

Université Montpellier 2

Stage effectué entre ma licence et ma maîtrise de Biologie Générale et de
Sciences et Vie de la Terre

Rapport de stage

Présenté par Caroline GROSEIL

2002-2003

Méthodes et techniques utilisées dans l'étude des influences des apports en nutriments sur le fonctionnement du réseau trophique microbien dans le lagon Sud-Ouest de Nouvelle-Calédonie

Responsable de stage : Jean-Pascal TORRETON, Directeur de recherche

Stage effectué dans le cadre de la thèse de Séverine JACQUET



Institut de Recherche pour le Développement - Nouméa

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Renaud FICHEZ pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité de Recherche CAMELIA.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Jean-Pascal TORRETON sans qui je n'aurais pas effectué ce stage en Ecologie Marine et sans qui mon rapport serait inexploitable.

Je remercie tout particulièrement Séverine Jacquet pour avoir pris le temps et eu la patience de me faire partager ses connaissances en microbiologie, en écologie, (tentative en statistique), ... Encore merci à Séverine de m'avoir fait participer à un maximum de manipulations se rapportant à ses travaux de recherche, de sa sympathie et de sa bonne humeur.

Aussi, je souhaite remercier toutes les personnes de l'équipe CAMELIA, comme Sylvain OUILLOU pour sa carte Kodak, Olivier PRINGAULT pour les citrons de son jardin, Pascal DOUILLET pour ses mauvaises blagues, Ben MORETON pour sa jovialité, Sandrine CHIFFLET pour les goûters partagés dans le bureau n°70...

Je remercie maintenant toutes les personnes que j'ai pu rencontrer pendant ces trois mois et demi de stage et auxquelles je me suis sincèrement attachée : Christian, lofteur extraordinaire, Maxime, copain du lofteur extraordinaire, Perrine, petite copine du copain du lofteur extraordinaire, Daouda, mon chouchou de géochimiste (comment se fait-il qu'il soit encore célibataire ?), Benoît, mon fidèle compagnon de plage, Julien et Nolwenn, mes bretons préférés, Guillaume et Bérengère, «on s'est fait une p'tite beenouz ?», encore Séverine, «t'as qu'à réfléchir !» et bien sûr mon Guéno sans qui je serais SDF.

Un grand merci à Juju qui m'a accueillie en Calédonie.

Pour finir, je remercie mon papa et ma maman sans qui je ne serais pas là.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
I CADRE GENERAL DE L'ETUDE.....	1
1.1 IRD (INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT).....	1
1.2 UNITE DE RECHERCHE CAMELIA.....	2
1.3 LA NOUVELLE-CALEDONIE.....	3
a) <i>Descriptif</i>	3
b) <i>Zone d'études : le lagon Sud-Ouest de Nouvelle-Calédonie</i>	4
1.4 BUTS, OJECTIFS, ET ACTIONS DE L'UR CAMELIA.....	5
1.5 CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....	6
1.6 SUJET DE THESE DE S. JACQUET ET OBJECTIFS.....	6
a) <i>Variabilité temporelle : suivi saisonnier</i>	7
b) <i>Variabilité spatiale : radiales</i>	8
II METHODES ET TECHNIQUES.....	9
2.1 STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE.....	9
2.1.1 CHOIX DES SITES D'ECHANTILLONNAGE.....	9
a) <i>Suivi saisonnier</i>	9
b) <i>Radiales</i>	9
2.1.2 PROFONDEUR DES PRELEVEMENTS.....	12
a) <i>Suivi saisonnier</i>	12
b) <i>Radiales</i>	12
2.1.3 REPARTITION TEMPORELLE DE L'ECHANTILLONNAGE.....	12
a) <i>Suivi saisonnier</i>	12
b) <i>Radiales</i>	12
2.1.4 OPERATIONS EN MER.....	13
2.2 ELEMENT NUTRITIF : NH4 +.....	15
2.2.1 METHODE.....	15
2.2.2 FLUORIMETRE.....	15
a) <i>Fonctionnement</i>	15
b) <i>Protocole</i>	16
c) <i>Limites méthodologiques</i>	16
2.3 VARIABLES BIOLOGIQUES.....	17

2.3.1	BIOMASSE BACTERIENNE.....	17
2.3.1.1	TECHNIQUES DIRECTES UTILISEES.....	17
a)	Microscopie à Epifluorescence.....	17
•	<i>Technique.....</i>	<i>17</i>
•	<i>Fonctionnement.....</i>	<i>18</i>
•	<i>Protocole.....</i>	<i>20</i>
•	<i>Méthode de comptage.....</i>	<i>20</i>
•	<i>Calcul de l'abondance.....</i>	<i>22</i>
•	<i>Calcul de la biomasse.....</i>	<i>22</i>
•	<i>Limites méthodologiques.....</i>	<i>24</i>
b)	Cytométrie de flux.....	25
•	<i>Technique et fonctionnement.....</i>	<i>25</i>
•	<i>Exemple de résultats obtenus.....</i>	<i>26</i>
•	<i>Limites méthodologiques.....</i>	<i>26</i>
2.3.1.2	COMPARAISON DES DEUX TECHNIQUES DIRECTES DE COMPTAGE.....	27
a)	<i>Abondance bactérienne et biomasse.....</i>	<i>27</i>
b)	<i>Quelques remarques.....</i>	<i>29</i>
2.3.2	CHLOROPHYLLE <i>a</i>	30
2.3.2.1	PRINCIPE.....	31
2.3.2.2	MATERIEL EMPLOYE.....	32
a)	<i>Appareillage.....</i>	<i>32</i>
b)	<i>Réactifs chimiques.....</i>	<i>32</i>
2.3.2.3	METHODE.....	33
a)	<i>Modalité de dosage.....</i>	<i>33</i>
b)	<i>Flaconnage, Echantillonnage, Conservation.....</i>	<i>34</i>
c)	<i>Extraction des pigments et mesures.....</i>	<i>34</i>
d)	<i>Limites méthodologiques.....</i>	<i>36</i>
e)	<i>Limites d'interprétations.....</i>	<i>37</i>
III	RESULTATS.....	38
3.1	SUIVI SAISONNIER.....	38
a)	<i>Ammonium.....</i>	<i>38</i>
b)	<i>Abondances et Biomasses.....</i>	<i>40</i>
3.2	RADIALES.....	42
a)	<i>Ammonium.....</i>	<i>42</i>
b)	<i>Abondances et Biomasses.....</i>	<i>43</i>

IV	CONCLUSION.....	45
V	DEFINITIONS DES TERMES UTILISES.....	46
VI	BIBLIOGRAPHIE.....	49

Liste des figures

Figure 1: Localisation géographique de la Nouvelle-Calédonie

Figure 2: Localisation du lagon Sud-Ouest de Nouvelle-Calédonie

Figure 3 : Zones d'études, stations d'échantillonnage regroupées par radiale et les deux stations du suivi saisonnier

Figure 4 : Sonde CTD Seabird SBE 19

Figure 5 : Bouteille NISKIN de 5 litres

Figure 6 : Appareil de mesure, le fluorimètre

Figure 7 : Schéma de principe d'un fluorimètre

Figure 8 : Formule semi développée plane de la molécule de DAPI

Figure 9 : excitation du complexe ADN-DAPI

Figure 10 : Photographie des bactéries colorées au DAPI et observées au microscope à épifluorescence avec une lumière d'une longueur d'onde comprise entre 330 et 380 nm

Figure 11 : Photographie des cyanobactéries colorées au DAPI, fluorescent en orange lorsqu'elles sont excitées dans le bleu, et observées au microscope à épifluorescence

Figure 12 : Description d'un appareillage de cytométrie de flux

Figure 13 : Comparaison entre la microscopie à épifluorescence et la cytométrie de flux sur un comptage de bactéries hétérotrophiques provenant du Nord-Est de la Mer Arabe en janvier, mars et décembre 1995

Figure 14 : Formule semi développée plane de la chlorophylle a (Neveux, 1973)

Liste des tableaux

Tableau 1 : Coordonnées Lambert et GPS des stations de prélèvement du suivi saisonnier

Tableau 2 : Coordonnées Lambert et GPS des stations de prélèvements par radiale

Tableau 3 : Résumé des facteurs de conversion de carbone estimés et des densités de carbone des cellules bactériennes

Tableau 4 : Moyennes, écarts-type, et coefficients de variations des concentrations en ammonium des stations M33 et N12, sur une période s'étalant du 18/04/02 au 28/01/03

Tableau 5 : Moyenne des abondances des stations M33 et N12, sur une période s'étalant du 04/04/02 au 28/01/03

Tableau 6 : Moyenne par radiale des abondances bactériennes, sur une période s'étalant du 18/04/02 au 14/01/03

Tableau 7 : Moyenne par radiale des abondances des cyanobactéries, sur une période s'étalant du 18/04/02 au 14/01/03

Liste des graphiques

Graphique 1 : Représentation des mesures d'ammonium, faites dans les baies Sud-Ouest de Nouméa, durant l'année 2002-2003

Graphique 2 : Comparaisons des abondances des cyanobactéries des stations du suivi saisonnier sur une période s'étalant du mois d'avril 2002 au mois de janvier 2003

Graphique 3 : Comparaisons des abondances bactériennes des stations du suivi de janvier 2003

Graphique 4 : Concentrations de NH_4^+ des radiales d'août 2002

INTRODUCTION

Mes trois premières années universitaires m'ont permis de découvrir de nombreux enseignements appartenant aux domaines de la biologie ou de la géologie.

Beaucoup de ces disciplines m'ont énormément intéressée. Cependant, comment en choisir une et dans quelle voie ? (enseignement ou recherche). J'ai donc décidé d'effectuer une période de stages, entre la licence et la maîtrise afin d'éclaircir mes perspectives d'avenir.

Le domaine qui m'attire le plus est celui de la Recherche, c'est pourquoi j'ai effectué un premier stage, de 3 mois et demi, au sein de l'Institut de Recherche pour le Développement à Nouméa.

Je m'intéresse particulièrement à des domaines tels que la biologie animale, la microbiologie et la biologie moléculaire, ce qui explique le choix de ce stage portant sur l'étude d'un écosystème planctonique.

Mes objectifs pour ce stage sont les suivants :

- Découvrir un institut de recherche,
- Comprendre une démarche scientifique,
- M'intéresser à un travail en cours et aider à l'acquisition de données, c'est à dire :
 - Appréhender le travail de terrain,
 - Saisir les techniques et méthodes utilisées en écologie planctonique,
 - Procéder aux approches expérimentales en participant aux travaux en laboratoire,
- et enfin, réaliser un rapport de stage.

I CADRE GENERAL DE L'ETUDE

1.1 IRD (Institut de Recherche pour le Développement)

Installé à Nouméa (Nouvelle-Calédonie) depuis le 2 Août 1946, l'Institut Français d'Océanie, devenu Centre ORSTOM en 1964, prend le nom de Centre IRD, suite au décret publié au Journal Officiel du 6 novembre 1998. Ce changement d'appellation correspond à une évolution significative des missions de l'Institut. Si la partie recherche fondamentale reste naturellement sa mission première dans les domaines scientifiques qui ont fait son renom dans le Pacifique (géosciences, océanographie physique et biologiques, sciences biologiques terrestres, substances naturelles...), elle est sous-tendue par des actions complémentaires fortes :

- l'expertise collégiale qui permet localement de fournir à l'Etat et aux exécutifs des trois provinces (Province Sud, Province Nord et Province des îles Loyauté) de Nouvelle-Calédonie, un état de savoir sur un ou plusieurs sujets relevant de la compétence de l'IRD.

- la formation de cadres scientifiques et techniques des institutions et services techniques partenaires,
- la diffusion des résultats de la recherche auprès de leurs partenaires institutionnels, mais aussi des décideurs politiques, économiques et du grand public en général (C. Colin in Laboute, 2000).

1.2 Unité de Recherche (UR) CAMELIA

Jusqu'à ce jour, les recherches en écologie marine menées dans des états insulaires étaient surtout fondamentales. Il s'agissait de décrire les éléments de l'écosystème et de comprendre leur fonctionnement par le biais des flux d'énergie entre les compartiments. Les acquis de ces travaux permettent une meilleure compréhension du fonctionnement interne des écosystèmes récifolagunaires et soulignent des phénomènes de recyclage qui assurent une certaine dépendance fonctionnelle entre les récifs et le lagon. Cependant, il n'existe que peu de données sur les échanges avec les terres émergées.

Le développement économique des pays de la zone intertropicale est responsable de modifications majeures de l'environnement côtier. Les états insulaires du Pacifique, disposant de ressources et d'espaces limités, sont particulièrement sensibles au nécessaire équilibre entre développement et gestion durable de l'environnement.

Un effort de recherche est devenu par conséquent primordial afin de déterminer, quantifier et prévoir les impacts des activités humaines sur ces écosystèmes. C'est dans ce contexte que l'UR CAMELIA (Caractérisation et Modélisation des échanges dans les Lagons soumis aux Influences Anthropiques et terrigènes) s'inscrit, en prolongeant le Programme ECOTROPE (Ecosystèmes côtiers et Tropicaux sous influences terrigènes et anthropiques, 1996-2000), ayant permis d'acquérir des connaissances en terme de physico-chimie des transferts de matières dissoutes et particulières des terres émergées vers le lagon.

Le programme de recherche CAMELIA est prévu sur une période de quatre ans entre 2001 et 2004. Il étudie principalement deux sites lagunaires urbanisés du Pacifique insulaire soumis à des degrés divers aux influences des activités humaines : le lagon Sud-Ouest de Nouvelle-Calédonie et le lagon de Suva à Fidji. L'efficacité de l'effort de recherche à l'échelle de la région pacifique est renforcée par une collaboration entre l'IRD et l'Université du Pacifique Sud, basée à Fidji. Par ailleurs, la Nouvelle-Calédonie a été retenue comme chantier du Programme National sur l'Environnement Côtier (PNEC) qui regroupe divers organismes - qu'il finance en partie - tels que l'IFREMER, le CNRS, l'INSU, le CNES et l'IRD pour permettre d'aborder de façon la plus complète possible, l'étude de la structuration et de la dynamique des zones côtières.

1.3 La Nouvelle-Calédonie

a) Descriptif

En raison de sa position géographique (22°S et 166°E) (figure 1), la Nouvelle-Calédonie, archipel de 185575 km², est soumise à un régime tropical maritime qui se caractérise par de faibles contrastes de températures entre la saison la plus chaude et la saison la plus froide (moins de 8°C). La température moyenne annuelle s'établit autour de 22°C. Ce climat est caractérisé par une forte pluviométrie, discontinue, avec une période de dépressions tropicales fréquentes de mi-Novembre à mi-Avril.

Deux régimes de vents prédominent : les vents d'Est ou Alizés de direction ESE et SE prépondérants toute l'année et des coups d'Ouest plus occasionnels de direction NW et SW généralement associés au passage de perturbations (dépressions et cyclones). Les vents conditionnent largement le renouvellement et la circulation des eaux lagunaires (Douillet, 1998).

L'île principale, appelée Grande Terre, est longue de 450 km pour une largeur de 50 km et est entourée d'un récif barrière de 1600 km de long qui délimite le lagon d'une superficie de 23400 km². Elle est en outre partagée longitudinalement par une chaîne de montagnes centrale culminant à 1620 m d'altitude qui sépare la côte Est, étroite bande de littoral à la végétation tropicale luxuriante et au relief encaissé, de la côte ouest, caractérisée par un relief atténué et la présence de savanes provenant des défrichements et des feux répétés. Au sud, la chaîne se transforme en un vaste plateau latéritique de 250 m d'altitude moyenne, parsemé de lacs et de rivières.

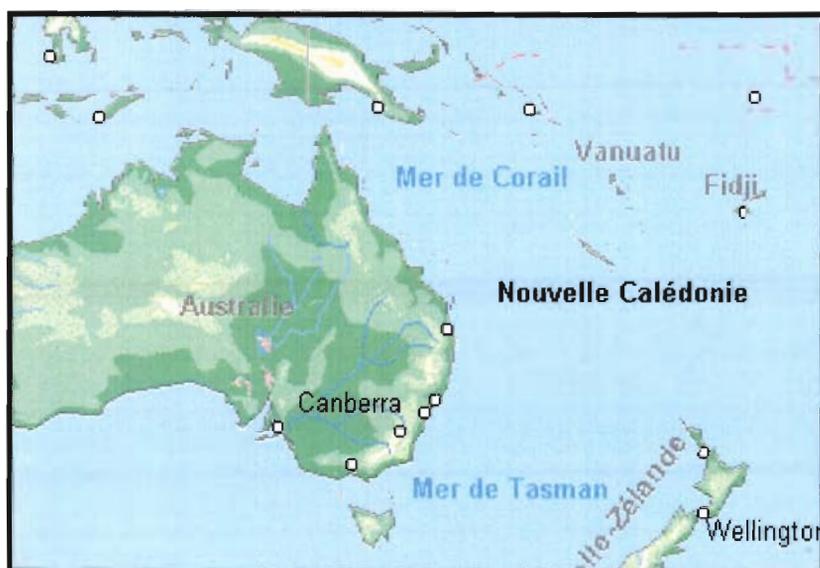


Figure 1: Localisation géographique de la Nouvelle-Calédonie

b) Zone d'études : le lagon Sud-Ouest de Nouvelle-Calédonie

Le lagon Sud-Ouest de Nouvelle-Calédonie comprend le site urbain de Nouméa et ses zones estuariennes environnantes, ce qui représente un secteur de 600 km². Les apports en eau douce sont représentés principalement par trois rivières : les Pirogues, la Coulée et la Dumbéa (figure 4).

Les baies sont peu profondes (environ 10 m). Elles sont soumises à une influence terrigène et anthropique marquée dont les signatures diffèrent selon l'activité locale.

Le récif barrière est entaillé par des passes de profondeurs comprises entre 10 m et 50 m, correspondant aux embouchures des rivières lors des périodes d'émersion (les dernières datent de : - 1800 ans et -5000 ans). Les passes de Boulari, Dumbéa et Uitoé sont associées respectivement aux rivières des Pirogues, de la Dumbéa et de Païta.

Le choix du lagon Sud-Ouest de Nouvelle-Calédonie (figure 2) comme site principal d'activité de l'UR CAMELIA s'est fait en tenant compte de la forte densité de population le long de la côte (Jacquet, 2001).

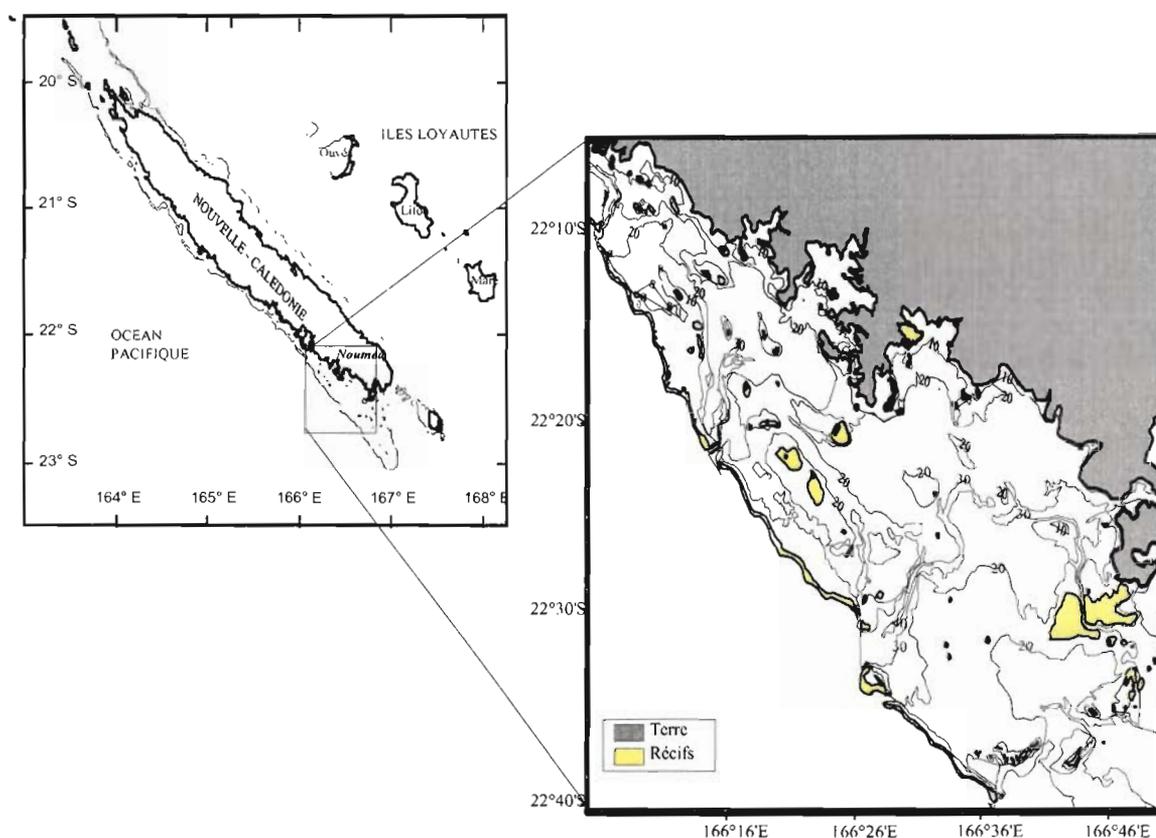


Figure 2: Localisation du lagon Sud-Ouest de Nouvelle-Calédonie

1.4 Buts, Objectifs et Actions de l'UR CAMELIA

L'UR CAMELIA a pour objectif de fournir des outils d'aide à la décision pour les aménageurs qui doivent gérer le développement économique de la zone côtière. Il est maintenant reconnu que les altérations du milieu liées aux activités humaines ont d'importantes incidences environnementales. La nécessaire gestion des ressources côtières repose sur l'existence d'outils de diagnostic et de prédictions fiables. L'UR CAMELIA cherche ainsi à définir les bases scientifiques de ces outils et à développer des approches (modélisation, hydrodynamique, transport de sédiment, fonctionnement biologique) qui permettront d'obtenir une vision synthétique de l'état et de l'évolution de l'écosystème côtier.

Ainsi, pour déterminer comment l'homme influence les écosystèmes littoraux du lagon Sud-Ouest de Nouvelle-Calédonie, l'UR CAMELIA s'intéresse aux apports :

- en particules entraînées par l'érosion des sols et des sous-sols qui sont responsables des processus d'hyper sédimentation,
- en éléments nutritifs organiques et inorganiques qui sont responsables du processus d'eutrophisation,
- en métaux qui peuvent s'avérer potentiellement toxiques pour les organismes vivant dans le lagon.

Les actions de recherche ont été définies de façon à apporter des réponses aux questions suivantes :

- Comment identifier les mécanismes de transport et de transformation des principaux agents d'influence terrigènes et anthropiques au niveau de la zone côtière tropicale ?
- Quels sont les effets des apports terrigènes et anthropiques en terme d'eutrophisation des systèmes et de bio-accumulation des métaux dans les organismes ?
- Dans quelle mesure la modélisation permet-elle de rendre compte de ces mécanismes de transport et de transformation ?

Ces actions s'articulent autour de cinq thèmes:

1. Caractérisations physico-chimiques des eaux et analyse des mécanismes de transport.
2. Dynamique des échanges à l'interface eau-sédiment et analyse de l'influence des apports.

3. Réponses des communautés planctoniques aux apports anthropiques et terrigènes.
4. Intégration des métaux dans la chaîne trophique et recherche de bio-indicateurs.
5. Modélisation de la circulation, du transport et du fonctionnement bio-géochimique.

1.5 Contexte scientifique

Mon stage s'inscrit principalement dans le cadre du thème 3.

Situés dans un environnement océanique oligotrophe tropical, les milieux récifo-lagonaires, hors de l'influence des apports d'origine anthropique, sont généralement oligotrophes en raison du taux de renouvellement important de leurs eaux. On peut constater un déficit important de connaissances sur les conséquences de l'eutrophisation dans ces milieux oligotrophes côtiers. La structure et le fonctionnement des réseaux trophiques diffèrent fondamentalement entre milieux oligotrophes, dominés par le réseau trophique microbien, et milieux eutrophes dominés par un réseau trophique «herbivore» (Legendre & Rassoulzadegan, 1995).

Ainsi, les effets des apports eutrophisants sont étudiés, selon trois approches complémentaires menées parallèlement :

- Etablir expérimentalement et comparer les réponses à des additions en éléments nutritifs des différentes communautés planctoniques dans diverses situations allant de l'oligotrophie à la mésotrophie.
- Déterminer expérimentalement et comparer les caractéristiques cinétiques d'incorporation de NH_4 et PO_4 pour les bactéries hétérotrophes et le phytoplancton dans ces mêmes situations.
- Etablir les relations *in situ* entre nutriments, abondance, activités et composition des communautés au moyen de prélèvements périodiques (Jacquet, 2002).

1.6 Sujet de thèse de S. Jacquet et Objectifs

Mon travail de stage participe au travail de thèse de S. Jacquet qui s'inscrit principalement dans la troisième approche.

S. Jacquet est actuellement en deuxième année de thèse au sein de l'UR CAMELIA (Directeur de thèse, J-P. Torréton (D.R.2)). Sa thèse traite de *L'influence des apports en nutriments sur le fonctionnement du réseau trophique microbien dans le lagon SW de Nouvelle-Calédonie*.

Un premier travail réalisé dans le cadre d'un stage de DEA (Jacquet, 2001) a permis d'étudier les relations *in situ* entre variables biologiques (chlorophylle a, abondance du picoplancton autotrophe,

production primaire, abondance et production des bactéries hétérotrophes) et les éléments nutritifs (ammonium, nitrate, phosphate).

Le sujet de thèse proposé a pour objectifs : (1) d'étendre cette étude sur une plus large échelle spatiale et temporelle, et (2) d'approfondir l'étude des changements des communautés planctoniques et de leurs activités avec l'eutrophisation.

Durant le stage de trois mois et demi (mi-novembre à février), j'ai découvert ce qu'est un organisme de recherche et j'ai suivi le travail en cours de S. Jacquet, en l'aidant à effectuer les différentes manipulations en laboratoire mais aussi sur le terrain.

En effet, ce sujet de thèse nécessite un important travail de terrain dont les objectifs sont les suivants :

1. Evaluer la variabilité temporelle des processus à différentes échelles :
 - à l'échelle journalière afin d'étudier la variabilité intrinsèque des processus microbiens,
 - à l'échelle saisonnière par un échantillonnage régulier sur une année,
2. Evaluer la variabilité spatiale des processus :
 - grâce à un ensemble de 5 radiales constituées de 6 stations chacune, étudiées trois fois par an.
3. Etudier les résultats *in situ* entre variables biologiques et nutriments, afin d'identifier le ou les effets limitants (Jacquet, 2002).

Après avoir compris la démarche scientifique de S. Jacquet, un de mes objectifs fondamentaux était de saisir les techniques et méthodes utilisées dans le domaine de l'écologie marine, en participant à un maximum de travaux en laboratoire et sur le terrain.

Ce sont toutes ces méthodes et techniques, découvertes et effectuées lors de mon stage, qui vont être développées dans mon rapport. Puis seront présentés les résultats obtenus durant ces trois mois et demi de stage au sein de l'UR CAMELIA.

a) Variabilité temporelle : suivi saisonnier

L'exploitation des données du programme ECOTROPE sur la chlorophylle *a*, montre un maximum net en mai et un maximum relatif en novembre. Le suivi, effectué par S. Jacquet, se déroule donc sur une année avec une fréquence d'échantillonnage hebdomadaire pendant les maxima attendus et bi-mensuel le reste de l'année. J'ai pu m'insérer à ce travail en cours, durant une période

d'échantillonnage hebdomadaire (décembre et janvier) et ainsi aider à l'acquisition de données. A cet échantillonnage correspondent des profils CTD toujours sur une base hebdomadaire.

b) Variabilité spatiale : radiales

Pendant le stage de DEA de S. jacquet, les variables ont été obtenues sur un ensemble de 5 radiales de 6 stations échantillonnées 3 fois entre mars et avril 2001 dans le but de couvrir une large gamme de variations possibles. Cependant, les conditions d'eutrophisation observées au cours de cette étude peuvent être bien supérieures. C'est pourquoi, au cours de l'année correspondant au suivi saisonnier, S. Jacquet a réalisé trois séries de cinq radiales (réparties dans les différentes baies proches de la ville de Nouméa) afin d'obtenir si possible des conditions d'eutrophisation plus contrastées et d'évaluer si le rôle prédominant de l'azote, identifié au cours du DEA, est vérifié aux différentes saisons. J'ai pu m'insérer dans la réalisation de la troisième série (datant du mois de janvier 2003) en participant aux travaux effectués sur le terrain et aux manipulations en laboratoire. Tous ces travaux et manipulations effectués seront explicités dans la suite de mon rapport au travers des différentes méthodes et techniques rencontrées.

II METHODES ET TECHNIQUES

2.1 STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE

2.1.1 Le choix des sites d'échantillonnage

a) Suivi saisonnier

Le suivi saisonnier se déroule sur deux stations : M33 et N12 (Figure 4, Tableau 1). Le choix de ces deux stations s'est fait selon les critères suivants :

- N12 est située dans la baie de Sainte Marie, sous influence anthropique recevant les eaux usées non traitées du quartier de Sainte Marie,
- M33 est située au large de l'îlot Maître, dans un chenal lagonaire, hors des influences anthropiques et terrigènes (station, *a priori*, plus oligotrophe que N12).

Donc deux stations sélectionnées : une représentative du lagon « hors influence anthropique », une sous influence anthropique, afin de mettre en évidence une éventuelle différence de saisonnalité.

b) Radiales

La figure 3 présente la zone d'étude et les stations regroupées par radiales (ensemble des stations échantillonnées le même jour). Le tableau 2 donne leurs coordonnées GPS. Le choix des stations s'est fait selon les critères suivants : tout d'abord, la radiale devait respecter un degré d'eutrophisation supposé (par exemple d'un fond de baie vers l'entrée de celle-ci). Ensuite, le nombre de stations à échantillonner par jour devait être suffisant mais rester réaliste. Six stations par radiale correspondent au juste compromis entre les différentes contraintes inhérentes à l'étude. Enfin, chaque radiale devait correspondre à des caractéristiques environnementales différentes (Jacquet, 2001).

Les radiales présentent les caractéristiques suivantes :

- « Baie de Boulari » : système essentiellement soumis aux apports terrigènes par la rivière La Coulée et de manière plus indirecte par la rivière des Pirogues. Ces deux rivières drainent des bassins versants présentant des activités d'extraction minières passées et présentes importantes.
- « Grande Rade » : radiale caractérisée par la présence de l'usine pyrométallurgique gérée par la « Société le Nickel » en fond de baie.

- « Baie de Dumbéa » : système plus complexe soumis pour une large part aux apports terrigènes de la rivière Dumbéa et pour partie aux apports industriels de l'usine de traitement de minerai de nickel (Grande Rade).
- « Baie de Sainte Marie » : Zone sous influence anthropique recevant les eaux usées non traitées du quartier de Sainte Marie.
- « Océan » : système lagonaire s'éloignant des influences anthropiques et terrigènes, radiale *a priori* la plus oligotrophe.

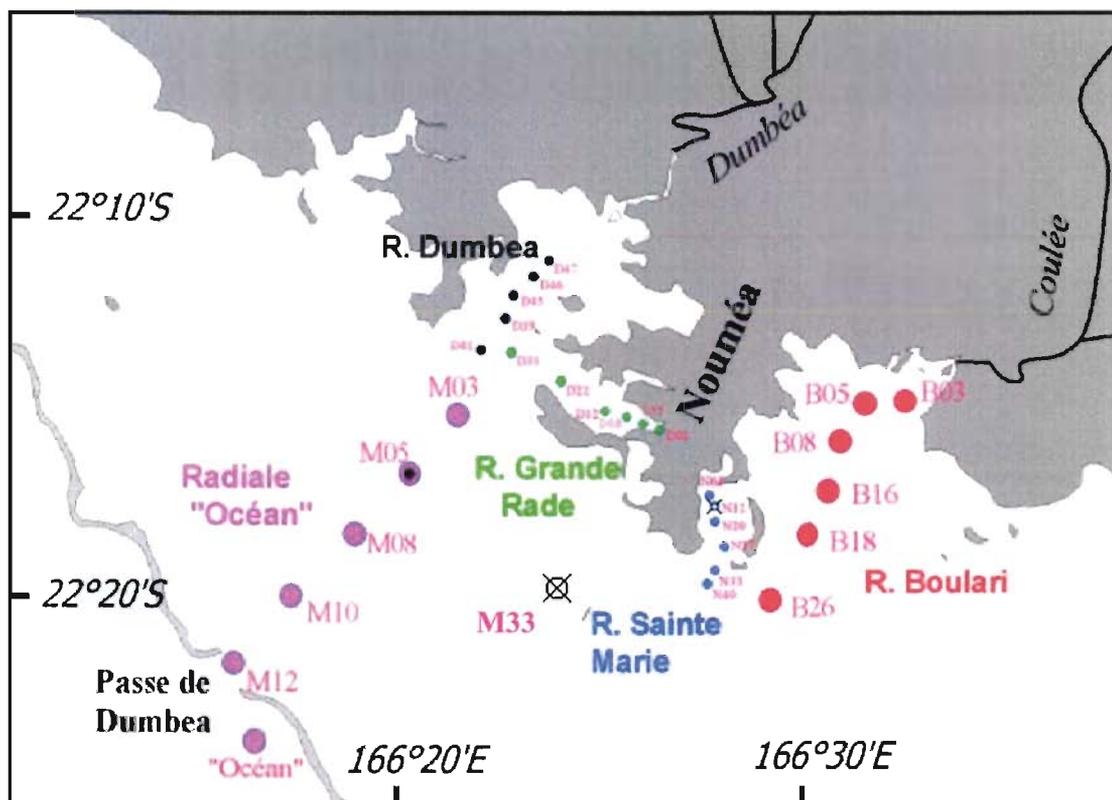


Figure 3 : Zones d'études, stations d'échantillonnage regroupées par radiale et les deux stations du suivi saisonnier

station	CARTE						GPS			
	Lat (°)	Lat (')	Lat (")	Long (°)	Long (')	Long (")	Lat (°)	Lat (')	Long (°)	Long (')
M33	22	21	23	166	23	43	22	21,06	166	23,62
N12	22	17	40	166	27	44	22	17,49	166	27,93

Tableau 1 : Coordonnées Lambert et GPS des stations de prélèvement du suivi saisonnier

radiale	station	CARTE						GPS			
		Lat (°)	Lat (')	Lat (")	Long (°)	Long (')	Long (")	Lat (°)	Lat (')	Long (°)	Long (')
Baie de Boulari	B03	22	15	12	166	32	44	22	15,03	166	32,92
	B05bis	22	15	80	166	32	0	22	15,48	166	32,00
	B08	22	16	12	166	31	4	22	16,03	166	31,26
	B16	22	17	14	166	30	44	22	17,07	166	30,92
	B18	22	18	14	166	30	15	22	18,06	166	30,44
	B26	22	19	46	166	29	7	22	19,59	166	29,30
Grande Rade	D01	22	15	52	166	26	17	22	15,70	166	26,48
	D05	22	15	47	166	25	48	22	15,62	166	25,99
	D08	22	15	38	166	25	22	22	15,47	166	25,55
	D16	22	15	19	166	24	20	22	15,15	166	24,52
	D22	22	14	46	166	23	40	22	14,60	166	23,85
	D33	22	14	7	166	22	20	22	13,95	166	22,53
Baie de Dumbéa	D47	22	12	5	166	23	20	22	11,92	166	23,53
	D46	22	12	29	166	22	56	22	12,32	166	23,13
	D45	22	13	7	166	21	46	22	12,94	166	21,96
	D39	22	13	24	166	22	14	22	13,23	166	22,43
	D41	22	14	9	166	21	29	22	13,98	166	21,67
	M05	22	16	57	166	19	45	22	16,78	166	19,94
Lagon - passe Océan	M03	22	15	35	166	20	59	22	15,41	166	21,17
	M05	22	16	57	166	19	45	22	16,78	166	19,94
	M08	22	18	23	166	18	16	22	18,22	166	18,45
	M10	22	19	51	166	16	36	22	19,68	166	16,79
	M12	22	21	10	166	14	49	22	21,00	166	15,00
	Océan	22	20	33	166	15	58	22	23,27	166	15,75
Ste Marie	N04	22	17	23	166	27	34	22	17,22	166	27,76
	N12	22	17	40	166	27	44	22	17,49	166	27,93
	N20	22	18	1	166	27	40	22	17,84	166	27,86
	N27	22	18	33	166	27	59	22	18,38	166	28,17
	N33	22	19	5	166	27	42	22	18,92	166	27,89
	M33	22	21	23	166	23	43	22	21,06	166	23,62

Tableau 2 : Coordonnées Lambert et GPS des stations de prélèvements par radiale

2.1.2 Profondeur de prélèvement

a) Suivi saisonnier

Les prélèvements ont été effectués à cinq profondeurs différentes équitablement réparties le long de la colonne d'eau. Les profondeurs des stations M33 et N12 sont respectivement de 25 et 14 m. Les profondeurs des prélèvements pour M33 sont de 3 m, 7 m, 12 m, 16 m et 20 m ; celles de N12 sont de 3 m, 5 m, 6.5 m, 8.25 m et 10 m.

Ces cinq prélèvements sont mélangés avant analyse afin de représenter au mieux la colonne d'eau, bien que l'homogénéité verticale constitue le cas le plus fréquent. L'échantillonnage commence à 3 m au minimum pour éviter l'éventuelle dessalure de surface après de fortes pluies.

b) Radiales

Les prélèvements ont été effectués à 3 m de profondeur. Des campagnes répétées au cours des programmes précédents ont en effet montré en moyenne l'homogénéité de la colonne d'eau. L'échantillonnage à 3 m permet d'éviter l'éventuelle dessalure de l'eau après de fortes pluies et de limiter le temps d'échantillonnage.

2.1.3 Répartition temporelle de l'échantillonnage

a) Suivi saisonnier

L'échantillonnage a commencé le 04/04/02 et se terminera fin avril 2003. La fréquence d'échantillonnage a été établie après une synthèse des données disponibles (chlorophylle *a* sur le lagon de Nouméa (Dandonneau et Gohin 1984 ; Binet et Le Borgne 1996) et des données ECOTROPE octobre 1997 à novembre 1998). L'exploitation de ces données de chlorophylle *a* montre un maximum net en mai et un maximum relatif en novembre. Chaque station a été échantillonnée de façon hebdomadaire pendant les maxima et de façon bi-mensuelle le reste de l'année. Il a été obtenu 64 points de mesure.

b) Radiales

La période d'échantillonnage s'est déroulée du 18/04/02 au 14/01/03. Chacune des cinq radiales a été échantillonnée 3 fois, avec six stations par radiale ; il a été obtenu 90 points de mesure.

2.1.4 Opérations en mer

Les différentes opérations effectuées à bord du «Coris», navire de l'IRD, aussi bien pour le suivi saisonnier que pour les radiales, sont les suivantes :

- **Mesures à la sonde CTD**

La sonde CTD (figure 4) est une sonde multi-paramètres dotée de 3 capteurs qui permettent de mesurer la conductivité, la température, la pression en chaque station. Des capteurs supplémentaires sont utilisés :

- Un *fluorimètre* qui permet la détermination *in situ* de la concentration en chlorophylle.
- Un *capteur de PAR* (Photosynthetically Active Radiation) afin de déterminer l'atténuation lumineuse en fonction de la profondeur.
- Un *néphélomètre* qui mesure la turbidité des eaux traversées par la sonde.

La sonde CTD, fixée à une corde, est descendue manuellement à vitesse régulière, elle acquière les paramètres hydrologiques obtenus par les différents capteurs, avec une fréquence de 4 mesures par seconde.

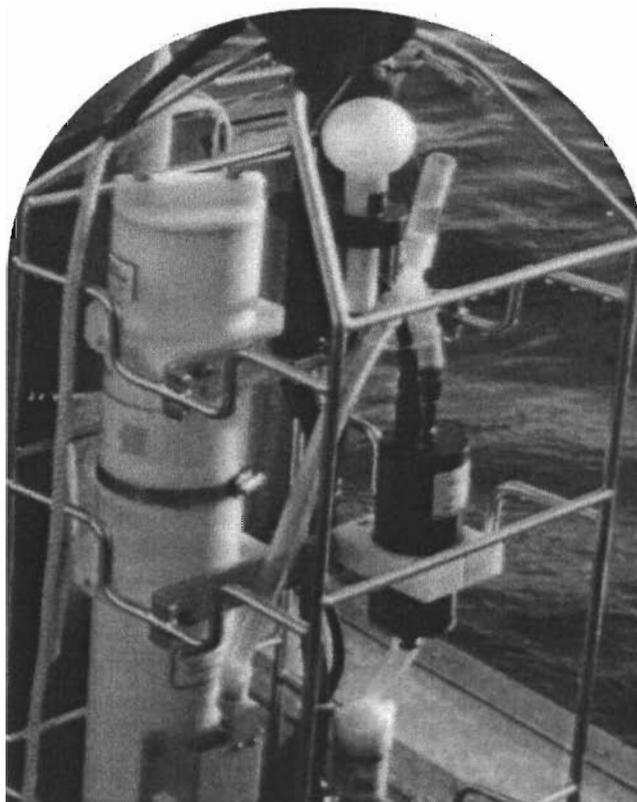


Figure 4 : Sonde CTD Seabird SBE 19

- **Prélèvement d'eau**

- a) Suivi saisonnier**

Pour chaque station, 5 bouteilles NISKIN (figure 5) de 5 litres sont amenées à 5 profondeurs différentes, et sont fermées à l'aide d'un messenger.

- b) Radiales**

Une bouteille NISKIN (figure 5) de 5 litres par station est amenée à 3 m. Les bouteilles sont stockées à l'ombre et les échantillons sont traités au laboratoire moins de deux heures après les prélèvements.



Figure 5 : Bouteille NISKIN de 5 litres

2.2 ELEMENT NUTRITIF : AMMONIUM

2.2.1 Méthode

Les mesures des ions ammonium sont réalisées en laboratoire, au sein de l'IRD. Quatre flacons, de 40 ml, sont remplis d'eau de mer provenant de chacune des stations, 2 ml de réactif OPA (OrthoPhtaldiAldehyde) sont immédiatement ajoutés. Les flacons sont préalablement lavés à l'acide (HCl 10%) puis rincés trois fois à l'eau Milli-Q et enfin rincés trois fois à l'eau de prélèvement. L'ajout de l'OPA permet la formation d'un complexe OPA-ammonium dosable par fluorimétrie (figure 6). Il est nécessaire d'attendre 5 heures (flacons placés au sec et à l'obscurité) afin que la réaction de complexification se fasse entre les ions ammonium et l'OPA.

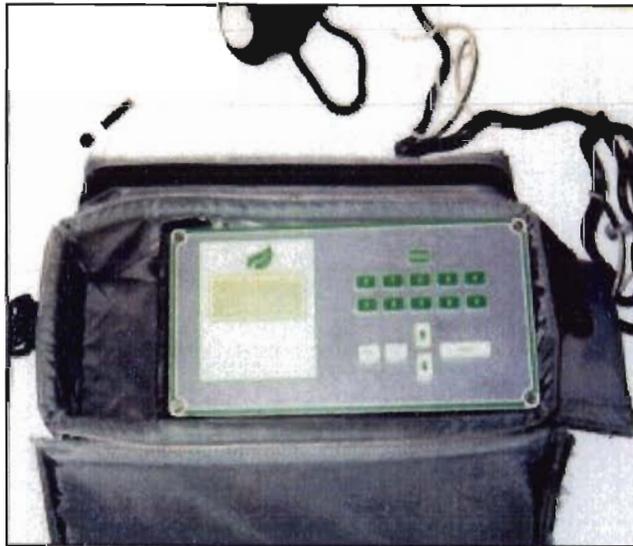


Figure 6 : Appareil de mesure, le fluorimètre

2.2.2 Fluorimètre

a) Fonctionnement

Le fluorimètre (figure 6) mesure la fluorescence de l'échantillon, à une longueur d'onde supérieure à celle de la lumière incidente. La fluorescence est obtenue lors du passage des électrons de certaines molécules de l'échantillon d'un état excité à un état de base. Il y a absorption de la lumière par

l'échantillon à une certaine longueur d'onde et réémission à une nouvelle longueur d'onde plus longue et reçue par un détecteur (figure 7).

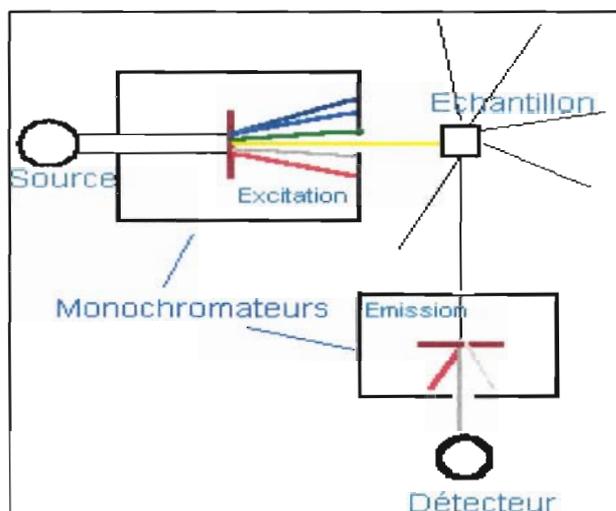


Figure 7 : Schéma de principe d'un fluorimètre

b) Protocole

Il est important de laisser chauffer 15 minutes le fluorimètre avant de l'utiliser (pour que la stabilité du signal soit optimale car la lampe produit des vibrations). Les mesures d'ammonium étant sensibles aux différentes contaminations, il est important de rincer le tube dont on va se servir pour effectuer les mesures, 3 fois à l'eau Milli-Q. Puis retirer de l'obscurité les échantillons préparés, les agiter et rincer le tube 3 fois avec l'eau de mer de l'échantillon que l'on désire mesurer et enfin placer le tube devant le faisceau lumineux dans le fluorimètre. Un blanc avant la première mesure et un second à la fin des mesures, sont nécessaires afin de vérifier que le fluorimètre n'a pas dérivé. Ainsi, il sera obtenu 4 mesures par station.

c) Limites méthodologiques

Les mesures d'ammonium présentent une variabilité qui justifie la réalisation de quatre échantillons par station et des conditions d'échantillonnage drastiques (les vapeurs d'huile de moteur peuvent par exemple fausser les mesures).

2.3 VARIABLES BIOLOGIQUES

2.3.1 Biomasse bactérienne

L'estimation de la biomasse bactérienne passe par l'estimation préalable de l'abondance bactérienne. Cette dernière est le nombre de bactéries existant par unité de volume (10^6 bactéries/ml).

L'abondance bactérienne est déterminée par des techniques de comptage bactérien telles que la microscopie à épifluorescence ou la cytométrie de flux.

Actuellement, il n'existe pas d'appareil ou de moyen automatisé permettant d'évaluer directement la biomasse ; cette dernière est interprétée à partir des volumes cellulaires et de relations carbone/volume. La majorité des publications sont basées sur la détermination des abondances bactériennes par microscopie à épifluorescence.

Mon rapport se limite à une étude des méthodes de détection directe qui sont la microscopie à épifluorescence et la cytométrie de flux.

2.3.1.1 Techniques utilisées

a) Microscopie à épifluorescence

- **Technique**

Un des nombreux marqueurs fluorescents utilisés est le DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole), il se fixe sur l'ADN (figure 8) (Porter et Feig, 1980).

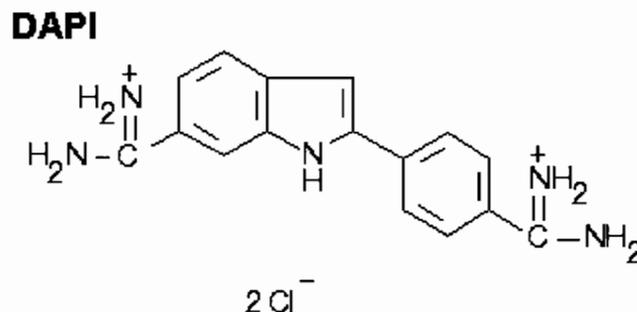


Figure 8 : Formule semi développée plane de la molécule de DAPI

Quand le complexe ADN-DAPI formé, est excité avec une lumière d'une longueur d'onde comprise entre 330 et 380 nm, il fluoresce dans le bleu (figure 9).

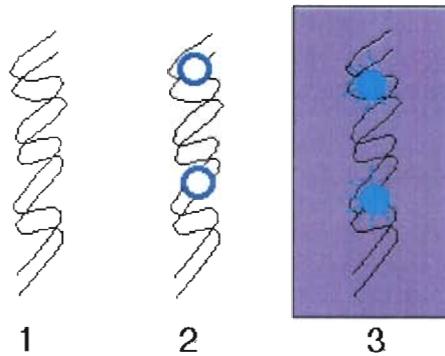


Figure 9 : excitation du complexe ADN-DAPI

- **Fonctionnement:**

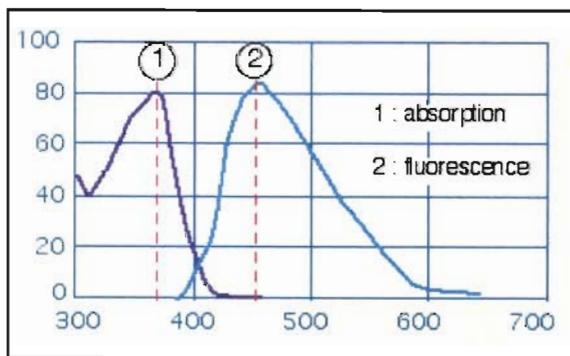


Figure A

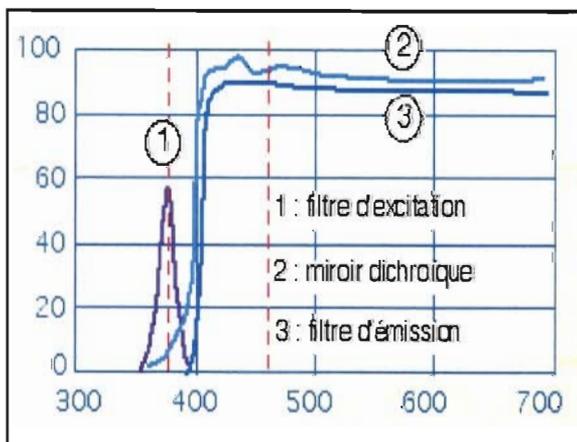


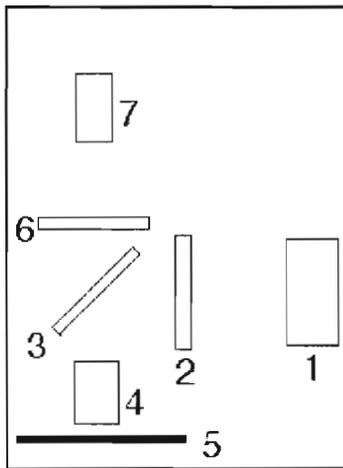
Figure B

Comme on le voit, le DAPI absorbe les radiations violettes (max. 372nm) et restitue une fluorescence bleue (max. 456nm) (Figure A).

Le microscope à épifluorescence doit être équipé d'un jeu de filtres correspondant aux caractéristiques du fluorochrome :

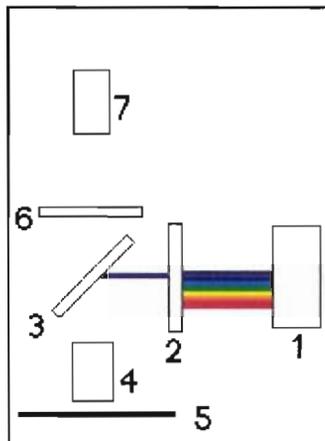
- un filtre d'excitation permettant la sélection des radiations absorbées par le fluorochrome (environ 380nm pour le DAPI),
- un miroir dichroïque réfléchissant les radiations absorbables vers l'échantillon et ne laissant passer par transmission que les radiations bleues et au dessus (ici >400nm),
- un filtre d'émission ne laissant passer par transmission que les radiations bleues et au dessus (>400nm) (Figure B).

➤ **Optique simplifiée du microscope à épifluorescence :**

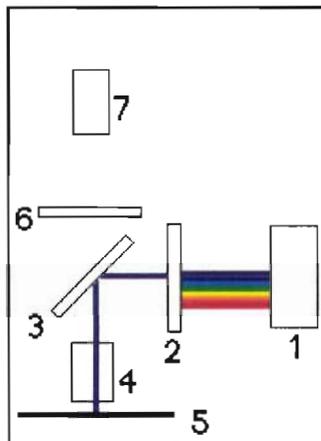


- 1-lampe à arc
- 2-filtre d'excitation
- 3-miroir dichroïque
- 4-objectif
- 5-préparation

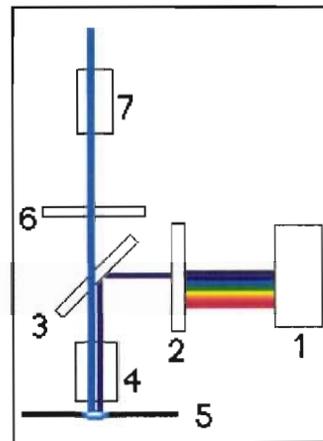
➤ **Le trajet des radiations lumineuses:**



Le filtre d'excitation sélectionne les radiations spécifiques du fluorochrome...



...qui sont réfléchies par le miroir et éclairent l'échantillon...



...celui-ci émet les radiations de fluorescence qui seules atteignent l'oculaire.

• **Protocole**

- Le DAPI est acheté en poudre. Une solution mère de 10mg dans 10ml d'eau Milli-Q est préparée puis congelée par aliquotes de 1ml. Le jour même des comptages, il est nécessaire de diluer la solution mère avec 9ml d'eau Milli-Q filtrée sur Millex 0.2 μ m, puis de la stocker au réfrigérateur et à l'obscurité.
- Laver les tourelles en verre avec 15ml au RBS, puis bien rincer à l'eau déminéralisée ensuite à l'eau Milli-Q, et enfin à l'eau Milli-Q filtrée à la seringue + Millex.
- Disposer un sous-filtre Millipore 0.8 μ m sur le fritté afin d'homogénéiser la dépression, puis un filtre Nuclepore 0.2 μ m noir, côté brillant (mouillable) dessus.
Le filtre Millipore 0.8 μ m doit être pré mouillé avec de l'eau Milli-Q 0.2 μ m pour que le Nuclepore adhère bien dessus.
- Mettre délicatement les tourelles en verre,
- Bien agiter les flacons au vortex et/ou à la main,
- Disposer précisément 10ml sur la tourelle de filtration grâce à une seringue ou une pipette de 10ml.
- Filtrer très doucement, vérifier que la dépression de la pompe ne soit pas à plus de 20mmHg, le ménisque doit descendre très lentement. Lorsqu'il ne reste plus qu'1 ml au dessus du filtre, arrêter la pompe et casser le vide.
- Rajouter 4 gouttes de DAPI dilué avec une seringue de 1ml et un Millex GV,
- Attendre 10 minutes, disposer à l'obscurité.
- Finir la filtration jusqu'à ce que le filtre soit sec.
Laisser le vide 1 minute, en fin de filtration, pour sécher le filtre Nuclepore.
Prendre filtre et sous-filtre, les placer dans une boîte de Pétri (marquée).
Conserver à -20°C jusqu'au comptage.

• **Méthode de comptage**

Les bactéries, colorées par le DAPI, apparaissent bleues (figure10). Elles doivent être comptées sur 20 champs de 4 carreaux minimum et leur nombre doit être supérieur à 400 pour atteindre une précision statistique de plus ou moins 10%.

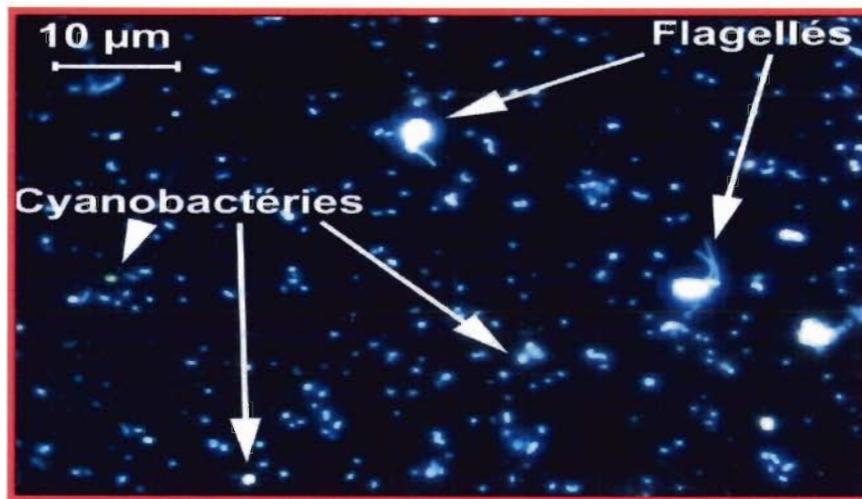


Figure 10 : Photographie des bactéries colorées au DAPI et observées au microscope à épifluorescence avec une lumière d'une longueur d'onde comprise entre 330 et 380 nm

Le DAPI permet la visualisation des bactéries mais aussi leur distinction des cyanobactéries qui possèdent un pigment caractéristique, la phycoérythrine qui fluoresce en orange lorsqu'il est excité dans une autre longueur d'onde.

Les cyanobactéries apparaissent oranges (figure 11), et sont comptées sur 20 champs de 100 carreaux minimum et leur nombre doit être supérieur à 400.

Grâce aux comptages effectués méticuleusement, il est possible d'en déduire l'abondance puis la biomasse des bactéries et des cyanobactéries.



Figure 11 : Photographie des cyanobactéries colorées au DAPI, fluorescent en orange lorsqu'elles sont excitées dans le bleu, et observées au microscope à épifluorescence

- **Calcul de l'abondance:**

L'abondance bactérienne est le nombre de bactéries existant par unité de volume, exprimée en 10^6 bactéries / ml.

Formule 1- Calcul de l'abondance bactérienne

$$\text{Bactéries (10}^6\text{ B/ml)} = Bt * 100 / C * 1 / c * 18319 / Vf * 1 / 10^6$$

Avec : B : bactéries

Bt : nombre total de bactéries comptées

C : nombre de carreaux par champs sur lesquels sont dénombrées les bactéries

c : nombre de champs comptés

Vf : volume filtré en ml

18319 : nombre de champs de 100 carreaux sur un filtre de 15.3 mm

- **Calcul de la biomasse**

La biomasse est la masse totale de matière bactérienne présente dans un biotope à un moment donné. Elle ne peut être mesurée directement ; sa détermination passe par l'estimation préalable de l'abondance bactérienne multipliée par un facteur de carbone par cellule ou par unité de volume (bactéries de biovolume compris entre 0.036 et $0.073 \mu\text{m}^3$ (soit 0.41 - $0.52 \mu\text{m}$ de diamètre), Lee et Fuhrman, 1987).

Le choix du facteur de conversion du carbone des cellules bactériennes a été très discuté et a demandé beaucoup de recherches et d'analyses.

D'après la littérature, la valeur de 20 fgC/cellule est la plus largement utilisée pour les calculs de biomasse. Cependant, elle représente une haute densité de carbone, et plus particulièrement pour de petites cellules ($< 500 \mu\text{m}^3$) caractéristiques des milieux océaniques ($< 400 \text{ fgC}/\mu\text{m}$). Cette valeur est proche des limites supérieures des plus hautes estimations rapportées par Bratbak et Dundas. Les estimations indépendantes de la biomasse bactérienne, indique que la teneur en carbone des bactéries peut-être quelque peu inférieure.

Christian et Karl (1994) et Caron et al. (1999) ont obtenu des estimations de 10 à 15 fgC/cellule . Dans une nouvelle approche, Carlson et al. (1999), ont utilisé des analyses de hautes précisions du DOC et TCO_2 pour trouver le carbone contenu dans les bactéries.

Le contenu en carbone trouvé allait de 7 à 13 fgC/cellule pour des cellules de taille allant de 0.06 à $0.09 \mu\text{m}^3$.

Les facteurs de conversion du carbone des cellules, rapportés par Lee et Fuhrman (1987), ne sont pas des estimations directes des populations bactériennes actuelles *in situ*. Ceci s'explique par le fait que les estimations peuvent être biaisées par la succession des espèces pendant les cultures.

Fukuda et al. (1998) ont rapporté la première mesure directe de la teneur en carbone et en azote d'un assemblage de bactéries marine. Après avoir préparé les filtrats d'eau de surface, sur une large étendue de sites côtiers et océaniques, avec une contamination minimale, ils ont analysé le carbone en utilisant la méthode d'oxydation catalytique à haute température (HTCO).

L'approche analytique a évité le besoin de concentrer les échantillons sur les filtres GF/F pour l'analyse CHN, en évitant aussi la perte de petites cellules (probablement dense en carbone) au travers des filtres.

Fukuda et al. (1998) ont obtenu un taux moyen de 12.4 +/- 6.3 et 30.2 +/- 12.3 fgC/cellule pour, respectivement, les milieux océaniques et côtiers (tableau 3). Ils estiment que ce sont des évaluations représentatives de la plupart des milieux marins. L'utilisation d'un facteur uniforme, comme 20 fgC/cellule, aurait tendance à surestimer les biomasses bactériennes dans les habitats océaniques et à la sous-estimer dans les habitats des régions côtières.

Durant mon stage, le calcul des biomasses des différents échantillons, pris en milieu océanique, a été effectué avec le taux de conversion de Fukuda et al. (1998), de 12.4 fgC/cellule.

Formule 2- Calcul de la biomasse bactérienne

$$\text{Biomasse } (\mu\text{gC/L}) = \text{Abondance bactérienne } (10^6/\text{ml}) * 12.4(\text{fgC/cellule})$$

Avec :

μgC : micro grammes de carbone

fgC : femto grammes de carbone

Region	Density (fg C μm^{-3})	Content (fg C cell $^{-1}$)	Method	References
Pure cultures	160-930		CHN analysis	Bratbak (1985)
Estuarine: coastal shelf				
Norwegian fjord		7-12	X-ray diffraction	Fagerbakke et al. (1996)
Long Island Sound	210-600	15-24	CHN analysis	Lee and Fuhrman (1987)
Otsuchi Bay, Japan		17-53	CHN analysis	Kogure and Koike (1987)
Ross Sea Antarctica	77-165	7-13	C mass balance	Carlson et al. (1999)
Oceanic				
Hawaii		10	Biomass constraints	Christian and Karl (1994)
Bermuda		15	Biomass constraints	Caron et al. (1995)
Southern Ocean		12	Direct measurement	Fukuda et al. (1998)

Tableau 3 : Résumé des facteurs de conversion de carbone estimés et des densités de carbone des cellules bactériennes.

- **Limites méthodologiques**

Il est important de noter que le DAPI peut se fixer sur du matériel non ADN qui va fluorescer, rendant le comptage difficile.

La présence de voiles organiques, de protistes ou de phytoplancton en trop grand nombre sur les lames, induisent des risques de sous-estimation lors du comptage. A l'opposé, la présence de trop grandes quantités de matière organique, formant de petits conglomerats, peuvent induire des risques de sur-estimation.

Il faut noter que lors du comptage au microscope à épifluorescence, il est impossible de distinguer les cellules actives des inactives. De plus, il faut faire la différence entre les bactéries hétérotrophes et les phototrophes (tels que les cyanobactéries coccoïdes et les prochlorophytes) de taille et de caractéristiques similaires.

Le comptage au microscope reste une méthode relativement longue et fastidieuse.

b) La cytométrie de flux

• Technique et fonctionnement

La cytométrie de flux permet de déterminer le contenu cellulaire en ADN grâce à des colorants fluorescents, appelés fluorochromes. Les cellules en suspension (figure 12) sont guidées dans un fin capillaire, jusqu'à l'extrémité d'une buse, où elles vont traverser, en file indienne, le faisceau d'un laser qui va exciter le ou les fluorochromes présents.

L'émission engendrée varie selon la nature et la qualité du marqueur fixé par la cellule. Cette intensité, exprimée par un numéro de canal, sera visualisée sur un écran par des histogrammes. La vitesse d'analyse (1000-2000 événements/seconde) permet l'examen d'un nombre important de cellules, qui peuvent être triées et collectées sur certains appareils.

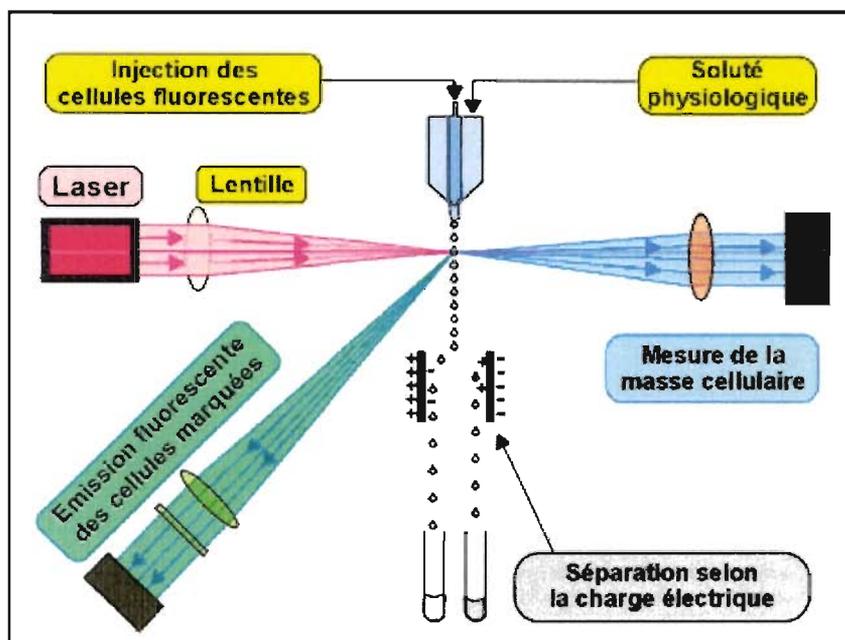


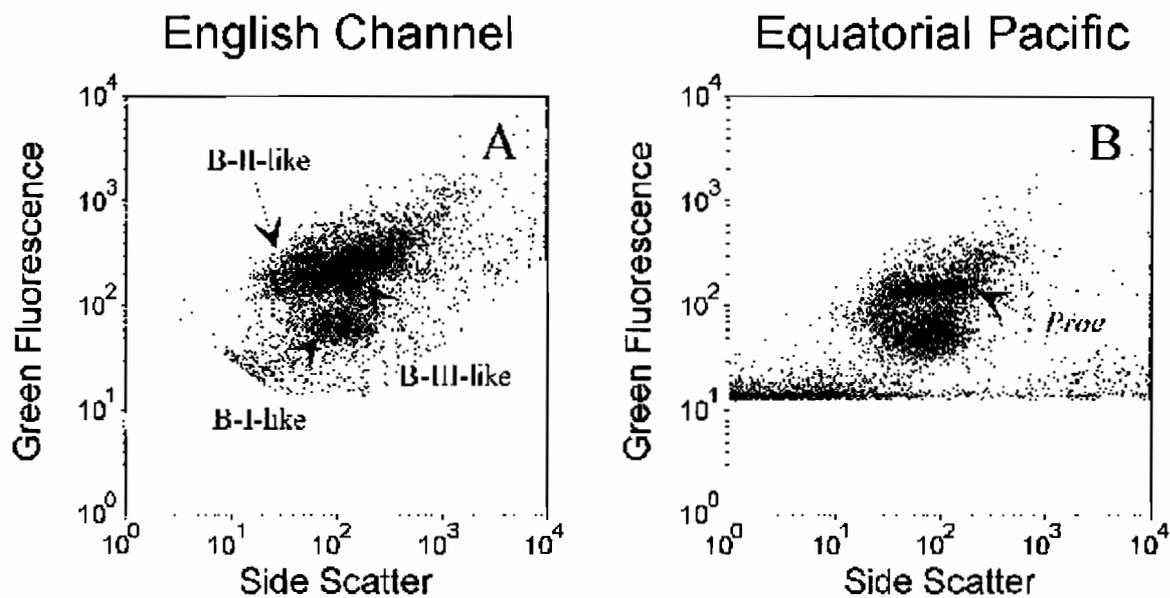
Figure 12 - Description d'un appareillage de cytométrie de flux

Les cellules sont dispersées dans de l'eau de mer et passent à travers un faisceau de lumière laser (figure 12).

Les cellules qui émettent la fluorescence sont reconnues par une cellule photoélectrique particulière. Enfin, on peut éventuellement séparer les cellules selon leur charge électrique : séparateur de cellules (comme un module de tri séparant les cellules toujours sur le même principe de marquage différent).

- **Exemple de résultats obtenus**

L'analyse par flux cytométrique des bactéries qui contiennent généralement peu d'ADN, requiert la combinaison de substances hautement fluorescentes. Sous lumière UV, sont utilisés des marqueurs fluorescents tels que le DAPI ou Hoechst 33342, ou encore des marqueurs plus récents comme le Yoyo-1 ou le Pico-Green, rendant ce type d'analyse possible sur des cytomètres de flux peu puissants et moins coûteux.



Figures A et B : Exemple de résultats obtenus en cytométrie de flux

Chaque cellule possède une intensité de fluorescence différente et proportionnelle à son contenu d'ADN. Les eaux côtières sont dominées par des bactéries qui ont un contenu en ADN important (Figure A) alors que dans les eaux des milieux oligotrophes, les bactéries possédant un faible contenu en ADN sont plus abondantes (Figure B) (Station biologique de Roscoff, novembre 1998).

- **Limites méthodologiques**

La cytométrie de flux ne permet pas d'analyser des cellules supérieures à 50µm, cependant ceci concerne rarement les bactéries.

L'application de la cytométrie en flux au milieu naturel requiert un certain nombre de développements méthodologiques. Il s'agit en particulier de la standardisation des protocoles d'analyse de façon à ce que les résultats obtenus ne soient pas dépendants des appareils utilisés. Le dénombrement des cellules et leur résolution en populations distinctes n'est qu'une étape descriptive. La conversion des données de cytométrie en biomasse de carbone, pour chaque population résolue, constitue en soi une information de grand intérêt. Il n'existe pas encore de moyen de conversion simple et le développement d'algorithmes s'avère indispensable pour réaliser cette évaluation de façon automatisée.

En outre, la distinction entre cellules vivantes et cellules mortes constitue une étape vers la caractérisation de l'état physiologique des cellules analysées.

2.3.1.2 Comparaison des deux techniques directes de comptage

a) Abondance bactérienne et biomasse

- La microscopie à épifluorescence reste la méthode la plus largement utilisée afin de mesurer l'abondance bactérioplantonique. Elle reste irremplaçable car sert de base solide sur laquelle les interprétations en microbiologie peuvent être faites.

Les personnes expérimentées dans l'utilisation du microscope à épifluorescence sont capables de faire des traitements d'images remarquables; cependant, il est difficile de documenter de manière correcte l'information obtenue durant un comptage visuel. Ces personnes expérimentées se basent sur des critères subjectifs (forme, taille, luminosité) pour effectuer leurs comptages.

- Avec le développement de l'optique sensitive, des systèmes de lasers et le rendement des fluorochromes à haute fluorescence, la détection et l'énumération des bactéries hétérotrophes par cytométrie de flux devient une alternative attractive à la microscopie.

Cette méthode est préférable car plus de cellules sont comptées dans chaque échantillon qu'il n'est possible d'en compter avec la microscopie à épifluorescence. La cytométrie de flux est une méthode potentiellement capable de différencier les cellules actives des cellules inactives en estimant l'intensité de fluorescence pour chaque cellule qui contient une quantité d'acides nucléiques spécifique.

De plus, avec la cytométrie de flux, les bactéries hétérotrophes peuvent être aisément distinguées des prochlorophytes et des cyanobactéries coccoïdes de taille et de caractéristiques de fluorescence similaires (Campbell et al. 1994); ces bactéries phototrophes sont souvent comptées comme des hétérotrophes avec le microscope, excepté s'il l'on prend soin de vérifier par d'autres excitations.

La préparation des échantillons est beaucoup moins laborieuse ; dans un premier temps on fixe les bactéries avec du glutaraldéhyde et dans un second temps on plonge les cryotubes dans l'azote liquide.

Grâce à la facilité de préparation de ces échantillons et le plus grand rendement, par rapport aux efforts fournis, la cytométrie de flux devrait remplacer la microscopie à épifluorescence dans la plupart des applications fastidieuses et routinières, au cours des prochaines années.

Néanmoins, grâce à la découverte de nouveaux colorants et la sophistication des analyses d'images numériques, la détermination du nombre de cellules et de leur taille par microscopie devrait rester un repère solide encore pour de nombreuses années.

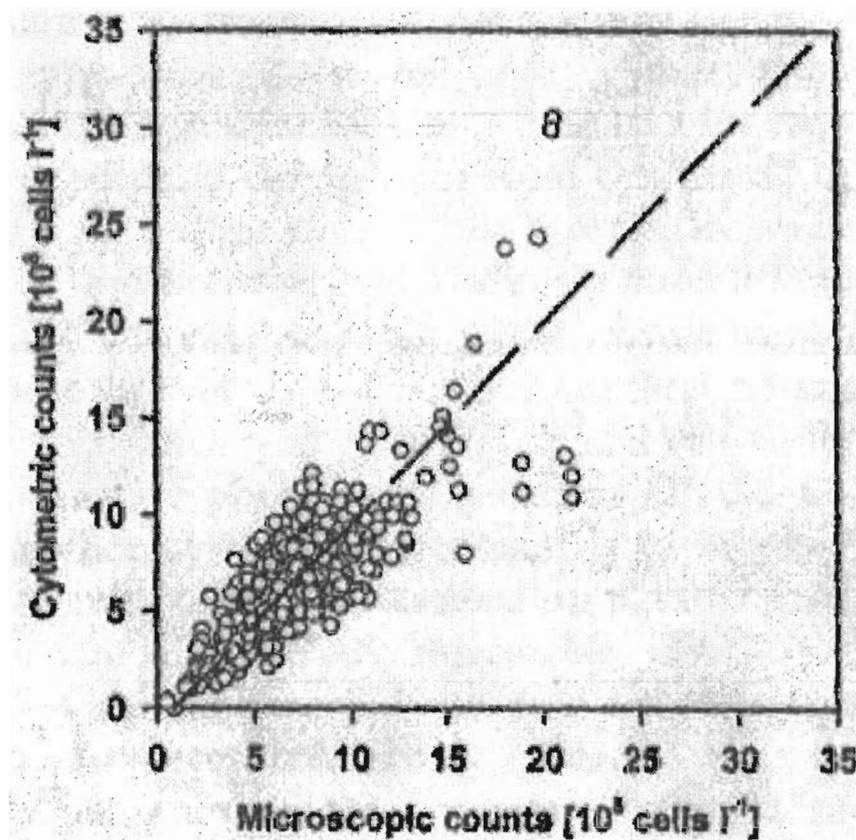


Figure 13 : Comparaison entre la microscopie à épifluorescence et la cytométrie de flux sur un comptage de bactéries hétérotrophiques provenant du Nord-Est de la Mer Arabe en janvier, mars et décembre 1995.

Effectivement, on remarque bien que les deux méthodes paraissent détecter, dans l'ensemble, les mêmes populations de cellules (figure 13) ; cependant, comme il a été noté précédemment, le comptage par cytométrie de flux fait apparaître plus de cellules dont les abondances sont plus importantes.

b) Remarques

Volume des cellules bactériennes

L'estimation du volume des cellules reste techniquement difficile par microscopie et par cytométrie. Le volume de la cellule est habituellement mesurée grâce à la microscopie à épifluorescence, en utilisant des images vidéo à partir desquelles seront faites une analyse d'images numériques (Bjornsen 1986 ; Ducklow et al. 1995 ; Carlson et al. 1996; Pomroy et Joint 1999). Cette analyse est limitée, pour des considérations pratiques, à environ 300-400 cellules par échantillon. Le plus sérieux problème avec les déterminations du volume des cellules à l'épifluorescence est le manque de standards authentiques.

Des microsphères fluorescentes sont habituellement utilisées pour calibrer les mesures algorithmiques, mais la longueur d'onde de leur émission et la fluorescence diffèrent de leur population d'origine (il y a différentes luminosités et couleurs), ceci rendant plus complexe la détection des contours par traitement d'image. C'est pourquoi, il n'est pas possible de comparer des volumes de cellules objectivement.

Décider quels objets vus et détectés sous le microscope devraient être comptés et mesurés en tant que cellules bactériennes, présente une autre difficulté car comme il a été précisé précédemment, la plupart des scientifiques expérimentés dans l'analyse d'images, se basent sur leur expérience et des critères subjectifs comme la forme, la taille et la luminosité, afin de recenser les objets non-cellulaires avant le comptage.

Cette approche est généralement fiable pour les échantillons prélevés en milieu océanique ouvert, car ils contiennent moins de particules détritiques et d'autres contaminants visibles à l'image par microscopie à épifluorescence; tandis que pour l'analyse des échantillons prélevés dans les zones situées près des côtes et des estuaires, même les personnes expérimentées dans le comptage sur ces images, rencontrent des difficultés. En effet, dans ces zones, les populations d'objets non cellulaires sont hautement diversifiées.

Avec les nouveaux colorants et la sophistication des approches numériques, la détermination du nombre de cellules et de leur taille, basée sur la microscopie, devrait rester un repère fiable pour les années à venir.

Cependant, la cytométrie de flux offre quelques espoirs d'amélioration. La théorie de Mie suggère que les caractéristiques de fractionnement de la lumière pourraient être une fonction du volume ou de la masse des cellules, ceci rendant ainsi possible de dériver la masse à partir de la détermination de l'angle moyen de réflexion de la lumière (FALS) par échantillon.

Robertson et al. (1998) ont trouvé une relation viable entre FALS et la masse sèche, aussi bien pour des cellules en culture que pour populations cellulaires naturelles. L'inconvénient actuel est que les bactéries planctoniques marines restent encore proche de la limite inférieure de résolution de la plupart des cytomètres de flux, rendant incertaine l'extrapolation de la relation entre FALS et le volume des cellules jusqu'aux caractéristiques des populations d'origine.

Une autre approche de la cytométrie est de mettre en relation la fluorescence moyenne par échantillon et le volume cellulaire, déterminé en parallèle sur l'échantillon, grâce à des traitements d'image. Avec cette approche, plus les cellules sont grandes, plus leur contenu en ADN est important. Par conséquent, elles devraient absorber plus de fluorescence et donc apparaître plus lumineuses (Sherr et al. 1999). Cependant, les calibrations sont basées sur celles de la microscopie, avec toutes les difficultés notées précédemment.

De plus, la présence de cellules inactives, ne se divisant plus, avec un faible contenu cellulaire et la présence de petites cellules actives, multipliant rapidement leur génome, entraînent aussi des erreurs d'interprétation. Néanmoins, le large taux d'échantillonnage et la collecte de données multiparamétrées capable d'être analysés par cytométrie de flux, rendent cette technique attractive.

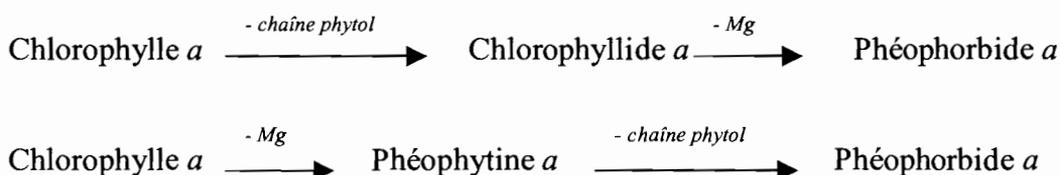
2.3.2 Chlorophylle *a*

La chlorophylle *a* est déterminée par le laboratoire de Chimie marine de l'IRD.

Au cours de mon stage, S. Chifflet m'a fait assister à chacune des étapes de l'analyse de la chlorophylle *a*, réalisées pour les travaux de S. Jacquet. La chlorophylle *a* est considérée comme un estimateur de la biomasse phytoplanctonique. Les concentrations en chlorophylle *a* et phéophytine *a* ont été déterminées par fluorimétrie selon la méthode de Yentsch et Menzel (1966), modifiées par Jeffrey et Humphrey (1975).

La chlorophylle est un pigment indispensable à la photosynthèse des algues. Le dosage de ce composé sert donc à estimer la biomasse phytoplanctonique du milieu marin. Un des principaux problèmes de cette analyse réside dans la spéciation du pigment. En effet la chlorophylle (Figure 14) est une molécule complexe qui génère de nombreux sous produits dont les spectres d'absorption sont presque tous similaires les uns aux autres.

Selon Yentsch (1965), la dégradation de la chlorophylle se schématise de la façon suivante :



Bien que certains auteurs aient reporté la présence de chlorophyllide en milieu marin (Barret et Jeffrey, 1964 ; Jeffrey, 1974), il semble que les principaux produits de dégradation soient la phéophytine et la phéophorbide. Ces composés sont regroupés sous le nom de phéopigments.

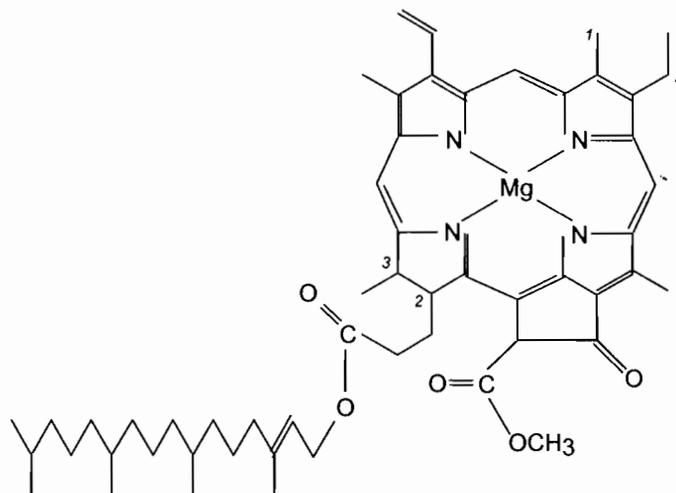


Figure 14 : Formule semi développée plane de la chlorophylle *a* (Neveux, 1973)

- Chlorophylle *b* : comme la chlorophylle *a* mais en position 1, une fonction aldéhyde (-CHO) à la place du radical méthyle (-CH₃),
- Chlorophylle *c*₁ : comme la chlorophylle *a* mais un groupe acide acrylique (-CH=CH-COOH) au lieu du propionate estérifié en position 2, disparition du radical méthyle en position 3 remplacée par une double liaison entre 2 et 3,
- Chlorophylle *c*₂ : comme la chlorophylle *c*₁ mais en position 4 un radical vinyle (-CH=CH₂) au lieu du radical éthyle (-CH₂-CH₃).

2.3.2.1 Principe

Deux méthodes sont généralement utilisées pour le dosage de la chlorophylle : la spectrophotométrie et la fluorométrie. Le principal intérêt de la méthode fluorométrique (Yentsch et *al.*, 1963 ; Holm-Hansen et *al.*, 1965 ; Lorenzen, 1966) par rapport à la spectrophotométrie est sa plus grande sensibilité. Elle permet donc de traiter des échantillons de volume plus réduit (0,1 à 1l contre 5 à 10l pour la méthode spectrophotométrique), ce qui représente un gain de temps

appréciable. De plus, la mesure se fait par lecture directe à une seule longueur d'onde. C'est donc la fluorimétrie qui est utilisée par S. Chifflet afin de doser la chlorophylle *a*.

Après filtration d'un certain volume d'eau de mer pour concentrer le phytoplancton, le filtre est immergé dans un solvant qui assure l'extraction des pigments chlorophylliens. Ils sont ensuite excités par un faisceau lumineux à 450nm et la fluorescence émise est mesurée à 670nm. Sur chaque extrait, la mesure de fluorescence est effectuée deux fois, avant et après acidification. La diminution de fluorescence observée entre ces deux lectures est en relation avec le pourcentage relatif de chlorophylle *a* par rapport à la somme chlorophylle *a* + phéophytine *a*.

2.3.2.2 Matériel employé

a) Appareillage

Au laboratoire de Chimie Marine, est utilisé un fluorimètre Turner Designs TD700 équipé d'un kit optique n°7000-961 comprenant :

- lampe de lumière bleue F4T5 dont le spectre d'émission varie de 360 à 600nm (réf : 10-045),
- filtre d'excitation $\lambda_{ex} = 340-500 \text{ nm}$ (réf : 10-050R),
- filtre d'émission $\lambda_{em} > 665 \text{ nm}$ (réf : 10-051R),

Pour avoir une lecture fiable, il est conseillé d'allumer l'appareil au moins une heure avant son utilisation. Tant que les filtres et la lampe n'ont pas été manipulés, l'étalonnage n'a pas besoin d'être refait systématiquement à chaque fois que l'appareil est éteint. Le dernier étalonnage est gardé en mémoire.

a) Réactifs chimiques

Pour ces analyses sont utilisés les réactifs suivants :

- La chlorophylle *a* commerciale (1mg),
- L'acide chlorhydrique 36% (d=1,18),
- Et le méthanol.

2.3.2.3 Méthode

a) modalités de dosage

La méthode fluorométrique utilisée dans le cadre de la thèse de S. Jacquet, a été adaptée à partir de celle proposée par Yentsch et *al.* (1963). C'est une méthode simple et rapide qui permet de déterminer sélectivement des faibles concentrations de chlorophylle *a* (Chl *a*) et phéophytine *a* (Pheo *a*).

Avec cette méthode d'analyse, les contaminations d'échantillons sont extrêmement rares. La verrerie utilisée ne nécessite pas de nettoyage particulier ; il suffit qu'elle soit soigneusement rincée trois fois avec de l'eau milliQ.

➤ L'acide chlorhydrique

Une solution d'HCl à 0,3mol/l est préparée de la façon suivante : verser lentement 2,5ml d'HCl fumant ($d=1,18$) dans 100ml d'eau milliQ.

A partir d'une solution commerciale, le calcul du volume d'acide à diluer se fait de la façon suivante :

Avec : d : la densité de l'acide concentré,

% : le degré de pureté du produit,

C_0 : la concentration de l'acide commercial (mol/l),

C' : la concentration de l'acide dilué (mol/l),

M : la masse molaire de l'acide (g/mol),

E : le volume d'acide concentré à diluer (unité de volume : l, ml ou autre),

U : le volume total d'acide dilué (même unité de volume que E : l ml ou autre).

On a :

$$C_0 = \frac{d \times \%}{M} \times 1000$$

$$C' = C_0 \times \frac{E}{U}$$

D'où E , le volume d'acide à diluer :

$$E = \frac{C'}{U} \times \frac{M}{d \times \% \times 1000}$$

Remarque: Les acides concentrés sont des produits fortement corrosifs, il est indispensable de les manipuler avec la plus grande précaution. Toute manipulation doit se faire sous une hotte ; le manipulateur doit impérativement porter blouse et lunette.

➤ Méthanol (93 et 95%)

Pour un litre de méthanol à 95%, mélanger 950ml de méthanol et 50ml d'eau milliQ. La solution est stable indéfiniment si elle est stockée dans un flacon en verre.

Pour un litre de méthanol à 93%, mélanger 930ml de méthanol et 70ml d'eau milliQ. La solution est stable indéfiniment si elle est stockée dans un flacon en verre.

Le méthanol est un produit fortement volatile avec un caractère toxique et inflammable. Il est donc recommandé de le manipuler sous une hotte.

b) Flaconnage, Echantillonnage, Conservation

Une fois prélevée à la bouteille Niskin, l'eau de mer est directement échantillonnée dans des flacons en polyéthylène (ou polycarbonate) puis stockée à l'abri de la lumière. Une pré filtration sur une soie de grosse maille n'est pas toujours souhaitable car elle peut entraîner des sous estimations de la Chl *a* et Pheo *a*. Il est ensuite recommandé de ne pas trop attendre entre le prélèvement et la filtration.

Les volumes d'eau de mer filtrés sont variables selon les échantillons ; en général entre 0,1 et 1L. Au laboratoire de Chimie Marine (IRD – Nouméa), il est filtré au maximum 500ml. La filtration est effectuée sur des filtres en fibre de verre (Whatman GF/F, diamètre 25 mm, porosité 0,7 μ) sous une dépression de 200mm Hg. La filtration terminée, le filtre prélevé à l'aide d'une pince est introduit soit dans un tube à essai pour une analyse immédiate soit dans un micro tube (1,5ml) pour être conservé à -40°C.

c) Extraction des pigments et Mesures

Les tubes à essai utilisés pour l'extraction et la lecture de la fluorescence doivent être parfaitement propres (exempt de traces de doigts, rayures ou contaminations d'échantillons précédents) et secs. Pour cela, ils sont rincés 3 fois à l'eau milliQ puis 2 fois avec du méthanol avant d'être séchés à 60°C.

Le filtre est placé au fond d'un tube à essai dans lequel on ajoute 7ml de méthanol. La rétention d'eau de mer variant en fonction de la nature des filtres utilisés, pour être à chaque fois dans les

mêmes conditions de référence, il est nécessaire d'en tenir compte lors de l'extraction avec le méthanol. Ainsi, on considère généralement que les filtres en fibres de verre (Whatman) retiennent l'équivalent d'environ 2% d'eau; dans 7 ml, on fera donc une extraction avec du méthanol à 95%. La rétention d'eau sur les filtres en polycarbonate (Nucléopore) étant négligeable, l'extraction des pigments se fera directement avec du méthanol à 93%.

Une fois les 7ml de méthanol introduits dans le tube à essai, fermer le tube avec un bouchon en silicone et agiter doucement. Bien que l'extraction soit complète en quelques minutes, il est préférable de la laisser se poursuivre au moins 15 minutes à l'obscurité et à température ambiante (ou 1 heure à 4°C). Agiter de nouveau avant d'enlever le filtre à l'aide d'une canne en verre propre. Faire une première lecture de fluorescence F_0 puis acidifier l'extrait avec 70 μ l d'HCl à 0,3mol/l (ou 10 μ l HCl par ml de solvant), boucher et agiter doucement. Faire immédiatement après la deuxième lecture de fluorescence F_a .

Les quantités extraites puis dégradées de chlorophylle *a* varient avec le temps. Il ne faut donc pas faire des séries d'extraction trop grande (10 échantillons maxi) car il est extrêmement important de respecter les mêmes temps de traitement pour chaque échantillon. Il faut notamment veiller à ce que le temps de lecture entre F_0 et F_a soit le même pour toutes les analyses. Une fois l'extraction faite il faudra donc traiter les filtres les uns après les autres

L'étalonnage est réalisé à partir de Chl *a* commerciale.

➤ Préparation de la solution mère

Mettre 1mg de Chl *a* dans une fiole jaugée de 500ml ; compléter avec du méthanol à 93%. Boucher et placer la fiole à l'obscurité. Laisser extraire jusqu'à disparition totale des paillettes de chlorophylle tout en agitant régulièrement.

La chlorophylle étant une molécule sensible à la lumière, il est fortement conseillé de protéger la fiole par une feuille de papier d'aluminium. La solution se dégrade très vite ; elle ne peut pas être conservée plus d'une journée à 4°C.

La concentration exacte de cette solution est déterminée par spectrophotométrie. La mesure de densité optique se fait à 663nm dans une cuve en verre de trajet optique 1cm. La correction de DO à 750nm correspond à la mesure de turbidité.

$$[\text{Chla}] \text{ (g/l)} = \frac{\text{DO}_{663} - \text{DO}_{750}}{K}$$

Selon la littérature, la valeur du coefficient spécifique d'absorption dans le méthanol (K) varie entre 75 et 78 $\text{lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$, la valeur choisie est la suivante :

Marher (1972) : $K = 76 \text{lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ valeur utilisée au laboratoire de Chimie Marine (IRD – Nouméa).

En l'absence de phéophytines, le rapport R doit être proche de 1,7.

$$R = \frac{DO_{663}^{na}}{DO_{663}^a}$$

DO_{663}^{na} : densité optique à 665nm de l'étalon non acidifié
 DO_{663}^a : densité optique à 663nm de l'étalon acidifié

➤ Préparation des standards

Au laboratoire de Chimie Marine (IRD – Nouméa), les scientifiques travaillent avec une gamme de concentration de Chl *a* variant de 0 – 20 $\mu\text{g/l}$ pour des échantillons prélevés du lagon néo-calédonien. Toutes les dilutions se font avec du méthanol à 93%.

NOUVELLE CALEDONIE				
[Chl <i>a</i>] _{finale} ($\mu\text{g/l}$)	5	10	15	20
*				
V _{SM} (μl)	250	500	750	1 000
V _{fiolle} (ml)	100	100	100	100

* La préparation des standards dépend bien sûr de la concentration de la solution mère (SM).

La lecture de la fluorescence est effectuée avant et après acidification en suivant le protocole décrit précédemment. Trois mesures de "Blanc" sont également effectuées de la même façon sur du méthanol à 93% soit F_0^{Blanc} et F_a^{Blanc} les fluorescences respectives du méthanol avant et après acidification.

d) Limites méthodologiques

Etant donné les interférences dues aux chlorophylles *b* et *c*, la précision des échantillons dépend de la nature même des communautés planctoniques. Pour la chlorophylle *a*, Yentsch et Menzel (1963) considèrent généralement que la méthode est précise à $\pm 15\%$. Cette précision ne tient pas compte de la présence éventuelle de la chlorophyllide *a* qui est dosée avec la chlorophylle *a*.

La limite de détection dépend naturellement de l'appareillage utilisé. Avec le TD700, elle est de 10 ng/L.

e) Limites d'interprétation

La chlorophylle *a* est considérée comme un estimateur de la biomasse phytoplanctonique. Toutefois les relations entre la concentration en chlorophylle et le carbone phytoplanctonique n'est probablement pas constante. Cette relation est très probablement variable selon l'espèce (et donc selon les classes de tailles) et selon l'état physiologique des espèces présentes. La concentration en chlorophylle *a* est donc un bon indicateur de la biomasse chlorophyllienne plutôt qu'une valeur de référence.

III RESULTATS

Les résultats sont accompagnés de quelques unes de mes interprétations personnelles qui sont basées sur le travail qui a été essentiellement mené durant mon stage. Il est important de souligner que l'interprétation approfondie des résultats appartient à S. Jacquet. Ceci implique un travail important qu'elle effectue durant ses trois années de thèse. C'est seulement à la suite d'un suivi long et rigoureux, que pourront être avancées des interprétations valables.

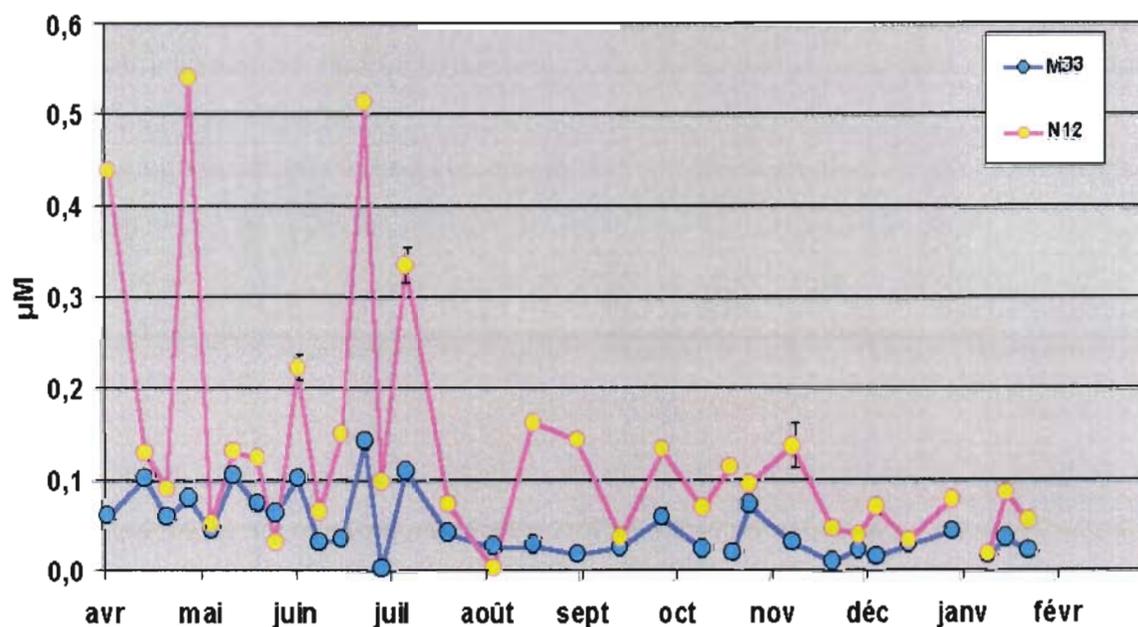
3.1 Suivi saisonnier

Le suivi saisonnier se déroule sur deux stations dont il est nécessaire de rappeler leurs caractéristiques afin de mieux interpréter les résultats :

- N12 est située dans la baie de Sainte Marie, sous influence anthropique recevant les eaux usées non traitées du quartier de Sainte Marie,
- M33 est située au large de l'îlot Maître, dans le chenal lagunaire, hors des influences anthropiques et terrigènes (station, *a priori*, plus oligotrophe que N12).

a) Ammonium

Les substances azotées telles que l'ammonium, les nitrites, les nitrates, sont d'origine naturelle mais également humaine, liées aux rejets industriels et urbains ou aux apports agricoles.



Graphique 1 : Représentation des mesures d'ammonium, faites dans les baies Sud-Ouest de Nouméa, durant l'année 2002-2003

D'après le graphique 1, on remarque que les concentrations de NH_4^+ sont plus élevées pour la station N12 que pour la station M33 durant toute la période d'échantillonnage.

Notons, que pour la station N12, il existe une saisonnalité bien marquée durant l'année:

- durant l'hiver, d'avril à juillet, les concentrations en ammonium sont élevées, pouvant atteindre 0.541 μM durant le mois de mai,
- durant l'été, d'août à février, les concentrations sont beaucoup plus faibles, tendant à rejoindre les valeurs de la station M33.

Ammonium		
	M33	N12
Moyenne (μM)	0.049	0.144
Ecart type (μM)	0.003	0.005
Coef. variations	0.061	0.035
Nb de mesures	32	32

Tableau 4 : Moyennes, écarts-type, et coefficients de variations des concentrations en ammonium des stations M33 et N12, sur une période s'étalant du 18/04/02 au 28/01/03, (avec Nb : nombre)

A l'opposé de la station N12, dont le coefficient de variation est de 0.035 (tableau 4), les valeurs de concentration en ammonium de la station M33 sont plus stables avec un coefficient de variation de 0.061. Les valeurs de concentration de la station M33 sont, en général, inférieures ou égales à 0.1 μM pendant la période d'échantillonnage (graphique 1) et les écarts-type sont faibles (tableau 4) confirmant que les variations d'ammonium sont peu élevées. Ce milieu est donc très peu contaminé par les composés organiques de l'azote et ceci durant toute l'année.

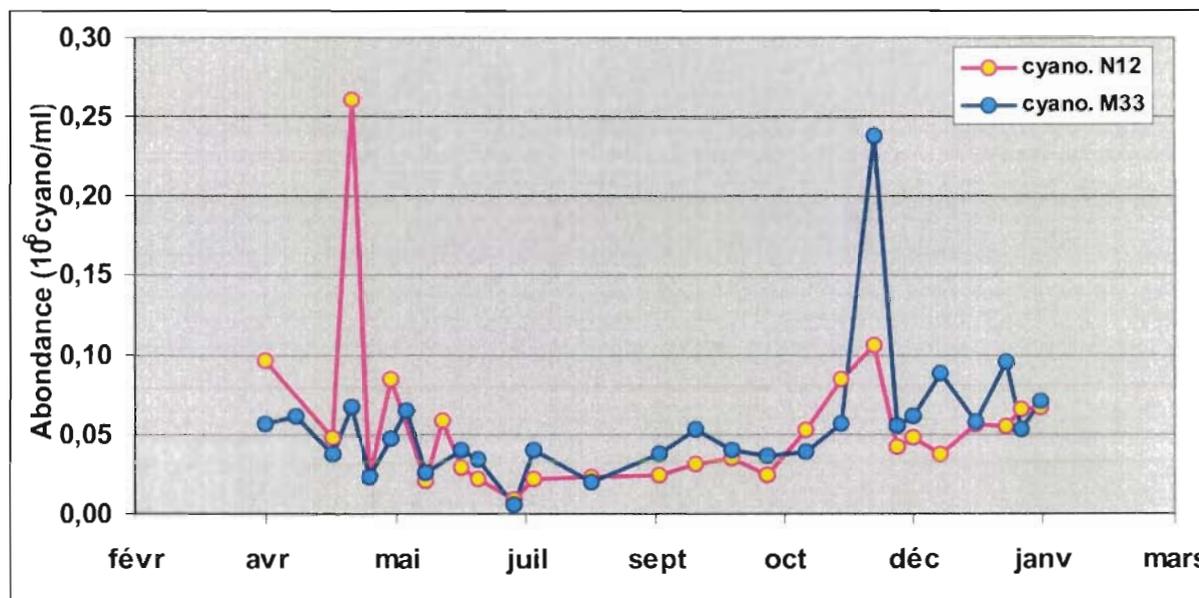
La station N12, située dans la baie de Sainte Marie, reçoit toutes les eaux usées du quartier, véhiculant des composés organiques de l'azote qui, en présence d'oxygène, se transforment et se minéralisent donnant des nitrites et des nitrates. Les composés de l'azote augmentent la productivité végétale et contribuent à l'eutrophisation du milieu.

L'augmentation des concentrations en ammonium durant l'hiver pourrait s'expliquer par le fait que les activités humaines et les déchets sont, en général, plus importants durant cette période; de ce fait l'eutrophisation est favorisée, expliquant les grands pics d'avril à août.

N12 se trouve donc dans un milieu plus eutrophe que M33, dû essentiellement, aux influences anthropiques.

Cependant, la concentration maximale de $0.541\mu\text{M}$ durant le mois de mai (graphique 1), n'est pas une concentration très élevée, donc le milieu, même en hiver, subit une pollution moyenne.

b) Abondance et Biomasse



Graphique 2 : Comparaisons des abondances des cyanobactéries des stations du suivi saisonnier sur une période s'étalant du mois d'avril 2002 au mois de janvier 2003

Durant l'année 2002-2003, on constate que les valeurs des abondances des cyanobactéries (graphique 2) calculées pour les deux stations du suivi saisonnier sont généralement inférieures ou égales à $0.1 \cdot 10^6$ cyanobactérie/ml. Les écarts-type sont faibles (tableau 5) indiquant une faible variabilité des abondances des cyanobactéries ; de plus, les coefficients de variations confirment que les valeurs d'abondance restent relativement stables, tout au long de l'année donc quelques soient les conditions climatiques.

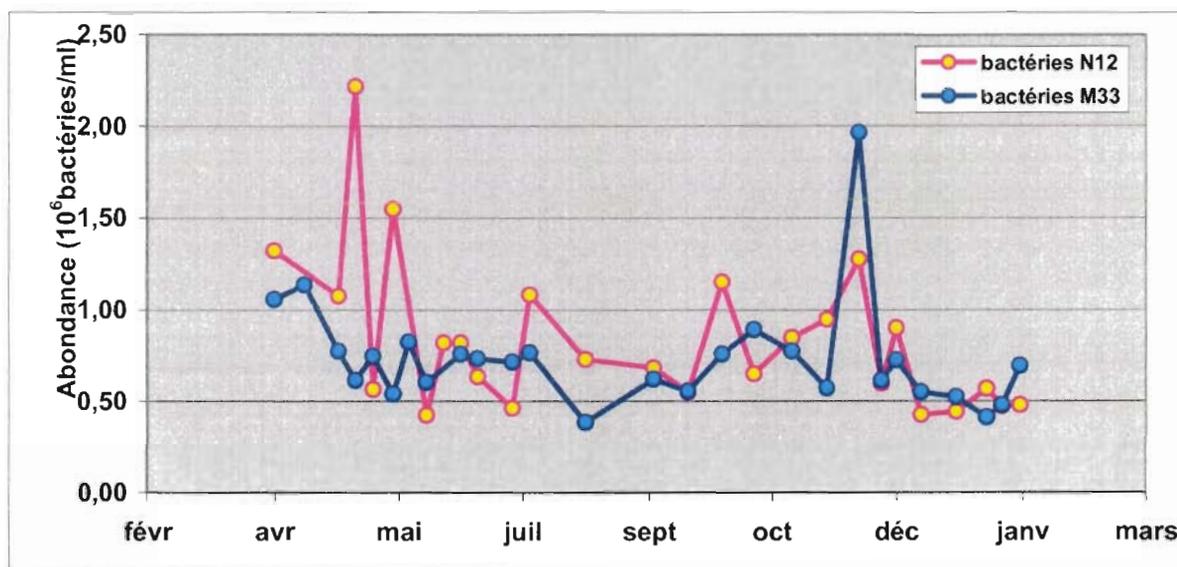
	Bactéries		Cyanobactéries	
	M33	N12	M33	N12
Moyenne ($10^6/\text{ml}$)	0.7353	0.8037	0.0560	0.0534
Ecart type	0.0329	0.0367	0.0046	0.0025
Coef. variation	0.0447	0.0442	0.0821	0.0468
Nb de mesures	27	26	27	26

Tableau 5 : Moyenne des abondances des stations M33 et N12, sur une période s'étalant du 04/04/02 au 28/01/03

En effet, les valeurs d'abondance obtenues (graphique 2), aussi bien pour N12 que pour M33, se recourent très souvent. Cependant, on remarque deux pics importants :

- le premier en avril, pour la station N12,
- le second en novembre, pour la station M33.

Cependant, ces pics restent ponctuels, n'apparaissant qu'à des périodes différentes, et la période d'échantillonnage est encore trop courte. C'est pour toutes ces remarques qu'il m'est impossible d'affirmer que l'abondance des cyanobactéries est indépendante des variations climatiques et/ou des caractéristiques du milieu.



Graphique 3 : Comparaisons des abondances bactériennes des stations du suivi saisonnier sur une période s'étalant du mois d'avril 2002 au mois de janvier 2003

D'après le graphique 3, on constate que la majorité des valeurs d'abondance bactérienne, pour les deux stations, sont comprises entre $0,5 \cdot 10^6$ et $1,3 \cdot 10^6$ bactéries/ml. Pour chacune des stations, on ne peut pas considérer que les variations d'abondance bactérienne soient importantes. Le graphique 3 ne nous permet pas non plus d'observer des différences de valeurs d'abondance flagrantes entre les deux stations du suivi saisonnier, durant la période d'études.

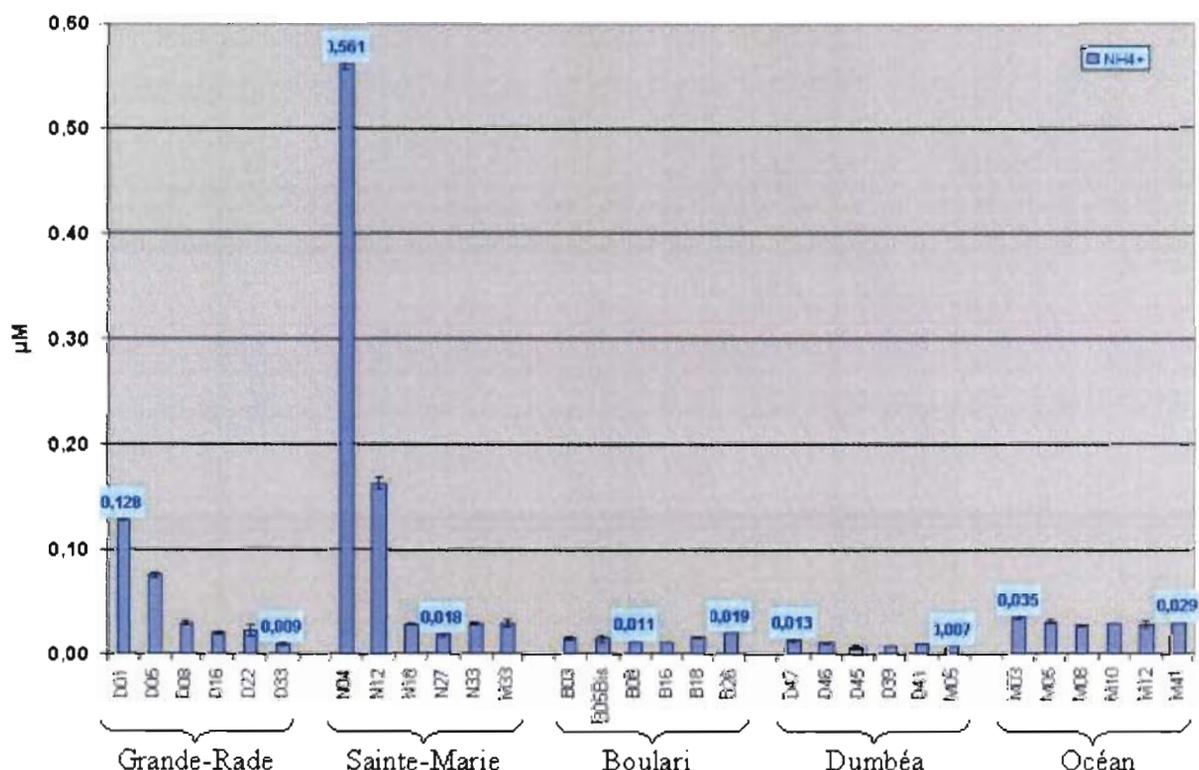
Les moyennes et les écarts-type ont été calculés à partir des résultats obtenus sur une période étalée du 04/04/02 au 28/01/03. On constate que les écarts-type (tableau 5) sont très faibles; on peut donc en déduire que les variations de l'abondance bactérienne sont peu élevées, au cours de l'année 2002. Le tableau 5 ne met donc pas en évidence une relation existant entre l'abondance bactérienne, le milieu et les saisons; il permet de confirmer ce qui a été noté précédemment sur les graphiques 2

et 3. Cependant, le graphique 3 indique un maximum observé en avril-mai pour la station N12 uniquement et un second maximum en octobre-décembre pour la station M33. Ainsi, il n'est pas certain que l'abondance bactérienne et par conséquent, la biomasse, ne varient pas en fonction du type de milieu et/ou des conditions climatiques.

3.2 Radiales

a) Ammonium

D'après le graphique 4, on constate que les trois dernières radiales ont des valeurs de concentrations en ammonium qui varient peu, par contre les variations concernant les deux premières radiales (Grande Rade et Sainte Marie) sont beaucoup plus importantes. La radiale Grande Rade (D01 à D33) est caractérisée par la présence de l'usine pyrométallurgique gérée par la « Société Le Nickel » en fond de baie (figure 4). Ainsi la station la plus proche de l'usine est D01 et la station la plus éloignée est D33 ; ce gradient de concentration d'ammonium décroissant peut être expliqué par l'éloignement des stations par rapport à l'usine pyrométallurgique qui pourrait dégager des résidus ammoniacaux ou des résidus favorisant la production de NH_4^+ .



Graphique 4 : Concentrations de NH_4^+ des radiales d'août 2002

La radiale Sainte-Marie (N04 à M33) se situe dans une zone sous influence anthropique recevant les eaux usées non traitées du quartier de Sainte Marie. On note que la station la plus proche du rivage, N04, est la plus touchée, avec un pic très important de 0.561 μM en NH_4^+ .

Les eaux usées véhiculent des composés organiques de l'azote qui, en présence d'oxygène, se transforment et se minéralisent donnant des nitrites, des nitrates et de l'ammonium. Les composés de l'azote augmentent la productivité végétale et contribuent à l'eutrophisation du milieu. De nouveau, on remarque une diminution de la concentration en ammonium lorsque l'on s'éloigne du fond de la baie vers le large. De même que l'eutrophisation diminue plus on s'éloigne des influences anthropiques et de la sortie des eaux usées.

Les apports terrigènes caractérisant les radiales de Boulari (B03 à B26) et Dumbéa (D47 à M05) ne semblent pas affecter la concentration en NH_4^+ car les variations sont minimales et les valeurs des concentrations sont faibles. Ces milieux sont très peu pollués par les composés organiques de l'azote.

Contrairement à ce que l'on pourrait attendre, la radiale Océan (M03 à M41) qui est, *a priori*, le milieu le plus oligotrophe, possède des valeurs de concentration de NH_4^+ légèrement plus élevées que les radiales de Boulari et Dumbéa situées dans des milieux plus exposés à diverses pollutions.

b) Abondance et biomasse

Radiales	Océan	Sainte Marie	Boulari	Dumbéa	Grande Rade
Moyenne ($10^6/\text{ml}$)	0.515	0.658	0.600	0.557	0.551
Ecart type	0.023	0.026	0.028	0.025	0.025

Tableau 6 : Moyenne par radiale des abondances bactériennes, sur une période s'étalant du 18/04/02 au 14/01/03

Radiales	Océan	Sainte Marie	Boulari	Dumbéa	Grande Rade
Moyenne ($10^6/\text{ml}$)	0.035	0.067	0.043	0.045	0.044
Ecart type	0.002	0.003	0.003	0.002	0.002

Tableau 7 : Moyenne par radiale des abondances des cyanobactéries, sur une période s'étalant du 18/04/02 au 14/01/03

Les moyennes des abondances, pour chacune des radiales, ont été calculées sur les trois campagnes menées durant l'année 2002-2003 (tableau 5).

Il est important de remarquer que dans la baie de Sainte Marie, les abondances des bactéries et cyanobactéries sont les plus élevées (respectivement $0.658 \cdot 10^6$ bactéries/ml et $0.067 \cdot 10^6$ cyanobactéries/ml).

A contrario, la radiale Océan possède les abondances des bactéries et des cyanobactéries les plus faibles (respectivement $0.515 \cdot 10^6$ bactéries/ml et $0.035 \cdot 10^6$ cyanobactéries/ml).

Ceci peut encore s'expliquer par le fait que la baie de Sainte Marie se trouve sous influence anthropique alors que la radiale Océan se situe plus loin des influences anthropiques et terrigènes.

Ainsi la radiale Océan semble être, dans le cadre de l'étude, la zone la plus oligotrophe, c'est-à-dire la plus pauvre en substances nutritives ; ces dernières limiteraient la croissance bactérienne.

A l'opposé, la radiale Sainte Marie apparaît comme étant dans la zone la plus eutrophe, c'est-à-dire la plus riche en substances nutritives et où les bactéries auraient la possibilité (moins limitées par la quantité de matière organique) de croître plus.

Cependant, les valeurs des abondances bactériennes entre les radiales Sainte Marie et Océan, ne sont pas si éloignées l'une de l'autre (respectivement $0.658 \cdot 10^6$ bact./ml et $0.515 \cdot 10^6$ bact./ml).

On peut donc en déduire que les bactéries restent peu influencées par les caractéristiques environnementales du milieu et ceci tout au long de l'année car les écarts type restent faibles.

Il est important de noter que les valeurs calculées des abondances des cyanobactéries sont plus variables, passant du simple au double de la radiale Océan à celle de Sainte Marie (respectivement $0.035 \cdot 10^6$ cyanos/ml et $0.067 \cdot 10^6$ cyanos/ml).

L'abondance des cyanobactéries serait donc plus influencée que les bactéries par les caractéristiques environnementales du milieu. Toutefois, durant l'année, les écarts type restant faibles, on peut conclure que l'abondance des cyanobactéries varie peu. Ainsi, elles ne sont pas influencées par les conditions climatiques et pas ou peu par celles imposées par le milieu.

III CONCLUSION

Ces trois mois et demi de stage passés dans le vaste domaine de l'Ecologie Marine, m'ont permis de découvrir le monde de la Recherche et de comprendre comment elle s'insère dans un contexte national voire international. C'est au sein de l'UR CAMELIA que j'ai pu découvrir une multitude de travaux et d'études menés afin de mieux comprendre l'impact de l'activité humaine sur les environnements côtiers.

S. Jacquet m'a encadrée, insérée dans ses travaux de terrain, et formée aux différentes techniques et méthodes. L'ensemble de mes objectifs étant réalisé, je me suis enrichie aussi bien sur le plan personnel que sur le plan professionnel.

En effet, travailler parmi les divers stagiaires et chercheurs de l'UR, m'a fait réaliser que la Recherche est un métier qui demande beaucoup de qualités, notamment celle d'être passionné afin de s'investir sans réserve.

Le domaine dans lequel j'ai travaillé, m'a fortement intéressée et je me suis totalement épanouie durant ce premier stage. Cependant, beaucoup d'autres domaines m'attirent; c'est pourquoi, je souhaite continuer ma période de stages en Géologie. Ce second stage me permettra de passer d'un travail scientifique précis en Biologie à un travail plus technique en Géologie, couvrant ainsi les deux principaux volets de mes trois premières années d'études universitaires.

IV DEFINITIONS DES TERMES UTILISES

Anthropie : Plusieurs approches qui concernent l'étude sont possibles :

- En écologie, se dit de phénomènes qui sont provoqués ou entretenus par l'action consciente ou inconsciente de l'homme.
- En métallurgie, se dit de ressources de récupération extraites des déchets des industries.

Bio-accumulation : Résulte de la capacité d'un organismes à aborder certains contaminant présents dans son milieu ambiant et stocker dans ses tissus une partie de la fraction absorbée ; En terme de bilan, il y a bio-accumulation quand l'efficacité et/ou la cinétique de l'ensemble des processus d'absorption sont supérieures à celles de l'ensemble des processus d'élimination.

La bio-accumulation dépend de plusieurs facteurs :

- De l'espèce animale ou végétale considérée,
- De facteurs biologiques (stade de développement, âge et taille/biomasse, condition corporelle, potentiel trophique, etc.),
- De la **bio-disponibilité** (cf. définition) du contaminant vis-à-vis de cette espèce,
- De la concentration du contaminant dans le milieu,
- Du temps de contact de cette espèce avec le contaminant.

Bio-disponibilité : Capacité d'un contaminant à être transféré d'un biotope vers la biocénose qui lui est associée. Elle dépend de plusieurs facteurs :

- De l'espèce animale ou végétale considérée,
- De la forme chimique du contaminant considéré et des caractéristiques physiques du vecteur de contamination auquel il peut être associé (particules en suspension, sédiment, granulométrie, teneur en eau du sédiment, vitesse de sédimentation),
- Des variations physico-chimiques du milieu (température, salinité, pH, carbone organique total, sulfures volatils (AVS), etc.), qui influent sur les formes physico-chimiques du contaminant et de son vecteur (réactions de complexation, d'absorption, de précipitation, etc.).

Contamination : Augmentation des concentrations d'une substance ou d'un ensemble de substances introduite(s) dans un milieu par l'activité humaine, sans que des effets néfastes résultant de cette augmentation n'aient été observés. Dans le cas de substances naturellement présentes dans le milieu (par exemple, les métaux), on définit cet accroissement par rapport aux teneurs supposées

être exclusivement naturelles, qui constituent le bruit de fond de cette substance dans le milieu considéré. La substance introduite est alors appelée contaminant.

Eutrophie : Enrichissement de lacs, de réservoirs, de cours d'eau et de rivages marins en sels minéraux qui entraîne une prolifération de plantes aquatiques. En 1919, le limnologue suédois Einar Naumann décrivit les lacs oligotrophes comme étant généralement profonds, ayant des eaux transparentes et ne pouvant entretenir qu'une vie animale ou végétale pauvre. Les lacs eutrophes ont une faible profondeur. Ils entretiennent également une vie végétale microscopique abondante. Très solubles, les nitrates sont aisément lessivés par les eaux d'infiltration, s'ils ne sont pas absorbés par les plantes. En revanche, les phosphates sont peu solubles. La petite quantité qui s'échappe avec les eaux d'infiltration se trouve généralement sous forme de particules. On sait aujourd'hui que les changements récents sont causés par l'augmentation des sels minéraux provenant des sols, à la suite des activités humaines telles que le déboisement, le labour et la fertilisation des terres cultivées. Ce type d'eutrophisation d'origine humaine porte le nom d'eutrophisation anthropique.

Oligotrophie : Caractérise les lacs profonds pauvres en substances nutritives (oligotrophes) et produisant peu de substances organiques. Dans ces milieux, la croissance est surtout limitée par une faible disponibilité en phosphore. Des manques occasionnels d'azote sont compensés par les algues « bleues » capables de fixer le N. La petite quantité de phosphore, souvent fixée organiquement, provient d'apports. Le taux de croissance reste faible.

Nitrate : Les nitrates sont un sel de l'acide nitrique (nitrate d'argent). Les nitrates jouent un rôle important comme engrais, car ils constituent le principal aliment azoté des plantes, dont ils favorisent la croissance. Ils agissent en fournissant de l'azote à la végétation et sont employés sous forme de sel de sodium, de potassium, de calcium et d'ammonium.

Nutriments : Terme en général désignant toute substance alimentaire que l'organisme peut absorber entièrement. Tout élément ou composé organique ou inorganique, contenu dans les aliments et qui peut être utilisé par l'organisme sans subir de transformation digestive pour être assimilé par les cellules. Principe nutritif assimilable directement ou substance dont l'assimilation peut-être réalisée sans transformation digestive.

Pollution marine : Il s'agit soit d'une :

- Introduction par l'Homme directement ou non, de substances ou d'énergie dont résultent des effets néfastes tels des torts aux ressources vivantes, des risques pour la santé humaine, des gênes aux activités marines, des altérations de la qualité des eaux.
- Modification défavorable du milieu naturel qui apparaît en totalité ou en partie comme sous produit de l'activité humaine, à travers d'effets directs ou indirects altérant les modalités de répartition des flux d'énergie, du niveau de radiation, de la constitution physico-chimique du milieu naturel et de l'abondance des espèces vivantes. Ces modifications peuvent affecter l'Homme directement ou au travers des ressources en produits agricoles, en eau et en autres produits biologiques. Elles peuvent aussi l'affecter en altérant les objets physiques qu'il détient, les possibilités récréatives du milieu ou encore en enlaidissant la nature.

La substance introduite est alors appelée polluant.

Terrigène : S'applique un à matériel (galet, graviers, sables, vases, argiles) arraché aux terres émergées et transporté vers le milieu marin sous l'action de facteurs mécaniques naturels (vent, pluies, glace).

V BIBLIOGRAPHIE

- Bjornsen, PK (1986) Automatic determination of bacterioplankton biomass by image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 : 1199-1204.
- Bratback G, and Dundas I (1984) Bacterial dry matter content and biomass estimations. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 : 755-757.
- Campbell L, Nolla HA, and Vaultot D (1994) The importance of *Prochlorococcus* to community structure in the central North Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 39 : 954-961.
- Carlson C, Ducklow HW and Sleeter TD (1996) Stocks and dynamics of bacterioplankton in northwestern Sargasso Sea. *Deep-Sea Res. II* 43 :491-516.
- Carlson CA, Bates NR, Ducklow HW and Hansell DA (1999) Estimation of bacterial respiration and growth efficiency in the Ross Sea, Antarctica. *Aquat. Microb. Ecol.* 19 : 229-244.
- Caron DA, Peele ER, Lim EL, Dennett MR (1999) Picoplankton and nanoplankton and their trophic coupling in surface waters of the Sargasso Sea South of Bermuda. *Limnol. Oceanogr.* 44 : 259-272.
- Christian JR, and Karl DM (1994) Microbial community structure at the US-JGOFS Station ALOHA : Inverse methods for estimating biochemical indicator ratios. *J. Geophys. Res.* 99 : 14269-14276.
- Ducklow HW, Quinby HL and Carlson CA (1995) Bacterioplankton dynamics in the equatorial Pacific during the 1992 Nino. *Deep-Sea Res. II* 42 : 621-63.
- Ducklow HW, Carlson CA and Smith WO (1999) Bacterial growth in experimental plankton assemblages and seawater cultures from the *Phaeocystis antarctica* bloom in the Ross Sea, Antarctica. *Aquat. Microb. Ecol.* 19 :215-227.
- Fukuda R, Ogawa H, Nagata T and Koike I (1998) Direct determination of carbon and nitrogen contents of natural bacterial assemblages in marine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 3352-3358.
- Jacquet S, (2001) Importance comparée des biomasses et production bactérienne et primaire planctoniques et leurs relations avec les variables physico-chimiques dans le lagon Sud-Ouest de Nouvelle-Calédonie .
Rapport de DEA de l'Université Pierre et Marie Curie – Paris VI. 33pp + annexes.

- Jacquet S, (2002) Influence des apports en nutriments sur le fonctionnement du réseau trophique microbien dans le lagon Sud-Ouest de Nouvelle-Calédonie. *Sujet de thèse en Sciences de l'environnement, Université Pierre et Marie Curie – Paris VI, 5pp.*
- Jeffrey SW, Humphrey GF (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in algae, phytoplankton and higher plants. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 167 :191-194.
- Kirchman DL (2000) Microbial ecology of the oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* 4 :89-99.
- Laboute P et Grandperrin R (2000) Poissons de Nouvelle-Calédonie, IRD-Nouméa. *Catherine Ledru*
- Lee S and Furrman JA (1987) Relationship between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 : 1298-1303.
- Legendre L, Rassoulzadegan F (1995) Plankton and nutrient dynamics in marine Waters. *Ophelia.* 41 :153-172.
- Lorenzen CJ (1996) A method for the continuous measurement of *in vivo* chlorophyll concentration. *Deep-Sea Res.* 13 :223-227.
- Pôle d'Aspach (SADEF). (Page consultée le 5 mars 2003). Experts en agronomie et en environnement, [En ligne]. Adresse URL : <http://www.sadef.fr>
- Pomroy A and Joint I (1999) Bacterioplankton activity in the surface waters of the Arabian Sea during and after the 1994 SW monsoon. *Deep-Sea Res. II* 46 : 767-794.
- Porter KG and Feig YS (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25 : 943-948.
- Robertson BR, Button DK and Koch AL (1998) Determination of the biomass of small bacteria at low concentrations in a mixture of species with forward light scatter measurements by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 3900-3909.
- Sheer BF, del Giorgio P, and Sherr EB (1999) Estimating abundance and single-cell characteristics of actively respiring bacteria via the redox dye CTC. *Aquat. Microb. Ecol.* 18 : 117-131.
- Station Biologique de Roscoff. (Page consultée le 5 mars 2003). Site de la station Biologique de Roscoff, [En ligne]. Adresse URL : <http://www.sb-roscoff.fr>
- Université Pierre et Marie Curie. (Page consultée le 5 mars 2003). Site Biologie et Multimédia, [En ligne]. Adresse URL : <http://www.snv.jussieu.fr>
- Yentsch CS, Menzel DN (1963) A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and pheophytin by fluorescence. *Deep-Sea Res.* 10 : 221-231.



Résumé

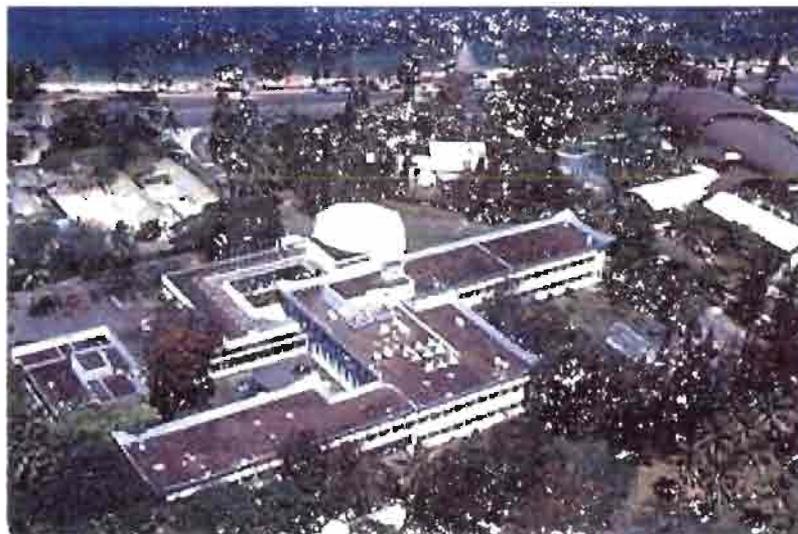
Au sein de l'IRD de Nouméa, l'UR CAMELIA a pour objectif de fournir des outils d'aide à la décision pour les aménageurs devant gérer le développement économique de la zone côtière. L'un des thèmes est de connaître la réponse des communautés planctoniques aux apports anthropiques et terrigènes.

C'est dans ce cadre que s'inscrivent les travaux de thèse de S. Jacquet qui tente d'établir les relations *in situ* entre les nutriments, l'abondance, les activités et la composition des communautés, au moyen de prélèvements périodiques. Ces derniers sont effectués grâce à la mise en place d'un suivi saisonnier sur deux stations (M33 et N12) échantillonnées de façon hebdomadaire ou bimensuelle et sur cinq radiales comprenant chacune six stations échantillonnées trois fois par an. Mes travaux de stage participent à ceux de la thèse de S. Jacquet ; j'ai ainsi pu découvrir le monde de la Recherche et approfondir mes connaissances dans le domaine de l'écologie planctonique.

C'est dans ce cadre que m'ont été enseignées les techniques et méthodes telles que la microscopie à épifluorescence et la cytométrie de flux. De plus, j'ai pu appréhender le travail de terrain ainsi que participer aux travaux en laboratoire.

Les interprétations des résultats obtenus durant mon stage ne tendent pas à établir de réelles relations existant entre les caractéristiques du milieu, les conditions climatiques et l'abondance des communautés (de bactéries et de cyanobactéries). Cependant, de véritables interprétations pourront être faites par S. Jacquet seulement à la suite de ses trois années de travaux longs et rigoureux.

Responsable de stage : Jean-Pascal TORRETON, Directeur de recherche
Stage effectué dans le cadre de la thèse de Séverine JACQUET



Institut de Recherche pour le Développement - Nouméa