

Document «PROTOCOLES »

Protocole simplifié métazoaires

Ce document vous explique de manière simplifiée comment était organisé le protocole de collecte des métazoaires lors des expéditions Tara Oceans entre 2009 et 2013. Ces prélèvements faisaient parti d'un ensemble plus vaste de collectes, pour échantillonner des virus aux métazoaires, et faisant donc appel à des techniques variées. L'exemple de l'échantillonnage des métazoaires a été choisi car il est le plus proche de ce que peuvent réaliser des élèves avec les moyens d'une classe.

PRESENTATION DES OBJECTIFS

L'objectif est de caractériser un environnement marin, tant sur le plan biologique que physico-chimique. Ainsi, on collecte du plancton de toutes les tailles pour en extraire la diversité morphologique sous microscope et la diversité génétique avec des outils moléculaires, tout en réalisant des mesures physiques et chimiques afin de caractériser au mieux le site de prélèvement. Ce protocole a été mis en place pour répondre à certaines questions que se posent les scientifiques :

- Comprendre la distribution spatiale et temporelle de la biodiversité planctonique et les causes de sa variabilité (relation entre biodiversité et habitat sachant que l'habitat change).
- Comprendre et découvrir quelles sont les molécules produites par les organismes planctoniques (photosynthèse, respiration mais aussi d'autres molécules qui pourraient s'avérer intéressantes pour l'homme).
- Comprendre et mettre en évidence les liens (symbiose, parasitisme, alimentaire ...) des organismes entre eux.

La biodiversité est estimée par comptage taxonomique et outils moléculaires (génétique). Ainsi, les récoltes sont établies pour pouvoir faire ce travail dans les meilleures conditions au laboratoire.

Le zooplancton est collecté pour plusieurs raisons et types d'études :

- Inventaire des espèces présentes dans un lieu donné
- Détermination des quantités et des proportions de chaque espèce
- Recherche d'espèces inconnues
- Génétique

PROTOCOLE SIMPLIFIÉ

A - Préparation de la station

- Préparer les flacons et coller les étiquettes de code-barres sur les flacons
- Préparer la fiche de station
- Vérifier l'état de tous les collecteurs
- Accrocher les collecteurs sur les filets
- Accrocher les enregistreurs de profondeur et les débitmètres sur les bons filets

Instructions générales pour le déroulement de la station / mode opératoire

- Réplication des prélèvements pour estimer les variations possibles dans les manipulations : cela signifie que l'échantillon collecté est divisé généralement en 2 parts égales qui pourront servir à faire 2 analyses identiques par la suite.
- Déployer les filets à la vitesse de 0,5 m/s.
- Porter des gants tout au long des manipulations pour éviter toute source de contamination par des cellules humaines. Utiliser des instruments et des consommables propres.
- Le filet doit être rincé avec de l'eau de mer filtrée à 0,2 µm pour ne pas contaminer l'échantillon de l'extérieur vers l'intérieur, de façon à faire descendre les organismes dans le collecteur.
- Concentrer l'échantillon dans le collecteur.

B - Déroulé de la station

Les filets et autres instruments sont déployés les uns après les autres dans un minimum de temps pour éviter d'abîmer et/ou de stresser les organismes. La rosette* est déployée en premier pour établir la DCM** et avoir une idée de la façon dont se présente la colonne d'eau d'un point de vue physico-chimique. Les filets sont ensuite déployés.

*Rosette : barillet portant plusieurs bouteilles de prélèvement que l'on fait descendre dans l'eau pour échantillonner les différentes masses d'eau présentes.

**Deep Chlorophyll Maximum (DCM) : profondeur à laquelle l'activité chlorophyllienne est la plus forte

1/ Filet bongo

Taille des mailles 300 microns

Profondeur entre -500 m et la surface remontée oblique

Echantillons récoltés

- 1 flacon contenant du formol pour l'étude morphologique
Stockage : température ambiante

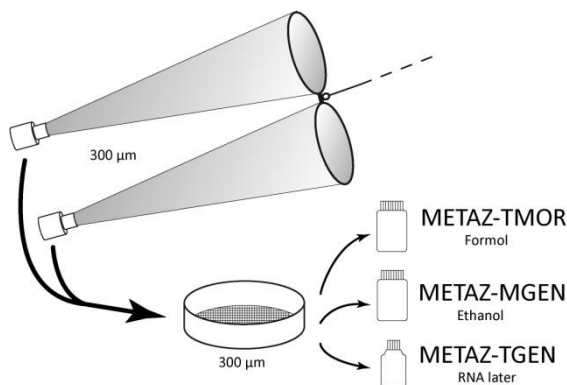
- 1 flacon dans l'éthanol pour l'étude morphologique
Stockage : congélateur -20°C

- 1 flacon dans le RNA later pour l'étude génétique
Stockage : congélateur -20°C

(d) Fraction > 300 µm / 0 to -500 m / Oblique

Day & Night

© 2012 — N. Le Bescot / EPPO / SB Roscoff / CNRS



2/ WPII

Taille des mailles 50 microns

Profondeur entre -100 m et la surface remontée verticale à la vitesse de 0.8 m/s pour une filtration optimale

Echantillons récoltés

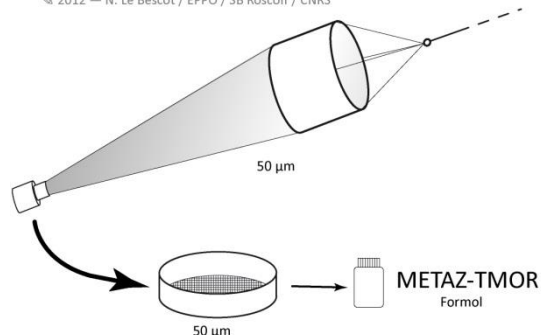
- 1 flacon contenant du formol pour l'étude morphologique

Type de stockage : température ambiante

a Fraction 50 µm / 0 to -100 m / Vertical

Day

© 2012 — N. Le Bescot / EPPO / SB Roscoff / CNRS



3/ WPII

Taille des mailles 200 microns

Profondeur entre -100 m et la surface remontée verticale à la vitesse de 0.8 m/s

Echantillons récoltés

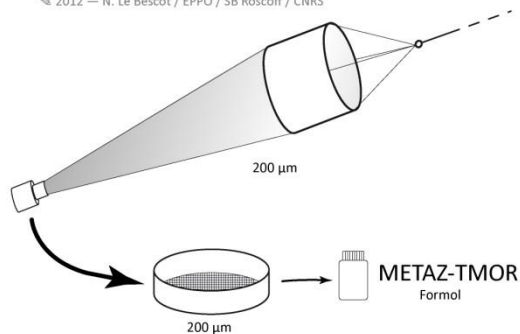
- 1 flacon contenant du formol pour l'étude morphologique

Type de stockage : température ambiante

c Fraction 200 µm / 0 to -100 m / Vertical

Day & Night

© 2012 — N. Le Bescot / EPPO / SB Roscoff / CNRS



4/ Filet régent

Taille des mailles 680 microns

Profondeur entre -500 m et la surface remontée oblique

Echantillons récoltés

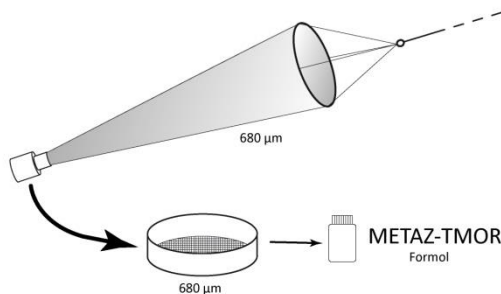
1 flacon contenant du formol pour l'étude morphologique

Type de stockage : température ambiante

f Fraction > 680 µm / 0 to -500 m / Oblique

Day & Night

© 2012 — N. Le Bescot / EPPO / SB Roscoff / CNRS



5/ Double filet

Taille des mailles 180 microns

Profondeur 1 : surface

Echantillons récoltés

- 1 flacon dans le formol pour l'étude morphologique

Type de stockage : température ambiante

Taille des mailles 180 microns

Profondeur 2 : DCM

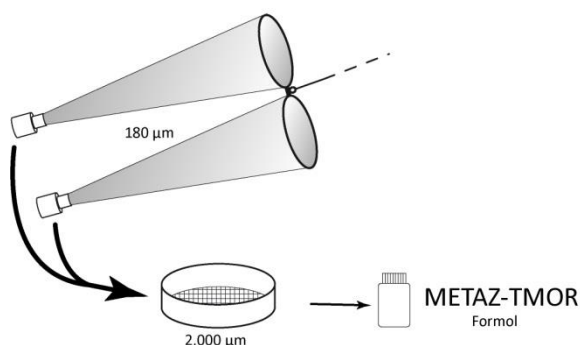
Echantillons récoltés

1 flacon contenant du formol pour l'étude morphologique

Type de stockage : température ambiante

(a) Fraction 180 to 2,000 μm — Surface & DCM

© 2012 — N. Le Bescot / EPPO / SB Roscoff / CNRS



6/ Deuxième double-filet

Taille des mailles 20 microns

Profondeur 1 : surface

Echantillons récoltés

1 flacon dans le formol pour l'étude morphologique

Type de stockage : température ambiante

Profondeur 2 : DCM

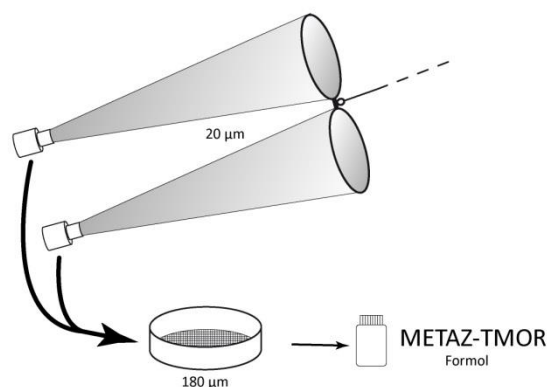
Echantillons récoltés

1 flacon contenant du formol pour l'étude morphologique

Type de stockage : température ambiante

(b) Fraction 20 to 180 μm — Surface & DCM

© 2012 — N. Le Bescot / EPPO / SB Roscoff / CNRS



Notons que ces deux dernières manipulations servent aussi à récolter d'autres organismes de tailles variés qui sont étudiés de différentes manières.

7/ Multinet

Note : le multinet est un appareil qui tracte 5 filets de même taille à une profondeur précise, ce qui permet d'obtenir 5 échantillons différents qui seront traités différemment dans les laboratoires.

- Taille des mailles : 500 microns
- Profondeur : entre 1000 m et la surface remontée en oblique
- Echantillons récoltés : 5 flacons contenant du formol pour l'étude morphologique
- Type de stockage : température ambiante

C - Fin de station

- Remplir les fiches de log
 - latitude, longitude, heures de début et de fin (UTC), profondeur maximum réelle

- Incidents de manipulations
 - Rincer les filets et les collecteurs avec de l'eau douce (pour éviter la corrosion du matériel par le sel).
 - Repérer s'il y a des trous, les réparer avec un patch et de la glue.
 - Réparer les collecteurs, si nécessaire.
 - Vérifier que les informations sur les échantillons sont notées en plus du code barre.
 - Vérifier que les enregistrements du capteur de profondeur sont bien téléchargés dans l'ordinateur.
 - Vérifier les chiffres du débitmètre avant et après le déploiement des filets.
 - Vérifier que les bouteilles avec les échantillons sont bien enregistrées.
 - Ne pas laisser les tamis s'assécher à l'air (pour éviter les contaminations par les embruns).

Les échantillons sont stockés sur le bateau avant d'être acheminés vers les différents laboratoires responsables de leur traitement. L'ensemble des analyses est regroupé dans une énorme base de données communes, accessible par tous les scientifiques.

Ces récoltes et analyses ont permis aux scientifiques de publier des articles dans les meilleures revues scientifiques mondiales : Science, Nature,... et de faire ainsi évoluer les connaissances sur le plancton de façon considérable.

Proposition de protocole de collecte simplifiée

Pour les classes

Objet

L'objectif est de décrire un environnement aquatique tant sur le plan biologique que physico-chimique. Il s'agit d'une part de collecter du plancton de toutes les tailles et toute nature pour en extraire la diversité morphologique sous microscope, et d'autre part de réaliser des mesures physiques et chimiques pour décrire au mieux le site de prélèvement.

Avertissement

Ce document vous propose une trame pour réaliser l'étude d'un milieu aquatique. Il convient à l'enseignant de l'adapter aux conditions particulières de travail (matériel, niveau des élèves...).

Problématiques

- Comment caractériser un milieu à partir d'éléments biologiques, physiques et chimiques ?
- Comprendre les variabilités biologiques (distribution spatiale et temporelle) au regard des conditions environnementales (habitat) ?

La biodiversité est estimée par comptage taxonomique, l'habitat est caractérisé par un certain nombre de mesures physico-chimique.

Prérequis

Pour comprendre le protocole, il faut que les termes suivants soient connus : écosystème, habitat, population, espèces, plancton, procaryote, eucaryote, protozoaires, métazoaires, cellules, gammes de taille du plancton. Connaître le principe de la classification binomiale est un plus.

A - Préparation de la collecte

Cette phase est très importante, elle conditionne en partie le matériel nécessaire et la manière dont le prélèvement va être effectué.

- Avant toute chose, il s'agit d'identifier la question à laquelle on souhaite répondre :
 - Veut-on comparer la diversité de différents sites ? Il faut alors prévoir lesquels, leur accès ...
 - Veut-on avoir sur un même site plusieurs profondeurs ? Dans ce cas, il faut prévoir des mesures en profondeur qui réclament des moyens adaptés.
 - Cherche-t-on à suivre dans le temps l'évolution biologique d'un site donné ?
 - Ensuite il faut préparer le matériel de collecte (voir ci-dessous).
 - Marquer à l'avance les flacons.
 - Prévoir éventuellement les tableaux qui permettront de noter les résultats au retour de la collecte.
 - Préparer une fiche de collecte qui donnera les événements particuliers du jour et du site de la collecte (météo, événement particulier sur le site pouvant influencer la collecte, etc) et qui permettra de noter les caractéristiques physico-chimiques du milieu.

B - Caractérisation du milieu

Chaque site de prélèvement (et chacune des profondeurs éventuellement), seront caractérisés.

Matériels et réactifs

- Thermomètre
- Papier pH
- Salinographe (se trouve par mesure de conductivité)

Voir ci-dessous comment a procédé une classe

Le projet <http://grainesdexplorateurs.ens-lyon.fr/archives-1/2012-2013/projets/tara-2013/pouldreuzic-2013>

La présentation lors du congrès <http://html5.ens-lyon.fr/Acces/GrainesExplorateurs/2013/20130530/Pouldreuzic/video.html#diap001>

- Autres outils de caractérisation chimique (nitrate par exemple)

Mode opératoire

Réaliser les différentes mesures suivantes en vue de caractériser l'environnement physico-chimique dans lequel évoluent les organismes qui seront récoltés, et noter scrupuleusement les informations sur la fiche prévue.

1. Température
2. pH
3. Salinité
4. Autres ...

C - Collecte du plancton

Tous les prélèvements seront doublés, dans le but d'estimer les possibles variations liés à la manipulation.

Les prélèvements pourront éventuellement être réalisés à plusieurs profondeurs, dans le but de voir comment celle-ci peut influencer sur la diversité des organismes.

Précaution opératoire

Porter des gants tout au long des manipulations pour éviter toute source de contamination par des cellules humaines. Utiliser des instruments et consommables propres.

Matériels et réactifs

- Tamis de 0.7 μm pour les bactéries et les algues unicellulaires, les protistes.
- Tamis de 200 μm pour les protistes et certains eucaryotes.
- Tamis de 1000 μm pour les eucaryotes, essentiellement du zooplancton.

Ce type de matériel peut s'acheter facilement ou se fabriquer en utilisant des toiles de filtration que l'on trouve facilement.

- Filet à planctons 50 et 200 μm

Schéma du type de filet, voir ces deux propositions simples et efficaces

<http://www.diatomloir.eu/Siteplancton/Filet.html>

<http://micromonde.free.fr/bricolage/filet/filet.htm>

- Bidon de 10 L

- Alcool à 90°

- Pissette

- ...

Mode opératoire

- o. Préparation préalable des flacons de collectes. Ils doivent être marqués pour être facilement identifiés au retour. Un système de notation est donc à mettre en place en amont de la collecte.
1. Collecte des bactéries, phytoplanctons et petits eucaryotes

- Prélever 10 L d'eau à la surface du site de prélèvement. Filtrer rapidement à travers un tamis d'une porosité de 20 μm . La fraction liquide contient alors les organismes les plus petits.
 - Il faut ensuite concentrer les organismes pour faciliter l'observation au microscope. Par exemple, en filtrant sur un tamis encore plus fin (0,7 μm) et en récoltant et re-diluant légèrement avec le filtrat (et rapidement) les organismes retenus par le tamis.
 - Pour conserver les organismes, ajouter de l'alcool à 90°.
2. Collecte des eucaryotes (> 50 μm)
- Prendre un filet à 50 μm et le faire trainer à la surface pendant 5 mn.
 - Nettoyer le filet de l'extérieur vers l'intérieur, avec une pissette pour bien tout récolter
 - Passer rapidement la récolte sur un tamis de 200 μm et collecter dans un flacon (contenant de l'alcool à 90°).
3. Collecte des eucaryotes métazoaires (> 200 μm)
- Prendre un filet à 200 μm et le faire trainer à la surface pendant 15 mn (c'est long !).
 - Nettoyer le filet de l'extérieur vers l'intérieur avec une pissette pour bien tout récolter.
 - Passer rapidement la récolte sur un tamis de 1000 μm et collecter dans un flacon (contenant de l'alcool à 90°).