

Le plancton, Méthodes d'observation

Pour comprendre **comment vivent les individus** d'une espèce, il faut analyser de quelle manière ils **se nourrissent, se reproduisent, se déplacent**. Des **caméras vidéo** tenues par des plongeurs ou embarquées à bord d'engins sous-marins, permettent d'identifier, de dénombrer et observer les **animaux planctoniques, *in situ***. Les **techniques d'élevage** au laboratoire tendent à reproduire les conditions du milieu dans le but d'étudier le **développement de communautés planctoniques**. Des **loupes et microscopes** couplés à des caméras, révèlent les organes de ces animaux, la structure fine de leurs cellules et organes et leurs fonctionnements. Enfin les **techniques moléculaires, biochimiques et physiologiques** permettent d'identifier les **organismes constituant une population** et leurs **paramètres métaboliques**.



Observation
in situ



Cultures
chémostats,
Zooscan



Microscopes
optiques



Microscopes
électroniques



Techniques
moléculaires



Observations *in situ*

Bouées



Des **bouées de surface** permettent de suivre l'**évolution des caractères physico-chimiques** en un site sur de longues périodes. Les informations sont **transmises par satellites** ou vers des **navires océanographiques**. Leur mise en oeuvre est essentielle pour l'étude de l'**évolution des climats et des populations océaniques**. De tels engins sont mis au point à l'Observatoire Océanologique de Villefranche-sur-mer.

Profileur vidéo-marin



PVM : Profileur Vidéo Marin développé à l'Observatoire Océanologique par Gaby Gorsky et son équipe.

Il s'agit d'un instrument d'observation qui enregistre tout ce que l'oeil d'une caméra peut voir à quelques mètres dans le faisceau d'un projecteur. Le dépouillement des séquences permet de préciser la diversité et le comportement naturel d'espèces bien connues au laboratoire, mais aussi d'en découvrir d'autres jamais collectées dans les filets.



Cultures/Chemostats



Un **chémostat** est un appareil qui permet d'étudier les **relations existantes entre les espèces planctoniques**. Différentes espèces sont transférées au laboratoire et maintenues dans des conditions physico-chimiques étroitement contrôlées dans le chemostat. On reproduit ainsi un **écosystème expérimental simplifié** qui représente un « **modèle** » **simple d'une communauté planctonique**. Le comptage et l'identification des individus, l'analyse automatique des facteurs physiques (densité optique, température...) et chimiques (salinité, oxygène dissous, teneur en sels minéraux, nature des chlorophylles et autres pigments...) constituent des données expérimentales indispensables pour **comprendre l'évolution des écosystèmes planctoniques marins**. L'analyse de ces données permet de mettre au point des **modèles mathématiques** dont l'application fournit une approche prédictive de l'évolution *in situ* du plancton dans des conditions définies et permet la **modélisation d'un écosystème**.



Microscopes optiques

Microscopes stéréoscopiques (Loupes binoculaires)



Prélèvement à la loupe

Les microscopes stéréoscopiques ou loupes permettent d'observer à faibles grossissements (50 à 500 fois) avec une profondeur de champ importante. Des organismes de quelques millimètres d'épaisseur peuvent ainsi être observés et manipulés avec netteté et leurs structures, leurs déplacements et comportements peuvent être suivis sans modifier la mise au point. Par ailleurs, la surface d'objets opaques peut être examinée en lumière épiscopique, c'est à dire en l'éclairant par dessus. Depuis quelques années, cet éclairage épiscopique permet l'observation de la fluorescence naturelle ou induite des organismes.



Groupe d'*Oxnerella* sp. x140

Microscopes droits et microscopes inversés

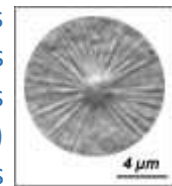


microscope droit

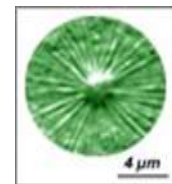
Les **microscopes droits et inversés** permettent de **grossir de 100 à 2000 fois** et de distinguer 2 points distants de quelques micromètres (millième de millimètre). Pour observer un échantillon dans les meilleures conditions, il faut le placer entre une « **lame porte objet** » et une fine « **lamelle couvre objet** ». L'**échantillon** ou objet biologique doit être **mince et transparent** ou **débité en fines tranches** (coupes) afin d'analyser sa structure. Dans ce dernier cas, il faut le **fixer** préalablement, c'est à dire figer ses structures internes et sa composition physico-chimique, puis l'inclure dans un milieu plastique susceptible de durcir (paraffine, résines...), enfin, le découper en fines tranches à l'aide d'un **microtome**. L'**observation est faite** le plus souvent en **lumière transmise** (par transparence). Dans ce cas, les couleurs sont réelles. Des filtres polaroïdes (biréfringents) permettent d'observer en **lumière polarisée** et de localiser dans les cellules des inclusions minérales ou l'arrangement pseudocristallin de macromolécules organiques. On peut aussi intercaler des filtres, des diaphragmes et prismes sur le trajet de la lumière et observer en **contraste de phase, contraste de phase interférentiel ou épiscopie** permettant de visualiser plus nettement ou sélectivement les structures des organismes, de leurs organes et des cellules.



Oxnerella sp. X350



Oxnerella sp.
Grain central
x1620



idem avec filtre vert



microscope inversé

Dans un **microscope inversé** la préparation est éclairée par- dessus et les objectifs se situent sous l'objet. La distance entre l'échantillon et la source lumineuse permet de placer dans le champ des objets, tels que des boîtes de culture d'un à deux centimètres de haut contenant des organismes qui permettent ainsi de les **manipuler plus facilement** (perfusion, empalement par micropipette et enregistrement etc..).

Microscope droit (fluorescence)

Le **microscope de fluorescence** (épifluorescence) permet de choisir la longueur d'onde d'illumination dans le spectre visible ou UV et d'exciter ainsi des molécules (dites fluorescentes) qui restituent de la lumière dans une autre longueur d'onde. Cette technique permet d'**observer des organismes, organelles ou macromolécules naturellement fluorescent** (par exemple les chloroplastes), ou des molécules fluorescentes introduites ou induites par manipulations génétiques (colorants ou Green Fluorescent Proteins). Les techniques d'**immunofluorescence** permettent notamment de révéler dans une cellule, la présence d'une macro molécule (antigène) qui a réagi de façon spécifique avec un **anticorps** (techniques d'immunolocalisation).



Raphidiophrys sp.

Microscope confocal



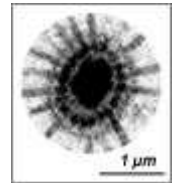
Le **microscope confocal** permet d'effectuer des **coupes optiques** de quelques micromètres à travers un échantillon fluorescent (un organisme, tissu, embryon ou cellule) à l'aide d'un fin faisceau laser. L'image est recomposée par ordinateur sur un écran. Cet appareil peut être comparé à un scanner médical, et permet de faire de la **tomographie** non pas sur des animaux entiers mais sur des cellules et des organismes microscopiques dont les molécules sont fluorescentes. Des microscopes confocaux "multiphotons" permettent d'explorer des échantillons épais sans dommage pour les tissus.



Microscope électronique

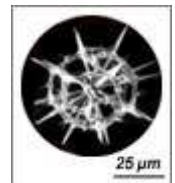


Le **microscope électronique à transmission** permet des grossissements compris entre **5 000 et 1 000 000 fois** supérieurs à ceux des microscopes photoniques et à balayage. En raison de leur principe de fonctionnement (bombardement d'électrons dans un vide poussé), ces appareils **ne permettent pas d'observer d'échantillons vivants**. Dans le microscope électronique, **l'image résulte d'un faisceau d'électrons frappant l'objet et le traversant** plus ou moins profondément en fonction de la densité des structures cellulaires. L'image noire et blanc obtenue est formée sur le capteur d'une caméra électronique ou sur une plaque photographique.



Oxnerella sp.
Grain central
x8000

Le **microscope électronique à balayage** permet de visualiser la **surface d'objets** deshydratés et **recouverts d'une fine couche métallique** déposée sous vide.



*Squelette
d'acanthaïre x240*



Le **microtome** est un instrument qui permet de **confectionner des coupes minces** ou ultraminces d'un échantillon. L'**ultra-microtome** permet de débiter **en tranches extrêmement minces** (0.5 à 1 micromètre) l'échantillon biologique, ce qui permet la pénétration par le faisceau électronique. Pour débiter des tranches si fines il faut d'abord **fixer** la cellule, l'embryon ou l'organisme par une molécule réactive (aldéhyde), puis **déshydrater** et **inclure l'échantillon** dans un petit **réceptacle (gélule) contenant une résine** fluide qui durcira par polymérisation. Le petit bloc contenant l'échantillon sera alors débité sur un couteau de diamant à l'aide d'un **ultra-microtome**. Les **coupes fines** seront recueillies sur des **grilles métalliques** (3 mm de diamètre, 100-700 trous) et introduites dans le microscope pour observation. Il est aussi possible de **congeler rapidement les échantillons** et de débiter des tranches dans un microtome à congélation puis de les observer congelées dans un microscope équipé d'un porte-grille spécial.



Techniques moléculaires

Les **techniques moléculaires** sont utilisées pour **analyser les macromolécules et leurs expressions** dans les organismes, organes et cellules. Les techniques de **protéomique** sont destinées à **cataloguer les protéines**. Les techniques de **génomique** permettent **d'identifier les espèces et leur évolution** grâce à l'analyse de leur acide désoxyribonucléique (**ADN**) qui contient, sous forme d'une infinité de combinaisons de quatre bases élémentaires, le **code génétique spécifique des espèces et individus**. En étudiant la **structure et l'organisation des gènes** et en comparant le génome de différentes populations, il est possible **d'identifier la présence d'une espèce dans un mélange d'espèces**, de distinguer des populations provenant de biotopes différents, de retracer l'histoire des migrations etc...