

3. Partie scientifique

3.1 Préparation scientifique du stage

J'ai été amené à me renseigner sur l'adhésion de la moule et de la patelle, deux mollusques pouvant se fixer sur des substrats en milieux aqueux.

Adhésion de la moule

La moule juvénile, sous forme larvaire, est mobile au début et se laisse porter par les courants marins. Une fois qu'elle a atteint un certain âge (entre 3 semaines et 6 mois), elle s'accroche de manière définitive à un substrat solide tel qu'un rocher ou la coque d'un bateau.

Sa fixation se fait via un mucus avec de nombreuses protéines, pour la plupart adhésives qui agissent comme une colle. La plupart des colles que les humains ont créées sont solubles dans l'eau et donc inefficaces en milieu aqueux. Par contre celle des moules est très résistante à l'eau, grâce à une partie de la protéine adhésive, qui contient l'acide aminé Lysine. Elle permet de « nettoyer » la zone d'adhésion sur le substrat qui est encombrée à cause d'ions hydratés et qui donc empêchent les parties adhésives d'accéder au substrat. Une fois débarrassé de cette couche, le substrat est libre et la partie adhésive de la protéine peut faire des ponts hydrogène avec la surface et donc s'y coller.

Certaines parties de la protéine adhésive se font oxyder sous l'action de l'oxygène présent dans l'eau (dû aux remous), ce qui les rend inefficaces. La moule produit alors une autre protéine, qui va réduire la première et lui rendre ainsi sa capacité d'adhésion maximale.

Adhésion de la patelle

La patelle est un mollusque comme la moule. Mais contrairement à cette dernière, sa fixation est davantage basée sur un effet de succion via son pied (qui crée une dépression entre son pied et le substrat, ce qui la fixe) que sur le principe d'une colle adhésive. De plus, elle est capable de se déplacer grâce à son pied. Les protéines adhésives de la patelle n'ont pas encore été beaucoup étudiées. Leur fonctionnement et leur composition étant presque inconnus pour le moment, je n'ai pas pu trouver plus d'informations à ce sujet.

3.2 Description des activités réalisées

Avant d'expliquer ce que j'ai fait pendant ma semaine de stage, il est important d'expliquer la disposition des mésocosmes puisque nous avons fait différentes expériences dans chacun d'eux. Il y a 6 aquariums divisés en 2 groupes, le groupe A et le groupe B. Les aquariums de chaque groupe sont reliés entre eux via un système de pompes et partagent donc la même eau, mais pas exactement les mêmes organismes (ils ne passent pas par les pompes). L'annexe 1 est un schéma de la disposition des aquariums. Les boutures de coraux étaient suspendues par des fils de nylon et étaient donc près de la surface.

J'ai fait 3 expériences principales en parallèle sur mes 5 jours de stage :

1 : Monitoring

Le monitoring servait à voir si les boutures de corail dans le A0 se remettaient de leur stress. En effet, la semaine du 16 juillet, près de 80 boutures dans le A0 sont mortes en l'espace d'une nuit. On ne connaît toujours pas la cause de cette perte massive. On voulait donc peser les boutures qui avaient survécu et vérifier si elles avaient un taux de croissance correct. En effet, si les coraux sont en stress, ils ont un taux de croissance plus faible que la normale.

On a pesé 15 boutures de coraux du A0 (5 de *Seriatopora hystrix*, l'espèce la plus présente dans les aquariums, 5 de *Pocillopora damicornis* et 5 de *Stylophora pistillata*) durant 3 jours pour avoir un suivi de croissance de ces boutures. Afin d'éviter de stresser les coraux, on prenait leur poids immergé en les suspendant dans l'eau via un crochet relié à une balance de précision. On devait aussi mesurer la salinité et la température de l'eau car ce sont des paramètres qui peuvent changer la valeur du poids immergé et qui variaient en fonction du temps. Un calcul nous permettait d'obtenir des valeurs comparables entre elles.

Voici nos résultats : *S. hystrix* a un taux de croissance d'un peu plus de 1% de son poids immergé par jour, ce qui correspond aux résultats des monitorings précédents. *S. pistillata* est à un peu moins de 1%, ce qui est concordant aussi. *P. damicornis* est aussi aux alentours de 1% mais elle a été peu monitorée précédemment. On ne peut donc pas tirer de conclusion hâtive même si les résultats obtenus correspondent à ceux d'avant. On peut quand même avancer que les 15 boutures monitorées ne sont plus en état de stress.

En plus du monitoring de boutures, on a fait des prélèvements d'eau dans le A0 afin de faire des tests d'alcalinité. Ce test permet de mesurer le taux de carbonate, une molécule importante pour que les coraux puissent fabriquer leur squelette calcaire. La concentration est calculée via un pH-mètre qui fait un titrage acide-base. Le but était de vérifier si les concentrations étaient normales et donc vérifier si ce n'était pas une explication à la mort des 80 organismes. Les résultats étaient normaux et cette hypothèse a donc été rejetée.

2 : Imaging PAM

L'Imaging PAM (Pulse-Amplitude-Modulation) se base sur le fait que les coraux sont en symbiose avec des microalgues, les zooxanthelles, et peuvent faire de la photosynthèse. Si on envoie un flash lumineux (dans les longueurs d'ondes qui sont utiles pour la photosynthèse) sur le corail, la chlorophylle des zooxanthelles s'active. Mais si le flash est très bref et intense, on la sature. L'énergie emmagasinée, au lieu d'être convertie en énergie photochimique et faire de la

photosynthèse, va alors être entièrement convertie en fluorescence. Il faut ajouter que le corail, comme la plupart des organismes, émet de la fluorescence même s'il est dans le noir.

La machine PAM analyse la fluorescence du corail dans le noir et celle émise suite au flash. Via un calcul, on peut alors avoir le « rendement photosynthétique » du corail. (Plus de détails en annexe 2). Ce rendement représente en quelque sorte la quantité de chlorophylle disponible pour faire de la photosynthèse et donc la santé du corail. En effet, un corail est en bonne santé s'il a notamment une bonne quantité de zooxanthelles qui peuvent lui fournir de l'énergie via la photosynthèse. S'il renvoie beaucoup de fluorescence, cela veut donc dire qu'il a beaucoup de zooxanthelles et donc qu'il est en bonne santé.

Nous avons fait cette manipulation avec 5 boutures de *S. hystrix* et 4 de *S. pistillata*. Nous avons eu des rendements autour de 0.5 (le rendement est compris entre 0 et 1). Ce chiffre ne nous permet pas de tirer des conclusions. Pour avoir une meilleure idée de la santé des coraux, il faudrait faire plus d'Imaging PAM sur une plus longue durée, combinée à un suivi de leur poids immergé. Le but de ces tests était surtout l'apprentissage de la méthode et de mieux comprendre les nombreux paramètres de la machine et l'analyse de ses résultats. Dans un premier temps, ces tests ne serviront donc pas vraiment à vérifier la santé des coraux.

Des photos prises en Imaging PAM sont jointes en annexe 3.

3 : Respirométrie

La respirométrie fut l'expérience la plus importante, au niveau du temps mais aussi du point de vue du lien avec la thèse du doctorant (l'absorption du nitrate et du phosphate par les coraux). Elle permet d'analyser la quantité de nutriments que prennent et rejettent les coraux sur un certain laps de temps.

Voici comment nous avons procédé : nous avons branché 4 bocaux (les respiromètres) de 1,3L avec des agitateurs magnétiques au B0. Dans les 3 premiers, nous y avons mis une bouture de corail (des *S. hystrix* provenant de B0) et rien dans le quatrième. Via un système de valves et de pompes, l'eau des bocaux est renouvelée pendant une heure. L'eau est donc la même que dans le B0. Puis pendant une heure, le système est fermé et l'eau du bocal reste telle quelle. Ces deux heures font un cycle et il y a 12 cycles par jour puisque le système fonctionne en continu. Le principe est que lors d'un cycle, on prélève 3 fois de l'eau des 4 bocaux et de B0 : avant la fermeture, juste après la fermeture et juste avant l'ouverture du système. On répète l'opération pendant 2 jours, avec 3 cycles par jour. Au premier cycle, nous n'avons rien changé au système. Au deuxième nous avons injecté dans les 4 bocaux, juste après la fermeture du système, une solution de 50mL à $25 \cdot 10^{-6}$ mol/L de nitrate et phosphate (les deux à même concentration et dans une seule solution), ce qui une fois dilué, donne à peu près 10^{-6} mol/L dans le bocal. Nous avons fait la même chose pour le troisième cycle mais avec une solution de $50 \cdot 10^{-6}$ mol/L, ce qui fait $2 \cdot 10^{-6}$ mol/L après dilution.

Nous avons ensuite analysé les échantillons pour obtenir la concentration en nitrate et phosphate. Les graphes des résultats sont joints en annexe 4.

En plus des prélèvements, on observait en direct la concentration en oxygène dans les respiromètres via des oxymètres. Nous observions que lorsque le circuit était fermé, le taux d'oxygène diminuait (le corail respirait) et lors de l'ouverture, il remontait et se stabilisait au même niveau que celui du B0. Nous observions aussi que le taux était nettement plus faible la nuit que le jour. C'est dû à la photosynthèse des zooxanthelles durant le jour, qui produisait de l'oxygène.

Nous avons également fait de l'Imaging PAM avec les 3 boutures de l'expérience et avec une bouture de la même espèce, restée dans le B0 tout au long de l'expérience. Nous les avons flashés avant de les placer dans les respiromètres, juste après les avoir sortis (donc 2 jours plus tard) et le lendemain afin de voir l'évolution de son rendement photosynthétique.

Quand on observe le graphique du phosphate, nous pouvons observer que la concentration reste assez constante dans le B0, ce qui est logique vu que nous n'y avons rien ajouté. Par contre, les courbes pour les 4 respiromètres ne sont pas celles escomptées. En effet, étant donné que les coraux consomment du phosphate et du nitrate, nous devrions observer une diminution de la concentration dans les respiromètres 1, 2 et 3 mais pas dans le 4 vu l'absence de corail. Or ici, on observe que les courbes fluctuent très peu et qu'il n'y a aucune différence notable entre celle du R4 et les autres. Les écarts observés ne paraissent pas logiques. Ils sont très probablement dus à la précision de l'instrument de mesure ou à des erreurs de manipulation (nous travaillons à l'échelle de la micromole par litre ; il suffit donc que la solution ne soit pas tout à fait homogène pour avoir une différence dans les résultats). Les résultats obtenus ne permettent donc pas de conclure quoi que ce soit.

Les problèmes sont les mêmes avec le nitrate.

Quand on observe le graphique de l'évolution du rendement photosynthétique (en annexe 4), on note une légère hausse de ce dernier, une fois les boutures sorties du respiromètre. Cela peut paraître logique car le nitrate et le phosphate agissent un peu comme des engrais. C'est pourquoi le rendement croît légèrement. Par contre, un jour plus tard, le rendement revient à peu près à sa valeur initiale. En effet, les coraux ne reçoivent plus « d'engrais », c'est pourquoi tout revient à la normale.

Lors d'une réunion organisée après l'expérience, nous avons appris l'existence d'un mémoire datant d'il y a 10 ans, qui a étudié en détail l'absorption du phosphate par les coraux. Le mémorant était arrivé à la conclusion que le corail absorbait près d'une micromole par jour (ce qui fait 0.04 micromole par heure). C'est nettement moins que ce à quoi nous nous attendions. Cela explique pourquoi on ne voit aucune évolution pertinente dans les graphes. En effet, les coraux absorbaient trop peu de nutriment par rapport à l'échelle où nous travaillions.

Lors de cette même réunion, nous avons donc émis des idées afin d'arriver à des résultats plus analysables pour la prochaine fois, telles qu'augmenter la durée des cycles ou diminuer la taille du récipient par rapport à la bouture de corail. Cela mérite encore réflexion.

3.3 Point de vue personnel sur les activités réalisées

Ce stage m'a beaucoup plu car j'étais utile et impliqué dans la thèse du doctorant. Par contre, je ne me rendais pas compte de la quantité de stress que peut générer la gestion d'autant d'expériences. En effet, on est tenu par le temps, on fait plusieurs expériences en parallèle et il faut donc courir dans tous les sens.

J'ai trouvé toutes les manipulations très intéressantes même si je suis un peu déçu que nous n'ayons pas obtenu de résultats analysables sur la respirométrie alors que nous y avons consacré beaucoup de temps. Mais apparemment, ce n'est pas rare lorsqu'on fait de la recherche.

J'ai aussi été étonné par le temps que prend l'analyse des résultats. L'encodage proprement dit des données était extrêmement long et il fallait ensuite encore coder les graphiques de données (ce que je n'ai pas fait moi-même mais c'est l'étape la plus longue du processus) puis essayer de les interpréter.

J'ai aussi constaté que certaines tâches étaient plus ardues, comme nommer les 180 échantillons de respirométrie. Mais cela ne représente pas beaucoup de temps par rapport aux autres tâches plus intéressantes.

3.4 Sources d'information

https://www.sciencesetavenir.fr/animaux/animaux-marins/un-adhesif-ultra-puissant-inspire-par-les-moules_103069 (pour la préparation sur les moules)

<http://science.sciencemag.org/content/349/6248/628> (idem)

<https://www.futura-sciences.com/planete/actualites/zoologie-supercolle-moules-livre-secrets-32557/> (idem)

<http://citruscollege.edu/stem/summerresearch/Documents/Posters/2013/Limpet.pdf> (pour la préparation sur les patelles)

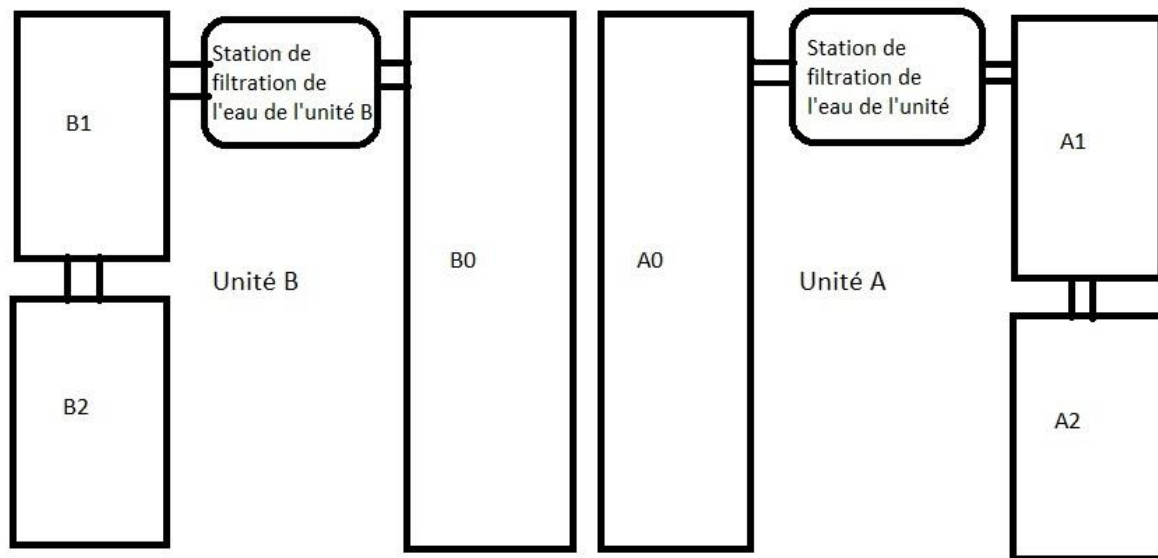
<https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.2307/1543164?journalCode=bbl> (idem)

<http://www.walz.com/index.html> (pour des infos supplémentaires sur l'Imaging PAM)

https://sharepoint1.umons.ac.be/FR/universite/facultes/fs/services/institut_bio/ecologie_numerique_milieux_aquatiques/Pages/Mesocosmesartificiels.aspx (pour l'image d'un mésocosme (en annxe))

Annexes de la partie 3.2

Annexe 1 : Schéma de la disposition des aquariums

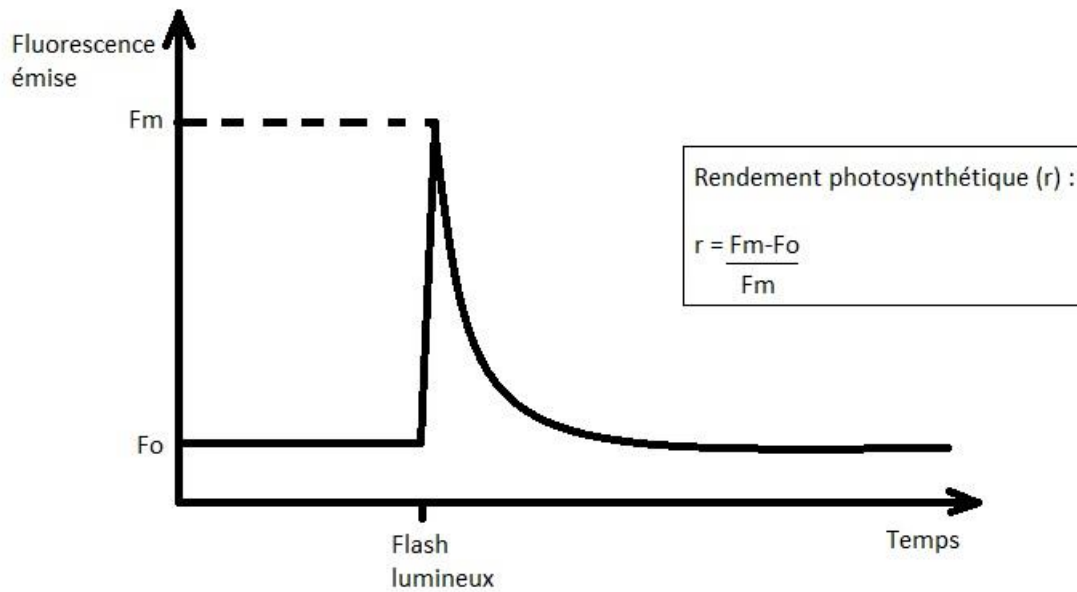


Rem : il n'y a aucun échange d'eau entre l'unité A et B. L'eau n'a donc pas exactement les mêmes caractéristiques dans les 2 unités, mais la différence est minime.



Photo d'un des aquariums. Au premier plan, on voit le A0, et accolé derrière, le B0. En bas à droite on distingue la station de filtration de l'unité A. Au fond à gauche, on voit le B2.

Annexe 2 : Explication du rendement photosynthétique



Graphique montrant l'évolution de la fluorescence émise par le corail suite à un flash lumineux, en fonction du temps. Rem. : pour avoir des données correctes, il faut que la bouture ait été maintenue dans le noir pendant quelque temps pour qu'elle ne renvoie que sa fluorescence minimale (Fo). Il est toutefois possible de le faire si elles sont à la lumière mais c'est nettement plus complexe et laborieux (il faudrait faire en sorte que le corail ait toujours la même exposition à la lumière, même dans la machine). C'est plus simple dans le noir car il ne faut changer aucun paramètre.

Annexe 3 : Photos de l'Imaging PAM

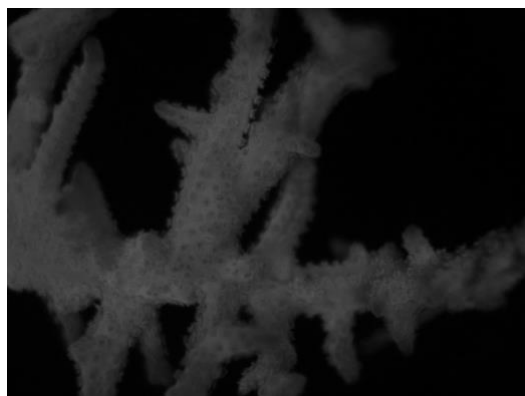
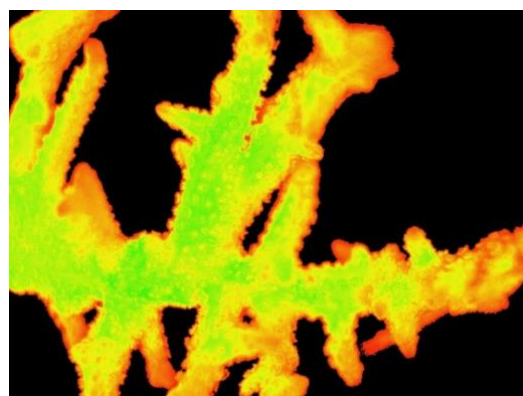


Image en Imaging PAM d'un corail longtemps sans lumière (une nuit), avant le flash lumineux.



Même image mais colorisée avec une échelle relative de fluorescence émise (rouge = peu intense, vert = intermédiaire et bleu = très intense).

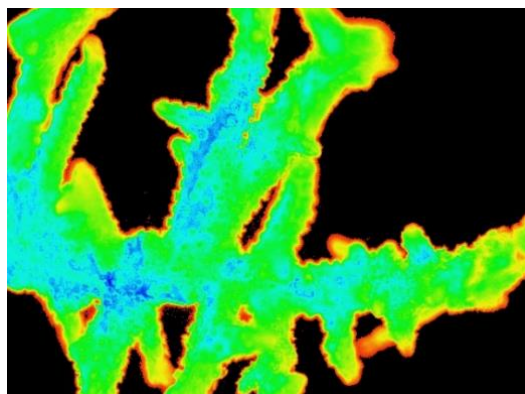


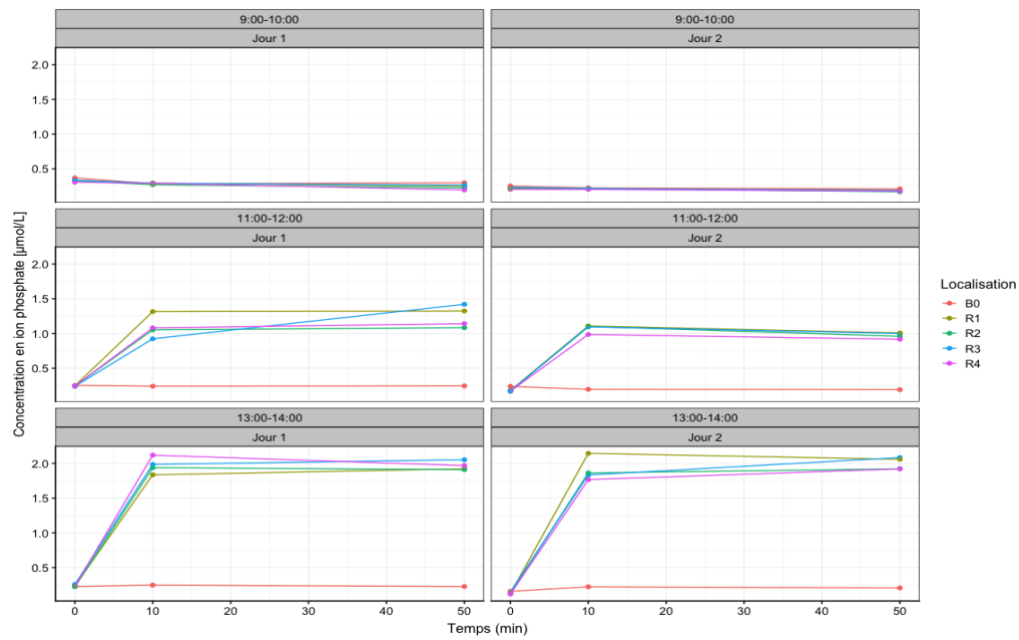
Image du corail juste après avoir été flashé, colorisé selon la même échelle relative.



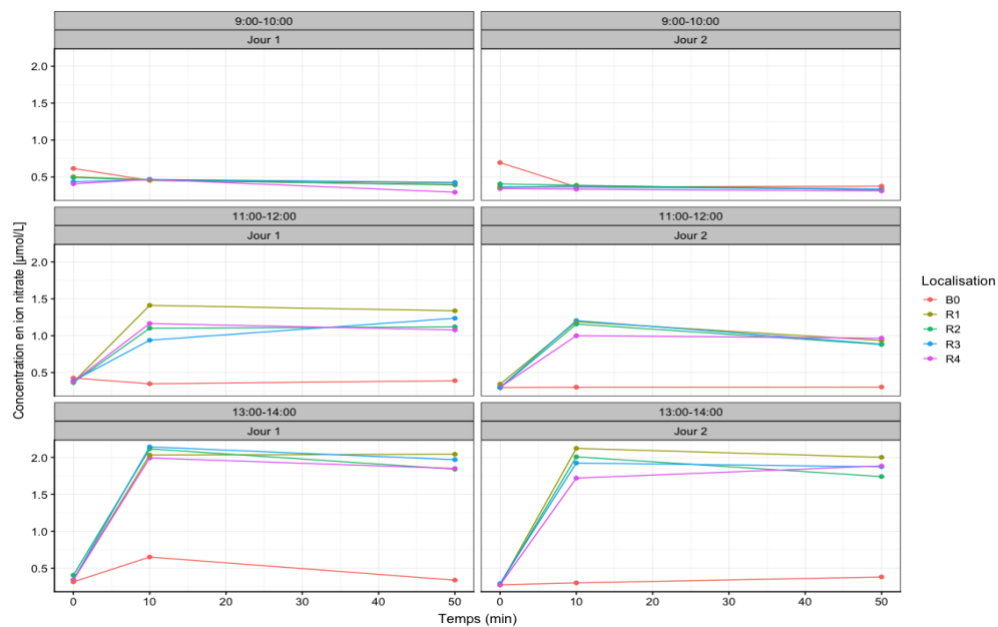
Image du corail où on choisit des zones d'intérêt (les cercles) pour le calcul du rendement photosynthétique. Seules ces zones seront prises en compte par le logiciel pour la mesure de la fluorescence.

Rem. : on prend les zones nettes car elles ont eu la même exposition de lumière.

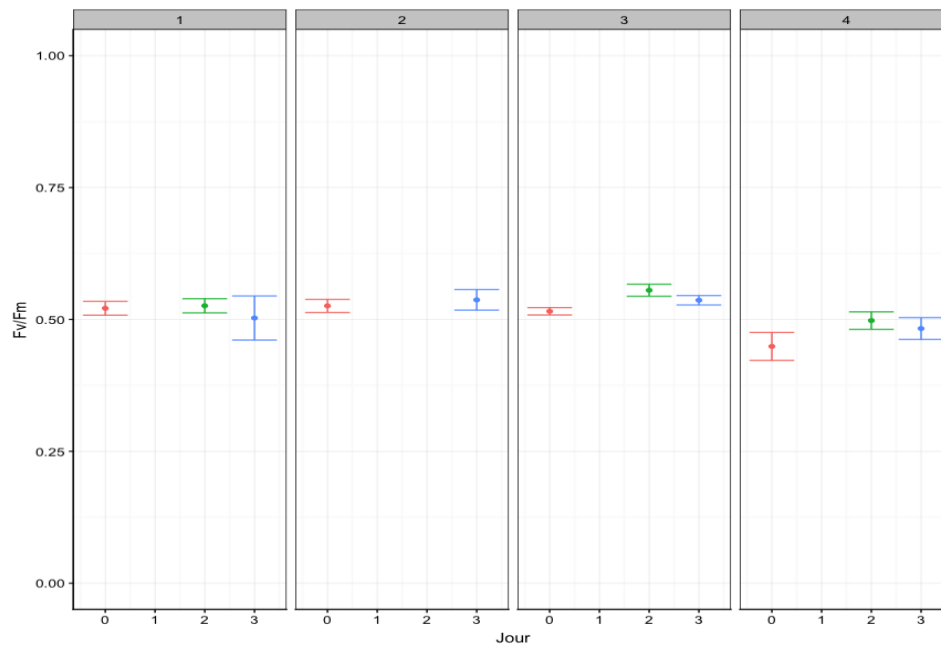
Annexe 4 : Graphiques des résultats de l'expérience de respirométrie



Graphique de l'évolution de la concentration en phosphate dans les respiromètres (R1, R2, R3 et R4) et le B0 en fonction du temps. A noter qu'il n'y avait pas de corail dans le R4. La fermeture du système se faisait peu après 0 minute, le prélèvement après la fermeture se faisait dans les 10 minutes et celui avant l'ouverture se faisait à 50 minutes. Après quoi, nous fermons le système.



Graphique de l'évolution de la concentration en nitrate dans les respiromètres et le B0 en fonction du temps. Cf. graphique précédent.



Graphique du rendement photosynthétique en fonction du temps. Les boutures 1,3 et 4 ont été placées dans les respiromètres alors que la 2 est restée dans le B0 pendant toute la durée de l'expérience. Le point du jour 0 (rouge dans le graphique) a été mesuré juste avant le placement dans le respiromètre, le point du jour 2 (vert) a été relevé juste à la sortie du respiromètre et le point du jour 3 (bleu) a été mesuré dans le but de voir l'évolution du rendement un jour plus tard.