

L'influence de la vitesse d'agitation de l'eau sur le temps de fatigue des *Pyrocystis lunula*



Annabelle DESCAMPS

Agathe MARTIN

Cécilia MASSONI

Laurine NICOLAS

BCPST 1 - 841

Année 2010 - 2011

Sommaire

I. Première manipulation	4
1. Mise en culture.....	4
2. Résultats	5
II. Deuxième manipulation	6
1. Observations préliminaires	6
2. Protocole	6
3. Résultats	7
4. Mesure qualitative supplémentaire	8
III. Discussions	9
1. Analyse de l'échec de la première manipulation	9
2. Recherche des raisons de l'absence de variations mesurées par le luxmètre dans la deuxième expérience	9

Remerciements

Avant toute chose nous tenons à remercier chaleureusement ceux qui nous ont aidé dans la réalisation de ces TIPE, et sans qui, le projet n'aurait pas abouti, probablement même pas commencé.

Mme BRONDEX : notre professeur de SVT, qui nous a soutenues, encouragées, aidées, et qui nous a aussi permis d'acheter nos Pyrocystis une première fois, puis une deuxième fois.

Mme ISOPPO : notre professeur de physique-chimie qui nous a aidées dans les conversions d'unités d'intensités lumineuses, domaine très vaste.

Philippe : le laborantin de SVT qui nous a permis de réaliser toutes nos manipulations en mettant à notre disposition tout le matériel nécessaire, ainsi que toutes ses connaissances scientifiques, et surtout qui nous a assisté pendant les expériences, même pendant son temps libre et pendant les vacances.

Rachel SAXON et Joanne FIELD, du laboratoire SAMS, qui nous ont expédié nos algues et donné beaucoup de conseils sur la culture des Pyrocystis.

Patrice Le GAL et Anne-Sophie CUSSATLEGRAS pour leurs recherches antérieures. Leurs rapports ont été nos principales sources d'information en français, et également pour leurs conseils.

Bibliographie :

- http://ecologie.snv.jussieu.fr/eem/berder2009/Presentations_Berder09/Patrice_LeGal_Berder09.pdf
- http://www.slidefinder.net/b/bioluminescence_milieu_marin/4130070/p2
- <http://www.ccap.ac.uk>

Introduction:

Nous avons entendu parler d'algues ayant joué un rôle particulier pendant la guerre. Lors de la première guerre mondiale : le sous-marin U-34, le dernier sous-mersible allemand coulé par les alliés, avait été repéré par son sillage luminescent... De plus, ce sont ces mêmes sillages qui, durant la seconde guerre mondiale, permettaient parfois aux pilotes de retrouver leur porte-avion la nuit.

Pour beaucoup d'organismes marins la bioluminescence joue un rôle protecteur qui éloigne les prédateurs. Les *Pyrocystis lunula* sont des algues unicellulaires responsables de la luminescence qui apparaît dans le sillage des bateaux et constituent la nourriture de nombreux crustacés. La nuit, en réponse à toute stimulation mécanique, ces dinoflagellés émettent un flash d'un dixième de seconde environ. Or, expérimentalement, il a été montré que les crustacés consomment moins de dinoflagellés lorsqu'elles émettent de la lumière. On peut donc penser que leur bioluminescence augmente leurs chances de survie. Cependant cette lumière ne dure pas indéfiniment : au bout de quelques minutes les *Pyrocystis* se fatiguent et s'éteignent.

Problématique :

Quelle est l'influence de la vitesse d'agitation de l'eau sur le temps de fatigue des *Pyrocystis lunula* ?

Hypothèses :

- L'intensité de la lumière diminue au cours du temps lors de l'agitation.
- Le temps de fatigue des algues diminue lorsque l'agitation de l'eau augmente.

Si nos hypothèses se confirment, nous devrions observer que :

- L'intensité lumineuse diminue au cours du temps
- L'intensité lumineuse diminue d'autant plus vite que la vitesse d'agitation de l'eau est élevée.

Principe :

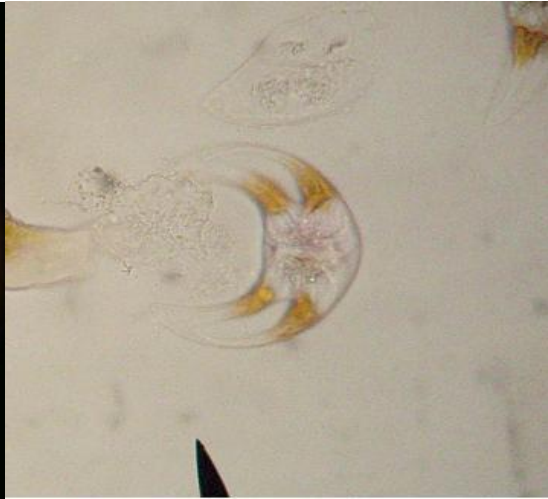
Le principe de l'expérience est de mesurer l'intensité lumineuse en fonction du temps pour différentes vitesses d'agitation. De cette manière, nous pourrions en déduire le temps de fatigue des *Pyrocystis* en fonction de la vitesse d'agitation de l'eau. Pour en arriver là, nous avons constaté que ces algues ne brillaient pas indéfiniment mais se fatiguaient lorsqu'on les agitait. Il est évident que le seul paramètre variable ici est la vitesse d'agitation de l'eau. Les mesures de l'intensité lumineuse se feront directement par le biais d'un luxmètre et de l'ExaO.

Choix du support expérimental :

Les *Pyrocystis lunula* : Ce sont des algues bioluminescentes unicellulaires. Cette espèce a la forme d'un croissant de lune. Lorsqu'elles sont agitées, elles produisent une lumière bleue de longueur d'onde 480 nm.



Pyrocystis lunula en cycle de jour. Taille : 120 μ m



Pyrocystis lunula en cycle de nuit

I. Première manipulation

1. Mise en culture

Préparation du milieu :

Nous sommes allées prélever 1.5 litres d'eau de mer que nous avons filtrée sur Büchner.



Nous avons mesuré un litre de cette eau de mer grâce à une éprouvette graduée que nous avons transvasé dans un cristallisoir. A l'aide de pipettes stérilisées nous avons prélevé 1 mL de NaNO_3 , 1mL de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mL d'une solution d'oligo-éléments et 1 mL d'une solution de vitamines. Après transfert dans le cristallisoir et homogénéisation de la solution nous avons ajusté son pH à 8 grâce à un pH-mètre et une solution de NaOH. Nous avons séparé la solution dans 2 ballons de 500 mL chacun, fermé les ballons à l'aide d'un bouchon de coton et stérilisé le tout à l'étuve.



Etapes de préparation du milieu

Mise en culture :

Grâce aux 60 mL d'algues reçues nous avons prélevé deux fois 30 mL que nous avons réparti dans chacun des ballons. Puis nous avons placé les préparations dans une hotte hermétique à la lumière et programmé un cycle de 12h de jour et 12h de nuit grâce à un néon branché sur un minuteur. Les Pyrocystis ne produisant de la lumière que pendant leur phase de nuit, le néon était allumé de 20h à 8h et éteint de 8h à 20h pour nous permettre de réaliser nos manipulations pendant les heures d'ouverture du lycée. Les Pyrocystis étaient ainsi dans des conditions optimales de développement.

2. Résultats

La simple agitation des fioles contenant les algues aurait dû produire de la lumière. Malheureusement nous n'avons pas observé de lumière de la part des algues. Nous avons donc fait l'hypothèse qu'il n'y avait plus d'algues dans le milieu.

Après avoir agité l'erlenmeyer contenant les algues, afin d'homogénéiser la solution et de décoller celles-ci des parois, nous avons prélevé à l'aide d'une pipette graduée stérile, quelques gouttes de solution que nous avons observées au microscope optique, entre lame et lamelle. Il n'y avait aucune cellule, seuls de nombreux agrégats se trouvaient dans la solution. Nous avons donc conclu que nos Pyrocystis étaient mortes. Le milieu ne présentant pas de sédimentation ni de moisissures, il ne semblait pas avoir été contaminé lors de sa préparation. Nous pensons donc soit qu'elles étaient déjà mortes à leur arrivée, soit qu'il y a eu un problème lors de la mise en culture.

II. Deuxième manipulation

Nous avons donc décidé de recommencer une nouvelle série de manipulations avec une nouvelle commande d'algues.

1. Observations préliminaires

Nous avons donc à nouveau commandé des algues que nous avons observées sous microscope dès réception. Nous avons alors remarqué leur forme de lune caractéristique et conclu qu'elles étaient bien vivantes.

Cependant nous ne les avons cette fois-ci pas mises en culture pour éviter tous problèmes dans cette étape. Nous avons donc directement placé les deux pots de 60 mL d'algues en cycle jour-nuit.

Sans mise en culture la durée de vie des *Pyrocystis* est réduite. Après un cycle jour-nuit de 6 jours, nous avons alors observé lors d'agitation manuelle de nombreux flashes bleus donnant à la solution sa couleur turquoise bien connue.



Bioluminescence des *Pyrocystis Lunula* après agitation manuelle

2. Protocole

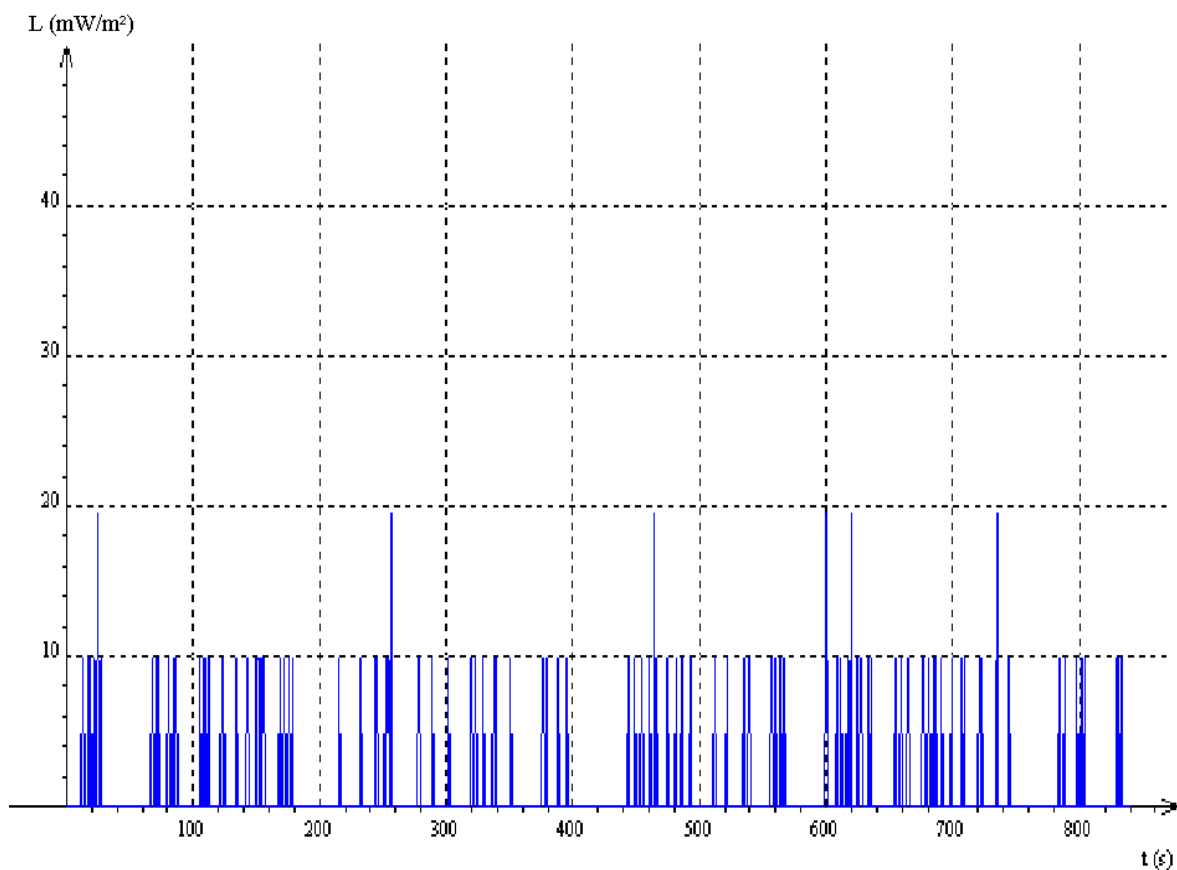
Nous avons alors pu effectuer les manipulations visant à tester nos hypothèses. Nous avons donc placé 20 mL de la solution contenant les algues dans un petit récipient, relié à un dispositif, permettant l'agitation de la solution en même temps que la mesure de l'intensité lumineuse, grâce à un luxmètre relié à l'ExaO. Puis nous avons effectué une première série de mesures à une agitation de 900 tours par minute ($\text{tr} \cdot \text{min}^{-1}$) afin de mesurer l'intensité lumineuse émise par les algues en fonction du temps. Lorsque les algues ont cessé de briller, nous avons arrêté l'acquisition. Nous avons renouvelé la manipulation pour une agitation de $1500 \text{ tr} \cdot \text{min}^{-1}$ puis de $2100 \text{ tr} \cdot \text{min}^{-1}$ sur deux autres lots de 20mL d'algues.



3. Résultats

Toutefois aucun résultat exploitable n'a pu être récupéré. En effet pour chacune des acquisitions le même graphe s'affichait sur Orphy Lab. L'intensité lumineuse restait globalement constante, contrairement à nos observations visuelles

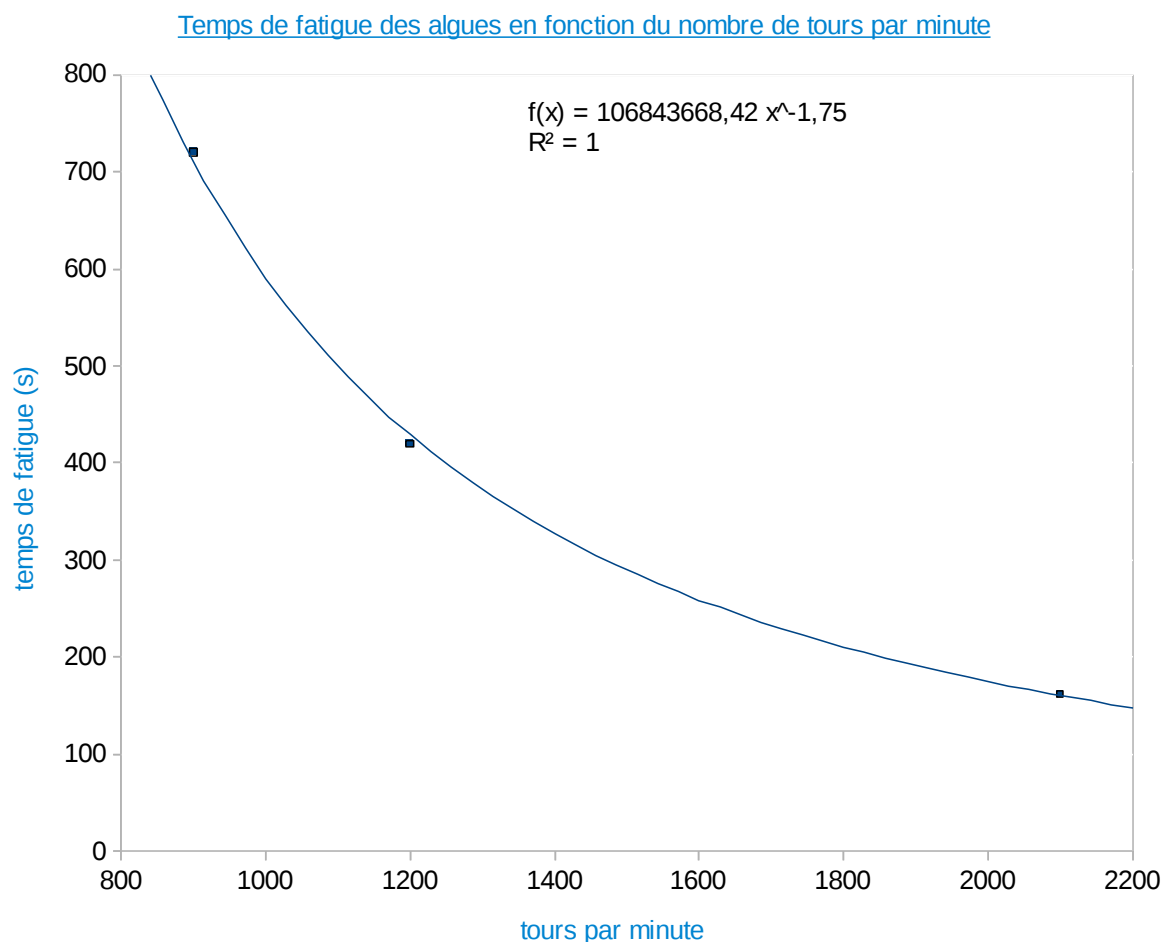
Les trois graphes obtenus avaient tous cette allure :



Graphe de mesure : $L(W : m^2) = f(t)$

4. Mesure qualitative supplémentaire

Visuellement nous observons une diminution de l'intensité lumineuse au cours du temps. Par ailleurs, plus nous augmentons la vitesse d'agitation, moins les algues unicellulaires brillaient longtemps. La variation de l'intensité lumineuse ne pouvant apparemment pas être étudiée grâce à notre dispositif, nous avons mesuré à l'aide d'un chronomètre le temps de fatigue en fonction des différentes vitesses d'agitation. Nous déclenchions le chronomètre au début de l'agitation, et nous l'arrêtons lorsque les algues semblaient ne plus briller. Seules trois vitesses ont pu être étudiées car la quantité d'algues restantes c'est-à-dire n'étant pas encore fatiguée ne permettait plus de faire une étude exhaustive des vitesses. Bien sûr ces mesures restent qualitatives et très subjectives. Grâce à ces mesures nous avons tout de même pu obtenir le graphe suivant :



Ces résultats semblent confirmer l'une de nos hypothèse, le temps de fatigue diminue largement lorsque la vitesse d'agitation augmente.

Nous avons alors pensé que le luxmètre n'était pas assez sensible pour enregistrer la lumière émise par les *Pyrocystis lunula*, qui reste, pour la concentration étudiée, relativement faible.

III. Discussions

1. Analyse de l'échec de la première manipulation

Les algues n'émettant aucun flash, nous avons émis plusieurs hypothèses qui pourraient expliquer cet échec :

- La préparation du milieu de culture :

Il est possible que les conditions de stérilité n'aient pas été scrupuleusement respectées. Cependant, le milieu de culture ayant été passé à l'étuve avant le transfert des algues, il semble peu probable que l'échec de l'expérience soit dû à un problème de contamination. D'autant plus que lors de l'observation au microscope, nous n'avons pas observé de bactéries.

- Les algues :

Nous nous sommes aussi demandé si les algues que nous avons reçues étaient vivantes lors de la réception. Nous avons fait l'erreur de ne pas observer directement les algues après leur réception mais seulement après avoir constaté que celles-ci ne brillaient pas.

Nous n'avons pas reproduit la même erreur lors de la 2^{ème} expérience, puisque nous les avons observées dès que nous les avons reçues.

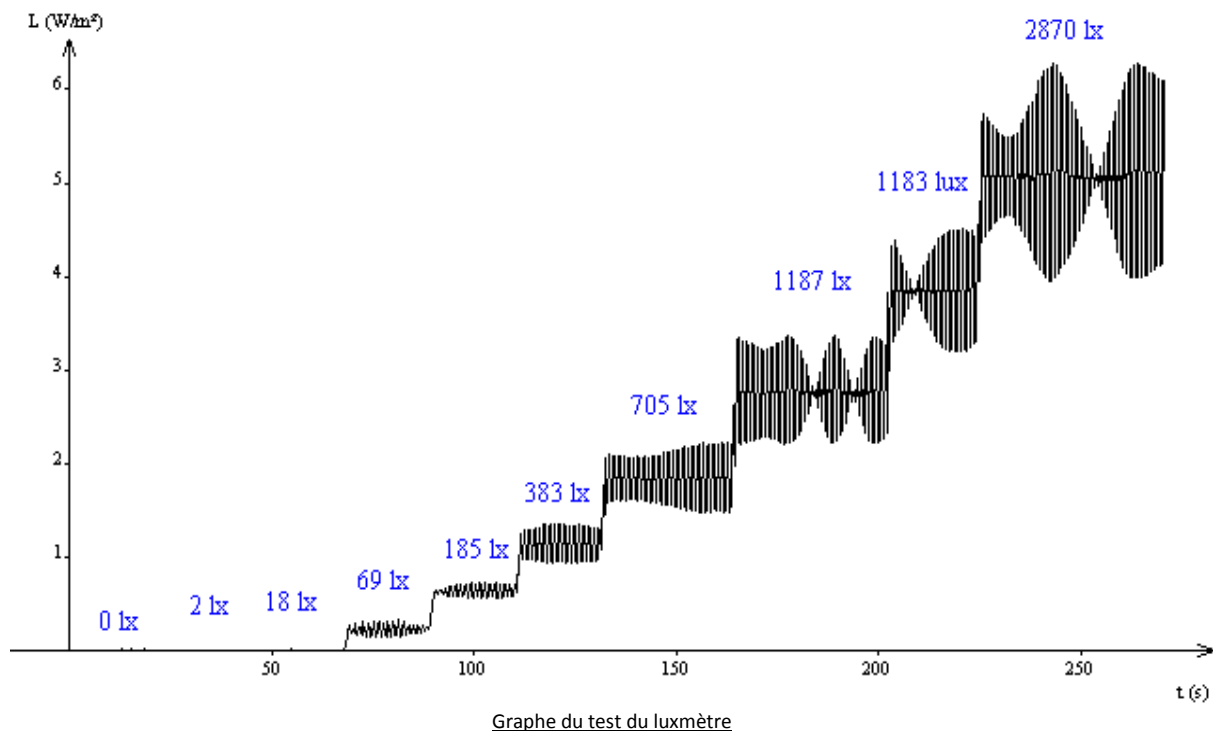
2. Recherche des raisons de l'absence de variations mesurées par le luxmètre dans la deuxième expérience

Lors de la deuxième expérience les algues ont émis de la lumière mais nous n'avons pas pu exploiter les résultats car les graphes ne présentaient aucun résultat significatif. L'allure des graphes laisse à penser que l'intensité lumineuse ne diminue pas au cours du temps. Or, nous avons pu qualitativement observer ce phénomène. Et toujours sur la base de simples observations, nous avons remarqué que cette intensité diminue d'autant plus rapidement que la vitesse d'agitation augmente. Ainsi, nous nous sommes demandées pourquoi nos courbes expérimentales ne reflétaient pas les faits. Nous avons alors fait différentes hypothèses pour expliquer ce problème. La plus probable que nous avons donc choisi de tester est celle mettant en cause la sensibilité de notre luxmètre.

Le luxmètre que nous avons utilisé pour nos mesures est de type ExaO. La cellule photosensible est reliée à une interface, elle-même reliée à l'ordinateur. Sur le capteur il était indiqué que celui-ci pouvaient détecter des intensités entre 0 et 50 klx (kilolux). (A titre informatif : une journée ensoleillée correspond à environ 130 klx et une nuit de pleine lune permet un éclairage de environ 0.5 lx.) Nous avons donc supposé que notre appareil n'était pas assez précis pour les petites intensités lumineuses.

Pour tester cette hypothèse, le labo disposait d'un luxmètre digital plus précis dont nous avons pu régler le calibre. Nous avons donc fait un montage permettant de mesurer à partir de quelle intensité lumineuse l'ordinateur recevait un signal du luxmètre électronique, en utilisant le

luxmètre digital comme témoin. Notre montage était constitué d'une lampe à incandescence reliée à un potentiomètre permettant de faire varier l'intensité électrique arrivant dans l'ampoule et, par suite, l'intensité lumineuse produite par celle-ci. En comparant les résultats informatiques et les résultats manuels (relevé d'intensité sur le lux mètre digital) nous obtenons le graphe suivant.



On observe donc que l'ordinateur ne détecte pas les intensités lumineuses comprises entre 0 et environ 50 lx. Nous avons alors mesuré l'intensité lumineuse de nos *Pyrocystis* après plusieurs jours de repos et de cycle jour-nuit. Les conditions étaient donc optimales et la lumière émise maximale. Le luxmètre digital a indiqué une intensité lumineuse de 1 lx, soit à peine plus qu'une nuit de pleine lune. Au vu du test que nous venons de faire, le luxmètre électronique ne pouvait donc pas détecter une intensité si faible.

Notre hypothèse est donc vérifiée, le luxmètre que nous avons utilisé n'était pas assez sensible pour les mesures que nous voulions faire.

Conclusion :

L'étude des *Pyrocystis lunula* à travers ces TIPE nous a permis de découvrir le monde marin sous un nouvel angle : celui de la bioluminescence. Il est évident que nous avons rencontré de nombreuses difficultés dans la réalisation de ces TIPE, mais l'idée de travailler avec des algues encore peu étudiées dans le domaine de la biologie a d'autant plus motivé nos recherches. Nous avons pu découvrir que ces microorganismes unicellulaires réagissaient de façon intense à une agitation de l'eau en produisant une vive lumière bleue. Les séries de mesures, au cours des expériences, ont permis de vérifier notre hypothèse de départ : le temps de fatigue des algues diminue lorsque l'agitation de l'eau augmente. Cette bioluminescence se retrouve aussi chez des organismes tels que la luciole, si bien que nous avons d'abord pensé travailler avec ces insectes avant de nous rendre compte qu'il aurait été trop difficile de s'en procurer.