briggs, S P. 2008. Discovery and revision of *Arabidopsis* genes by proteogenomics, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 21034–21038.
- Catusse J., Strub J-M. Job C, Van Dorselaer A. Job D. 2008. Proteome-wide characterization of sugarbeet seed vigor and its tissue specific expression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 10262–10267.
- Chabrière E., Elias M, Hiblot J, Djeghader A, Schwartz C, Rohr O, Schwartz C, Masson P. 2012. Les protéines DING : propriétés biochimiques, structurales et capacité à inhiber la réplication du virus VIH, *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 196, 693-704.
- Chen S, Chao L, Sun L, Sun T. 2013. Effects of bacteria on cadmium bioaccumulation in the cadmium hyperaccumulator plant *Beta vulgaris* var. *cicla* L., *International Journal of Phytoremediation*, 15, 477-487.
- Cherrier T, Elias M, Jeudy A, Gotthard G, Le Douce V, Hallay H, Masson P, Janossy A, Candolfi E, Rohr O, Chabrière E, Schwartz C. 2011. Human-Phosphate-Binding-Protein inhibits HIV-1 gene transcription and replication. *Virology Journal*, 8, 352.
- Clemens S, Palmgren M G, Krämer U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation, *Trends in Plant Science*, 7, 309–315.
- Cluzel D, Maurizot P, Collot J, Sevin B. 2012. An outline of the geology of New Caledonia; from Permian – Mesozoic Southeast Gondwanaland active margin to Cenozoic obduction and supergene evolution, *Episodes- Newsmagazine of the International Union of Geological Sciences*, 35, 72–86.
- Collombet J-M, Elias M, Gotthard G, Four E, Renault F, Joffre A, Baubichon D, Rochu D, Chabrière E. 2010. Eukaryotic DING proteins are endogenous: an immunohistological study in mouse tissues, *PLoS One*, 5, e9099.
- Corbineau F. 2012. Markers of seed quality: from present to future, *Seed Science Research*, 22, S61-S68.
- Darbinian N, Popov Y, Khalili K, Amini S. 2008. Creation of a bi-directional protein transduction system for suppression of HIV-1 expression by p27SJ, *Antiviral Research*, 79, 136–141.
- Darbinian N, Gomberg R, Mullen L, Garcia S, White M K, Khalili K, Shohreh Amini S. 2011. Suppression of HIV-1 transcriptional elongation by a DING phosphatase, *Journal of Cellular Biochemistry*, 112, 225–232.
- Darbinian-Sarkissian N, Darbinian A, Otte J, Radhakrishnan S, Sawaya B E, Arzumanyan A, Chipitsyna G, Popov Y, Rappaport J, Amini S, Khalili K. 2006. p27SJ, a novel protein in St John's Wort that suppresses expression of HIV-1 genome, *Gene Therapy*, 13, 288–295.
- Davis A P, Govaerts R, Bridson D M, Ruhsam M, Moat J, Brummitt N. 2009. A global assessment of distribution, diversity, endemism, and taxonomic effort in the *Rubiaceae*, *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 96, 68–78.
- Davis M A, Boyd R S, Cane J H. 2001. Host-switching does not circumvent the Ni-based defense of the Ni hyperaccumulator

Note de recherche

- Streptanthus polygaloides (Brassicaceae), *South African Journal of Science*, 97, 554–557.
- Diemer H, Elias M, Renault F, Rochu D, Contreras-Martel C, Schaeffer C, Van Dorsselaer A, Chabrière E. 2008. *Tandem use of X-ray crystallography and mass spectrometry to obtain ab initio the complete and exact amino acids sequence of HPBP, a human 38-kDa apolipoprotein*, *Proteins*, 71, 1708–1720.
- Djehader A, Aragones G, Darbinian N, Elias M, Gonzalez D, Garcia-Heredia A, Beltran-Debon R, Kaminski R, Gotthard G, Hiblot J, Rull A, Rohr O, Schwartz C, Alonso-Villaverde C, Joven J, Camps J, Chabrière E. 2012. The level of DING proteins is increased in HIV-infected patients: *in vitro* and *in vivo* studies. *PLoS One*, 7, e33062.
- Droux M, Ruffet M L, Douce R, Job D. 1998. Interactions between serine acetyltransferase and O-acetylserine (thiol) lyase in higher plants - Structural and kinetic properties of the free and bound enzymes, *European Journal of Biochemistry*, 255, 235-245.
- Dumas B, Freyssinet G, Pallett K E. 1995. Tissue-specific expression of germin-like oxalate oxidase during development and fungal infection of barley seedlings, *Plant Physiology*, 107, 1091-1096.
- Dure L, Crouch M, Harada J, Ho The, Mundy J, Quatrano R, Thomas T, Sung Z R. 1989. Common amino-acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants, *Plant Molecular Biology*, 12, 475-486.
- Elias M, Liebschner D, Gotthard G, Chabrière E. 2011. *Structural insights and ab initio sequencing within the DING proteins family*, *Journal of Synchrotron Radiation*, 18, 45-49.
- Eskew D L, Welch R M, Norvell W A. 1984. Nickel in higher plants, *Plant Physiology*, 76, 691–693.
- Faini M, Stengel F, Aebersold R. 2016. The evolving contribution of mass spectrometry to integrative structural biology. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 27, 966-974.
- Foster J, Kim H U, Nakata P A. 2012. A previously unknown oxalyl-CoA synthetase is important for oxalate catabolism in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 24, 1217-1229.
- Galland M, Huguet R, Arc E, Cueff G, Job D, Rajjou L. 2014. Dynamic proteomics emphasizes the importance of selective mRNA translation and protein turnover during *Arabidopsis* seed germination, *Molecular and Cellular Proteomics*, 13, 252-268.
- Galland M, Job D, Rajjou L. 2012. The seed proteome web portal, *Frontiers in Plant Science*, 3, 98.
- Gallien S, Perrodou E, Carapito C, Deshayes C, Reytrat J M, Van Dorsselaer A, Poch O, Schaeffer C, Lecompte O. 2009. Ortho-proteogenomics: Multiple proteomes investigation through orthology and a new MS-based protocol, *Genome Research*, 19, 128-135.
- Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman J F, Dommes J. 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures, *Plant Growth Regulation*, 37, 263-285.
- Gâteblé G. 2015. *Flore ornementale de Nouvelle-Calédonie*. Edition Au vent des îles, Pirae, Tahiti, Polynésie française, 624 p.
- Gleba D, Borisjuk N V, Borisjuk L G, Kneer R, Poulev A, Sarzhinskaya M, Dushenkov S, Logendra S, Gleba Y Y, Raskin I. 1999. Use of

Note de recherche

plant roots for phytoremediation and molecular farming, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 5973-5977.

Gonin M, Gensous S, Lagrange A, Ducouso M, Amir H, Jourand P. 2013. Rhizosphere bacteria of *Costularia* spp. from ultramafic soils in New Caledonia: diversity, tolerance to extreme edaphic conditions, and role in plant growth and mineral nutrition, *Canadian Journal of Microbiology*, 59, 164-174.

Gonzalez D, Richez M, Bergonzi C, Chabrière E, Elias M. 2014. Crystal structure of the phosphate-binding protein (PBP-1) of an ABC-type phosphate transporter from *Clostridium perfringens*, *Scientific Reports*, 4, 6636.

Goris J, De Vos P, Coenye T, Hoste B, Janssens D, Brim H, Diels L, Mergeay M, Kersters K, Vandamme P. 2001. Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp nov., *Ralstonia metallidurans* sp nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle 1998 emend, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1773-1782.

Grandcolas P, Murienne J, Robillard T, Desutter-Grandcolas L, Jourdan H, Guilbert E, Deharveng L. 2008. New Caledonia: a very old Darwinian island?, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 363, 3309-3317.

Grass G, Grosse C, Nies D H. 2000. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. strain CH34, *Journal of Bacteriology*, 182, 1390-1398.

Griffaut B, Debiton E, Madelmont J C, Maurizis J C, Ledoigt G. 2007. Stressed Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.) excrete a protein fraction with specific

cytotoxicity on plant and animal tumour cell, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770, 1324-1330.

Hanson B, Lindblom S D, Loeffler M L, Pilon-Smits E A H. 2004. Selenium protects plants from phloem-feeding aphids due to both deterrence and toxicity, *New Phytologist*, 162, 655-662.

Hara M, Fujinaga M, Kuboi T. 2005. Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains, *Journal of Experimental Botany*, 56, 2695-2703.

Hochuli E, Dobeli H, Schacher A. 1987. *New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighboring histidine-residues*, *Journal of Chromatography*, 411, 177-184.

Hwang J U, Song W Y, Hong D, Ko D, Yamaoka Y, Jang S, Yim S, Lee E, Khare D, Kim K, Palmgren M, Yoon H S, Martinoia E, Lee Y. 2016. Plant ABC transporters enable many unique aspects of a terrestrial plant's lifestyle, *Molecular Plant*, 9, 338 - 355.

Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel W W, Sessitsch A. 2004. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*, *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2667-2677.

Ingle R A, Mugford S T, Rees J D, Campbell M M, Smith A C. 2005. Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants, *Plant Cell*, 17, 2089-2106.

Isnard S, L'Huillier L, Rigault F, Jaffré T. 2016. How did the ultramafic soils shape the flora of the New Caledonian hotspot?, *Plant and Soil*, 403, 53-76

Note de recherche

- Jaffré T, Morat P, Veillon J-M. 1994. Caractéristiques et composition floristique des principales formations végétales, *Bois et Forêts des Tropiques*, 242, 7–30.
- Jaffré T, Pillon Y, Thomine S, Merlot S. 2013. The metal hyperaccumulators from New Caledonia can broaden our understanding of nickel accumulation in plants, *Frontiers in Plant Science*, 4, 279.
- Jaffré T, Schmid M. 1974. Accumulation du nickel par une rubiacée de Nouvelle-Calédonie, *Psychotria douarrei* (G. Beauvisage), *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, 278, 1727–1730.
- Jacques M-A, Durand K, Orgeur G, Balidas S, Fricot C, Bonneau S, Quilévéré A, Audusseau C, Olivier V, Grimault V, Mathis R. 2012. Phylogenetic analysis and polyphasic characterization of *Clavibacter michiganensis* strains isolated from tomato seeds reveal that non-pathogenic strains are distinct from *C. michiganensis* subsp. *Michiganensis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 8388–8402.
- Jiang N, Wiemels R E, Soya A, Whitley R, Held M, Faik A. 2016. Composition, assembly, and trafficking of a wheat xylan synthase complex, *Plant Physiology*, 170, 1999–2023.
- Jimtha J C, Smitha P V, Anisha C, Deepthi T, Meekha G, Radhakrishnan E K, Gayatri G P, Remakanthan A. 2014. Isolation of endophytic bacteria from embryogenic suspension culture of banana and assessment of their plant growth promoting properties, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118, 57–66.
- Johnson-Flanagan A M, McLachlan G. 1990. The role of chlorophyllase in degreening canola (*Brassica napus*) seeds and its activation by sublethal freezing. *Physiologia Plantarum*, 80, 460–466.
- Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A. 2012. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 3145–3175.
- Kang J, Park J, Choi H, Burla B, Kretzschmar T, Lee Y, Martinoia E. 2011. Plant ABC transporters. *Arabidopsis Book*, 9, e0153.
- Kermode A R. 1997. Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance in seeds, *Seed Science Research*, 7, 75–95.
- Kersten W J, Brooks R R, Reeves R D, Jaffré T. 1980. Nature of nickel complexes in *Psychotria douarrei* and other nickel-accumulating plants, *Phytochemistry*, 19, 1963–1965.
- Kim D Y, Bovet L, Kushnir S, Noh E W, Martinoia E, Lee Y. 2006. AtATM3 is involved in heavy metal resistance in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 140, 922–932.
- Kim D Y, Bovet L, Maeshima M, Martinoia E, Lee Y. 2007. The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance, *Plant Journal*, 50, 207–218.
- Kost T, Stopnisek N, Agnoli K, Eberl L, Weisskopf L. 2014. Oxalotrophy, a widespread trait of plant-associated Burkholderia species, is involved in successful root colonization of lupin and maize by *Burkholderia phytofirmans*, *Frontiers in Microbiology*, 4, 421.
- Kramer U, CotterHowells J D, Charnock J M, Baker A J M, Smith J A C. 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel, *Nature*, 379, 635–638.
- Kuffner M, De Maria S, Puschenreiter M, Fallmann K, Wieshammer G, Gorfer M, Strauss J, Rivelli A R, Sessitsch A. 2010. Culturable bacteria from Zn- and Cd-

Note de recherche

- accumulating *Salix caprea* with differential effects on plant growth and heavy metal availability, *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1471-1484.
- L'Huillier L, Jaffré T, Wulff A. 2010. Mines et environnement en Nouvelle-Calédonie: les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration. IAC, p. 412. Nouméa.
- Lane B G. 1991. Cellular desiccation and hydration - Developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos, *FASEB Journal*, 5, 2893-2901.
- Lane B G. 2002. Oxalate, germins, and higher-plant pathogens, *IUBMB Life*, 53, 67-75.
- Lane T S, Rempe C S, Davitt J, Staton M E, Peng Y, Soltis D E, Melkonian M, Deyholos M, Leebens-Mack J H, Chase M, Rothfels C J, Stevenson D, Graham S W, Yu J, Liu T, Pires J C, Edger P P, Zhang Y, Xie Y, Zhu Y, Carpenter E, Wong G K, Stewart C N Jr. 2016. Diversity of ABC transporter genes across the plant kingdom and their potential utility in biotechnology, *BMC Biotechnology*, 16, 47.
- Lazzaro A, Widmer F, Sperisen C, Frey B. 2008. Identification of dominant bacterial phylotypes in a cadmium-treated forest soil, *FEMS Microbiology Ecology*, 63, 143-155.
- Lee J Y, Yang J G, Zhitnitsky D, Lewinson O, Rees D C. 2014. Structural basis for heavy metal detoxification by an Atm1-type ABC exporter, *Science*, 343, 1133-1136.
- Lemaire B, Lachenaud O, Persson C, Smets E, Dessein S. 2012. Screening for leaf-associated endophytes in the genus *Psychotria* (*Rubiaceae*), *FEMS Microbiology Ecology*, 81, 364-372.
- Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul J M, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M. 2006. Genetics and biochemistry of seed flavonoids, *Annual Review of Plant Biology*, 57, 405-430.
- Lewis A P, Crowther D. 2005. DING proteins are from *Pseudomonas*, *FEMS Microbiology Letters*, 252, 215-222.
- Li Z S, Lu Y P, Zhen R G, Szczypka M, Thiele D J, Rea P A. 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato) cadmium, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 42-47.
- Losfeld G, L'Huillier L, Fogliani B, Jaffré T, Grison C. 2015. Mining in New Caledonia: environmental stakes and restoration opportunities, *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 5592-5607.
- Ma Y, Rajkumar M, Freitas H. 2009. Improvement of plant growth and nickel uptake by nickel resistant-plant-growth promoting bacteria, *Journal of Hazardous Materials*, 166, 1154-1161.
- Ma Y, Rajkumar M, Zhang C, Freitas H. 2016. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation, *Journal of Environmental Management*, 174, 14-25.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Sa T. 2007. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L), *Chemosphere*, 69, 220-228.
- Mari S, Gendre D, Pianelli K, Ouerdane L, Lobinski R, Briat J-F, Lebrun M, Czernic P. 2006. Root-to-shoot long-distance circulation of nicotianamine and nicotianamine-nickel chelates in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Journal of Experimental Botany*, 57, 4111-4122.

Note de recherche

- McAlister R L, Kolterman D A, Pollard A J. 2015. Nickel hyperaccumulation in populations of *Psychotria grandis* (Rubiaceae) from serpentine and non-serpentine soils of Puerto Rico, *Australian Journal of Botany*, 63, 85–91.
- Membré N, Bernier F, Staiger D, Berna A. 2000. *Arabidopsis thaliana* germin-like proteins: common and specific features point to a variety of functions, *Planta*, 211, 345–354.
- Merlot S, Hannibal L, Martins S, Martinelli L, Amir H, Lebrun M, Thomine S. 2014. The metal transporter PgIREG1 from the hyperaccumulator *Psychotria gabriellae* is a candidate gene for nickel tolerance and accumulation, *Journal of Experimental Botany*, 65, 1551-1564.
- Midha S, Bansal K, Sharma S, Kumar N, Patil P P, Chaudhry V, Patil P B. 2016. Genomic resource of rice seed associated bacteria, *Frontiers in Microbiology*, 6, 1551.
- Miernyk J A, Hajduch M. 2011. Seed proteomics, *Journal of Proteomics*, 74, 389-400.
- Mittermeier RA, Gil PR, Hoffman M, Pilgrim J, Brooks T, Mittermeier CG, Lamoreux J, da Fonseca GAB, Seligmann PA, Ford H. 2004. *Hotspots revisited*. (CEMEX, Ed.) (p. 390). Mexico: Conservation International.
- Morales R, Berna A, Carpentier P, Contreras-Martel C, Renault F, Nicodeme M, Chesne-Seck M L, Bernier F, Dupuy J, Schaeffer C, Chabrière E. 2007. Discovery and crystallographic structure of human apolipoprotein, *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 65, 98–107.
- Morales R, Berna A, Carpentier P, Contreras-Martel C, Renault F, Nicodeme M, Chesne-Seck M-L, Bernier F, Dupuy J, Schaeffer C, Diemer H, Van Dorsselaer A, Fontecilla-Camps J C, Masson P, Rochu D, Chabrière E. 2006. *Serendipitous discovery and X-ray structure of a human phosphate binding apolipoprotein*, *Structure*, 14, 601–609.
- Munzinger J, Morat Ph, Jaffré T, Gâteblé G, Pillon Y, Tronchet F, Veillon J-M, Chalopin M. 2016. *FLORICAL: Checklist of the vascular indigenous flora of New Caledonia*. vers. 22.IV.2016.
<http://www.botanique.nc/herbier/florical>
- Myers N, Mittermeier R A, Mittermeier C G, da Fonseca G A B, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities, *Nature*, 403, 853–858.
- Nakajima S, Ito H, Tanaka R, Tanaka A. 2012. Chlorophyll b reductase plays an essential role in maturation and storability of *Arabidopsis* seeds, *Plant Physiology*, 160, 261–273.
- Nesvizhskii A I. 2014. Proteogenomics: concepts, applications and computational strategies, *Nature Methods*, 11, 1114-1125.
- Osborne T B. 1924. *The vegetable proteins* (2nd edition, p. 125). London Longmans, Green and Co.
- Pantazaki A A., Tsolkas G P, Kyriakidis D A. 2008. A DING phosphatase in *Thermus thermophilus*, *Amino acids*, 34, 437–448.
- Pelletier B. 2007. *Geology of the New Caledonia region and its implications for the study of the New Caledonian biodiversity*. In Payri CE et Richer de Forges B (Eds), *Compendium of marine species of New Caledonia*, IRD Nouméa, 19–32.
- Perera T, Berna A, Scott K, Lemaitre-Guillier C, Bernier F. 2008. Proteins related to St. John's Wort p27SJ, a suppressor of HIV-1 expression, are ubiquitous in plants, *Phytochemistry*, 69, 865–872.

Note de recherche

- Perrier N, Colin F, Jaffré T, Ambrosi J-P, Rose J, Bottero J-Y. 2004. Nickel speciation in *Sebertia acuminata*, a plant growing on a lateritic soil of New Caledonia, *Comptes Rendus Géosciences*, 336, 567–577.
- Pilon-Smits E. 2005. Phytoremediation, *Annual Review of Plant Biology*, 56, 15-39.
- Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C. 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future, *Journal of Proteomics*, 73, 2064–2077.
- Rajjou L, Debeaujon I. 2008. Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds, *Comptes Rendus Biologies*, 331,796-805.
- Rajjou L, Duval M, Gallardo K, Catusse J, Bally J, Job C, Job D. 2012. Seed germination and vigor, *Annual Review of Plant Biology*, 63, 507–533.
- Rajjou L, Gallardo K, Debeaujon I, Vandekerckhove J, Job C, Job D. 2004. The effect of alpha-amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination, *Plant Physiology*, 134, 1598–1613.
- Ravanel S, Gakière B, Job D, Douce R. 1998. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 7805-7812.
- Reeves R D. 1992. In Baker AJM, Proctor J, Reeves RD (Eds) *The vegetation of ultramafic (Serpentine) soils*, Intercept, Andover, Hampshire, UK, 1992) ch. 20, 253 p.
- Reeves R D, Baker J M. 1984. Studies on metal uptake by plants from serpentine and non-serpentine populations of *Thlaspi goesingense* Halácsy (Cruciferae), *New Phytologist*, 98, 191–204.
- Reis V M, Estrada-de los Santos P, Tenorio-Salgado S, Vogel J, Stoffels M, Guyon S, Mavingui P, Baldani V L D, Schmid M, Baldani J I, Balandreau J, Hartmann A, Caballero-Mellado J. 2004. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 2155–2162.
- Sachdeva R, Darbinian N, Khalili K, Amini S, Gonzalez D, Djeghader A, Chabrière E, Suh A, Scott K, Simm M. 2013. DING proteins from phylogenetically different species share high degrees of sequence and structure homology and block transcription of HIV-1 LTR promoter, *PLoS One*, 8, e69623.
- Sachdeva R, Li Y, Shilpi RY, Simm M. 2015. Human X-DING-CD4 mediates resistance to HIV-1 infection through novel paracrine-like signaling, *FEBS Journal*, 282, 937-950.
- Sagner S, Kneer R, Wanner G, Cosson JP, Deus-Neumann B, Zenk MH. 1998. Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*, *Phytochemistry*, 47, 339–347.
- Salt D E, Smith R D, Raskin I. 1998. Phytoremediation, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 643-668.
- Santos PEL, Bustillos-Cristales R, Ecologi P D. 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2790–2798.
- Schevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 68, 850–858.

Note de recherche

- Schulze W X, Usadel B. 2010. Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics, *Annual Review of Plant Biology*, 61, 491-516.
- Schwager S, Lumjiaktase P, Stöckli M, Weisskopf L, Eberl L. 2012. The genetic basis of cadmium resistance of *Burkholderia cenocepacia*, *Environmental Microbiology Reports*, 4, 562-568.
- Scott K, Wu L. 2005. Functional properties of a recombinant bacterial DING protein: comparison with a homologous human protein, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1744, 234-244.
- Seregin I V, Kozhevnikova A D. 2006. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants, *Russian Journal of Plant Physiology*, 53, 257-277.
- Shakoori AR, Muneer B. 2002. Copper-resistant bacteria from industrial effluents and their role in remediation of heavy metals in wastewater, *Folia Microbiologica*, 47, 43-50.
- Sharma A, Dhiman A. 2013. Nickel and cadmium toxicity in plants, *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 2, 20-24.
- Sharma SS, Dietz KJ. 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance, *Trends in Plant Science*, 14, 43-50.
- Shewry PR, Napier JA, Tatham A S. 1995. Seed storage proteins: structures' and biosynthesis. *Plant Cell*, 7, 945-956.
- Singh S, Parihar P, Singh R, Singh V P, Prasad S M. 2015. Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1143.
- Sirhindi G, Mir M A, Abd-Allah E F, Ahmad P, Gucel S. 2016. Jasmonic acid modulates the physio-biochemical attributes, antioxidant enzyme activity, and gene expression in *Glycine max* under nickel toxicity. *Frontiers in Plant Science*, 7, Article Number: 591.
- Sirko A, Brodzik R. 2000. Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochimica Polonica*, 47, 1189-1195.
- Suh A, Le Douce V, Rohr O, Schwartz C, Scott K. 2013. *Pseudomonas* DING proteins as human transcriptional regulators and HIV-1 antagonists. *Virology Journal*, 10, 234.
- Svensson J, Palva E T, Welin B. 2000. Purification of recombinant *Arabidopsis thaliana* dehydrins by metal ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification*, 20, 169-178.
- Szczyпка M S, Wemmie J A, Moye-Rowley W S, Thiele D J. 1994. A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 22853-22857.
- Thakur S, Sharma S S. 2016. Characterization of seed germination, seedling growth, and associated metabolic responses of *Brassica juncea* L. cultivars to elevated nickel concentrations. *Protoplasma*, 253, 571-580.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 4350-4354.
- Tunnacliffe A, Wise M J. 2007. The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 94, 791-812.
- Van der Ent A, Baker AJM, Reeves R, Chaney RL, Anderson CWN, Meech JA,

Note de recherche

- Erskine PD, Simonnot MO, Vaughan J, Morel J L, Echevarria G, Fogliani B, Qiu R L, Mulligan D. R. 2015. Agromining: farming for metals in the future?, *Environmental Science et Technology*, 49, 4773-4780.
- Verbruggen N, Hermans C, Schat H. 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, 181, 759-776.
- Verma S C, Chowdhury S P, Tripathi A. K. 2004. Phylogeny based on 16S rDNA and nifH sequences of *Ralstonia taiwanensis* strains isolated from nitrogen-fixing nodules of *Mimosa pudica* India. *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 313-322.
- Vignais PM, Colbeau A. 2004. Molecular biology of microbial hydrogenases. *Current Issues in Molecular Biology*, 6, 159-188.
- Visioli G, D'Egidio S, Sanangelanton A M. 2014. The bacterial rhizobiome of hyperaccumulators: future perspectives based on omics analysis and advanced microscopy. *Frontiers in Plant Science*, 5, 752.
- Wang W Q, Liu S J, Song S Q, Moller I M. 2015. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. *Plant Physiology and Biochemistry*, 86, 1-15.
- Wilkins M. 2009. Proteomics data mining. *Expert Review of Proteomics*, 6, 599-603.
- Woo E J, Dunwell J M, Goodenough P W, Marvier A C, Pickersgill R W. 2000. Germin is a manganese containing homohexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities. *Nature Structural Biology*, 7, 1036-1040.
- Wulff A S, Hollingsworth P M, Ahrends A, Jaffré T, Veillon J M, L'Huillier L, Fogliani B. 2013. Conservation priorities in a biodiversity hotspot: analysis of narrow endemic plant species in New Caledonia. *PLoS One*, 8, e73371.
- Yusuf M, Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A. 2011. Nickel: an overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86, 1-17.
- Zhang L, Angle J S, Chaney R L, Angle S. 2007. Do high-nickel leaves shed by the nickel hyperaccumulator *Alyssum murale* inhibit seed germination of competing plants?, *New Phytologist*, 173, 509-516.
- Zhang X X, Scott K, Meffin R, Rainey P B. 2007. Genetic characterization of PDSP encoding the DING protein in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *BMC Microbiology*, 7, 114.
- Zheng Q, Cheng Z Z, Yang Z M. 2013. HISN3 mediates adaptive response of *Chlamydomonas reinhardtii* to excess nickel. *Plant and Cell Physiology*, 54, 1951-1962.
- Zongo C. 2010. *Données biologiques et physiologiques sur les semences de quelques espèces de milieux ultramaïques néo-calédoniens*. Thèse de Doctorat, Université de la Nouvelle-Calédonie, 228 p.

Edité par :

Christian Ferault, directeur de recherche honoraire à l'INRA, Membre de l'Académie d'Agriculture de France.

Rapporteurs :

Jean-François Briat, directeur de recherche de classe exceptionnelle du CNRS, ancien chef du département de biologie végétale de l'INRA, membre correspondant de l'Académie

Notes académiques de l'Académie d'agriculture de France
Academic Notes from the French Academy of Agriculture
(N3AF)

Note de recherche

d'agriculture de France.

Yvette Dattée, directeur de recherche honoraire de l'INRA, ancienne directrice du GEVES, membre de l'Académie d'agriculture de France.

Rubrique :

Cet article a été publié dans la rubrique « Notes de recherche » des *Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France*, 9, 1-37.

Reçu :

17 juillet 2016

Accepté :

4 octobre 2016

Publié :

25 octobre 2016

Citation:

Zongo C, Villegente M, Le Pessot L, Job C, Strub J-M, Van Dorsselaer A, Schaeffer-Reiss C, Bernier F, Berna A, Belghazi M, Jacques M-A, Amir H, Burtet-Sarramégna V, Rabier J, Fogliani B, Job D. 2016. Analyse protéomique des graines de *Psychotria gabriellae* (Baill.) Guillaumin, une plante endémique de la Nouvelle-Calédonie, en relation avec la tolérance au nickel. *Notes académiques de l'Académie d'Agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture (N3AF)*, 2(7), 1-37. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a264492>

Les auteurs :



Charly Zongo était chercheur à l'Institut agronomique néo-Calédonien. Il fut le premier Kanak à avoir soutenu une thèse en biologie à l'Université de la Nouvelle-Calédonie.



Matthieu Villegente est responsable de l'unité de Biologie moléculaire au service des laboratoires officiels vétérinaires, agroalimentaires et phytosanitaires de la Nouvelle-Calédonie.



Laurence Le Pessot a exercé le métier d'Ingénieur d'étude à l'INRA de Dijon. Après avoir travaillé pendant plusieurs années sur les protéines du goût, elle est actuellement Professeur de biologie à l'Institut Rondeaux – Idpces (Institut de Préparation au Concours et Etudes Supérieures) de Saint Briec.



Claudette Job est Ingénieur de recherche honoraire au CNRS. Domaines de recherche : physiologie végétale, développement des graines, biochimie des protéines, protéomique.

*Notes académiques de l'Académie d'agriculture de France
Academic Notes from the French Academy of Agriculture
(N3AF)*

Note de recherche



Jean-Marc Strub est Ingénieur de recherche au CNRS. Domaines de recherche : spectrométrie de masse des peptides et protéines, protéomique.



Alain Van Dorsselaer est Directeur de recherche émérite au CNRS. Il est responsable de la plate-forme protéomique Strasbourg Grand Est. Domaines de recherche : cancers, protéomique.



Christine Schaeffer-Reiss est Ingénieur de recherche au CNRS. Domaines de recherche : spectrométrie de masse des peptides et protéines, protéomique.



François Bernier est Professeur à l'Université de Strasbourg. Domaines de recherche : physiologie végétale, métabolisme, Germin-Like Proteins, oxalate oxydase, protéines DING de plantes, enzymes à cytochrome P450.



Anne Berna est Chargée de recherche au CNRS. Domaines de recherche : biosynthèse et fonctions essentielles de stéroïdes et d'autres isoprénoïdes végétaux, biochimie des protéines, germines et protéines DING végétales.



Maya Belghazi est Ingénieur de recherche au CNRS. Elle est responsable de la plate-forme de protéomique du Centre d'analyse protéomique de Marseille. Domaines de recherche : protéomique, quantification des protéines et des peptides, étude des interactomes.



Hamid Amir est Professeur à l'Université de la Nouvelle-Calédonie. Il est responsable du Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement (LIVE – EA 4243), Nouméa. Domaines de recherche : microbiologie, tolérance des plantes au nickel.



Marie-Agnès Jacques est Directeur de recherche à l'INRA. Elle est responsable de l'équipe EmerSys à l'Institut de Recherche en Horticulture et Semences (INRA, Angers). Domaines de recherche : microbiologie, santé des plantes, microbiote des graines.

Note de recherche



Valérie Burtet-Sarramégna est Maître de conférences en biochimie et biologie moléculaire à l'Université de la Nouvelle-Calédonie. Domaines de recherche : physiologie végétale, plantes endémiques de la Nouvelle-Calédonie.



Jacques Rabier est Maître de conférences à l'Université d'Aix-Marseille. Domaines de recherche : mécanismes physiologiques des interactions plantes-environnement, phytoremédiation, endomycorhizes, tolérance aux métaux lourds.



Bruno Fogliani est Chercheur HDR, directeur-adjoint de l'Institut Agronomique néo-Calédonien. Domaines de recherche : écophysiologie de la germination des plantes endémiques de la Nouvelle-Calédonie, conservation et restauration écologique.



Dominique Job est Directeur de recherche émérite au CNRS. Chercheur en physiologie végétale, ses travaux portent sur le développement et l'évolution des plantes, mettant en particulier en évidence la dynamique du protéome des graines.

Matériel supplémentaire

Analyse protéomique des graines de *Psychotria gabriellae* (Baill.) Guillaumin, plante endémique de la Nouvelle-Calédonie, en relation avec la tolérance au nickel

C. Zongo^{1,§,‡}, M. Villegente^{1,§}, L. Le Pessot², C. Job², J.-M. Strub^{3,4}, A. Van Dorsselaer^{3,4}, C. Schaeffer-Reiss^{3,4}, F. Bernier⁵, A. Berna⁵, M. Belghazi⁶, M.-A. Jacques⁷, H. Amir¹, V. Burtet-Sarramégn^{1,*}, J. Rabier⁸, B. Fogliani^{1,9,*}, D. Job^{2,*}

¹ Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement (LIVE – EA 4243), Université de la Nouvelle-Calédonie, Nouvelle-Calédonie

² Laboratoire mixte CNRS / Université Claude Bernard Lyon 1 / INSA / Bayer CropScience (UMR CNRS 5240), Lyon, France

³ Université de Strasbourg, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC – UMR CNRS 7178), Strasbourg, France

⁴ ProFI: Proteomic French Infrastructure, Strasbourg site (<http://www.profi-proteomics.fr/>)

⁵ Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (UPR CNRS 2357), Strasbourg, France

⁶ Centre d'Analyse Protéomique de Marseille (CAPM), Faculté de Médecine, Marseille, France

⁷ Institut de Recherche en Horticulture et Semences (UMR 1345 IRHS), INRA, AGROCAMPUS-Ouest, Université d'Angers, SFR 4207 QUASAV Beaucouzé, France

⁸ Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (IMBE, UMR Université Aix Marseille / CNRS 7263 / IRD 237 / Avignon Université), Marseille, France

⁹ Institut Agronomique néo-Calédonien (IAC), « Diversités biologique et fonctionnelle des écosystèmes terrestres », Païta, Nouvelle-Calédonie.

§ Contributions égales

‡ Cet article est dédié à la mémoire de Charly Zongo

* Correspondance : job.dominique@gmail.com ; vandors@unistra.fr ; valerie.sarramegna@univ-nc.nc ; fogliani@iac.nc

Matériel supplémentaire

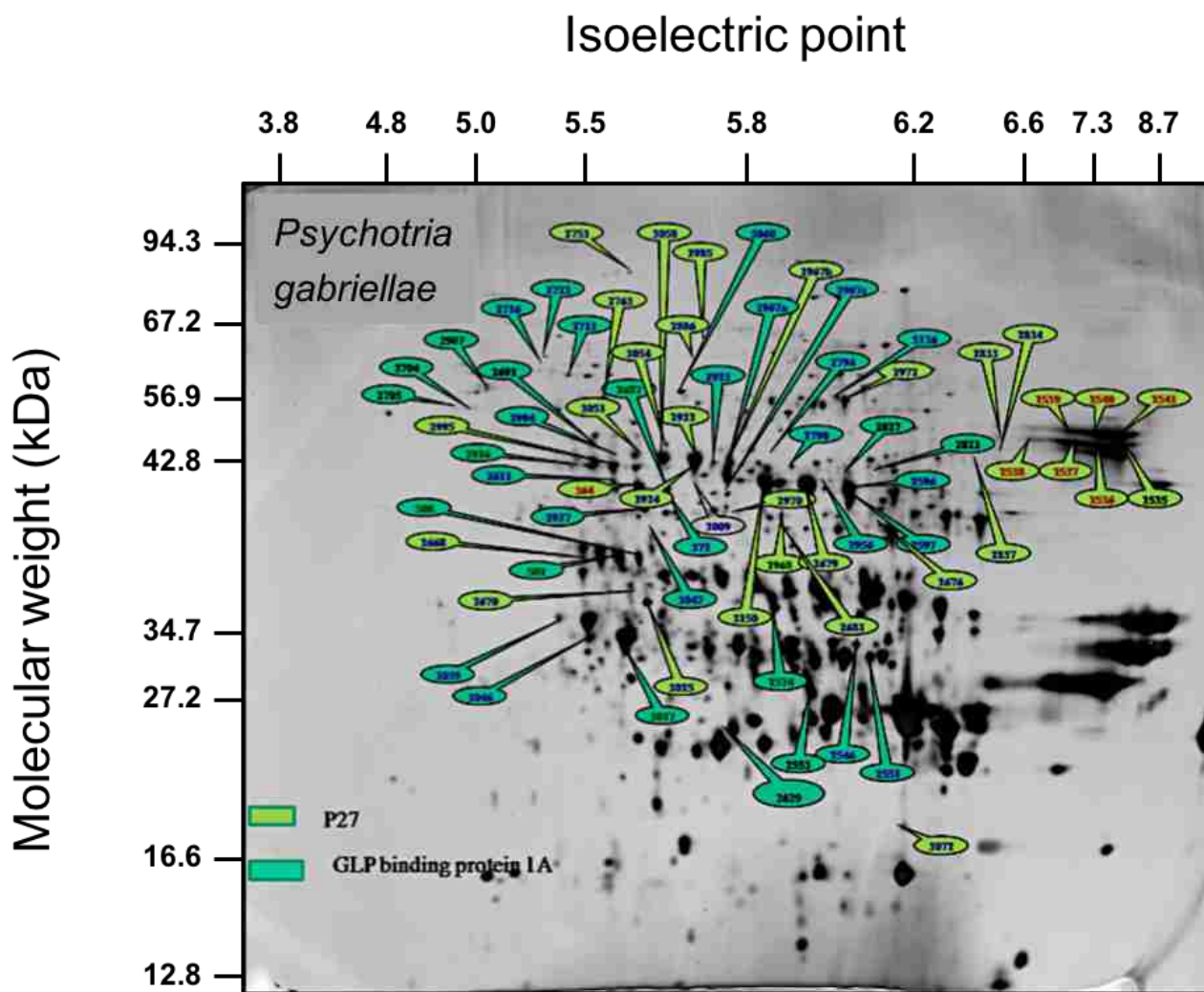


Figure S1. Gel 2D montrant les protéines albumines de *Psychotria gabriellae* identifiées comme appartenant à la classe fonctionnelle des protéines du métabolisme du phosphate. Le protéome contient deux protéines de cette classe : la protéine p27SJ de millepertuis (*Hypericum perforatum*) (représentée en vert-jaune) et la protéine GLP-binding protein 1a d'*Arabidopsis thaliana* (représentée en bleu). Cf. Tableau supplémentaire S1. Les graines ont été récoltées au Mont Koghi en 2006, 2009 et 2010 ; cf. Figure 1).

Matériel supplémentaire

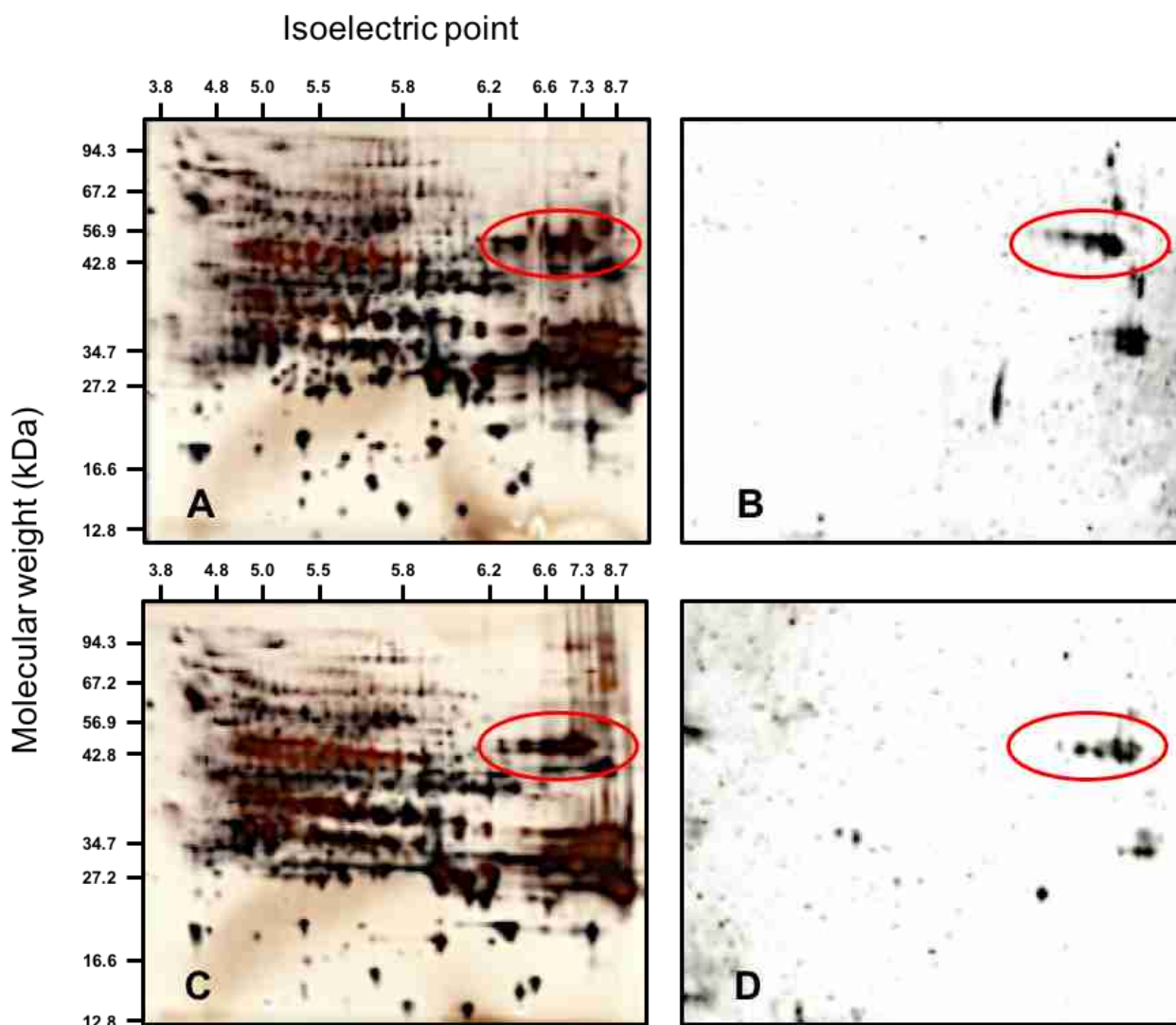


Figure S2. Gels d'électrophorèse bidimensionnelle des fractions albumines de différentes populations de graines matures de *Psychotria gabriellae*. A : graines récoltées à Poya (coloration des protéines à l'argent) ; C : graines récoltées au Mont Koghi (coloration des protéines à l'argent). B et D : western blots correspondant aux gels 2D présentés en A et C, respectivement, révélés avec l'anticorps anti-DING de tabac (Perera et al. 2008). La localisation des populations de *P. gabriellae* sur la Grande-Terre est indiquée en Figure 1. Les ovals rouges montrent les protéines DING de *P. gabriellae* de 40 kDa environ dont la caractérisation des peptides par spectrométrie de masse est présentée en Figure 6. Les données de masses peptidiques sont accessibles auprès de la plate-forme de protéomique de Strasbourg Grand Est (jmstrub@unistra.fr).

Matériel supplémentaire

Tableau supplémentaire S1. Protéome de la graine de *Psychotria gabriellae*.

Voir le fichier attaché *N3AF Nickel Tableau supplémentaire S1*

Matériel supplémentaire

Tableau supplémentaire S2 : Séquences obtenues par amplification PCR de l'ARN ribosomique 16S de bactéries endophytes isolées de graines mures sèches de *Psychotria gabriellae* (graines récoltées au Mont Koghi en 2010 et 2011 ; cf. Figure 1) et résultats des analyses d'homologies de séquences (Blast) ayant permis leur identification.

>110822-33_A03_II-518F.ab1 1310

GTAATAACGATCGGATTATTGGGCGTAAGC
GCGCGTAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTG
AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCA
TTGGAAACTGGAAACTTTGAGTGCAGAAGA
GGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAA
ATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGG
CGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACG
CTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
CGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCG
CCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGC
ACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGT
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGC
ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCA
AGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGA
CATCCTTTGACCGCTCTAGAGATAGAGTTTT
CCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGT
GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGA
TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGG
CACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCG
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCA
TGCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGACAATAAAGGGCAGCTAAACC
GCGAGGTCAAGCAAATCCATAAAGTTGTT
CTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGAC
TACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAG
ATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGG
GTCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGA
GAGTTTGTAACACCCGAAGCCGGTGGAGTA
ACCATTATGGAGCTAGCCGTGGAAGTGGG
ACAATGATTGGGTGAGCGCGAGGGGCCCC
CCCCCAATCCTGTTTCCGGGGTTTTTTCC
CCCCGCGCGGAGAAATAGGCCCGGTTTAT
TATGTTTCTTCTCTCGCGAGACGAGTATTTT

GTCAAAAAAATTTCCACCCCCCTCGTTT
TTACCCTGCGGTTTTATCCCCGCTCGAGAA
AAACACCTCTGGTGCCTGCCACAGAGAA
AGAGATAGGGGCGGATCTTCTCGCGTGG
ATGACACACTCTCCCGCCTGGGGCCGGAT
CCGTTGCGTTGGGGGTAAGAAGCTCATGT
CATCTTAATCATTAGCGCGACTAGCGCAGC
TACTATATTTGATGAAGCGAGACGTGCGGT
GCTGCTCCCGT
TCCCTCTGCA

Nucleotide Blast

Staphylococcus pasteurii strain CrK14 16S
ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|GQ503327.1](#)|Length:

1472Number of Matches: 1

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gap
1711 bits(926)	0.0	936/940(99%)	3/9

>110822-33_C03_II-800R.ab1 1201

GTGGACTTTCGCATCAGCGTCAGTTACAG
ACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGT
CCTCATATCTCTGCGCATTTCACCGCTACA
CATGGAATTCACCTTTCTCTTCTGCACTC
AAGTTTTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACG
GTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTA
AAAAACCGCCTACGCGCGCTTACGCCCA
ATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGT
ATTACCGCGGCTGCTGGCAGTAGTTAGC
CGTGGCTTTCTGATCAGGTACCGTCAAGA
CGTGCACAGTTACTTACACGTTTGTCTTC
CCTGATAACAGAGTTTTACGATCCGAAGAC
CTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTC
AGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCCTA
CTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGT
GTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCCCT
CTCAGGTCCGCTACGTATCGTTGCCTTGGT
AAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATACG
GCGCGGATCCATCTATAAGTGACAGCAAG
GCCGTCTTTCACCTATTGAACCATGCGGTT
AAAATCTTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCC
CGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTAT
CCACGTGTTACTCACCCGTCCGCGGCTAA
CGTCAAAGGAGCAAGCTCCTTATCTGTTCC
CTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCC

Matériel supplémentaire

AGCGTTCATCCTGAGCAATAAAAAAACTAT
 ATAAAAGAGCTGGAATCGGAGTATTCAAAGA
 GCAGCATGGGAATCTCAATATTTTGTCTGGT
 GTTGTAACTTTTCCGTCTCACCATGGGGAG
 TATCTAGACCAGGAGGGGGATCATAACAGTT
 ATGGAGAAACCCGCCAACGTGGGGCTATGA
 TGGGTTAATTACAGGAAACCACTGCGCACC
 TCATACTATCGGGGGCGGTTGTAGATAGTTA
 GAAGAGGATTTTCTCCCTCCCGTTCGCGACA
 TGACTGCACGGGTAGTATGGTGTGCTCTCC
 TGATAAGAAGTTGTAGGATCCAACACTTACA
 CCTCACTGGAGTGCCGTACGATTGGCTGGG
 AGAAATTCGGTGCGCGCTCAGGAGAAGTAG
 GACGTTAACTACGCGTGCATTGCTAGCTC
 AGTCTCGATGAACCGTACTACCGATAACCG
 GAT

Nucleotide Blast

Staphylococcus pasteurii strain IHB B 7069 16S
 ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|KJ767309.1|Length:

1524Number of Matches: 1

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities
1384 bits(749)	0.0	762/768(99%)

>110822-33_E03_III-518F.ab1 1301

GGGAGTGACGTTTCGGATTATTGGGCGTAAG
 CGCGCGTAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGT
 GAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTC
 ATTGGAAACTGGAAAACCTGAGTGCAGAAG
 AGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGA
 AATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAAGT
 GCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTAC
 GCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACA
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
 AACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTC
 CGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA
 GCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAG
 GTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC
 GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATC
 GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTT
 GACATCCTTTGACCGCTCTAGAGATAGAGT
 CTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGT
 GGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTG

AGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG
 CAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGT
 TGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACA
 AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAA
 TCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACAC
 ACGTGCTACAATGGACAATACAAAGGGCA
 GCTAAACCGCGAGGTCAAGCAAATCCCAT
 AAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTG
 CAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTA
 GTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAAT
 ACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCG
 TCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAA
 GCCGGTGGAGTAACCATTTATGGAGCTAG
 CCGTCGAAGTGGGACAATGATGGGGTGAG
 CTCGAGGGGGGGCCCCCCCCCAAGTGT
 TTCGGGGTTTTTCTACTCCGCCGGAAGA
 AATGGGCGAGGTTCTATTCTATTTTTTTCT
 TCTCGTGTGAAAGAAGTTGTTGAAAAAAA
 AACTCTCTCACCCCGGGGTTGTTCTC
 TGGGGTCTCCTCCAATGATGAAAATATATT
 CTGGGCGCTCGCAACGCAAAGAGAGACG
 GATGGATTTACATTGGGGGTGACGCACAC
 CTCTGTGGTGGGGCGCGATCAGTTGTTCT
 TGGGGGGCGAACCGCGTGCATCACTACAAC
 GAGGCGAGCGGAGCCGCATCTATTAGTAG
 ATGACCAGAGCGAAGCATCGGCTACTTGA
 C

Nucleotide Blast

Staphylococcus pasteurii strain CrK14 16S
 ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|GQ503327.1|Length:

1472Number of Matches: 1

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gap
1716 bits(929)	0.0	937/940(99%)	3/94

>110822-33_G03_III-800R.ab1 1173

TGGAATCTTTCGCATCAGCGTCAGTTACAG
 ACCAGAAAGTCGCCCTTCGCCACTGGTGT
 CCTCCATATCTCTGCGCATTTCACCGCTAC
 ACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACT
 CAAGTTTTCCAGTTTCCAATGACCCTCCAC
 GGTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACT

Matériel supplémentaire

TAAAAAACCGCCTACGCGCGCTTTACGCC
 AATAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGT
 ATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCC
 GTGGCTTTCTGATCAGGTACCGTCAAGATG
 TGCACAGTTACTTACACATTTGTTCTTCCCT
 GATAACAGAGTTTTACGATCCGAAGACCTTC
 ATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCT
 TTCGCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCT
 GCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCA
 GTTCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGT
 CGGCTACGTATCGTTGCCTTGGTAAGCCGT
 TACCTTACCAACTAGCTAATACGGCGCGGAT
 CCATCTATAAGTGACAGCAAAGCCGCCTTTC
 ACTATTGAACCATGCGGTTCAATATGTTATCC
 GGTATTAGCTCCGTTTTCCCGAAGTTATCCC
 AGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACT
 CACCCGTCCGCCGCTAACGTCAAAGGAGC
 AAGCTCCTTATCTGTTGCTCGACTTGCATG
 TATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGA
 GCAGTCAGACCTCTCTAACGCTGGTTAA
 GGGGGATGCACTAGGTAACGGAGGGAAT
 CCCCCCTTTATGTTTGGCTCCAGTATCTCAC
 GCCTCCAGGGGACGCACAAGCGGAGAGG
 GTGGACTTTCACAGGACAGAGAAAGCCCTC
 CAACGGGGGTGTACGTGGTTATTTTATGGAT
 GAGTAGGCAACCTCCATAATCTGCGCTGCT
 GGACGGACGTTGAGAGGGACTTCATCATCC
 AGCCGAGCAAGAGCGCCGGTCATGTACGC
 TTGTCGTCTCGCTGGATAGAGGAATTGTAA
 GATCAGACACTACAACCCACTGTATGTCTGC
 GTCTCAGCTGAAAATTCGTGCGCCAGAAAG
 TGAGCGTATCATACGCTGAATTGTACGCCTC
 AGTCTAGCGAGGACGTACTCGACTG

GGGTGAAAGCCTGTGGCTCAACCACAGAA
 TTGCCTTCGATACTGGTTGGCTTGAGACC
 GGAAGAGGACAGCGGAACTGCGAGTGTA
 GAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAAC
 ACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCC
 GGTTCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTG
 GGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTA
 GTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAGCC
 GTTGGCCTGCTTGCAGGTCAGTGGCGCC
 GCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGA
 GTACGGTCGCAAGATTAACACTCAAAGGAA
 TTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG
 CATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGA
 ACCTTACCATCCCTTGACATGGCATGTTAC
 CTCGAGAGATCGGGGATCCTCTTCGGAGG
 CGTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT
 CAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAG
 TCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTTA
 GTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGG
 GAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAA
 GGTGTGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCC
 CTTACGGGATGGGCTACACACGTGCTACA
 ATGGCGGTGACAGTGGGACGCGAAACCG
 CGAGGTTGAGCAAATCCCCAAAAGCCGTC
 TCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGGG
 TGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGTG
 GATCAGCACGCCACGGTGAATACGTTCCC
 GGGCCTTGTACACACCCGCCCGTCACACCA
 TGGGAGTTGGTCTTACCCGACGGCGCTGC
 GCCAACC GCAAGGAGGCAGCGACCACGG
 TAGGGTCAGCGACTGGGGTGAGCGCGAG
 GGGGGGCGGCGCTCCCCCATGCGCTTTC
 CGCGGGGGTTTATATTTCTGTGGGGTATAT
 TTATCTCGCGCAGAAAGAAAAGAAGCTATT
 ACCCCACGGAGTGCTTTACTATCCCTCGCA
 GGGAGGGGTGCGCACGTGGGTCCCCCCCA
 GTGAGAATATTACACTGTCTCGTCCGCTCA
 GAGGTAGAGGTGGTGCCTGCCCCACAC
 CGGGGGGGGAGTAGTCTCGCCACCACCA
 GCTATAGATATGCCCTGAGTAGATCAGCCC
 ACTCAACACCACTACAATCAGCACGACCG
 CTGCCTCGTCGTATGATACTCCTACTCACG
 TACCTACATGAGTGGTACTAGATATACTAGT
 AAT

Nucleotide Blast

Staphylococcus pasteurii 16S ribosomal RNA
 gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KF241144.1|](#) Length:

1513 Number of Matches: 1

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps
1382 bits(748)	0.0	753/755(99%)	2/755(0%)

>110822-33_I03_IV-518F.ab1 1308

TGGGACGTCGAGCTCGGATCACTGGGCGT
 AAGGGCGCGTAGGCGGCCGATTAAGTCGG

Nucleotide Blast

Methylobacterium populi strain VP2 16S

Matériel supplémentaire

ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KF955558.1](#)|Length:

1409Number of Matches: 1

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities
1712 bits(927)	0.0	935/938(99%)

GTGCGCTCACCGATCGAAGACGCATCCGC
 CTACCAAGCTCCAGGGAAGGGTGAGATTA
 GCCTGAAGAGAAAACAAGATAGGGCTCG
 GTTGACTTTAGTAGACCCTCACCACACTTC
 ACATATAAAGATATGCGTACGCCGTGGTCC
 CTCAGCGGTGCGAGATAATAACACAGTACT
 TCATTACCTTGTATATGAGGTGAGCTAA

>110822-33_K03_IV-800R.ab1 1321

GAGGTTTTTCGCGCTCAGCGTCAGACCGG
 ACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTT
 TTGCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACT
 CGCAGTTCGCTGTCTCTTCCGGTCTCAA
 GCCAACAGTATCGAAGGCAATTCTGTGGT
 TGAGCCACAGGCTTTCACCCCGACTTAAT
 CGGCCGCCTACGCGCCCTTTACGCCCAGT
 GATTCCGAGCAACGCTAGCCCCCTTCGTAT
 TACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCG
 GGGCTTATTCTTCCGGTACCGTCATTATCGT
 CCCGGACAAAAGAGCTTTACAACCCTAAGG
 CCTTCATCACTCACGCGGCATGGCTGGATC
 AGGCTTGCGCCATTGTCCAATATCCCA
 CTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGT
 GTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCCTC
 TCAGACCAGCTACTGATCGTCGCCTTGTA
 GGCCGTTACCCACCAACAAGCTAATCAGA
 CGCGGGCCGATCCTTCGGCAGTAAACCTTT
 CCCATAAGGGCGTATCCGGTATTAGCTCAA
 GTTTCCCTGAGTTATTCCGAACCGAAGGGC
 ACGTTCCACGTGTTACTCACCCGTCTGCC
 ACTGACTTCCGAAGAAGCCCGTTCGACTTG
 CATGTGTTAAGCCTGCCGCCAGCGTTCGCT
 CTGAGCCTATTCAAACCCTCTGACTTGGGG
 GCCACATTTCCAGAACCGCCTCGCCTGCAT
 TATAGTCAACTGGTGCTCTACAAGAAATATA
 AATACTGCTGGCGAGAATGGCACCGACTGG
 ACTTCATGGGGTTTGGAGGGGGCCCGCCA
 CCAGCGGAGTATGGGGGGTTAATTACAAG
 ACTTTCACCCAAACCTTTACATCCCTTTGAA
 CGGTTTTTACCCCAAAGAATTGAGAAATCC
 TTCTCTCGTCTTTCTTACTAGGGTGGAGAGT
 GGGGAGTAATCTCTGGGGGTTAGAATTTGT
 GGGAACAATCTCTACCCACGCGAAACAAAA
 GAACCTATTAATACCCAATTGTTTTTTGTGCG
 CTCCCCGAAGAGGACATTGTGCAATGAATC
 CCCCCACAAGTAGCTTGAATTAATCACGC

Nucleotide Blast

Methylobacterium populi gene for 16S
 ribosomal RNA, partial sequence, strain: z68b

Sequence ID: [dbj|AB698694.1](#)|Length:

1446Number of Matches: 1

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps
1267 bits(686)	0.0	691/693(99%)	2/693(0%)

>110825-26_E01_V-518F.ab1 1332

AAGATCATTTCGAGCTCAGCGTCATTACAGA
 CCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTT
 CTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACAC
 ATGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCATTCA
 AGTTCCCCAGTTTCCAATGACCTTCCTCGG
 TTGAGCCGAGGGCTTTCACATCAGACTTAA
 GAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCCAA
 TAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTA
 TTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCC
 GTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAAGGTG
 GGAACAGTTACTCTCCCACTTGTCTTCTC
 TAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCT
 TCTTCACTCACGCGCGTGTGCTCGGTCAG
 ACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACT
 GCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGT
 CTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCT
 CAGGTCCGGCTATGCATCACGGTCTTGTA
 GGCCATTACCCACCAACTAATAATGCAG
 CGCGGGCCCATCCAACAGTGACACCGAA
 GCGTCTTTTATTATTCTCCCATGCGGGAAA
 ACAATTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCA
 AGTGTATCCCCCTCTGTTGGGCAGGTTG
 CCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTC
 TTTGATTTTCGGTGGAGCAAGCTCCGGTG
 AAAATCAAAGCGTTCGACTTGCATGTATTA
 GGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGTG
 AATAAACCCCTCTCTTATGAGTTTAAACG

Matériel supplémentaire

GTAAGAGGGGAATTTTCGGCGCGTCTTCTCC
 CAATCCCGTGCCCCCCCCTTTTAAAAAAAC
 CCCCCCGGGGAGAGGGGGTTCACCT
 AAAAAAAAAAAAAACGTGTGGGGGGCGTG
 CTCCCCCGTGGAAGAATGAGGATTGTTGT
 ATTAACCAAATAAAAAAACAGCGGGGGG
 GGGGATTATCTTGGCCGCTCCACAGAAGA
 AAAAAATACCCTTGGGGGAAAAAGAATACC
 CCGGGGGGGTGTGTGTCTGAAAACAGCTG
 GTGTGAGGAGAAGAGAAGTCCCTCCCACC
 ACCCGGAGCCGTCTGAAAGATTATATTTCT
 CGCATAGCAACAATCCGCAACGCGCCGCG
 GACAAGCGAGAGTAAGAACGATACAGTGA
 GAGAATAAGCCCCATCCCTCCCCTAGGCTT
 GTCGAACATCGCTCCTACGGGCATGGTGAA
 TACGCAATAGCACCCGCACCGAGAGGGTGA
 AGCGACACGCGGCGTAACTCCCATCACACT
 CACATCTACATAACTATGATGAG

Nucleotide Blast

Vagococcus fluvialis strain M19 16S ribosomal
 RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|JF690756.1](#) | Length:

1534 Number of Matches: 1

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities
1393 bits(754)	0.0	759/761(99%)

>110825-26_G01_V-800R.ab1 1292

GCGTGACGTACGATTATTGGGCGTAAGCGC
 GCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA
 AGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATT
 GGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAG
 GAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAA
 TGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGC
 GAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACAC
 TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
 GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
 CGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCG
 CCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCA
 CTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCT
 GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
 ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCA
 AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA
 CATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTT

CTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGT
 GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAG
 ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
 ACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATAAGTTG
 GGCACCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAA
 CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC
 ATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC
 GTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGC
 AAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAA
 AACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCA
 ACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGT
 AATCGCGGATCAGCATGCGCGGGGTGAAA
 ATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCC
 CGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCG
 AAGTCGGTGGGGTAACCTTTTTGGAGCCA
 GCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATGGGGT
 GATCTCGCGGGCCCCCCCCCTCTCTCCCTT
 TACTGTATGCCCGCGTTTTGTTTGTAGGG
 TGCTCGCCCCGGGGGGGGGCATAATAATGA
 ATAAGTTGTGCTTCTCTCCCCACGAAGT
 GTGATATATTGAGACGCTATTTCCCTCCACC
 CACCGGGGCGCGGGTGTACATAAGATCAC
 ATTTCTGAGATAGGACAAATATCGTCATCTC
 GTGCGGTAGCAGACAGATTAGTTTCGTGAC
 TCAAGTGAGAAGTCAACACACATCCGTAG
 CCGAGGCTCGACACTGTGTTTCGTGTCGTA
 CACTACTCATCTGACAGCGACGAACCATCT
 TACTACTACAACGGGACTTCA

Nucleotide Blast

Bacillus cereus strain TE10 16S ribosomal
 RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KJ833788.1](#) | Length:

1002 Number of Matches: 1

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps
1705 bits(923)	0.0	954/967(99%)	9/96

Matériel supplémentaire

Caractérisation de la flore endophyte des graines de *P. gabriellae* ne reposant pas sur l'isolement de bactéries vivantes. Les graines de *P. gabriellae* récoltées au Mont Koghi en 2010 et 2011 (cf. Figure 1) ont été macérées pendant 12 h à 4°C sous agitation puis le macérât a été porté à ébullition pendant 10 min. L'amplification de l'ADNr 16S a ensuite été réalisée à l'aide d'amorces universelles puis séquencé comme décrit dans les Matériels et Méthodes.

Séquence de l'amplification de l'ADNr 16S :

```
GCCCTGTAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAG
ATTAGCTAATACCGCATACGACCTGAGGGTG
AAAGTGGGGGACCGCAAGGCCTCATGCTAT
AGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTG
GTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCCACGAT
CAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGA
CAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCC
GCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA
AGCACTTTTGTCCGAAAGAAATCGCACTTA
CTAATATTAGGTGTGGATGACGGTACCGGAA
GAATAAGGACCGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGTAGGGTCCAAGCGTTA
ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCA
GGCGGTTGTGCAAGACCGATGTGAAATCCC
CGGGCTTAACCTGGGAATTGCATTGGTGAC
TGCACGGCTAGAGTGTGTCAGAGGGGGGT
AGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTA
GAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGG
CAGCCCCCTGGGATAAACAACGCTCATG
CACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGG
```

Blast results

Ralstonia insidiosa strain BT 8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [gb|KJ848549.1](#)|Length: 1431
Number of Matches: 1

Uncultured *Burkholderiales* bacterium clone PS6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [gb|JX966195.1](#)|Length: 877
Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps
1221 bits(661)	0.0	665/667(99%)	0/667(0)

Score	Expect	Identities
1221 bits(661)		665/667(99%)

Matériel supplémentaire

Tableau supplémentaire S3. Séquences génomiques et plasmidiques des bactéries isolées des graines mures sèches de *Psychotria gabriellae*.

Staphylococcus pasteurii

genome sequence:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_022737.1

Methylobacterium populi

The complete genome sequences of *M. populi* BJ001, which contained one chromosome and two endogenous plasmids, have been deposited in the DDBJ/ENA/GenBank database (accession numbers CP001029 to CP001031);

Pour CP001029 :

http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/getentry/na/CP001029/?format=flatfile&filetype=html&trace=true&show_suppressed=false&limit=10

Pour CP001030 :

http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/getentry/na/CP001030/?format=flatfile&filetype=html&trace=true&show_suppressed=false&limit=10

Pour CP001031 :

http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/getentry/na/CP001031/?format=flatfile&filetype=html&trace=true&show_suppressed=false&limit=10

Bacillus cereus

The complete genome sequence of *B. cereus* ATCC 14579 has been deposited in GenBank at accession numbers AE016877 (chromosome) and AE016878 (plasmid):

Pour AE016877 :

http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/getentry/na/AE016877/?format=flatfile&filetype=html&trace=true&show_suppressed=false&limit=10

Pour AE016878 :

http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/getentry/na/AE016878/?format=flatfile&filetype=html&trace=true&show_suppressed=false&limit=10

Vagococcus fluvialis

Vagococcus fluvialis bH819 genome sequence

Accession: PRJEB275 ID: 184267 :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/184267>

***Ralstonia insidiosa* strain:ATCC 49129**

Taxonomy: *Ralstonia insidiosa*

Project data type: Genome sequencing and assembly

Scope: Other USDA-ARS

Accession: PRJNA324646 - ID: 324646

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/45089>

Synthèse

Tératogénèse induite par les diatomées : un modèle d'interaction proie-prédateur transgénérationnelle

Diatom-induced teratogenesis: a model of transgenerational prey-predator interaction

Serge Poulet

Directeur de recherche émérite au CNRS, Station Biologique de Roscoff (CNRS-Université Pierre et Marie Curie Paris), 29680 Roscoff, France

Correspondance :
sergepoulet2@orange.fr

Résumé :

Un mode de défense chimique original existe chez les diatomées. Il est fondé sur la production de petites chaînes d'acides gras, à partir des acides arachidonique et eicosapentaénoïque comme précurseurs, comprenant une série d'aldéhydes polyinsaturés toxiques de 7 à 12 atomes de carbone, dont la production est provoquée instantanément par une cascade enzymatique, dès la rupture des frustules par les mandibules des copépodes. Durant le transit intestinal, ces aldéhydes s'accumulent dans les ovaires et induisent une série d'anomalies cellulaires, observées au cours de l'ovogenèse, de l'embryogenèse et de la morphogenèse larvaire. Elles provoquent la stérilisation des femelles et la mort des juvéniles, selon une relation dose-réponse. La toxicité des aldéhydes impliqués dans ce type de défense chimique, n'affecte pas la survie des femelles, ni celle des mâles. Ce mécanisme de défense opère à retardement, et constitue un modèle d'interaction proie-prédateur trans-générationnelle.

Abstract:

Polyunsaturated aldehydes produced by diatoms species are ingested by female copepods and tend to accumulate in their gonads. These small molecules induce several lethal teratogenic effects on copepods in comparison to aldehydes free diatom in control diets. Cell anomalies are observed in gonads, embryos and larvae. They induce several lethal effects, including the decline of spawning rates and sterilization of females in few days. Embryogenesis is deeply disturbed as well as morphogenesis in larvae. Consequently, hatching rates decline, or mortality of larvae increases. These responses are dose-dependent and reversible. They illustrate an interesting predator-prey model among planktonic organisms. They also show that diatom species have evolved a very sophisticated chemical defense mechanism against copepods, one of their major predators.

Synthèse

Keywords:

Diatom-copepod interactions, inhibitory aldehydes

Mots clefs :

Interactions diatomées-copépodes, aldéhydes toxiques

Introduction

Les diatomées sont connues par un large public pour différentes raisons. Rappelons que d'importants dépôts sédimentaires, riches en diatomées, se sont constitués à partir de l'ère secondaire, dès le Jurassique et au cours du Crétacé. Ce qui témoigne d'une longue existence, d'une permanente adaptation et d'une remarquable résilience de la part de ces organismes, au cours de l'évolution. La roche ainsi formée, connue sous le nom de diatomite, est constituée des frustules siliceuses fossilisées (structure bivalve renfermant la cellule des diatomées), dont les propriétés spécifiques sont utilisées dans l'industrie en tant qu'agent de filtration et de clarification du vin, comme abrasifs pour le polissage des verre de lunettes, ou comme additifs dans divers produits industriels, telles les peintures, ou entrant dans la fabrication de la dynamite comme stabilisateur de la nitroglycérine.

Enfin, la renommée des diatomées est aussi liée au fait qu'elles sont à l'origine de la formation de certains pétroles fossiles. Dans les domaines de la biotechnologie, elles font partie des micro-algues, candidates potentielles pour la fabrication de futurs biocarburants renouvelables (Daboussi *et al.*, 2014). Elles constituent une source naturelle d'acides gras polyinsaturés, de pigments et d'antioxydants utilisables dans divers produits alimentaires et cosmétiques (Bozarth *et al.*, 2009 ; Scaife et Smith, 2016).

Aujourd'hui on connaît environ 100 000 espèces de ces micro-algues. Elles sont remarquables en raison de l'extraordinaire

diversité de la forme, de l'ornementation et de l'ultrastructure de leur frustule siliceuse, en raison de leur diversité génétique, et, aussi, en raison de leurs caractéristiques chimiques, biologiques et écologiques.

Unicellulaires ou coloniales, les espèces occupent, en zone photique, tous les écosystèmes benthiques ou pélagiques connus. Certaines espèces prolifèrent rapidement, selon certaines conditions physico-chimiques favorables du milieu, formant parfois des efflorescences de tailles gigantesques, détectées, mesurées et suivies en mer par les satellites de télédétection. Elles constituent une des composantes majeures du phytoplancton marin et d'eau douce (Field *et al.*, 1998). A ce titre, elles ont un intérêt pratique pour l'évaluation de la qualité de l'eau potable et de la contamination par les pesticides, ou herbicides, des cours d'eau, en France et dans le monde (Rimet et Bouchez 2011 ; Stevenson *et al.*, 2010). En agriculture, des expériences ont démontré le rôle de pesticide naturel de la poudre de diatomite (Islam *et al.*, 2010). Les diatomées jouent aussi un rôle clé en conchyliculture, constituant une fraction importante de l'alimentation des mollusques filtreurs, telles que huîtres et moules, cultivées en milieu naturel ou sous forme larvaire en écloserie (Pernet *et al.*, 2012).

Enfin les diatomées constituent un des chaînons primaire de la chaîne trophique marine, comptant à l'échelle globale pour 40 % de la productivité végétale annuelle, pour 25 % de la fixation du carbone, et pour 20 % de la génération d'oxygène généré (Field *et al.*, 1998). Dans les écosystèmes pélagiques, une partie variable de cette production organique sédimente, poursuivant ainsi la formation de nouveaux sédiments marins, tandis qu'une autre fraction est utilisée en tant que ressource alimentaire par une multitude d'organismes planctoniques, appartenant au chaînon secondaire du réseau trophique. A ce niveau, un groupe particulier de crustacés planctoniques microscopiques

Synthèse

occupe une position clé dans les écosystèmes pélagiques. Il s'agit des copépodes.

Ces organismes sont capables de capturer des proies dans une très large gamme de tailles (5 µm à quelques centaines de µm), issues de groupes taxonomiques, végétaux ou animaux, extrêmement variables, changeant en fonction de facteurs environnementaux, saisonniers, ou selon le caractère aléatoire des répartitions spatiales des copépodes et de leurs proies, coexistant dans un même milieu. Les diatomées constituent une fraction prépondérante des proies végétales entrant dans le régime de ces crustacés.

Jusque dans les années 1990, et selon un paradigme dominant à l'époque, les diatomées étaient considérées comme le maillon végétal essentiel, assurant une ration régulière en énergie, selon un rapport de rendement théorique égale à 1/10 (Jennings et Collingridge, 2015). C'était sans compter sur les aspects plus subtils des interactions proies-prédateurs, des phénomènes comportementaux, des agents de communications chimiques, des phénomènes d'exclusion et, plus récemment, de la découverte de nouvelles toxines phytoplanctoniques (Pohnert et Boland, 2002 ; Pohnert, 2004).

En explorant ces nouveaux domaines de l'océanographie biologique, des observations ont progressivement repoussé les limites classiques des connaissances sur le fonctionnement de l'écosystème marin, à l'interface diatomée-copépode. Notamment l'action tératogène exercée par les diatomées sur les copépodes qui s'en nourrissent a été découverte (Miralto *et al.*, 1999). Dans les écosystèmes pélagiques océaniques, il n'existe pas de refuges permettant à une proie de se cacher de son prédateur, à l'inverse des milieux benthiques ou terrestres. Les stratégies d'évitement acquises par les diatomées vis-à-vis de leurs principaux prédateurs, les copépodes, reposent donc sur des facteurs physiques et chimiques.

Dans les paragraphes suivants, les différents

aspects de ces interactions proie-prédateur, sont abordés du point de vue mécanique, chimique et ontogénique.

1. La co-évolution proie-prédateur : une vieille histoire de morphologie et de mécanique

Les copépodes et les diatomées ont co-évolué de façon parallèle. Les premiers ont une carapace et des pièces mandibulaires segmentées et articulées, constituées de chitine, comme chez tous les crustacés. Cependant, chez les copépodes, la chitine trop flexible des pièces buccales ne permettrait pas de broyer les diatomées, protégées par des frustules siliceuses, rigides et particulièrement résistantes à la pression des dents de ces micro-crustacés.

En effet, à l'échelle microscopique où opèrent les pièces buccales des copépodes, une pression équivalente de 100 à 700 tonnes/m² doit être exercée pour parvenir à faire éclater une cellule de diatomée (Hamm *et al.*, 2003). Pour réussir ce tour de force, les mandibules des copépodes sont munies, à leurs extrémités, de dents acérées, recouvertes d'une mince couche de silice, très résistante et rigide. Cette adaptation spécifique constitue un cas unique de métabolisation et d'utilisation de la silice dans le règne animal, mises à part les éponges.

En contrepartie, les diatomées ont des stratégies complémentaires à la résistance physique de leurs frustules pour se défendre contre la prédation. Pour ces algues, on connaît deux autres types de processus de défense. Le premier agit sur la miniaturisation de la taille cellulaire, chez les espèces unicellulaires ; ou, inversement, l'augmentation de la longueur des chaînes de cellules chez les diatomées coloniales. Le second processus concerne la présence d'ornementations sur chaque cellule, constituées de nombreux et très longs spicules siliceux protecteurs.

Synthèse

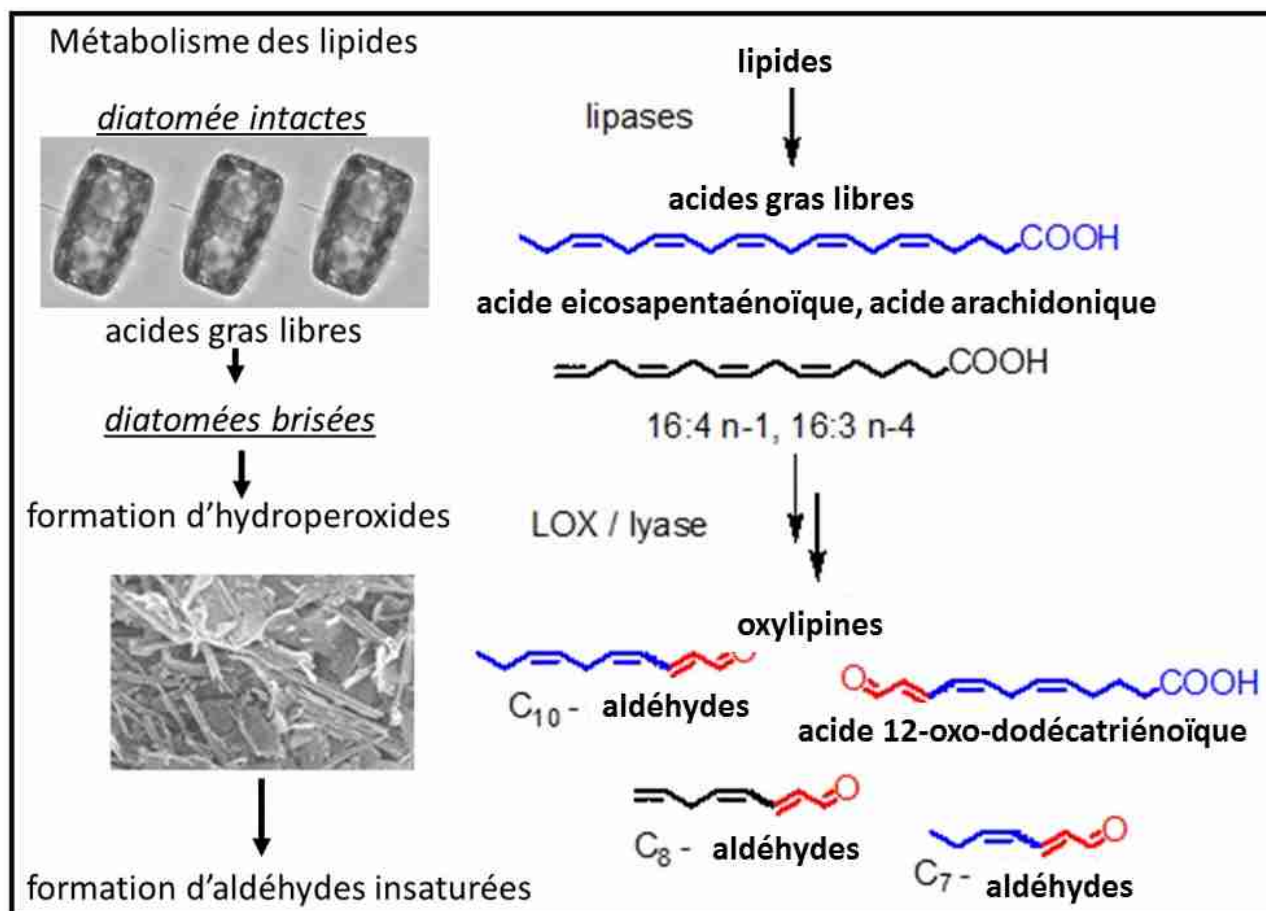


Figure 1. Différentes étapes de la production d'oxylipines par les diatomées. La formation d'aldéhydes toxiques en C7-C12, à partir de précurseurs lipidiques (acides arachidonique et eicosapentaénoïque) s'effectue selon une voie métabolique utilisant une cascade d'enzymes spécifiques (à droite). Cette voie est activée dès la rupture des diatomées par les mandibules des copépodes (à gauche). (Modifié d'après Pohnert, 2004).

Ces deux propriétés morphologiques renforcent ou provoquent soit l'inefficacité de capture des petites cellules isolées, soit l'évitement des plus longues colonies, réduisant ainsi la fréquence de mortalité cellulaire par mastication. Un autre phénomène bien connu d'échappement à la voracité du prédateur, consiste, chez les diatomées, à l'instar de la majorité des organismes phytoplanctoniques, à former des efflorescences dont la densité cellulaire entraîne un phénomène d'exclusion, soit par création d'une bulle anoxique, soit par l'émission de composés chimiques répulsifs

(diméthylsulfoxyde : DMSO ; aldéhydes poly-insaturés : PUA).

En résumé, il est concevable d'imaginer que cette interaction entre prédateurs zooplanctoniques et proies phytoplanctoniques se soit poursuivie à l'avantage des diatomées, par réduction partielle, ou massive de leur destruction par les copépodes, grâce à leurs diverses adaptations morphologique et chimique, et à leur capacité de prolifération. Indirectement ces stratégies adaptatives leur permettent de sédimenter en masse sur les fonds marins,

Synthèse

après chaque efflorescence saisonnière, comme en témoigne l'épaisseur des couches anciennes de diatomite.

2. Les facteurs chimiques de défense

Depuis deux décennies, de nouveaux agents chimiques de défense ont été identifiés. Les composés à la base de ce processus de défense sont des triglycérides fabriqués en quantité par les diatomées. Par l'action successive de lipases spécifiques, ces microalgues métabolisent une série d'acides gras polyinsaturés à longues chaînes carbonées, comportant 16 à 22 atomes de carbone. Parmi ce stock, utilisé pour les besoins en énergie ou la constitution des membranes cellulaires (après transformation en phospholipides), deux acides gras libres sont importants : il s'agit des acides arachidonique (C20:4 *n*-6) et eicosapentaénoïque (C20:5 *n*-3), les deux principaux précurseurs du mécanisme de défense.

La formation d'aldéhydes est déclenchée par la transformation oxydative de ces molécules en C20 qui, en se dégradant, libèrent de nouveaux acides gras en C16, qui sont ultérieurement métabolisés par une voie impliquant successivement deux enzymes spécifiques : une lipoxygénase (LOX) et une hydroperoxydase (HDL).

Ce métabolisme conduit à une série de composés volatils, réduits à 7 - 12 atomes de carbone. Cette nouvelle série de composés polyinsaturés (décatriénal, décadiénal, heptadiénal, acide 12-oxo-dodécatriénoïque, octénal, octatriénal, octadiénal, acide 9-oxo-nonadiénoïque, dodécanal, tridécanal et heptadécanal) constitue des oxylipines (métabolites secondaires intervenant dans diverses interactions biochimiques de la communication proie-prédateur, ou allélopathie).

Ces molécules sont responsables et directement impliquées dans le processus de défense anti-copépodes. Elles sont produites

« à la demande », en quelques secondes et uniquement après blessure, ouverture et destruction mécanique des frustules ; ce qui, sous l'effet du stress cellulaire, déclenche la cascade enzymatique (Figure 1). En l'absence de prédateurs, les diatomées ne fabriquent pas ces aldéhydes, et cette voie enzymatique spécifique à leur production n'est pas initiée. Les acides gras précurseurs ainsi économisés sont stockés sous forme de réserves, particulièrement utiles et importantes pour le métabolisme cellulaire (Pohnert, 2004).

Les aldéhydes ainsi formés sont des composés extrêmement réactifs du fait de leur chaîne carbonée insaturée, comprenant 3 à 4 doubles liaisons en position α , β , γ , δ , qui leur confèrent un fort potentiel d'accepteur de Michael (permettant la création de liaisons carbone-carbone). Cet élément structural, typique des produits secondaires de la peroxydation des lipides, leur confère des propriétés chimiques instables et une forte attraction moléculaire avec les nucléophiles, par transformation de la double liaison, ce qui est à la base de leur rôle d'éliciteur (composé capable de déclencher un mécanisme de défense). Parmi les aldéhydes identifiés chez les diatomées, le plus actif est par exemple le décadiénal, à 10 atomes de carbone. Les moins actifs sont ceux possédant plus de 9 atomes de carbone (dodécanal, heptadécanal, oxo-tridécanal) ; tandis que les chaînes courtes à 7-9 atomes de carbone ont une activité intermédiaire (heptadiénal, octadiénal, octa-trienal).

Des tests *in vitro* ont révélé que l'activité de ces petites molécules est liée à la longueur de la chaîne carbonée, au nombre et à la position relative des doubles liaisons, à leur position en α , β , γ , δ , par rapport à l'atome d'oxygène terminal, et, à longueur de chaîne égale, au degré d'insaturation (Pohnert *et al.*, 2002 ; Adolph *et al.*, 2003). Parmi 51 espèces de diatomées criblées à ce jour, seulement 35 % sont équipées des voies enzymatiques décrites plus haut, et sont donc capables de produire des aldéhydes toxiques (Ban *et al.*,

Synthèse

Observation d'ovocytes
(microscopie électronique par transmission)

[A] Atrésie
[B] Bourgeonnement cellulaire
[F] Fragmentation du matériel nucléaire

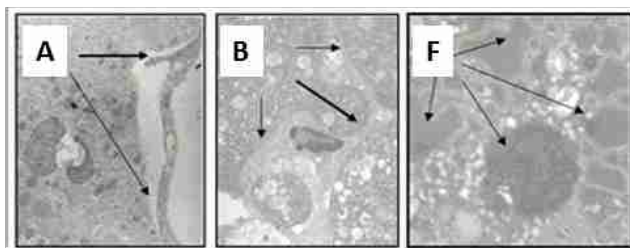


Figure 2- Observation en microscopie électronique par transmission (TEM) des ovocytes de copépodes femelles nourries avec des diatomées toxiques. Exemples de dégradations symptomatiques provoquées par l'accumulation d'aldéhydes toxiques dans les gonades : atrésie, bourgeonnement et fragmentation aux niveaux du cytoplasme, du noyau et de la membrane cellulaire des cellules germinales contaminées (Modifié d'après Poulet et al., 2006).

1999). La majorité des espèces testées ne produit pas d'aldéhydes létaux, ou pas en quantité suffisante pour avoir une toxicité mesurable. La production détectable chez les diatomées productrices d'aldéhydes toxiques, peut varier de 0,2 à > 5 fmol/cellule, selon les espèces (Wichard et al., 2004).

Bien que la production d'aldéhydes impliqués dans la défense chimique soit très spécifique, aucune étude génétique, à notre connaissance, n'a été effectuée pour identifier les gènes participant à cette production chez les diatomées, ou chez d'autres micro-algues planctoniques. Par exemple, la diatomée *Thalassiosira rotula* est la championne en termes de production. A l'inverse, *Prorocentrum minimum*, une autre espèce phytoplanctonique appartenant au groupe des dinoflagellés, n'est

pas productrice d'aldéhydes toxiques (Adolph et al., 2004).

3. Les effets tératogènes de la défense chimique

Bien que de nombreux aldéhydes soient connus dans le règne végétal et animal terrestre, pour leurs propriétés odorantes (parmi les fleurs et les fruits) ou répulsives d'insectes, la toxicité des aldéhydes polyinsaturés spécifiques du phytoplancton a été découverte tardivement et par hasard. Les premières mises en évidence ont été obtenues lors d'expériences criblant la valeur nutritive de plusieurs espèces de diatomées sur la production secondaire des copépodes calanoïdes (Poulet et al., 1994).

En laboratoire, des femelles de copépodes nourries avec des cultures de diatomées présentent plusieurs types de réponses, selon les espèces phytoplanctoniques testées. Dans le cas du dinoflagellé *P. minimum*, servant de référence, ou des espèces de diatomées qui ne métabolisent pas ces aldéhydes toxiques, les étapes de la reproduction, particulièrement l'ovogenèse et l'ontogenèse des larves, demeurent normales. Au contraire, les espèces de diatomées productrices d'aldéhydes toxiques provoquent des anomalies de la reproduction légères ou profondes, non-réversibles (Poulet et al., 1994).

L'amplitude des différentes anomalies cellulaires et morphologiques observées en fonction du temps (jour-semaine) est relative à l'espèce algale, à la densité cellulaire dans les régimes alimentaires, au taux de production d'aldéhydes (1-5 fg/cellule) et, enfin, à la toxicité moléculaire, selon une relation dose-réponse. Le déclin de la fécondité des femelles constitue une des premières manifestations provoquée par des diatomées, aboutissant en quelques jours à une stérilité complète, mais réversible à condition de changer de régime non-toxique.

La non-éclosion des œufs pondus constitue la

Synthèse

seconde anomalie constatée chez les copépodes fortement contaminés. Une troisième manifestation est fournie par les anomalies morphologiques observées dans les ovocytes, les œufs et les larves produits par les femelles contaminées (Figures 2, 3). A l'échelle cellulaire, ces anomalies concernent la structure aberrante du cytosquelette et la dispersion anarchique des chromosomes en fin de mitose, ou l'arrêt de la formation de la membrane cellulaire en fin de division cellulaire, ou encore la présence de nombreuses cellules en phase apoptotique dans les échantillons (Adolph *et al.*, 2004).

Les conséquences sont les suivantes : les d'œufs n'éclosent pas, ou bien les larves meurent rapidement après éclosion. Ces deux phénomènes soulignent l'impact à retardement des diatomées sur les juvéniles. Cet ensemble d'observations illustre l'effet tératogène des diatomées au cours de l'ontogenèse des copépodes (Poulet *et al.*, 1995).

Ce phénomène est paradoxal. En effet, les femelles en capturant et en ingérant des diatomées toxiques, de façon non-sélective, ne sont pas directement intoxiquées. Elles transfèrent les aldéhydes dans les gonades, qui s'accumulent dans les ovocytes (Wolfram *et al.*, 2014, 2015). La gamétogenèse des femelles est profondément perturbée (Poulet *et al.*, 2006). Ainsi la vitellogenèse au cours de la maturation des ovocytes est le théâtre initial de l'activité des aldéhydes stockés dans les réserves lipidiques des copépodes femelles. L'effet létal affecte uniquement les organismes de la génération suivante. Cet effet n'est donc pas immédiat.

D'autre part, en utilisant cette défense chimique, les algues se sacrifient individuellement, probablement à l'avantage de l'ensemble de la population. D'un point de vue énergétique, et surtout évolutif, le bénéfice obtenu par ce type d'inhibition à retardement du prédateur par les diatomées n'est pas évident. Ce qui, à une échelle darwinienne, ouvre une nouvelle fenêtre sur notre conception de l'avantage collectif d'une



Figure 3. Larves de copépodes au stade nauplius. En haut : larves normales, à symétrie bilatérale. En bas : larves anormales, asymétriques. Les anomalies concernent l'inhibition partielle ou totale de l'éclosion des œufs, et la morphogenèse aberrante des larves (Modifié d'après Poulet *et al.*, 1995).

population, gagné au détriment du sacrifice de l'individu.

Chez les copépodes, nous ne connaissons

Synthèse

pas encore de façon précise les éléments génétiques (ADN, ARN, familles de gènes), ni moléculaires (protéines, enzymes, hormones de croissance) ciblés à l'échelle cellulaire par ces aldéhydes pendant les étapes successives de la maturation ovocytaire et de la morphogenèse embryonnaire ou larvaire (Wolfram *et al.*, 2015 ; Ruocco *et al.*, 2016 ; Lauritano *et al.*, 2016). Nous savons que ces phénomènes d'inhibition sont largement répandus et affectent non seulement les micro-crustacés (copépodes marins et d'eau douce), diverses espèces d'ascidies, de mollusques, d'annélides et d'échinodermes *in vitro* et *in vivo*, mais affectent aussi certains cladocères d'eau douce (*Daphnia pulicaria*), qui n'ont aucune capacité de détoxification (Adolph *et al.*, 2004 ; Caldwell, 2009 ; Van Donk et Lanora, 2011). Cependant cette capacité a été observée au moins chez une espèce de copépode harpacticoïde (*Tisbe holothuriae*) (Taylor *et al.*, 2012).

Conclusion

Au-delà de la description d'un modèle d'interaction proie-prédateur original, les travaux entrepris sur la chimie des diatomées et la réponse des copépodes aux aldéhydes toxiques ont ouvert un nouveau chapitre de l'écologie marine. Cependant, à l'échelle de la recherche fondamentale, de nombreux points restent à éclaircir aux niveaux génétique et moléculaire pour comprendre précisément comment fonctionne ce processus de défense chimique au niveau cellulaire. Plusieurs équipes réparties dans le monde progressent dans ces domaines.

Observé en laboratoire, et confirmé *in situ* chez les copépodes en Atlantique, en Manche, en Méditerranée, et dans le Pacifique (Ban *et al.*, 1997 ; Miralto *et al.*, 1999 ; Poulet *et al.*, 2007), ce modèle existe-t-il chez d'autres organismes marins, également consommateurs de diatomées ? Alors que toutes les études démontrent la nocivité des aldéhydes, *in vitro*,

sur des échantillons d'hémocytes de mollusques, ou bien d'embryons de copépodes, d'annélides ou d'échinodermes, qui demeurent des modèles expérimentaux en laboratoire, aucunes ne portent sur des observations *in vivo*, utilisant des organismes vivants, telles que le krill, les huîtres ou les moules, qui sont aussi des filtreurs de phytoplancton, à l'instar des copépodes.

L'importance économique de ces mollusques dans l'aquaculture française est bien connue. Celle des diatomées et des copépodes dans le fonctionnement des écosystèmes marins est souvent négligée.

Dans ce contexte, il serait intéressant d'évaluer l'action perturbatrice potentielle de composés naturels toxiques sur la résistance immunitaire des mollusques d'intérêt aquacole, en relation avec l'impact d'agents climatiques et pathogènes, connus pour provoquer, certaines années, des mortalités massives dans les bassins ostréicoles français. De même, il serait utile de se pencher sur les conséquences du changement climatique sur les pêcheries, en portant un regard nouveau, et surtout plus précis, à l'échelon primaire-secondaire du réseau trophique.

En effet, tous les poissons marins dépendent d'une source alimentaire zooplanctonique durant leur vie larvaire. Ils sont zooplanctonophages et la majorité de leurs proies sont des copépodes. Les variations spécifiques du phytoplancton peuvent favoriser l'efflorescence de diatomées toxiques au détriment d'espèces non-toxiques, ou *vice versa*, au détriment de dinoflagellés et de coccolithophores plus sensibles à la diminution de pH, à l'augmentation de la température et aux fluctuations verticale de la thermocline (Hinder *et al.*, 2012).

Si une telle tendance climatique favorisait les diatomées à majorité toxiques, les copépodes seraient décimés les mauvaises années. Un tel changement pourrait modifier le stock disponible de copépodes, proies préférentielles des poissons, et par voie de

Synthèse

conséquence, il pourrait provoquer des carences suivies de mortalités massives, entraînant une raréfaction des ressources halieutiques exploitables. Ce scénario, théoriquement envisageable en prolongement logique de travaux relatifs aux phénomènes d'allélopathie, reste à démontrer par de futures études.

Références

- Adolph S, Bach S, Blondel M, Cueff A, Moreau M, Pohnert G, Poulet SA, Wichard T, Zuccaro A. 2004. Cytotoxicity of diatom-derived oxylipins in organisms belonging to different phyla, *Journal of Experimental Biology*, 207, 2935-2946.
- Adolph S, Poulet SA, Pohnert G. 2003. Synthesis and biological activity of alpha, beta, gamma, delta-unsaturated aldehydes from diatoms. *Tetrahedron*, 59, 3003-3008.
- Ban S, Burns C, Castel J, Chaudron Y, Christou E, Escribano R, Fonda Umani S, Gasparini S, Guerrero Ruiz F, Hoffmeyer M, Ianora A, Kang H-K, Laabir M, Lacoste A, Miralto A, Poulet S, Ning X, Rodriguez V, Runge J, Shi J, Starr M, Uye S-I, Wang Y. 1997. The paradox of diatom-copepod interactions, *Marine Ecology Programme Series*, 157, 287-293.
- Bozarth A, Maier U-G, Zauner S. 2009. Diatoms in biotechnology: modern tools and applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 195-201.
- Caldwell GS. 2009. The influence of bioactive oxylipins from marine diatoms on invertebrate reproduction and development. *Marine Drugs*, 7, 367-400.
- Daboussi F, Leduc S, Marechal A, Dubois G, Guyot V, Perez-Michaut C, Amato A, Falciatore A, Juillerat A, Beurdeley M, Voytas DF, Cavarec L, Duchateau P. 2014. Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology, *Nature Communications*, 5, 1-7.
- Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P. 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components, *Science*, 281, 237-240.
- Hamm CE, Merkel R, Springer O, Jurkojc P, Maier C, Prechtel K, Smetacek V. 2003. Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection, *Nature*, 421, 841-843.
- Hinder SL, Hays GC, Edwards M, Roberts EC, Walne AW, Gravenor MB. 2011. Changes in marine dinoflagellate and diatom abundance under climate change, *Nature Climate Change*, 2, 271-275.
- Islam S, Hasan M, Lei C, Mucha-Pelzer T, Mewis I, Ulrichs C. 2010. Direct and admixture toxicity of diatomaceous earth and monoterpenoids against the storage pests *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Sitophilus oryzae* (L.), *Journal of Pest Science*, 83, 105-112.
- Jennings S, Collingridge K. 2015. Predicting consumer biomass, size-structure, production, catch potential, responses to fishing and associated uncertainties in the World's marine ecosystems, *PloS One*, 10, 2-28.
- Lauritano C, Romano G, Roncalli V, Amoresano A, Fontanarosa C, Bastianini M, Braga F, Carotenuto Y, Ianora A. 2016. New oxylipins produced at the end of a diatom bloom and their effects on copepod reproductive success and gene expression levels, *Harmful Alga*, 55, 221-229.
- Miralto A, Barone G, Romano G, Poulet SA,

Synthèse

- Ianora A, Russo GL, Buttino I, Mazzarella G, Laabir M, Cabrini M, Giacobbe MG. 1999. The insidious effect of diatoms on copepod reproduction, *Nature*, 402, 173-176.
- Pernet F, Malet N, Pastoureaud A, Malet N, Vaquer A, Quere C, Dubroca L. 2012. Marine diatoms sustain growth of bivalves in a Mediterranean lagoon, *Journal of Sea Research*, 68, 20-30.
- Pohnert G. 2004. Chemical defense strategies of marine organisms. Chemistry of pheromones and other semiochemicals, *Topics in Current Chemistry*, 2309, 179-219.
- Pohnert G, Boland W. 2002. The oxylipin chemistry of attraction and defense in brown algae and diatoms, *Natural Product Reports*, 19, 108–122.
- Pohnert G, Lumineau O, Cueff A, Adolph S, Lange M, Cordevant C, Poulet SA. 2002. Are volatile aldehydes in diatoms the only line of chemical defence against copepods?, *Marine Ecology Progress Series*, 245, 33-45.
- Poulet SA, Ianora A, Miralto A, Meijer L. 1994. Do diatoms arrest embryonic development in copepods?, *Marine Ecology Progress Series*, 111, 79-96.
- Poulet SA, Laabir M, Ianora I, Miralto A. 1995. Reproductive response of *Calanus helgolandicus*. I. Abnormal embryonic and naupliar development, *Marine Ecology Progress Series*, 129, 85-95.
- Poulet SA, Cueff A, Wichard T, Marchetti J, Dancie C, Pohnert G. 2006. Influence of diatoms on copepod reproduction. III. Consequences of abnormal oocyte maturation on three reproductive factors in *Calanus helgolandicus*, *Marine Biology*, 152 415-428.
- Poulet SA, Escribano R, Hidalgo P, Cueff A, Wichard T, Aguilera V, Vargas CA, Pohnert G, 2007. Collapse of *Calanus chilensis* reproduction in a marine environment with high diatom concentration, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 352, 187-199.
- Rimet F, Bouchez A. 2011. Use of diatom life-forms and ecological guilds to assess pesticide contamination in rivers: lotic mesocosm approaches, *Ecological Indicators*, 11, 489-499.
- Ruocco N, Varrella S, Romano G, Ianora A, Bentley MG, Somma D, Leonardi A, Mellone S, Zuppa A, Costantini M. 2016. Diatom-derived oxylipins induce cell death in sea urchin embryos activating caspase-8 and caspase 3/7, *Aquatic Toxicology*, 176, 128-140.
- Scaife MA, Smith AG. 2016. Towards developing algal synthetic biology, *Biochemical Society Transactions*, 44, 716-722.
- Stevenson RJ, Pan YD, van Dam H. 2010. Assessing environmental conditions in rivers and streams with diatoms. In Smol JP and Stoermer EF (Eds.) *The diatoms. Applications for the environmental and earth sciences* (2 nd edition). Cambridge University Press, Cambridge, 57-85.
- Taylor RL, Caldwell GS, Olive PJW, Bentley MG. 2012. The harpacticoid copepod *Tisbe holothuriae* is resistant to the insidious effects of polyunsaturated aldehyde-producing diatoms, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 413, 30-37.
- Van Donk E, Ianora A, Vos, M. 2011. Induced defenses in marine and freshwater phytoplankton: a review, *Hydrobiology*, 668, 3-19.
- Wichard T, Poulet SA, Pohnert G. 2004.

Synthèse

Determination and quantification of α , β , γ , δ -unsaturated aldehydes as pentafluorobenzyl oxime derivatives in diatom cultures and phytoplankton: application in marine field studies, *Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in Biomedical and Life Sciences*, 814, 155-161.

Wolfram S, Nejstgaard JC, Pohnert G. 2014. Accumulation of polyunsaturated aldehydes in the gonads of the copepod *Acartia tonsa* revealed by tailored fluorescent probes, *PLoS One*, 9, 1-7

Wolfram S, Wielsch N, Hupfer Y, Monch B, Lu-Walther HW, Heintzmann R, Werz O, Svatos A, Pohnert G. 2015. A metabolic probe- Enabled strategy reveals uptake and protein targets of polyunsaturated aldehydes in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *PLoS One*, 10, 1-17.

Edité par :

Hervé This, directeur de l'Inrae-AgroParisTech International Centre for Molecular and Physical Gastronomy, membre de l'Académie d'agriculture de France.

Rapporteurs :

1. Chris Bowler est directeur de recherche CNRS à l'Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (IBENS, Paris)
2. Marie-Thérèse Esquerré-Tugayé est professeur émérite, à l'Université Toulouse III-Paul Sabatier, Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales ; elle est membre de l'Académie d'agriculture de France.

Rubrique :

Cet article a été publié dans la rubrique « Synthèse » des *Notes académiques de l'Académie d'agriculture de France*.

Reçu :

7 juillet 2016

Accepté :

13 octobre 2016

Publié :

3 novembre 2016

Citation:

Poulet S. 2016. Tératogenèse induite par les diatomées : un modèle d'interaction proie-prédateur transgénérationnelle, *Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture (N3AF)*, 2(9), 1-11. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a551012>.



Serge Poulet est directeur de recherche émérite du CNRS, spécialisé en biologie marine, écologie planctonique, et membre correspondant de l'Académie d'agriculture de France.

Note de conjoncture

Production de protéines thérapeutiques par des animaux transgéniques

Production of therapeutic proteins by transgenic animals

Louis-Marie Houdebine

Directeur de recherche honoraire à l'Inra, France

Correspondance :

louis.houdebine@inra.fr

Résumé

Les protéines exercent de multiples fonctions chez les organismes vivants. Lorsqu'elles font défaut, on peut les administrer aux patients ou aux animaux. Les protéines sont des macromolécules qui ne peuvent pas être synthétisées massivement par voie chimique. Il est parfois possible d'obtenir des quantités substantielles de protéines thérapeutiques par extraction à partir d'organes. Cela a été le cas pendant plusieurs décennies pour l'insuline de porc. Les techniques de génie génétique ont permis de produire de l'insuline humaine à partir de bactéries génétiquement modifiées, puis d'autres protéines. Une bonne proportion des protéines des mammifères doit subir des modifications post-traductionnelles pour être biologiquement actives, ce que ne savent pas faire les bactéries. C'est le cas des glycosylations (l'addition de sucres ajoutés en certains points de la chaîne polypeptidique). Des lignées de cellules CHO (*Chinese hamster ovary*) sont actuellement la principale source de protéines thérapeutiques humaines recombinantes. La principale limite des cellules de mammifères en culture est qu'elles ne synthétisent que des quantités parfois insuffisantes de protéines recombinantes et à un coût élevé. Le recours à des mammifères

transgéniques capables de sécréter en abondance dans leur lait des protéines thérapeutiques a été couronné de succès mais encore pour un nombre très limité de protéines.

Abstract

Proteins have multiple functions in living organisms. The missing proteins may be administered to patients. Proteins are macromolecules that cannot be chemically synthesized at an industrial scale. Some proteins like pig insulin may be extracted from porcine pancreas. It is now produced by genetically modified bacteria. A number of human proteins must be post-translationally modified. It is the case for glycosylation (the addition of carbohydrates in specific sites of the polypeptide chain). Bacteria are unable to achieve most of the post translation. Cultured genetically modified mammalian cells like CHO (*Chinese hamster ovary*) are the source of most recombinant therapeutic proteins. The major limit of CHO cells is that the quantity of the proteins is in some cases insufficient and produced at a high cost. It has been shown that the milk of transgenic animals may contain large quantities of highly

Note de conjoncture

active therapeutic proteins. For various reasons this method is developing slowly.

Keywords

therapeutic proteins, milk, transgenic mammals

Mots clefs

Protéines thérapeutiques, recombinantes, cellules en culture, lait, animaux transgéniques

Introduction

Les protéines ou polypeptides sont parmi les acteurs moléculaires les plus importants des organismes vivants. Certaines protéines sont des enzymes qui permettent de catalyser des réactions biochimiques. D'autres sont des molécules qui entrent dans la constitution des cellules et des organes. D'autres encore sont des hormones, des facteurs de croissance, des médiateurs nerveux, des facteurs sanguins, ou encore des anticorps et des protéines nutritives du lait et des œufs, etc. Certaines maladies héréditaires ou induites sont dues à l'absence ou à la mutation de gènes particuliers, ce qui se traduit par le dysfonctionnement des protéines correspondantes.

Plusieurs milliers de maladies génétiques ont été identifiées, et leur nombre va croissant, au fur et à mesure que des mutations de gènes sont mises en évidence. Pour tenter de traiter ces maladies plusieurs approches sont en principe possibles.

On peut théoriquement remplacer un gène muté par une version non pathogène du même gène. Les avantages théoriques de cette approche sont que la maladie est effectivement enrayerée tant que le gène transféré est présent et fonctionnel. La difficulté majeure est de transférer le bon gène au bon endroit.

Les outils récemment inventés permettant le transfert ciblé de gènes (par exemple, l'édition génomique) sont prometteurs (Ran *et al.*,

2013 ; Quétier, 2016). Les progrès dans la connaissance des cellules souches laissent envisager des protocoles fondés sur l'utilisation de cellules souches d'organes. A cette fin, des modifications génétiques peuvent être effectuées dans ce type de cellules. Le gène thérapeutique est alors apporté à l'organe par la transplantation des cellules souches d'organes génétiquement modifiées.

Une autre possibilité consiste à se procurer la protéine qui est déficiente chez le patient et à lui administrer. Cette voie, qui est suivie depuis des décennies, comporte des avantages et des limites. Il faut, tout d'abord, disposer de protéines humaines à l'échelle industrielle. Il faut, d'autre part, prendre en considération le fait que les protéines sont digérées lorsqu'elles sont administrées par voie orale, et donc inactivées. Les protéines doivent donc être injectées aux patients. Beaucoup de protéines ont une demi-vie courte, ce qui impose des injections répétées. Il est également important de prendre en compte le fait que la plupart des protéines injectées ne pénètrent pas spontanément dans les cellules et n'ont donc pas d'effet direct sur des pathologies qui concernent des mécanismes intracellulaires.

La première protéine thérapeutique utilisée en santé humaine a été l'insuline (hormone protéique produite par certaines cellules du pancréas qui a pour effet de maîtriser le taux de glucose dans le sang), que les diabétiques s'injectent quotidiennement. L'insuline a d'abord été d'origine porcine, car on ne disposait pas de pancréas humains en quantité suffisante. Il est progressivement apparu souhaitable d'utiliser des protéines recombinantes (synthétisées par des organismes vivants ou par des organes qui ne sont pas ceux d'où proviennent les protéines natives). Cette approche promettait de disposer de quantités considérables, et à un coût raisonnable, de protéines non contaminées par des prions ou d'autres agents pathogènes. Au niveau international, il

Note de conjoncture

a donc été décidé de ne plus utiliser des protéines thérapeutiques extraites d'organes humains, sauf lorsqu'il n'y avait pas d'autres sources de protéines.

L'intervention du génie génétique

Les protéines sont composées de 20 sortes de résidus d'acides aminés, formant des chaînes comportant de quelques unités à des centaines de milliers d'unités. L'enchaînement des résidus d'acides aminés des protéines détermine directement leur activité biologique. Cet enchaînement est déterminé par la structure de l'ADN des gènes. L'ADN est composé de quatre bases (adénine, thymine, guanine et cytosine), qui se suivent dans un ordre précis. Trois de ces bases qui se suivent déterminent la nature et la position d'un acide aminé dans une protéine. C'est ce que l'on nomme le code génétique, qui est le même dans toutes les espèces vivantes et qu'il ne faut pas confondre avec le patrimoine génétique des organismes vivants. La suite des bases d'un fragment d'ADN codant une protéine permet donc de déduire l'enchaînement des résidus d'acides aminés de la protéine correspondante, et l'inverse est en grande partie vrai.

L'ADN constitue donc un ensemble de messages codés, les gènes. Les gènes sont transcrits en ARN (acide ribonucléique), les ARN messagers ou transcrits, qui engendrent les protéines correspondantes à chaque gène. Les organismes vivants contiennent un nombre de gènes variable selon les espèces. Cet ensemble de gènes constitue le patrimoine de chaque organisme vivant. Les gènes sont présents dans la totalité des cellules de l'organisme. Le patrimoine génétique humain contient 25 000 gènes dont 22 000 codent des protéines ; les autres dirigent la synthèse d'ARN qui exercent diverses fonctions dans l'organisme. Les 22 000 gènes peuvent diriger la synthèse d'au moins 100 000 protéines, par exemple via des épissages divers des

fragments de transcrits primaires (les ARN messagers sont souvent synthétisés sous forme de précurseurs immatures, les pré-ARN messagers, comportant deux types de segments, les exons conservés dans l'ARN messenger mature final et les introns excisés lors du processus d'épissage), ce qui augmente considérablement la diversité des transcrits et ainsi des protéines correspondantes.

Un bon nombre de protéines subissent, de plus, des modifications post-traductionnelles (clivage, repliement, glycosylation, phosphorylation, association diverse de fragments de la protéine etc.). Ces modifications biochimiques ont lieu après la traduction des ARN messagers en protéines qui acquièrent de manière réversible ou pas des activités diverses plus ou moins différentes de celles des protéines natives.

Le corps humain est constitué d'environ 250 types de cellules, qui sont au service de l'organisme entier. Dans chaque type de cellules, 2000 à 3000 gènes seulement sont fonctionnels, et la moitié de ces gènes est active dans toutes les cellules, assurant les opérations de base de toutes les cellules. Environ 1500 à 2000 gènes participent à l'expression des fonctions spécifiques de chaque type cellulaire.

A titre d'exemple, on peut citer l'albumine sérique, qui est synthétisée en permanence dans les cellules hépatiques et est sécrétée dans le sang ; sa fonction est essentielle pour le maintien de la pression osmotique indispensable à la bonne répartition des liquides entre les vaisseaux sanguins et les tissus ou le milieu interstitiel. Un autre exemple est celui du lait dont les composants nutritifs ne sont synthétisés que dans les cellules mammaires, et seulement lorsqu'elles sont stimulées par les hormones de la lactation. Un tout autre cas est celui des cellules musculaires, qui contiennent des protéines qui, en se contractant, permettent d'assurer de nombreuses fonctions dont la locomotion.

Note de conjoncture

L'activité (l'expression) des gènes est réglée au cours du développement et tout au long de la vie. Les mécanismes qui assurent ces régulations sont en partie connus. Chez toutes les espèces vivantes, la région de l'ADN contenant un gène est précédée par une région régulatrice (ou promoteur) qui contient des signaux codés totalement différents de ceux du code génétique.

A titre d'exemple, on connaît en partie la séquence des régions régulatrices des gènes des protéines du lait. En absence de prolactine (la principale hormone de la lactation), les promoteurs des gènes des protéines du lait n'activent pas leurs gènes. Sous l'influence de la prolactine, des protéines régulatrices des cellules mammaires sont phosphorylées et ainsi activées. Elles se fixent alors sur l'ADN, au niveau des promoteurs, ce qui a pour effet d'induire la transcription des gènes des protéines du lait en ARN messagers, puis la synthèse des protéines correspondantes.

Les techniques du génie génétique permettent de séparer divers fragments d'ADN et de les associer dans un ordre nouveau. On peut également obtenir des gènes fonctionnels par synthèse chimique. Un gène codant une protéine possédant des propriétés thérapeutiques peut ainsi être placé sous la dépendance du promoteur d'un tout autre gène de la même espèce ou pas. La protéine en question sera alors synthétisée par l'organe où le promoteur est actif (Figure 1). Cette démarche est valable pour des espèces très différentes.

La synthèse chimique de protéines est possible, mais réservée aux molécules contenant au maximum quelques dizaines d'acides aminés. Au-delà, le rendement de la synthèse devient de plus en plus faible, et excessivement onéreuse. La synthèse biochimique de petites quantités de protéines à des fins de recherche est possible *in vitro* dans des tubes à essais contenant les éléments cellulaires nécessaires à la synthèse de protéines (ARN messager, ribosomes, ARN de transfert, etc.) (Takai *et al.*, 2010). Les

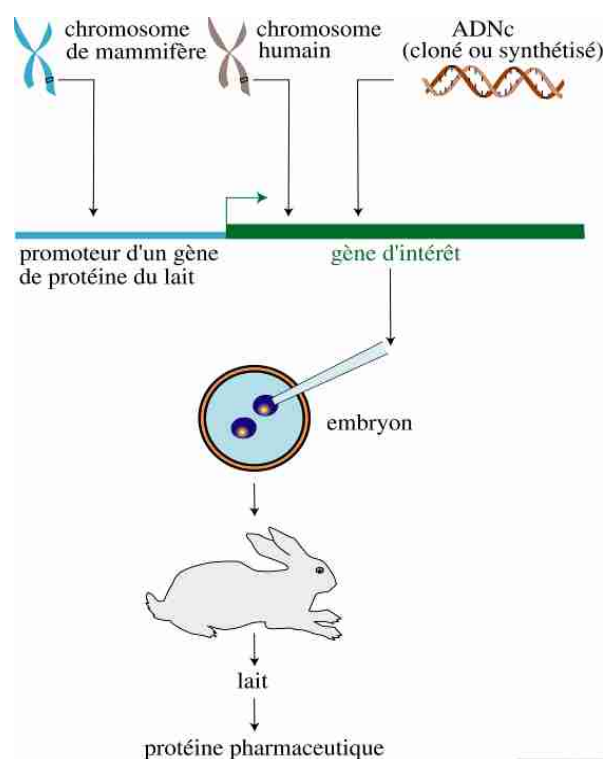


Figure 1. Représentation schématique de la construction de gènes recombinants capables de diriger la sécrétion de protéines thérapeutiques dans le lait.

protéines synthétisées de cette manière ne bénéficient pas de modifications post-traductionnelles. Pour disposer de protéines thérapeutiques en quantités suffisantes, il est donc nécessaire de procéder à des biosynthèses (la synthèse par des systèmes vivants : cellules en culture, animaux ou plantes transgéniques).

Les différents systèmes de production

Au début des années 1980, le transfert de gènes dans des bactéries était bien maîtrisé, et la production d'insuline humaine par des bactéries génétiquement modifiées a donc pu être tentée. A cette fin, le gène de l'insuline humaine a été placé sous la dépendance du

Note de conjoncture

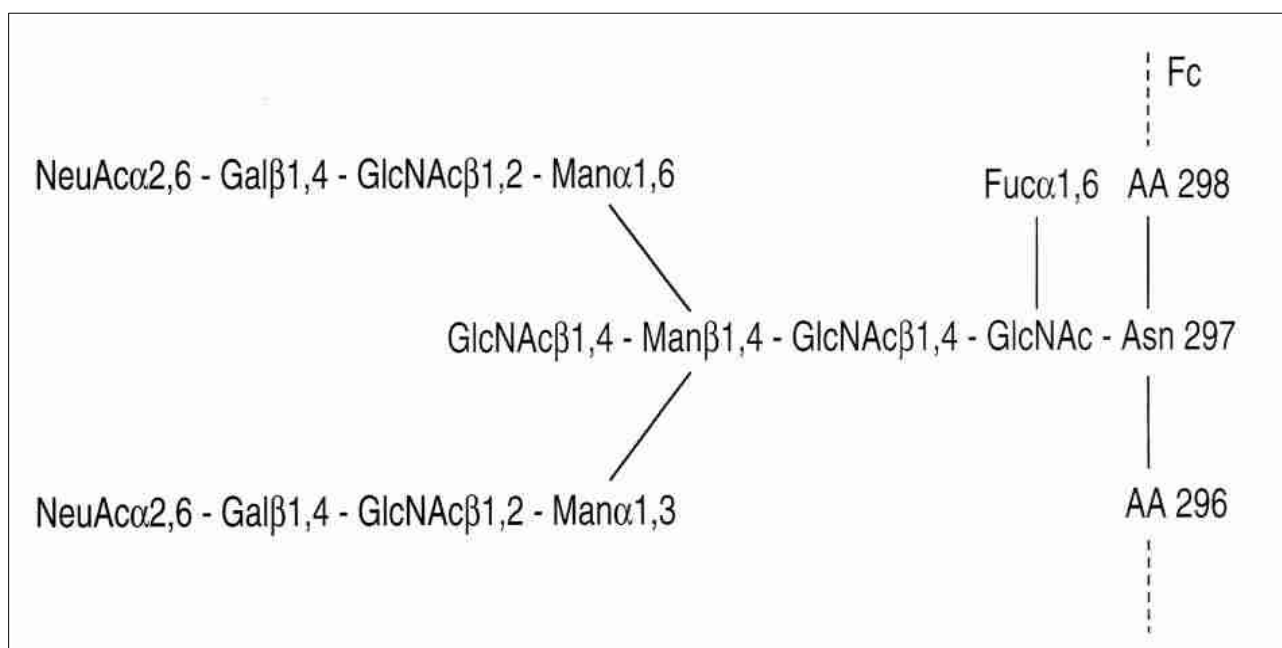


Figure 2. Structure des groupes glucidiques ajoutés aux protéines (ici au résidu de l'acide aminé asparagine 297 d'un anticorps) après leur biosynthèse. L'acide neuraminique terminal est indispensable pour augmenter la durée de vie des protéines dans le sang. L'absence de fucose augmente fortement la réaction ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) des anticorps (Olivier et Mehtali, 2009).

promoteur d'un gène bactérien. Le gène artificiel ainsi obtenu a été transféré dans des bactéries. Ce fut un succès (Villa-Komaroff *et al.*, 1980). L'insuline ainsi produite pour la première fois en 1978 s'est révélée posséder une excellente activité biologique, et elle fut approuvée pour une mise sur le marché en 1982 (Johnson, 1983). Elle est, depuis ce temps-là, utilisée à la place de l'insuline de porc, qui pourtant n'avait été à l'origine d'aucun problème particulier.

Le même protocole a été appliqué en 1984 pour l'hormone de croissance humaine (polypeptide de 191 résidus d'acides aminés), afin de disposer de plus grandes quantités de cette molécule (Chang *et al.*, 1987). Ce système devait surtout permettre d'éviter la transmission aux patients recevant des extraits d'hypophyses humaines (la région du cerveau où est synthétisée l'hormone de croissance)

d'être contaminés par des prions (agents pathogènes de nature protéique qui, chez les mammifères, sont les agents responsables des encéphalopathies spongiformes transmissibles ; Prusiner, 1982). Cette opération fut aussi un succès. Le même procédé a alors été appliqué à l'hormone de croissance bovine (Seeburg *et al.*, 1983). L'administration de cette hormone augmente la production laitière des vaches de 15 %. Il n'y avait pas d'autre moyen pour se procurer cette molécule en grandes quantités, car le nombre d'hypophyses de vaches était beaucoup trop faible pour répondre à la demande. L'hormone de croissance bovine, connue sous le nom de BST (bovine somatotropine), est utilisée dans certains élevages, notamment en Amérique du Nord, mais pas dans l'Union européenne.

D'autres tentatives pour produire des

Notes de conjoncture

Tableau 1. Représentation schématique de la construction de gènes recombinants capables de diriger la sécrétion de protéines thérapeutiques dans le lait.

	Systèmes de production					
	Bactéries	Levures	Baculovirus	CHO	Plantes	Animaux
Rendement	+++	+++++	+++	++	+++++	+++++
Investissement	+++	+++++	++	+	++++	+++
Coût de production	+++	+++++	++	++	+++++	++++
Souplesse	+++	+++++	++	+	+++++	++++
Conservation des lignées	+++	+++++	+++	+++	+++++	+++++
Stabilité des lignées	+++	+++++	++++	+++	+++++	++++
Développement	+++	+++++	++	+	+++++	++++
Collecte	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	++++
Modifications post-traductionnelles	+	++	+++	++++	+++	++++
Glycosylation	+	++	+++	++++	++	++++
Purification	+++	+++	+++	++++	+++	+++
Contamination par pathogènes	+++	+++++	+++++	++++	+++++	++++
Propriété intellectuelle	+++	+++	+++	++	+++	+++
Produits sur le marché	+++	+++	+++	+++++	+	+++

protéines pharmaceutiques se sont soldées par des échecs. Ce fut le cas pour l'alpha 1-antitrypsine humaine (inhibiteur des protéases le plus abondant dans le sérum humain). Cette

molécule produite par des bactéries recombinantes était parfaitement active *in vitro*, mais pas *in vivo* (Massoud *et al.*, 1990). D'autres outils ont donc dû être mis en œuvre. La raison pour laquelle l'alpha 1-antitrypsine

Note de conjoncture

recombinante était inactive *in vivo* a été identifiée. Beaucoup de protéines, et surtout celles qui sont sécrétées dans le sang, contiennent des groupes glucidiques (composés de sucres) attachés le long de la chaîne d'acides aminés (Figure 2).

Les protéines non glycosylées de manière appropriée (ne contenant pas à leur extrémité l'acide neuraminique ; Figure 2) sont captées par le foie et éliminées. Les bactéries ne disposent pas de gènes codant les enzymes permettant la glycosylation des protéines. Cela explique pourquoi l'alpha 1-antitrypsine produite par des bactéries n'est pas active après administration à des patients. En revanche, la molécule extraite du sang humain est glycosylée, ayant une demi-vie longue et une bonne activité *in vivo* (Massoud *et al.*, 1990). La composition des groupes glucidiques au sein des protéines peut avoir des effets délétères. Les acides neuraminiques peuvent être associés au motif N-glycosyle comme c'est le cas des protéines sécrétées dans le lait de chèvre mais pas dans les protéines humaines natives. Ces motifs glucidiques peuvent induire des réactions de rejet chez les patients (Lubon, 1998 ; Olivier & Mehtali, 2009).

D'autres événements doivent souvent avoir lieu pour qu'une protéine soit pleinement active. C'est le cas pour le repliement des protéines, processus physique par lequel une protéine se replie dans sa structure tridimensionnelle caractéristique dans laquelle elle est fonctionnelle. Les anticorps sont composés de quatre protéines glycosylées qui sont associées pour adopter une structure dans l'espace nécessaire à leur activité. Les bactéries sont incapables d'effectuer le repliement de toutes les protéines et en particulier des anticorps. Par ailleurs, certaines protéines sont dans leur état natif des pré-pro-protéines (forme précurseur d'une protéine, ou pro-protéine, comportant un peptide signal d'adressage à un compartiment subcellulaire, ou pré-pro-protéine), qui doivent perdre de courtes régions (dont le peptide signal) pour être actives. D'autres modifications post-

traductionnelles des protéines, telle la gamma-carboxylation (la fixation d'un groupe acide carboxylique COOH à un acide aminé comme l'acide glutamique), sont essentielles pour que certaines protéines soient actives (Lubon, 1998).

Il convient donc de choisir le ou les systèmes de production de protéines au cas par cas pour obtenir des protéines fonctionnelles. Il est indispensable de prendre en compte l'ensemble des facteurs et, en premier lieu, le niveau de production souhaité pour chaque protéine. D'autres paramètres, résumés dans le Tableau 1, concernent l'activité biologique, les modifications post-traductionnelles, la stabilité des organismes producteurs, le coût de production, la facilité à passer d'une démonstration au laboratoire à une production industrielle, etc.

La capacité et les limites des bactéries pour synthétiser des protéines thérapeutiques ont été discutées ci-dessus. Les levures (champignons unicellulaires) sont faciles à cultiver et les rendements en protéines peuvent être élevés (Demain & Vaishnav, 2005). Elles sont capables d'effectuer les repliements de beaucoup de protéines, mais ne les glycosylent pas ou de manière inappropriée.

Les baculovirus (virus qui infectent certains insectes) porteurs de gènes codant des protéines d'intérêt peuvent infecter des lignées de cellules d'insectes et synthétiser ainsi les protéines correspondantes (Kost *et al.*, 2005) qui ne sont pas complètement glycosylées. Cet outil est utilisé pour la recherche et peut occasionnellement permettre de disposer rapidement de protéines utilisables comme vaccins.

Il a donc été postulé que seules des cellules de mammifères pouvaient effectuer toutes les étapes de la synthèse de protéines destinées à des patients. Les cellules CHO (*Chinese hamster ovary* ; lignée cellulaire issue d'ovaires de hamster de Chine), très utilisées pour de nombreux projets de recherche et d'applications de génie génétique, sont

Note de conjoncture

devenues l'outil de référence pour produire des protéines pharmaceutiques (Houdebine, 2009 ; Bertolini *et al.*, 2016).

La plupart des modifications post-traductionnelles des protéines souhaitées sont effectuées par ces cellules. Des modifications génétiques ont permis d'améliorer leurs capacités à ajouter les glucides aux protéines (Houdebine, 2009 ; Olivier & Mehtali, 2009). Les limites des cellules CHO sont leur incapacité à synthétiser de grandes quantités de protéines et le coût élevé de leur production. Dès le début des années 1980, la transgénèse est apparue comme un outil possible pour produire des protéines thérapeutiques (Palmiter *et al.*, 1983). En effet, que ce soit pour les plantes ou pour les animaux, le nombre de cellules portant un gène étranger par individu est très élevé par comparaison avec les cellules en culture. De surcroît, les transgènes se trouvent dans une situation métabolique optimale, contrairement aux cellules en culture. Les plantes se prêtent bien à des productions massives, mais elles sont incapables de procéder à toutes les modifications post-traductionnelles qui ont lieu chez les protéines humaines. Les plantes contenant des protéines ayant des activités biologiques (par exemple croisement entre espèces apparentées) doivent par ailleurs être confinées d'une manière ou d'une autre (Houdebine & D'Aoust, 2011).

Les animaux transgéniques ont rapidement été sollicités. Dès l'année 1983, il a été observé que des souris transgéniques portant un gène d'hormone croissance de mammifères étaient plus grosses que les souris de référence et que leur sang contenait des microgrammes par millilitre de la molécule codée par le transgène (Palmiter *et al.*, 1983). Le sang d'animaux transgéniques pouvait donc être une source de protéines thérapeutiques. Des lapins portant un transgène codant le gène de l'alpha 1-antitrypsine humaine associé au promoteur d'un gène fortement exprimé dans leur foie ont été obtenus. Le sang de ces animaux contenait des quantités équivalentes d'alpha 1-antitrypsine humaine et de lapin.

Cette protéine humaine était parfaitement glycosylée et active *in vivo* (Massoud *et al.*, 1990). Ce résultat n'a pas été poursuivi par une application industrielle, car la purification de la protéine humaine, non contaminée par la protéine de lapin, aurait nécessité un investissement trop important. Par ailleurs, le succès remporté avec les lapins ne signifiait pas que le sang était une source idéale de protéines thérapeutiques. En effet, beaucoup de protéines ne sont pas stables dans le sang. C'est le cas des hormones de croissance, dont la demi-vie est de l'ordre de 15 minutes, qui ne s'accumulent pas dans le sang. Par ailleurs, les protéines humaines présentes dans le sang des animaux, contrairement au lait et au blanc d'œuf, risquent de perturber le métabolisme de leur hôte.

Un audacieux programme en cours consiste à inactiver les gènes codant les anticorps chez des vaches, porcs, lapins ou poulets, puis à transférer à ces animaux les gènes codant les anticorps humains. Lorsque ces animaux sont immunisés, ils sécrètent dans leur sang des anticorps purement humains, qui peuvent être administrés à des patients sans provoquer des réactions de rejet. Des anticorps polyclonaux humains dirigés contre le virus Ebola (virus très dangereux chez l'homme provoquant des fièvres souvent hémorragiques) et obtenus à partir de vaches transgéniques ont ainsi eu des effets positifs chez des patients. Il paraît raisonnable d'imaginer que ce procédé permettra de disposer d'anticorps variés contre des pathogènes humains (Houdebine, 2011).

Le sang peut donc être une source de protéines thérapeutiques recombinantes, mais dans des situations particulières seulement. Il a donc fallu trouver d'autres outils, et les meilleurs d'entre eux sont des organes naturellement producteurs de grandes quantités de protéines destinées à l'alimentation de la progéniture. C'est ainsi que le lait et le blanc d'œuf (voir ci-dessous) ont été retenus comme sources potentielles de protéines pharmaceutiques.

Note de conjoncture

Tableau 2. Temps pour obtenir des protéines recombinantes de lait.

	Lapin	Porc	Mouton	Chèvre	Vache
Gestation (mois)	1	4	5	5	9
Maturité sexuelle (mois)	5	6	8	8	15
Transfert du gène-première lactation (mois)	7	16	18	18	33
Nombre de descendants	8	10	1-2	1-2	1
Production annuelle de lait (litres)	15	300	500	500	8000
Protéines par femelle et par an (kg)	0,02	1,5	2,5	4	40

L'obtention, en 1985 (Hammer *et al.*, 1985), d'animaux transgéniques de ferme - des moutons, des porcs et des lapins, en mettant en œuvre les techniques mises au point chez la souris en 1980, a laissé penser que ce projet n'était pas utopique. La validation de cette méthode a eu lieu en 1987 avec la naissance de souris sécrétant dans leur lait des quantités faibles, mais bien réelles, d'une protéine humaine parfaitement active : le tPA (*tissue plasminogen activator*, ou activateur tissulaire du plasminogène, une protéase intervenant dans la dissolution des caillots sanguins ou fibrinolyse) (Gordon *et al.*, 1987). Ce pas franchi a incité les industriels à créer des entreprises travaillant en coopération avec des laboratoires de recherche académique. C'est ainsi que, au cours des années qui ont suivi, ont été créées quatre entreprises : en Grande Bretagne, *PPL Therapeutics* ; aux États-Unis, *Genzyme Transgenics Corporation* ; aux Pays-

Bas, *Pharming Group NV* ; en France, *BioProtein Technology*, utilisant respectivement des moutons, des chèvres et des porcs, des vaches et des lapins.

Les premiers résultats ont été suffisamment encourageants pour que l'on puisse faire les prédictions suivantes : sachant que les vaches, les chèvres, les moutons, les porcs et les lapins produisent respectivement 8000, 800, 500, 300 et 15 litres de lait par an et par femelle (Tableau 2), cela signifiait que ces mêmes animaux pouvaient produire respectivement 40, 4, 2,5, 1,5 et 0,02 kg de protéines pharmaceutiques par femelle et par an. Ainsi, pour répondre à la demande annuelle du marché, il faudrait 5 400 vaches pour produire les 100 000 kg attendus d'albumine, 4 300 moutons pour produire 5 000 kg d'alpha 1-antitrypsine, 58 chèvres pour produire 100 kg d'anticorps monoclonaux, 43 chèvres pour produire 75 kg d'anti-thrombine-III, 4 porcs pour

Note de conjoncture

produire 2 kg de facteur IX de coagulation et 50 lapins pour produire 1 kg d'inhibiteur de l'estérase C-1 (Tableau 3). Pour frapper les esprits, une des entreprises annonçait que le lait d'une seule chèvre produisait par an autant d'anti-thrombine-III que 90 000 prélèvements de sang humain (*Genzyme Transgenics Corporation*) !

Diverses erreurs techniques et managériales, des promesses non tenues et le peu d'enthousiasme des grandes entreprises de la

Tableau 3. Quantités potentielles de protéines à produire dans le lait.

Protéines	kg/par an	Espèces	Nombre d'animaux
Albumine sérique	100 000	Vache	5400
Alpha-1-antitrypsine	5000	Mouton	4300
Anticorps monoclonaux	100	Chèvre	58
Anti-thrombine-III	75	Chèvre	43
Facteur-IX	2	Porc	4
Inhibiteur-G-1	1	Lapin	50

pharmacie qui sont inévitablement dans la chaîne pour mener à bien les tests de validation des protéines ont ébranlé ce bel édifice. L'entreprise des USA (*Genzyme Transgenics Corporation*) a été rachetée par une grande entreprise française de la préparation de facteurs sanguins (LFB : *Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies*), l'entreprise britannique (*PPL Therapeutics*) a fait faillite et l'entreprise française (*BioProtein Technology*) a dû rejoindre l'entreprise hollandaise (*Pharming Group NV*) à la suite du non-respect d'un contrat passé avec le LFB, son principal partenaire. Pendant ce temps, les Argentins, les Chinois et quelques autres

groupes dont *ProGenetics* (USA ; <http://www.progenetics.co.il/index.php/about-us>) suivent leur chemin avec succès !

Autres systèmes possibles de production

Le blanc d'œuf : La mise en œuvre du blanc d'œuf comme source de protéines thérapeutiques a eu lieu plus tardivement que celle du lait. La raison principale de ce délai vient du fait que les techniques de transgénèse couramment utilisées pour les mammifères, les vertébrés inférieurs et les invertébrés n'étaient pas opérationnelles chez les oiseaux. Il a fallu attendre la mise au point des vecteurs rétroviraux et des cellules souches de gonades pour que l'obtention de poulets transgéniques devienne une réalité (Kamihira *et al.*, 2005). Dans un premier cas, les gènes à transférer sont introduits dans des vecteurs rétroviraux utilisés pour infecter des cellules embryonnaires. Dans un deuxième cas, les gènes sont introduits dans des cellules souches de gonades (organes reproducteurs), qui sont transférées dans des embryons précoces, donnant naissance à des animaux chimères et mosaïques pour le transgène. Dans cette situation le transgène n'est présent que dans une partie des cellules de l'animal chimère. La transmission du transgène est alors inférieure à 50 % mais elle suit les lois de Mendel dans les générations suivantes (Houdebine, 2013).

Plusieurs protéines thérapeutiques ont été obtenues dans le blanc d'œuf à des niveaux relativement modestes (Bertolini *et al.*, 2016). Des améliorations des vecteurs de transgénèse sont donc nécessaires. Une enzyme, l'alpha sélipase, produite dans le blanc d'œuf par *Alexion Pharmaceuticals* a été adoptée par la FDA (*Food and drug administration*). La production d'autres enzymes dont une destinée à traiter les déficiences de lipase lysosomiale acide ainsi que la maladie du stockage d'ester de cholestérol est en cours de préparation avec les mêmes outils pour traiter des maladies humaines. Un point positif est le fait que,

Note de conjoncture

contrairement de la plupart d'autres systèmes de production de protéines, le blanc d'œuf ne contient pas de protéases susceptibles de détruire les protéines d'intérêt. Un point négatif est le fait que certains patients traités par des protéines issues du blanc d'œuf ont développé des réactions anaphylactiques (Sheridan, 2016).

Des anticorps monoclonaux anti-tumeurs ont été produits dans le blanc d'œuf. Toutefois, ces protéines ne sont pas complètement glycosylées, ce qui réduit leur demi-vie *in vivo* et oblige à en administrer des quantités relativement élevées aux patients. Par ailleurs, les anticorps monoclonaux produits dans le blanc d'œuf ne contiennent pas de fucose (Figure 2), ce qui les rend plus aptes à stimuler les cellules tueuses des patients et à induire une involution des tumeurs ciblées (Olivier & Mehtali, 2009).

L'urine et le plasma séminal : Il a été montré que l'urine de souris transgéniques pouvait contenir de l'hormone de croissance humaine fonctionnelle. Des quantités notables de protéines thérapeutiques pourraient être produites à partir de gros animaux. Le plasma séminal de porcs transgéniques peut également contenir des protéines thérapeutiques. Les glandes séricigènes des vers à soie et les larves de drosophile sont aussi des systèmes potentiels de production de protéines thérapeutiques (Houdebine, 2009 ; Bertolini *et al.*, 2016).

Le lait : Le laps de temps qui s'écoule entre le transfert de gènes pour obtenir des animaux transgéniques et les premières mesures des concentrations des protéines dans le lait va de quelques mois à plusieurs années, selon les espèces (Tableau 2).

Afin de raccourcir ce temps, il est possible de procéder à des inductions de lactation artificielles chez des animaux (des vaches) matures sexuellement (entre 9 et 12 mois) en leur administrant pendant quelques semaines des œstrogènes, de la progestérone, des glucocorticoïdes, de la prolactine et de

l'hormone de croissance. Ce procédé permet de mesurer le taux de protéines recombinantes dans le lait et d'analyser leurs propriétés biologiques. Ces informations permettent de prendre la décision de développer ou pas chacune des lignées d'animaux transgéniques.

Un autre procédé consiste à injecter dans les trayons d'animaux en lactation des vecteurs adénoviraux portant le gène codant la protéine d'intérêt. Le lait de ces animaux, collecté pendant les quelques jours qui suivent le transfert de gènes, peut contenir jusqu'à 3-4 mg/mL de protéine thérapeutique (Bertolini *et al.*, 2016). Cette opération peut être répétée plusieurs fois. Ce procédé est laborieux, et il nécessite de respecter les consignes de confinement et de bien-être animal.

Enfin, le clonage des animaux transgéniques permet de plus d'accélérer la constitution de troupeaux producteurs de protéines thérapeutiques.

Conclusion

Force est de constater qu'il s'est passé 19 ans entre la naissance des premières souris sécrétant une protéine humaine dans leur lait (Gordon *et al.*, 1987) et la mise sur le marché de la première protéine issue de lait de chèvre, l'antithrombine-III (en 2006 aux États-Unis), et quatre ans de plus pour l'inhibiteur de l'estérase C-1 produit dans le lait de lapin (*Pharming Group NV*). Ce temps est relativement long, ce qui a quelque peu dissuadé les investisseurs et les grandes entreprises pharmaceutiques de collaborer avec les entreprises (start up ou spin up) concernées.

Les commissions de sécurité des États-Unis et de l'Union européenne chargées d'évaluer les bienfaits attendus et les risques d'un ensemble de procédés nouveaux ont dû faire face à la situation nouvelle que représente la biosynthèse de protéines médicaments par les animaux transgéniques. Tout bien pesé, les 19

Note de conjoncture

ans d'attente ne sont pas beaucoup plus longs que le temps nécessaire pour évaluer la plupart des médicaments classiques.

Il y a aujourd'hui 24 projets connus en cours, dont trois concernent des facteurs sanguins de coagulation VII, VIII et IX destinés aux hémophiles et qui sont en phase III d'évaluation (Bertolini *et al.*, 2016). Ces projets concernent des protéines très variées. Il paraît très probable que la majorité des projets auront dans le futur pour objet de produire des anticorps monoclonaux dirigés contre des tumeurs. Le lait est une source qui répond bien à cette demande compte tenu du fait que les quantités d'anticorps nécessaires sont relativement élevées.

Plusieurs projets ont pour but de modifier la composition du lait en lui apportant par transgénèse des protéines antibactériennes à large spectre dont deux, la lactoferrine et le lysozyme (une hydrolase acide capable de détruire la paroi bactérienne) (Cui *et al.*, 2015) sont présentes en abondance dans le lait humain mais pas dans le lait de vache. La lactoferrine est de surcroît porteuse de fer, qui fait défaut dans le lait des ruminants d'élevage. La troisième protéine, la lysostaphine (une métallo-endopeptidase), qui est d'origine bactérienne a pour but de freiner le développement des mammites (Wall *et al.*, 2005). Ces protéines ne sont pas au sens strict des médicaments mais elles sont par nature capables de prévenir des épidémies par des administrations orales ou mammaires.

La transgénèse permet également de modifier la composition du lait de manière à améliorer la santé des consommateurs : sécrétion d'anticorps monoclonaux dirigés contre des virus ou des bactéries, diminution du taux de lactose lequel cause une intolérance chez les consommateurs de divers pays, suppression d'allergènes (bêta-lactoglobuline, caséines), diminution des acides gras saturés et augmentation des oméga-3.

Il semble que certaines grandes entreprises pharmaceutiques n'étaient pas et ne sont peut-être toujours pas pressées d'adopter les

protéines-médicaments issues d'animaux transgénétiques. C'est sans doute le cas pour les facteurs sanguins de coagulation et les anticorps monoclonaux dirigés contre des tumeurs. Ces protéines provenant actuellement de cellules CHO sont une source de bénéfices certains pour ceux qui les produisent. L'EPO (érythropoïétine, une hormone stimulant la formation et la croissance des globules rouges), et le facteur VII (qui intervient dans le processus de coagulation du sang) sont vendus au prix de 1 M€/g. Du facteur VII a été obtenu par *BioProtein Technology* dans le lait de lapins à la concentration de 3 mg/mL. Le prix de revient brut des protéines provenant du lait est en moyenne sept fois plus faible que celui des mêmes protéines issues de cellules CHO (Bertolini *et al.*, 2016). Il convient toutefois d'interpréter ces données en prenant en compte le fait que la purification des protéines et leur validation représentent la majeure partie du coût de production, quel que soit le procédé mis œuvre pour obtenir les protéines. Pendant les 19 dernières années, qui ont été nécessaires pour produire commercialement la première protéine thérapeutique, les techniques de transgénèse se sont très notablement améliorées. Une amélioration est la mise en œuvre du clonage. Pour ce faire le gène à transférer est introduit dans des cellules fœtales qui sont utilisées comme donneuses de noyaux pour le clonage (Schnieke *et al.*, 1997). Cette méthode qui conduit à la naissance de clones transgénétiques est appliquée régulièrement pour les gros animaux de ferme.

Une autre amélioration attendue est l'usage des outils (CRISPR-Cas9) permettant une intégration ciblée des gènes directement dans le génome (Quétier, 2016) pour remplacer les gènes de protéines du lait par ceux codant les protéines thérapeutiques (Ran *et al.*, 2013). De tels outils permettraient des succès moins versatiles que les techniques mettant en œuvre des vecteurs d'expression classiques (Houdebine, 2014).

Note de conjoncture

Il est probable que les nouveaux outils seront capables de diminuer l'expression non strictement mammaire des transgènes, expression qui se traduit parfois par la présence de protéines thérapeutiques dans le sang des animaux et exerçant sur eux des effets délétères (Massoud *et al.*, 1996).

Les techniques de transgénèse n'infligent pas aux animaux producteurs de protéines thérapeutiques des souffrances particulières, sauf exception, comme dans le cas de la production d'EPO (Massoud *et al.*, 1996). Les animaux producteurs de protéines thérapeutiques sont des organismes génétiquement modifiés. Il est notable que l'opinion publique ne s'oppose que modérément à de telles pratiques tant il est clair que les enjeux concernent la santé humaine (PEGASUS. 2014).

Le cas du taureau Herman fait exception. Ce taureau transgénique a été obtenu en 1990 par *Gen Pharm* (devenue *Pharming Group NV*) pour produire de la lactoferrine humaine dans le lait (Krimpenfort *et al.*, 1991). Ce projet a été contesté aux Pays Bas pour des raisons éthiques (voir *Herman the bull* dans la liste des références). Le gouvernement néerlandais a donné son autorisation en 1992 pour que Herman puisse se reproduire afin de permettre l'étude des effets du transgène, mais pas en vue de développer un troupeau destiné à la production de lactoferrine.

Le lait des femelles descendantes de Herman contient comme attendu de la lactoferrine humaine mais en quantité relativement faible. Ce projet a été repris avec un meilleur succès par un laboratoire chinois qui a utilisé des vecteurs contenant le gène de la lactoferrine humaine entouré des deux régions d'ADN génomique humain (Yang *et al.*, 2008). Après la naissance de 83 veaux, Herman n'a plus été utilisé. Il a été euthanasié au cours de sa 13^e année, car il souffrait d'arthrite considérée comme naturelle.

Les animaux en question sont élevés dans des conditions ne permettant pas leur infection par des agents pathogènes ni leur évasion ou la

dissémination intempestive de leurs transgènes (EFSA, 2013). Une attention particulière est portée pour que les animaux ne souffrent pas de maladies à prions. Sur ce point, les lapins présentent particulièrement peu de risques, car ils ne développent pas spontanément de maladies à prions (Sarradin *et al.*, 2015). La viande des animaux sacrifiés après la fin de leur service est soigneusement tenue hors des circuits de l'alimentation humaine.

Les différents systèmes de production de protéines thérapeutiques sont fonctionnels à des degrés divers. Les plus importants (lait, blanc d'œuf, plantes, levures, cellules CHO) sont en cours d'amélioration sur essentiellement deux points : le niveau de production et la capacité à effectuer les modifications post-traductionnelles. Pour atteindre le second de ces buts, des gènes favorisant la glycosylation, le clivage des protéines, la gamma-carboxylation, etc. (Lubon, 1998) sont transférés à divers animaux et à d'autres systèmes qui acquièrent ainsi la capacité de produire diverses protéines dont les modifications post-traductionnelles sont satisfaisantes. Cela laisse supposer que la demande de protéines thérapeutiques sera mieux satisfaite dans l'avenir, en particulier dans les pays en développement, qui ne peuvent que difficilement se payer, par exemple, des anticorps monoclonaux anti-tumeurs.

Après trois décennies il apparaît que la production de protéines thérapeutiques par les animaux transgéniques est moins simple que ce que l'on imaginait. Il est clair qu'il n'existe pas de systèmes universels pour obtenir dans de bonnes conditions toutes les protéines désirées. Il est probable que les différents outils disponibles et en cours d'amélioration seront choisis au cas par cas en tenant compte de toutes les contraintes spécifiques de chaque situation. Il est probable que le lait d'animaux transgéniques restera une des sources pour la production de protéines thérapeutiques.

Note de conjoncture

Références

- Bertolini LR, Meade H, Lazzarotto CR, Martins LT, Tavares KC, Bertolini M, Murray JD. 2016. The transgenic animal platform for biopharmaceutical production. *Transgenic Research*, 25(3), 329-343.
- Chang CN, Rey M, Bochner B, Heyneker H, Gray G. 1987. High-level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli*. *Gene*, 55(2-3), 189-196.
- Cooper CA, Brundige DR, Reh WA, Maga EA, Murray JD. 2011. Lysozyme transgenic goats milk positively impacts intestinal cytokine expression and morphology. *Transgenic Research*, 20(6), 1235-1243.
- Cui D, Li J, Zhang L, Liu S, Wen X, Li Q, Zhao Y, Hu X, Zhang R, Li N. 2015. Generation of bi-transgenic pigs overexpressing human lactoferrin and lysozyme in milk. *Transgenic Research*, 24(2), 365-373.
- Demain AL, Vaishnav P. 2005. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297-306.
- EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). 2013. Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified animals. *The EFSA Journal*, 11(5), 3200.
- Gordon K, Lee E, Vitale JA, Westphal H, Hennighausen H. 1987. Production of human plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Bio Technology*, 5, 1183-1187.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 315, 680 - 683.
- Herman the bull (<http://www.redorbit.com/reference/herman-the-bull/>)
- Houdebine LM. 2009. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32, 107-121.
- Houdebine LM. 2011. Production of human polyclonal antibodies by transgenic animals. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2, 138-141.
- Houdebine LM, D'Aoust MA. 2011. La production de protéines biosynthétiques à usages thérapeutiques. In Ricoch A, Dattée Y, Fellous M (eds) *Biotechnologies végétales. Environnement, alimentation, santé*. Editions Vuibert, Paris, 223-231.
- Houdebine LM. 2013. *Les animaux transgéniques*. <http://urlz.fr/4wuX>.
- Houdebine LM. 2014. Design of vectors for optimizing transgene expression. In Pinckert CA (ed) *Transgenic Animal Technology. A Laboratory Handbook*. Elsevier, 489-507.
- Johnson IS. 1983. Human insulin from recombinant DNA technology. *Science*, 219(4585), 632-637.
- Kamihira M, Ono KI, Esaka K, Nishijima KI, Kigaku R, Komatsu H, Yamashita T, Kyogoku K, Iijima S. 2005. High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. *Journal of Virology*, 79(17), 10864-10874.
- Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 23(5), 567-575.

Note de conjoncture

- Krimpenfort P, Rademakers A, Eyestone W, van der Schans A, van den Broek S, Kooiman P, Kootwijk E, Platenburg G, Pieper F, Strijker R, De Boer H. 1991. Generation of transgenic dairy cattle using 'in vitro' embryo production. *Biotechnology (NY)*, 9(9), 844-847.
- Lubon H. 1998. Transgenic animal bioreactors in biotechnology and production of blood proteins. *Biotechnology Annual Review*, 4, 1-54.
- Massoud M, Bischoff R, Dalemans W, Pointu H, Attal J, Schultz H, Clesse D, Stinnakre MG, Pavirani A, Houdebine LM. 1990. Production of human proteins in the blood of transgenic animals. *Compte Rendus de l'Académie des Sciences série III*, 311, 275-280.
- Massoud M, Attal J, Thepot D, Pointu H, Stinnakre MG, Theron MC, Lopez C, Houdebine LM. 1996. The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reproduction Nutrition Development*, 36, 555-563.
- Olivier S, Mehtali M. 2009. Les systèmes alternatifs de production d'anticorps monoclonaux thérapeutiques. *Médecine/Science*, 25(12), 1163-1168.
- Palmiter RD, Norstedt G, Gelinas RE, Hammer RE, Brinster RL. 1983. Metallothionein human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science*, 222(4625), 809-814.
- PEGASUS. 2014. *Final Report*. http://cordis.europa.eu/result/rcn/58569_en.html.
- Prusiner SB. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216(4542), 136-144.
- Quétier F. 2016. The CRISPR-Cas9 technology: Closer to the ultimate toolkit for targeted genome editing. *Plant Science*, 242, 65-76.
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281-2308.
- Sarradin P, Viglietta C, Limouzin C, Andréoletti O, Daniel-Carlier N, Barc C, Leroux-Coyau M, Berthon P, Chapuis J, Rossignol C, Gatti JL, Belghazi M, Labas V, Vilotte JL, Béringue V, Lantier F, Laude H, Houdebine LM. 2015. Transgenic rabbits expressing ovine PrP are susceptible to scrapie. *PLoS Pathogens*, 11(8), e1005077.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KH. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 9, 278(5346), 2130-2133.
- Seeburg PH, Sias S, Adelman J, de Boer HA, Hayflick J, Jhurani P, Goeddel DV, Heyneker HL. 1983. Efficient bacterial expression of bovine and porcine growth hormones. *DNA*, 2(1), 37-45.
- Sheridan C. 2016. FDA approves "farmaceutical" drug from transgenic chickens. *Nature Biotechnology*. 34(2), 117-119.
- Takai K, Sawasaki T, Endo Y. 2010. Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos. *Nature Protocols*, 5(2), 227-38.
- Villa-Komaroff L, Broome S, Naber SP, Efstratiadis A, Lomedico P, Tizard R, Chick WL, Gilbert W. 1980. The synthesis of insulin in bacteria: a model for the production of medically useful proteins in prokaryotic cells. *Birth Defects Original Article Series*, 16(1), 53-68.
- Wall RJ, Powell AM, Paape MJ, Kerr DE, Bannerman DD, Pursel VG, Wells KD, Talbot N, Hawk HW. 2005. Genetically enhanced cows

Note de conjoncture

resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nature Biotechnology*, 23(4), 445-451.

Yang P, Wang J, Gong G, Sun X, Zhang R, Du Z, Liu Y, Li R, Ding F, Tang B, Dai Y, Li N. 2008. Cattle mammary bioreactor generated by a novel procedure of transgenic cloning for large-scale production of functional human lactoferrin. *PLoS One*, 3(10), e3453.

Reçu

20 octobre 2016

Accepté

12 décembre 2016

Publié

15 décembre 2016

Citation:

Houdebine LM. 2016. *Des protéines thérapeutiques produites par des animaux transgéniques*. *Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture*, 11, 1-16. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a435750>

Edité par

Dominique Job, membre de l'Académie d'agriculture de France.

Rapporteurs

1. Marcel Kuntz, directeur de recherche au CNRS, Grenoble, France
2. Francis Quétier, professeur émérite des Universités, Génopole, Evry, France.
3. Jean-Paul Renard, directeur de recherche honoraire à l'Inra, membre de l'Académie d'agriculture de France.

Rubrique

Cet article a été publié dans la rubrique «Notes de conjoncture » des *Notes académiques de l'Académie d'agriculture de France*.



Louis-Marie Houdebine est directeur de recherche honoraire à l'Inra et membre de l'Académie d'agriculture de France.

Notes
académiques
de
l'Académie
d'agriculture
de
France



ACADÉMIE
d'AGRICULTURE
de FRANCE

AGRICULTURE ■ ALIMENTATION ■ ENVIRONNEMENT