

I.N.S.A.
Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.

**DIPLOME D'INGENIEUR BIOCHIMISTE INSA LYON et D.E.A. de
BIOCHIMIE UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I**

PROMOTION 2000-20001

**Comparaison de 2 méthodes de mesure des vitesses d'hydrolyse des lipides
par les bactéries marines.**
**Dosage des lipides marins par chromatographie FID. Application à 2
écosystèmes marins, le site DYFAMED, le lagon néo-calédonien.**

Rapport présenté par : Galy Olivier
Le 11 Septembre 2001
Sous la direction du Docteur Madeleine Goutx et du Docteur Jean-Pascal Torréton

**LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE MARINE DE MARSEILLE
UNIVERSITE DE LUMINY.**

**IRD Nouméa (Institut de Recherche pour le Développement anciennement Orstom).
NOUVELLE CALEDONIE.**

TABLE DES MATIERES

<i>TABLE DES MATIERES</i>	2
----------------------------------	----------

<i>PRESENTATION DU LABORATOIRE D'ACCUEIL.</i>	3
--	----------

<i>INTRODUCTION</i>	4
----------------------------	----------

PROBLEMATIQUE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS.	4
--	---

TRAVAIL EFFECTUE	5
------------------	---

<i>METHODES</i>	6
------------------------	----------

STRATEGIE DE PRELEVEMENT ET ECHANTILLONNAGE.	6
--	---

CHROMATOGRAPHIE IATROSCAN	9
---------------------------	---

MESURE DES ACTIVITES EXO-ENZYMATIQUES	11
---------------------------------------	----

EXPERIENCES DE CLASSES DE TAILLE.	15
-----------------------------------	----

CONTRÔLES ET PRECAUTIONS ANALYTIQUES.	15
---------------------------------------	----

<i>RESULTATS DISCUSSION</i>	16
------------------------------------	-----------

MESURES DU TAUX D'HYDROLYSE DU MUF-Oléate LE LONG D'UN GRADIENT SURFACE/PROFONDEUR SUR LE SITE DYFAMED.	16
---	----

MESURES DU TAUX D'HYDROLYSE DU MUF-Oléate LE LONG D'UN GRADIENT CÔTE-LARGE SUR LE LAGON DE NOUMEA.	18
--	----

COMPARAISON DES METHODES MUF ET TG* : VITESSES ET CINETIQUES CONCENTRATION LE LONG D'UN GRADIENT DE MATIERE.	19
--	----

COMPARAISON DES ACTIVITES CORALLIENNES	21
--	----

EXPERIENCES DE CLASSES DE TAILLE	23
----------------------------------	----

<i>CONCLUSION</i>	24
--------------------------	-----------

<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	25
---	-----------

PRESENTATION DU LABORATOIRE D'ACCUEIL.

Le laboratoire de microbiologie marine (L.M.M.) de Luminy a été créé en 1979 sur l'initiative de Monsieur Armand Bianchi, Microbiologiste spécialiste des activités microbiennes en milieu marin profond et sédiments. Dépendant du département des Sciences De l'Univers (S.D.U.) du CNRS, le laboratoire devient une unité mixte de recherche en se rattachant en janvier 2000 au Centre d'Océanologie de Marseille (COM). Le laboratoire est actuellement sous la direction de Micheline Bianchi.

Le département SDU développe des thèmes de recherche portés sur les sciences de la terre, les sciences de l'atmosphère, l'océanographie et l'astronomie. Ses objectifs sont fondés sur la compréhension des différents systèmes qui régissent le fonctionnement de notre univers par une approche de recherche fondamentale. L'étude des problèmes environnementaux est un des axes de recherche appliquée du département SDU.

Le principal thème de recherche du LMM est l'étude des interactions entre la matière organique (MO) et les communautés bactériennes dans l'écosystème marin, ainsi le laboratoire contribue à étudier, à modéliser et à comprendre les grands cycles de la matière dans l'océan. Différentes campagnes en mer permettent de recueillir des données et des échantillons. Les équipes du LMM, par une approche pluridisciplinaire, coordonnent le traitement des échantillons afin de retirer un maximum d'informations sur le plan de la chimie de la matière organique (MO) et sur les caractéristiques spécifiques et/ou métaboliques des communautés bactériennes.

Le stage que j'ai effectué s'est déroulé sous la direction de Madeleine Goutx, Biogéochimiste et Microbiologiste chargée de recherche CNRS-1, spécialiste des marqueurs lipidiques en milieu marin. Toute une partie du travail a été réalisée grâce à la collaboration de France Van Wambeke, microbiologiste au sein du LMM qui m'a guidé dans la partie «Activités microbiennes enzymatiques». L'ingénieur chimiste Catherine Guigue m'a aidé pour toute la partie chimie. Mon stage c'est également effectué sous la tutelle de Jean Pascal Torréton, Bactériologiste à l'IRD Nouméa où j'ai pris part à une mission d'un mois et demi.

INTRODUCTION

PROBLEMATIQUE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS.

Le stock de matière organique (MO) dans l'environnement marin se rencontre essentiellement sous forme de macromolécules. La dégradation et la régénération par voie microbienne de la MO issue des productions biologiques dépendent donc d'une étape d'hydrolyse enzymatique assurant le clivage des biopolymères en molécules plus petites capables d'être assimilées par les bactéries, à tous les niveaux de la colonne d'eau. L'hydrolyse des macromolécules est réalisée par des systèmes ecto-enzymatiques produits par des microflores plus ou moins spécialisées. Du fait de leur position en amont dans les processus de dégradation, l'activité de ces enzymes est un facteur limitant la décomposition du matériel organique et la croissance bactérienne qui s'accompagne de la respiration (Chrost, 1991). Il est donc important, quand on étudie le devenir des productions biologiques notamment à travers la dynamique du réseau microbien, de bien définir ce paramètre d'hydrolyse bactérienne (Riemann et al. 2000).

Or les activités d'hydrolyse actuellement mesurées sont des activités potentielles estimées à partir de substrats synthétiques hydrolysables par des enzymes non spécifiques (Rath et al. 1993 ; Foreman et al. 1998). On connaît peu les activités hydrolytiques réellement développées *in situ* par les bactéries, les caractéristiques des enzymes responsables de ces hydrolyses et les facteurs qui déterminent l'expression de leur activité et leur régulation dans les différentes conditions des systèmes océaniques en milieu marin.

Les protéines, les lipides et les sucres (respectivement polymères d'acides aminés, esters d'acides gras et polyosides) sont des composés biosynthétisés par les cellules vivantes au sein desquelles ils constituent les membranes, les réserves cellulaires ou le pool de métabolites intermédiaire dans les réactions de biosynthèse ou de catabolisme. Dans le milieu marin, ce sont des composés facilement identifiables qui représentent 10 à 60% de la MO totale qui comprend en outre la MO dite complexe. Ils représentent les principales ressources de MO assimilable par les bactéries dans l'océan. En milieu côtier, ils sont concentrés dans les eaux résiduelles urbaines et dans les effluents des industries alimentaires.

Le programme PNEC (Programme National Environnement Côtier), dans le cadre duquel le stage m'a été proposé, offre de mettre au point des protocoles originaux de mesure des activités hydrolytiques spécifiques des protéines et des lipides des communautés bactériennes marines basés sur l'utilisation de substrats de type polymère. La représentativité des substrats analogues (le plus souvent dimères et monomères porteurs d'un groupement fluorescent employés dans la méthode dite classique) et l'effet de facteurs environnementaux (écosystèmes pauvres ou riches en MO, respectivement milieux oligotrophes ou eutrophes, gradients de MO, qualité de la MO disponible analysée chimiquement en parallèle) y sont examinés. Cette mise au point méthodologique est novatrice sous divers aspects :

- Utilisation en tant que traceurs de nouveaux substrats de type polymère.
- Analyse simultanée de la disparition du substrat et de l'apparition des produits de l'hydrolyse.
- Mesure de la concentration en substrat naturel dans l'échantillon d'eau de mer ou de sédiment.
- Estimation de la vitesse réelle d'hydrolyse *in situ*.

TRAVAIL EFFECTUE

Le stage que j'ai effectué concerne la mesure des activités lipolytiques.

Un protocole basé sur l'utilisation d'un substrat triglycéride tritié et le dosage des acides gras libres marqués produits de l'hydrolyse a été récemment mis au point au laboratoire.

Compte tenu de ces considérations, l'objectif de mon stage a été:

- Effectuer des mesures d'activité lipase par les communautés bactériennes naturelles du milieu marin en utilisant une méthode dite classique, celle ci utilisant un analogue fluorescent de triglycéride, le MUF- Oléate.
- Mesurer en parallèle, sur les mêmes échantillons, l'activité lipase par une méthode innovante utilisant des triglycérides marqués au Tritium, en collaboration avec Nicolas Bourguet étudiant en thèse.
- Mesurer la concentration en substrat naturel afin de convertir les mesures d'activité en un taux d'hydrolyse réel de la matière organique présente dans le milieu. Cette mesure se fait suivant une méthode de chromatographie sur couche mince couplée à la détection à ionisation de flamme.
- Tester la pertinence de la nouvelle méthode par rapport à la méthode MUF-Oléate dans différents sites marins.

Pour atteindre ces objectifs j'ai participé à deux missions en mer au cours desquelles ont été effectuées des mesures d'activité enzymatiques et des récoltes d'échantillons:

- Mission océanographique DYFAMED en mer Méditerranée.
- Mission océanographique NOUMEA dans le lagon Néo-Calédonien.

METHODES

STRATEGIE DE PRELEVEMENT ET ECHANTILLONNAGE.

Notre stratégie d'échantillonnage a été d'étudier les activités le long d'un gradient important de MO. Celui ci s'accompagnant généralement d'intensités d'activités bactériennes contrastées. Lors de nos 2 missions, les gradients de MO rencontrés sont attribuables à la profondeur (Gradient Surface-Profondeur) au site DYFAMED, à la plus ou moins grande proximité des rejets anthropiques côtiers (Gradient côte-Large) à Nouméa sur la radiale de Dumbéa, à la proximité de récifs coralliens (Gradient Corail-Eau environnante) à Nouméa également.

Les échantillons d'eau de mer sont prélevés par bouteille PVC Niskin (Volume max. 10 ou 12 Litres). Les bouteilles sont fixées à un câble et immergées. On peut déclencher leur fermeture à distance depuis le pont du bateau une fois la profondeur voulue atteinte. Un système de messenger lesté permet de réaliser l'opération. Les échantillons sont remontés à la surface de manière dépressurisée. La profondeur et la localisation GPS exacte du prélèvement sont systématiquement répertoriées. Un profil de paramètres physiques (Fluorescence de l'eau, Salinité, PO₂, température) et biologiques (taux de Chlorophylle) sont enregistrés parallèlement à l'échantillonnage par une sonde CTD Seabird.

MISSION OCEANOGRAPHIQUE DYFAMED DU 13 AU 25 MARS 2001.

Les prélèvements ont été réalisés sur le site DYFAMED au large de la station marine de Villefranche sur Mer près de Nice (30 Km).

Il y a un intérêt particulier à travailler sur le site de DYFAMED, cette station de prélèvement est en effet localisée dans une zone sans régime de courant marin fort. La colonne d'eau située sous la zone voit donc se faire une sédimentation de la MO sous une forme quasi verticale sans apports autres que ceux venant des couches productives de surface. Il va donc être possible de travailler sur un gradient de MO. J'ai réalisé un profil de la colonne d'eau comprenant 4 profondeurs (5, 30, 400 et 2000m de profondeur). La profondeur maximale du site étant d'environ 2300m.

De part les contraintes liées au travail sur le bateau (aménagement du laboratoire embarqué, houle, impossibilité de travailler pendant le trajet de retour au port), les échantillons sont traités une fois à quai soit environ 4 à 5 heures après le prélèvement. Les échantillons destinés aux mesures d'activité sont stockés dans une enceinte thermostatée à température de l'eau.

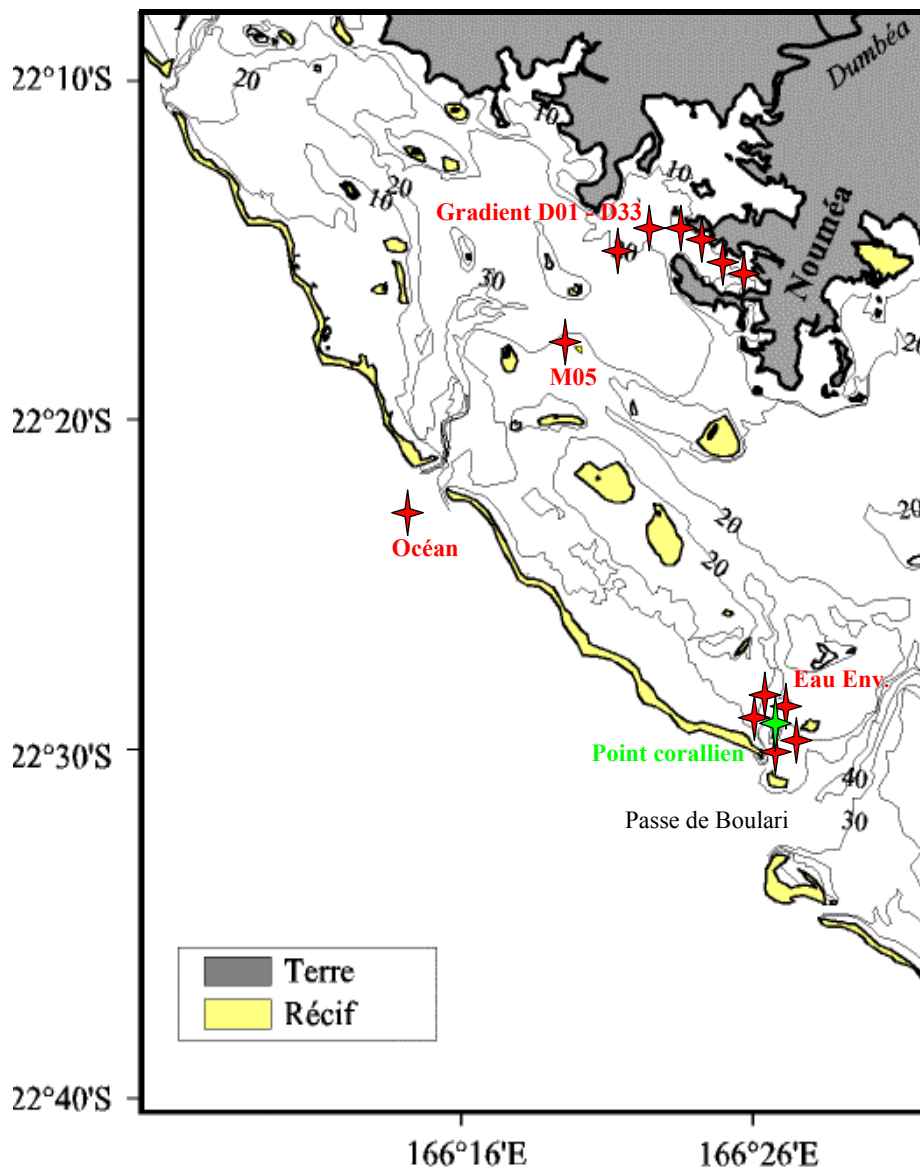
MISSION OCEANOGRAPHIQUE NOUMEA DU 23 AVRIL AU 10 JUIN 2001.

La nouvelle Calédonie est une île d'environ 400 Km de longueur située dans l'Océan pacifique entre la Polynésie française et l'Australie, elle est entourée presque totalement par une grande barrière de corail. Le lagon de Nouméa est l'écosystème marin délimité au sud par la barrière de corail et au nord par la baie de Nouméa. Cet écosystème est un milieu relativement fermé où les masses d'eau circulent lentement. La profondeur moyenne est de 20m, ce sont les régimes de vents qui influencent le plus le déplacement des masses d'eau et le renouvellement de la MO dans le lagon. 6 points de la baie de Dumbéa, facilement accessibles depuis le laboratoire, ont été échantillonnés: les points D01, D05, D08, D16, D22 et D33 (*Document 1-Carte de prélèvement*). Cette série de points constitue un gradient de

MO. Le premier point du gradient, le point D01, se situe dans le port de commerce de Nouméa. Il est riche en matière organique (eutrophe) et sous large influence anthropique (pollution urbaine et industrielle). Au contraire, le point D33 en fin de gradient se situe au milieu du lagon il est beaucoup plus oligotrophe. L'eau a été prélevée à 5m de profondeur à l'aide d'une bouteille Niskin.

Afin de relier les activités bactériennes lagunaires avec celles rencontrées dans un milieu ouvert comme l'océan, nous avons également échantillonné un point isolé à l'intérieur du lagon (point M05) et un autre à l'extérieur du lagon ; c'est le point «Océan» (Cf. Document 1- Carte d'échantillonnage).

Nous avons finalement prospecté une série de points coralliens (échantillonnage d'eau à proximités de polypes coralliens) et des points d'eau environnants. Les échantillonnages coralliens ont permis de tester les activités bactériennes sous influence du corail et de les comparer, en utilisant les 2 méthodes, avec celles d'eau environnante.



DOCUMENT 1-Carte d'échantillonnage du lagon de Nouméa

EXTRACTION DES LIPIDES.

Des prélèvements de 4 Litres d'eau de mer sont filtrés à la pompe à vide sur filtre GF/F (fibre de verre) 0,7µm.

Deux litres de filtrat sont récupérés en vue d'extraire les lipides dissous. Ils sont conservés avec 50mL de dichlorométhane (Aldrich HPLC Grade) à 4°C en attendant l'extraction.

Le filtre GF/F est récupéré et conservé dans des cryotubes à -20°C. Il contient l'extrait lipidique dit «Particulaire».

Avant extraction, 100µL d'une solution de 3-hexadécane (Concentration : 1mg → 5mL), un étalon interne, sont ajoutés aux échantillons bruts de lipides dissous et particulaires (Figure 1).

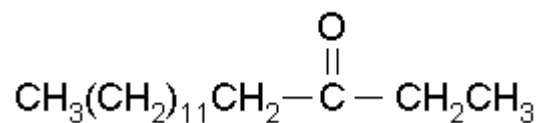


Figure 1-Formule de la 3-hexadécane (Ref H7504 catalogue Sigma).

Cette cétone a la particularité de ne pas être présente dans le milieu marin. Elle peut en outre être identifiée et quantifiée facilement par la chromatographie IATROSCAN (Striby L. 2000).

Un rendement global pour chaque extraction est calculé en déterminant le rapport entre la quantité de cétone ajoutée aux échantillons et la quantité effectivement estimée après la chromatographie.

EXTRACTION DES LIPIDES DISSOUS.

Il s'agit d'une extraction Liquide/Liquide. Les extraits lipidiques dissous sont récupérés par 4 extractions successives avec 50mL de dichlorométhane dont 2 sont réalisées en milieu acide (quelques gouttes d'acide chlorhydrique limitent l'ionisation des acides gras et ainsi leur semi-solubilisation dans la phase aqueuse). Les extraits sont ensuite concentrés sous vide puis sous flux d'azote et conservés dans des inserts de 0,4ml à -20°C jusqu'à analyse IATROSCAN.

EXTRACTION DES LIPIDES PARTICULAIRES.

Les extractions des lipides particulaires sont réalisées suivant le protocole décrit par Bligh & Dyer (1959). Les filtres GF/F sont repris dans 10ml de mélange monophasique (Méthanol, Eau Dichlorométhane 2/0,8/1), broyés à l'aide d'une spatule en verre, traités aux ultrasons 3 minutes et mis au repos 12h à 4°C. Les broyats sont ensuite déposés sur un fritté monté sur une ampoule à décanter. Le mélange est rendu biphasique par l'ajout d'eau (0,73% NaCl) et de dichlorométhane (Nouveau rapport : Méthanol /Eau/ Dichlorométhane : 2/1,8/2). L'échantillon est ensuite extrait 4 fois par du dichlorométhane. Les lipides sont récupérés dans la phase organique inférieure. Les extraits sont ensuite concentrés sous vide puis sous flux d'azote et conservés dans des inserts de 0,4ml à -20°C jusqu'à analyse.

CHROMATOGRAPHIE IATROSCAN

PRINCIPE.

La technique chromatographique IATROSCAN a été mise au point au Japon par les laboratoires Iatron. C'est l'association d'une méthode de chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC = Thin Layer Chromatography) et d'une méthode de détection par ionisation de flamme (FID = Flamme Ionisation Detection) plus généralement utilisée en chromatographie en phase gazeuse. Cette méthode combine l'efficacité de séparation et la facilité d'utilisation de la chromatographie sur couche mince de silice avec la très grande sensibilité et la rapidité de réponse de la méthode FID. Cette technique rend possible la détection de quelques nano-grammes de composés lipidiques.

ETAPES DE L'ANALYSE IATROSCAN.

DEPOT.

Les mélanges de lipides sont déposés sur les chromarods (Rods), de fines baguettes de quartz revêtues d'une couche d'acide silicique (*Figure 2*). Les rods reposent sur un portoir pouvant contenir jusqu'à dix rods. Les rods sont préalablement passés à la flamme après activation par un bain d'eau milli-Q[®] suivi d'un bain dans l'acétone. Les dépôts de 2 à 6 μ L se font à l'aide de micro-seringues en verre Hamilton (*Figure 3*).

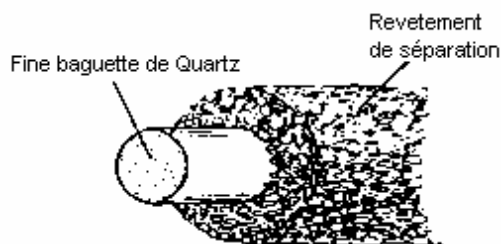


Figure 2-Détail d'un Chromarod.

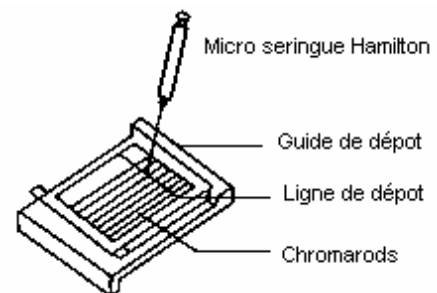


Figure 3-Dépôts sur les rod.

ELUTION

Les lipides du mélange sont séparés par élution dans une cuve de développement en verre saturée par un mélange de solvants propres à séparer la classe lipidique donnée suivant le modèle de la CCM classique (*Figure 4*).

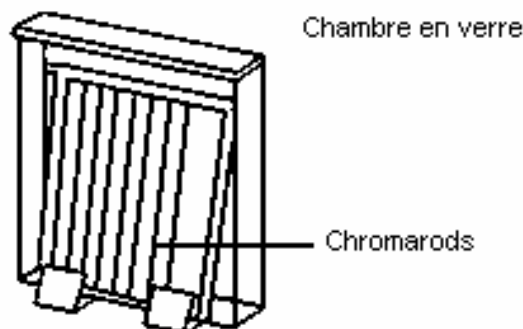


Figure 4-Détail d'un portoir à chromarods dans la cuve d'élution.

ANALYSE

Après élution et séchage, le portoir est placé dans l'enceinte de l'analyseur (*Figure 5*). L'analyseur utilisé est le modèle MK4, il comporte

- Un scanner composé d'un châssis permettant l'installation du portoir à rods.
- Un brûleur enflammant un mélange d'oxygène et d'hydrogène et au niveau duquel défilent successivement tous les rods du portoir.
- Une électrode réceptrice, au dessus du brûleur, sensible aux molécules ionisées et capable d'amplifier un signal vers le centre de calcul de l'appareil.

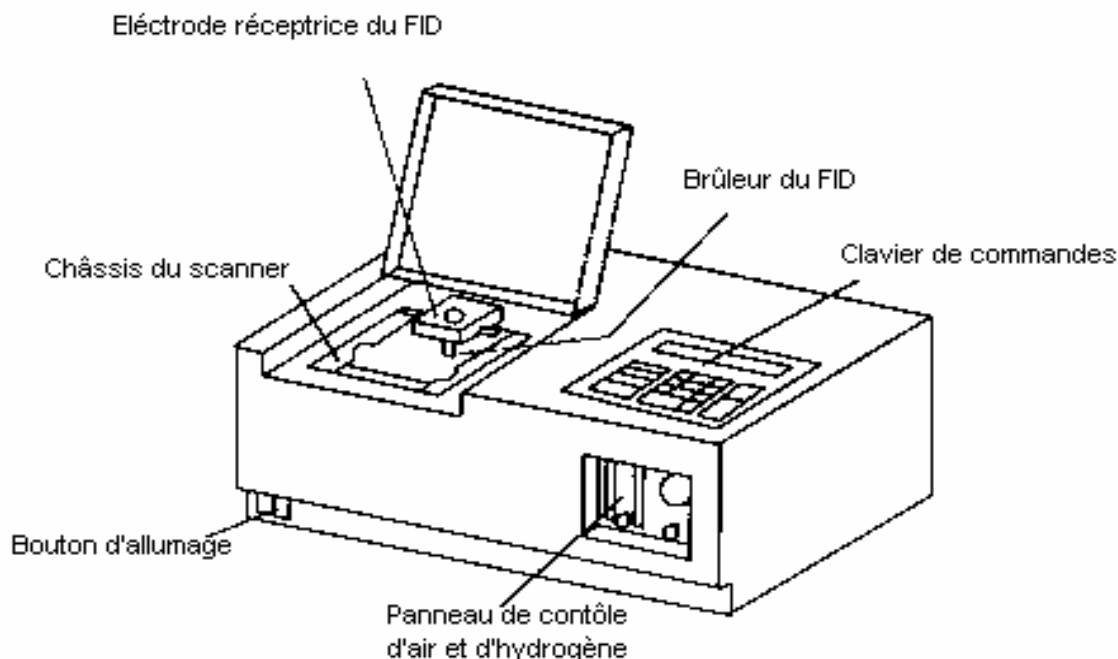


Figure 5-Analyseur MK5.

Les composés du mélange lipidique sont identifiés par analogie entre leur temps de rétention et celui de composés contenus dans un mélange standard déposé sur le premier rod. La quantification se fait par intégration des pics des chromatogrammes. L'analyseur MK4 est couplé en sortie au logiciel d'exploitation développé par l'entreprise JMBS.

Une des originalités de la méthode IATROSCAN est la possibilité de ne brûler qu'une partie du rod à la suite d'une élution. Ceci permet de garder intact, près du point de dépôt, les composés n'ayant pas ou peu migré lors de l'élution. La séquence d'élution choisie pour analyser les échantillons permet de séparer et quantifier les composés majeurs d'un extrait lipidique marin, en particulier les triglycérides (*Tableau 1*).

Tableau 1. Composition des bains d'éluion et classes de composés séparés (Gordilo et al.1998)

¹-L'acide formique permet la saturation des sites acides de la silice activée.

Composition du bain (Bain de 200ml)	DUREE DU BAIN	COMPOSES ISOLES
97% Hexane 3% Ether 0,2%Ac. Formique ¹	30 minutes	Hydrocarbures Cires Cétones
80% Hécane 20% Ether 0,2% Ac. Formique	40 minutes	Acides gras Triglycérides Alcools Stérols
100% Acétone	8 minutes	Pigments
48% Méthanol 48% Chloroforme 4% Hydroxyde d'Ammonium	40 minutes	Phosphatidyl-Glycerides Phosphatidyl-ethanolamine. Phosphatidyl-choline

MESURE DES ACTIVITES EXO-ENZYMATIQUES

MUF-OLEATE

PROPRIETES

Le 4-Methylumbelliferyl (MUF-Oléate) (Figure 6) est classiquement utilisé pour mesurer les activités enzymatiques lipolytiques (Hoppe 1983, Beisson et Al. 2000). Ce composé synthétique est constitué d'un résidu oléate ponté sur l'alcool d'un groupement fluorochrome, le 4-Methylumbelliférol (MUF) (Figure 7).

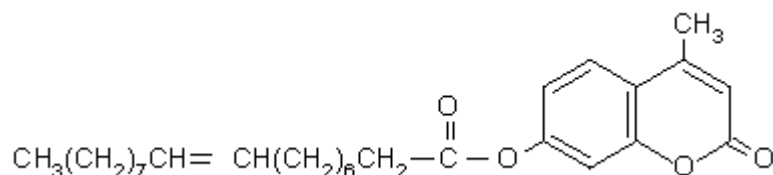


Figure 6-Formule du 4-Methylumbelliferyl (MUF-Oléate)

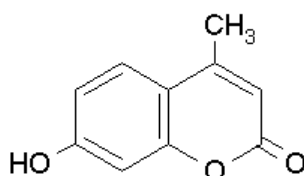


Figure 7-Formule du 4-Methylumbelliférol (MUF)

L'hydrolyse de la liaison ester entre le MUF et l'oléate libère le MUF qui excité à $\lambda=365$ nm fluoresce à 450 nm.

Le MUF-Oléate est un composé peu fluorescent par rapport au MUF, de plus excité à 365nm il émet à 410 nm. Dans les conditions expérimentales, le MUF-Oléate peut être en large excès par rapport aux petites quantités de MUF libérées. Afin de vérifier que la fluorescence mesurée est due au MUF et pas au MUF-Oléate en excès, j'ai réalisé des spectres

d'émissions de fluorescence comparés en me plaçant dans des conditions de concentration expérimentales (100 fois plus de MUF-Oléate que de MUF)(Cf. figure8).

Spectre d'émission de fluorescence comparés MUF-Oléate et MUF seule.

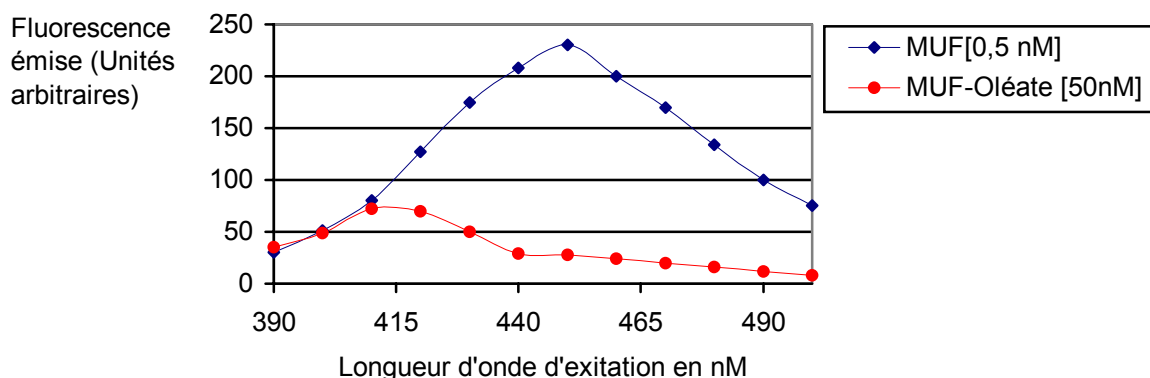


Figure 8- Spectre d'émission MUF-Oléate / MUF après excitation à 365 nm. On observe pas de recouvrement des spectres à la longueur d'émission du MUF $\lambda=450\text{nm}$).

Les solutions mères de MUF et MUF-Oléate utilisées sont concentrées respectivement à 1nM et 5nM. Le MUF (solide) et MUF-Oléate (huile) sont dissous dans le Methylcellosolve (un composé non fluorescent et ne modifiant pas les activités hydrolytiques –.Hoppe 1983). Les solutions sont conservées à -20°C à l'abri de la lumière.

MESURE DE L'ACTIVITE MUF-Oléate.

Les activités ectoenzymatiques sont mesurées à partir d'échantillons 50ml d'eau dans des tubes en polypropylène 50ml Falcon contenant, et des quantités de MUF-Oléate variant de 2 à 5000 nM. Les incubations sont menées dans les tubes pendant une période de 2 à 4 heures dans une enceinte thermostatée maintenue à la température de l'eau prélevée (environ 25°C pour Nouméa et 13°C pour DYFAMED). Les tubes sont incubés à l'obscurité afin de limiter la photodégradation du MUF-Oléate (Hoppe 1983).

A différents intervalles de temps des triplicatas de 3ml sont prélevés après homogénéisation et la mesure de la fluorescence est réalisée à l'aide d'un fluorimètre.

Le fluorimètre utilisé est le TD-700 de la marque Turner, cet appareil est sensible et facile d'utilisation, cependant il nécessite un calibrage spécifique. Ce calibrage consiste à attribuer, avant de prendre les premières mesures, la valeur de réponse maximale détectable par l'appareil à la valeur maximale de fluorescence attendue. Une recalibration est nécessaire à chaque fois qu'une expérience nécessite d'utiliser des concentrations de substrat différentes et doit coïncider avec la réalisation d'une nouvelle courbe d'étalonnage MUF. Deux gammes étalon utilisées lors des mesures d'activité sont présentées sur la Figure 9.

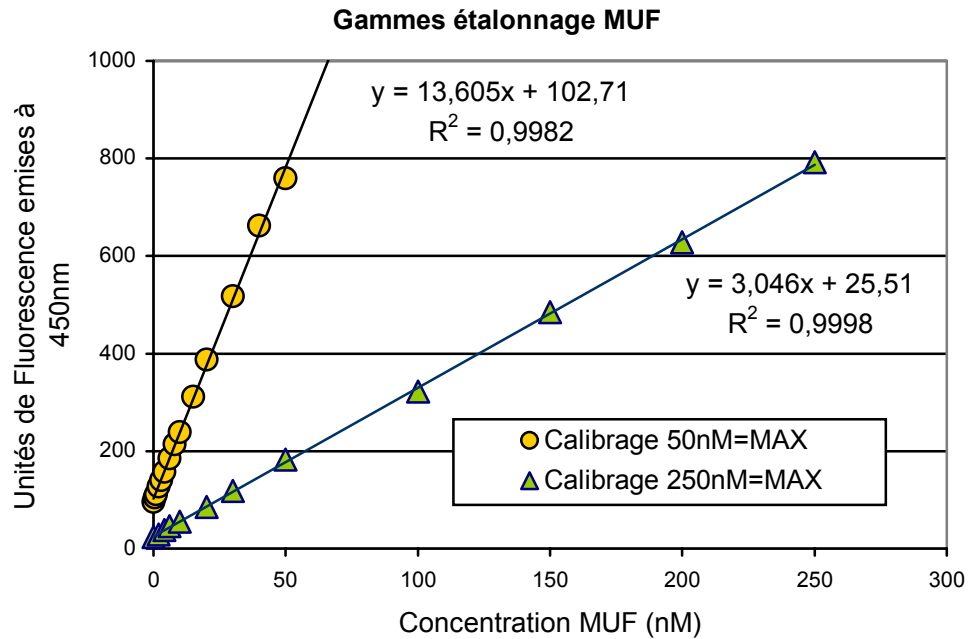


Figure 9-Deux Gammes étalons utilisées lors des mesures d'activité.

Le MUF-Oléate peut être considéré comme un substrat analogue non spécifique pour la mesure des activités Triglycéride Lipase pour plusieurs raisons :

- La structure moléculaire du MUF-Oléate est relativement différente de celle du substrat naturel (Figure 6). En particulier, le groupe fluorochrome est plus encombrant que le squelette de glycérol des triglycérides naturels. Le groupement fluorescent pourrait donc occasionner un gêne stérique important qui pourrait perturber le mécanisme moléculaire normal de l'hydrolyse enzymatique.
- De nombreuses enzymes et protéines présentes dans le milieu marin seraient capables d'induire le clivage du MUF-oléate (Beisson F. 1999).
- Les enzymes triglycérides lipases naturelles peuvent avoir des affinités différentes pour les 3 liaisons ester d'un triglycéride (2 positions *sn*-1 ou *sn*-2 symétriques). L'activité Lipase naturelle globale est donc la somme des différentes activités d'hydrolyse de chacune de ces liaisons ester. Le MUF-Oléate n'offre qu'un seul type de liaison ester.

D'une façon générale, les expériences de cinétiques concentration permettent, par une représentation de type Michaelis-Menten, la détermination de constantes cinétiques traditionnellement utilisée en Enzymologie comme le K_m (constante d'affinité Substrat/Enzyme de Michaelis) ou le V_{max} (Vitesse maximale ou saturation). Les paramètres (V_{max} et K_m) doivent être redéfinis dans le cadre de mon étude. Les écosystèmes bactériens marins sont complexes, en effet, les activités mesurées dans l'eau de mer sont dues à de nombreuses enzymes, spécifiques de plusieurs communautés bactériennes. A ce niveau de complexité peut s'ajouter la non-spécificité du substrat utilisé, qui pourrait en théorie être clivé par de nombreuses estérases sans lien avec les triglycérides lipases étudiées. De plus, les paramètres V_{max} et K_m sont très spécifiques d'un substrat et d'une enzyme donné, ils sont déterminés en utilisant des enzymes purifiées dont le titre est connu. Dans le cas de notre étude ils ne peuvent donc pas être employés.

Nous calculerons cependant des constantes de saturation, que nous appellerons V_{max} apparent, et qui seront représentatives du niveau de saturation global des systèmes enzymatiques en présence. Elles seront calculées comme un V_{max} classique grâce au logiciel *Kinetics* version 3.0 et à une estimation faite graphiquement en utilisant une représentation en double inverse.

Des représentations de type Michaelis-Menten ainsi que des représentations en double inverse de type Hanes-Woolf ont été réalisées dans les expériences de cinétiques concentration. La modélisation de Hanes-Woolf est une linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten. Elle représente [S]/V en fonction de [S] (S=Concentration en substrat introduite, V= vitesse d'hydrolyse mesurée). L'inverse de la pente donne une approximation du V_{max} apparent selon la formule :

$$[S]/V = (1/V_{\text{max apparent}}) \times [S] + K_m / V_{\text{max apparent}}$$

L'utilité de combiner les 2 représentations graphiques est de pouvoir observer directement les valeurs des vitesses d'hydrolyse et des seuils de saturation grâce à la courbe de saturation tout en étudiant la linéarité de la représentation inverse pour juger de sa représentativité.

MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE LIPASE AVEC LA TECHNIQUE ³H-TRIOLEINE (TG).*

La technique utilisée consiste dans l'ajout à des concentrations traces d'un substrat Trioléine radioactif (chaînes des acides gras marquées par deux radioéléments tritium ³H : [9,10-³H(N)]-Trioléine) et dosage spécifique des acides gras marqués libérés, isolés par une extraction sélective en système biphasique. Les triglycérides non dégradés ainsi que les diglycérides et monoglycérides, intermédiaires de dégradation, se retrouvent dans la phase organique, tandis que les acides gras se répartissent entre les deux phases suivant un coefficient de partition déterminé en parallèle. Un témoin bouilli, soumis aux mêmes traitements que les échantillons, tient lieu de témoin de dégradation abiotique du triglycéride.

Pour chaque échantillon, le substrat trioléine marqué est ajouté, en solution dans l'éthanol. Après homogénéisation au vortex, deux aliquotes (500 à 1000 µl) sont prélevés pour le dosage en radioactivité de la concentration en substrat marqué, et deux séries de 3 aliquotes de 1200 µl (triplicats) sont réparties dans des tubes Falcon de 15 ml pour incubation. Une série est arrêtée immédiatement et la seconde à t_{final}, en ajoutant 750 µl de tampon TRIS 1M pH 11, et 4800 µl d'un mélange de solvants (méthanol - chloroforme - heptane, 38.6 : 34 : 27.4, v/v/v), conformément au système d'extraction de Borgstöm modifié par Belfrage et Vaughan, (1969). Les tubes d'extraction sont alors agités vigoureusement au vortex puis centrifugés 4 minutes à 5500 rpm. Enfin, 2 ml de la phase aqueuse supérieure sont transférés dans un flacon à scintillation contenant 12 ml de liquide scintillant (HIONIC FLUOR, Packard Biosciences B.V., Groningen, Pays-Bas) et comptés en scintillation.

La même expérience menée en parallèle à t=0, en ajoutant cette fois du ³H-Acide oléique au lieu de la ³H-Trioléine, permet de déterminer la répartition de l'acide gras entre les deux phases.

Finalement, un calcul, faisant intervenir le volume total de la phase supérieure, la répartition de l'acide oléique entre les deux phases, l'activité spécifique du trioléate marqué, ainsi que la quantité de trioléate introduite, permet de déterminer une expression de l'activité lipase.

Un test de reproductibilité de cette méthode a permis de mesurer une variabilité des mesures de l'ordre de 10 %

EXPERIENCES DE CLASSES DE TAILLE.

Les expériences de classes de tailles ont été menées afin de localiser les activités Triglycéride Lipase Bactériennes dans des sous portions d'eau de mer filtrées sur des membranes présentant différentes tailles de pore. On distingue généralement 3 niveaux de filtration : $1\mu\text{m}$ - $0,6\mu\text{m}$ - $0,22\mu\text{m}$ (Hoppe 1983).

Un échantillon d'eau de mer frais est homogénéisé et divisé en quatre parts, trois d'entre elles sont préfiltrées chacun sur un niveau, la dernière portion est l'échantillon total. Les mesures d'activité sont alors réalisées dans chaque extrait.

Le filtrat issu de la filtration à $0,22\mu\text{m}$ contient l'activité libre essentiellement due à des enzymes libres, solubilisées ou liées à des fines particules de taille inférieure à $0,22$ microns.

Le filtrat issu de la filtration à $0,6\mu\text{m}$ détient l'activité libre plus l'activité bactérienne libre. Cette activité est due aux ecto-enzymes liées à la paroi des bactéries de taille inférieure à $0,6\mu\text{m}$.

Le filtrat issu de la préfiltration à $1\mu\text{m}$ contient les 2 activités de la portion inférieure à $0,6\mu\text{m}$ plus l'activité dite «intermédiaire» due à des agglomérats bactériens, ou à des protistes de taille supérieure à $1\mu\text{m}$.

Finalement l'activité mesurée dans l'échantillon total à laquelle on retranche l'activité de la fraction inférieure à $1\mu\text{m}$ est appelée activité particulière, elle représente l'activité intrinsèque liée aux grosses particules ($>1\mu\text{m}$) en suspension dans l'eau.

CONTRÔLES ET PRECAUTIONS ANALYTIQUES.

Des précautions sont à prendre lors de la mesure des activités bactériennes. Il est prouvé que la présence de parois dans l'environnement proche des bactéries induit la formation de Biofilms bactériens. Les Biofilms sont d'autant plus importants que le stockage est long. Ces Biofilms se comportent différemment des bactéries libres en termes d'activité et pourraient induire un biais dans nos mesures. Pour limiter l'effet «Biofilm», les échantillons d'eau de mer ont été stockés dans des volumes relativement grands (bouteilles Polycarbonate de 4 Litres) et les prélèvements dédiés à l'analyse ont été effectués loin des parois des bouteilles.

Au cours des différentes prises de mesure, plusieurs paramètres ont été contrôlés : J'ai vérifié que la variabilité de la fluorescence naturelle de l'eau était négligeable au cours du temps, les variations de fluorescence enregistrées lors des expériences de cinétique sont donc dues seulement à l'hydrolyse du MUF-Oléate. J'ai également vérifié la stabilité des solutions mères de MUF et MUF-Oléate durant leur conservation.

Finalement, la variation de la fluorescence d'échantillons d'eau de mer filtrés et bouillis après ajout de MUF-Oléate a été mesurée. Cette variation est nulle, l'hydrolyse du MUF-Oléate est donc un processus enzymatique. Pour les expériences de cinétique concentration la linéarité des vitesses d'hydrolyse a été contrôlée. L'estimation des vitesses, pente de la fonction : $\text{nM MUF libérées} = f(\text{Temps})$, est déterminée dans une zone linéaire de la fonction.

RESULTATS DISCUSSION

MESURES DU TAUX D'HYDROLYSE DU MUF-OIéate LE LONG D'UN GRADIENT SURFACE/PROFONDEUR SUR LE SITE DYFAMED.

Le travail réalisé sur le site DYFAMED au début de mon stage, avait pour objectif de me familiariser avec les techniques d'échantillonnage en mer et avec l'utilisation des protocoles de mesure d'activités et d'analyse chimique d'échantillons marins. Sur le site DYFAMED, les activités d'hydrolyse du substrat MUF-OIéate ont été mesurées le long de la colonne d'eau. Pour chaque profondeur j'ai réalisé une expérience de cinétique concentration menée sur une période de 4 heures. Cinq concentrations de substrat MUF-OIéate sont utilisées 50, 100, 250, 1000 et 5000nM (*Figure 10, A,B,C,D*). Ce spectre de concentration, volontairement élevé (facteur 100 entre les deux concentrations extrêmes), permet de recouvrir, et de solliciter plusieurs familles enzymatiques.

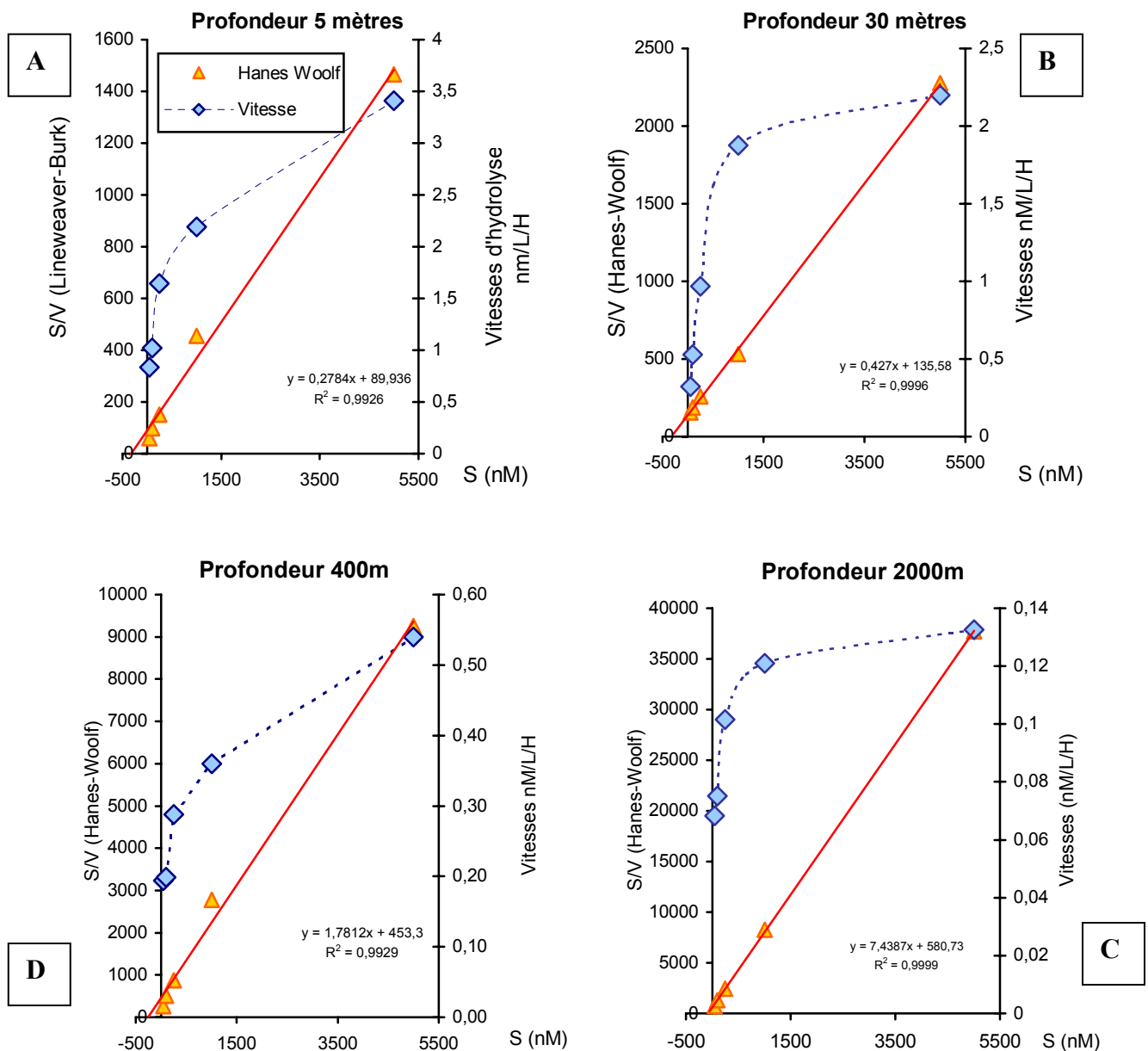


Figure 10-A, B,C,D : Représentations de type Michaelis-Menten et Hanes Woolf des cinétiques concentration réalisées sur DYFAMED.

Les résultats des cinétiques concentration effectuées le long de la colonne d'eau permettent de mettre en évidence que les vitesses d'hydrolyse du MUF oléate diminuent globalement avec la profondeur. (Figure 10 A,B,C,D). Les Vmax apparents globaux calculés pour les quatre points testés sont représentés dans le tableau ci dessous:

PROFONDEUR (m)	Vmax apparent calculé par Kinetics 3.0	Vmax apparent calculé par linéarisation de type Hanes-Woolf
5	3,27	3,59
30	2,39	2,34
400	0,49	0,56
2000	0,12	0,13

La diminution des vitesses d'hydrolyse des substrats peut s'expliquer par la diminution des effectifs des populations bactériennes avec la profondeur. L'abondance des substrats naturels, est également moindre à 2000m de profondeur qu'à 5m (Tableau 1). L'abondance des Triglycérides n'a pu être évaluée. Cependant, la quantité de lipides totaux estérifiés a été mesurée, elle passe de 176,6 µg/L à 8,6 µg/L.

Tableau 1-Quantification des lipides par chromatographie IATROSCAN.

En µg/L	LIPIDES TOTAUX ⁻¹	LIPIDES estérifiés ⁻²	Acides Gras ⁻³	Tri-Glycerides ⁻⁴
5m	192,6	176,6	13,7	0
30m	30,2	25,8	3,6	0
400m	3,5	3,0	0,5	0
2000m	9,1	8,6	0,4	0

⁻¹-Somme des lipides particuliers et dissous (sans les hydrocarbures)

⁻²-Lipides totaux sans les acides gras.

⁻³-Acides gras libres

⁻⁴-Triglycerides

MESURES DU TAUX D'HYDROLYSE DU MUF-Oléate LE LONG D'UN GRADIENT CÔTE-LARGE SUR LE LAGON DE NOUMEA.

J'ai mesuré les activités MUF sur chacun des 6 points du gradient de Dumbéa (Points : D01 - D05 - D08 - D16 - D22 - D33) afin de tester la sensibilité de la méthode sur cet écosystème et de mettre effectivement en évidence l'existence d'un gradient de MO le long de la radiale Côte-Large. La quantité de MUF-Oléate utilisée est de 12,5 nM. (Figure 11)

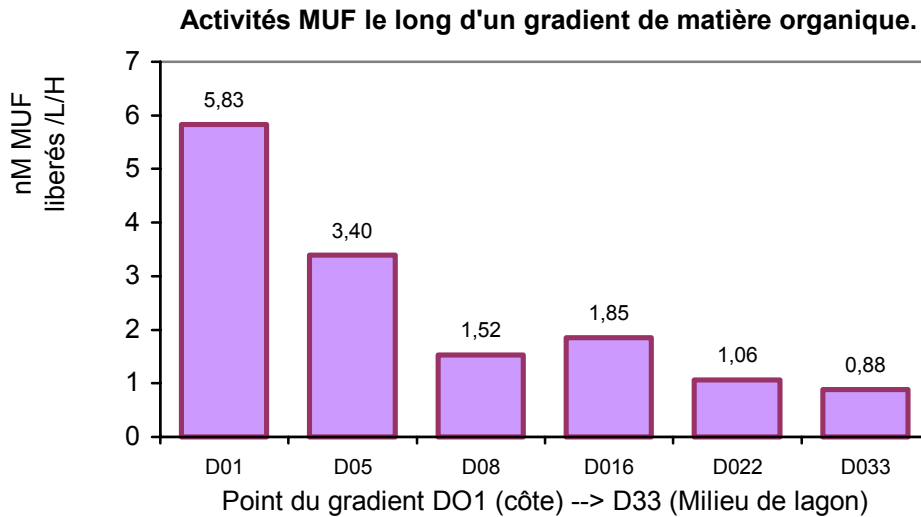


Figure 11- Détail des activités d'hydrolyse du MUF-Oléate mesurées le long d'un gradient de matière organique.

Sur la figure 11, on remarque que la vitesse d'hydrolyse du substrat MUF-Oléate augmente avec l'eutrophie du milieu, mis a part pour le point D16 (Figure 11).

Dans un second temps des expériences de cinétique concentration ont été effectuées séparément au point D01 et au point D33 (fin et début de gradient) (Figure 12 A,B.)

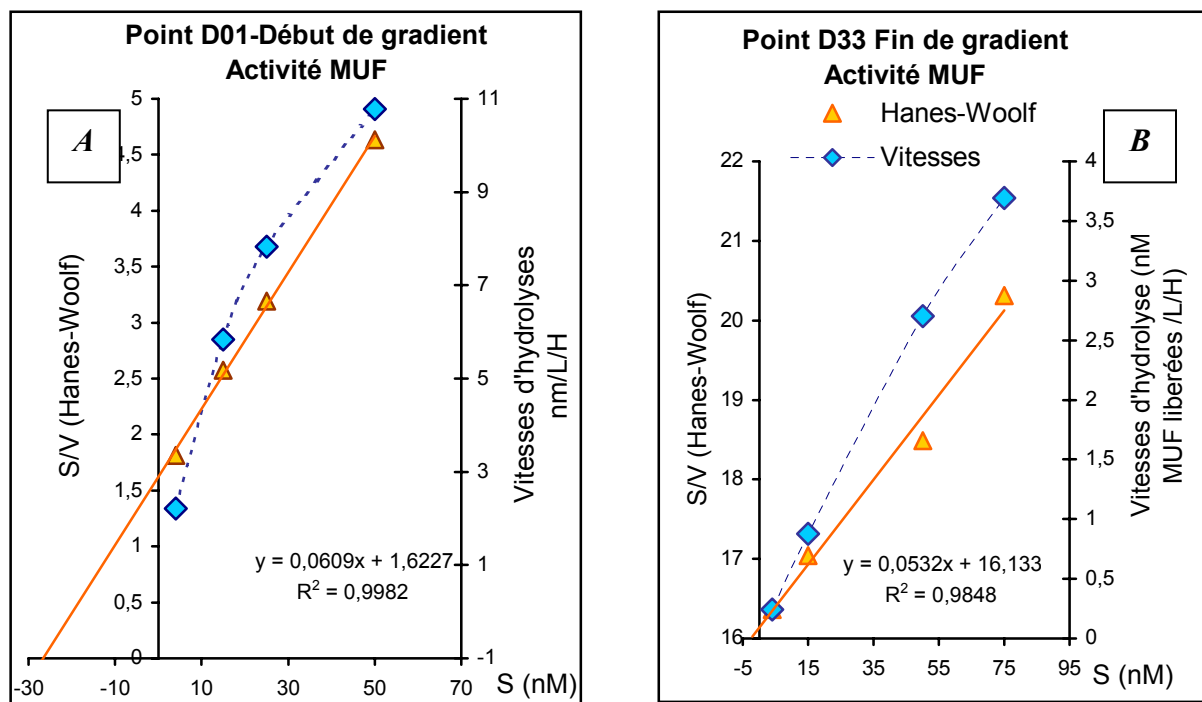


Figure 12 A,B- Représentations de type Michaelis-Menten et Hanes Woolf des cinétiques concentration réalisées aux points D01 et D33.

Les Vmax apparents calculés à partir de ces cinétiques sont représentés dans le tableau ci dessous:

Vmax app. en nM/L/H	Vmax apparent déterminé par Kinetics	Vmax apparent déterminés par linéarisation de type Hanes-Woolf
Point D01	16,42	16,77
Point D33	18,79	16,14

Les valeurs des vitesses d'hydrolyse bien supérieures au point D01 par rapport à D33, et les valeurs des Vmax apparents comparables montreraient un contrôle de l'activité hydrolytique par l'effectif bactérien. Cette hypothèse pourra être vérifiée lorsque l'on disposera des données de décompte bactérien.

COMPARAISON DES METHODES MUF ET TG* : VITESSES ET CINETIQUES CONCENTRATION LE LONG D'UN GRADIENT DE MATIERE.

Les vitesses d'hydrolyse du substrat MUF-Oléate sont comparées aux vitesses d'hydrolyse du substrat TG*. Les méthodes sont comparées sur deux expériences, une expérience de mesure d'activités et une expérience de comparaison sur des cinétiques concentration.

COMPARAISON DES ACTIVITES TG* ET MUF MESUREES LE LONG D'UN GRADIENT DE MATIERE ORGANIQUE.

Le gradient utilisé est celui de la baie de Dumbéa. Pour chaque point du gradient. La vitesse d'hydrolyse des substrats est mesurée avec la méthode MUF-Oléate et avec la méthode TG*. J'ai calculé, pour chaque point, le rapport entre la vitesse d'hydrolyse du MUF-Oléate et celle du TG* (Vitesse exprimée a des nanomoles de liaisons ester hydrolysées par litre et par heure) (Figure 13).

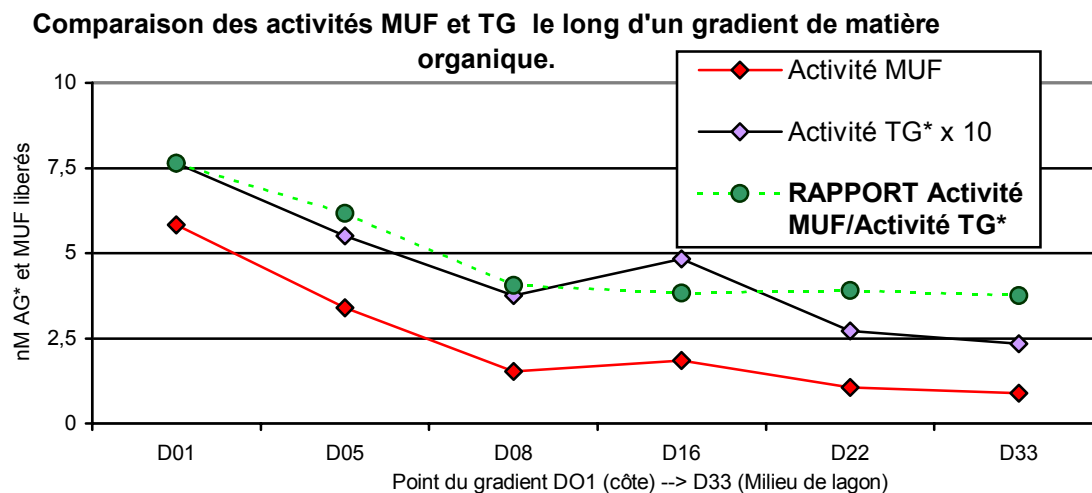


Figure 13- Vitesses d'hydrolyses MUF et TG* comparées le long d'un gradient de MO.

La figure 13 montre que les vitesses d'hydrolyse mesurées par la méthode MUF sont plus fortes que les activités TG*. De plus, tout comme la méthode MUF l'avait montré sur la figure 12, la méthode TG* permet de mettre en évidence un gradient d'activité d'hydrolyse

décroissant entre D01 et D33 (l'activité particulière du point D16 est également mise en évidence par la méthode TG*).

Le rapport entre les activités MUF et TG* passe de 7,5 à 4 entre les 3 premiers points de la radiale (D01 – D05 – D08) montrant une décroissance plus rapide de l'activité MUF par rapport à l'activité TG*. Pour les points les plus oligotrophes (D08, D16, D22 et D33) le rapport des activités est constant à une valeur comprise entre 3,76 et 4,05, les activités d'hydrolyse mesurées par la méthode MUF sont donc 4 fois plus fortes que celles mesurées par la méthode TG*. La matière organique est plus diluée pour ces 4 points. La constance du rapport peut signifier que malgré son manque de spécificité, le MUF oléate mesure, à un facteur multiplicatif près, les mêmes activités que la méthode TG*. En revanche, pour les milieux plus riches D01 et D05 il y a une forte probabilité d'être en présence d'enzymes peu spécifiques capables de cliver le MUF-Oléate augmentant ainsi le rapport entre les activités MUF et TG*.

COMPARAISONS DES CINETIQUES CONCENTRATION.

J'ai réalisé des expériences de cinétique concentration sur les points D01 et D33 en utilisant la méthode MUF-Oléate et la méthode TG*. 6 concentrations en substrat TG* ou MUF-Oléate ont été utilisées (Figure 14).

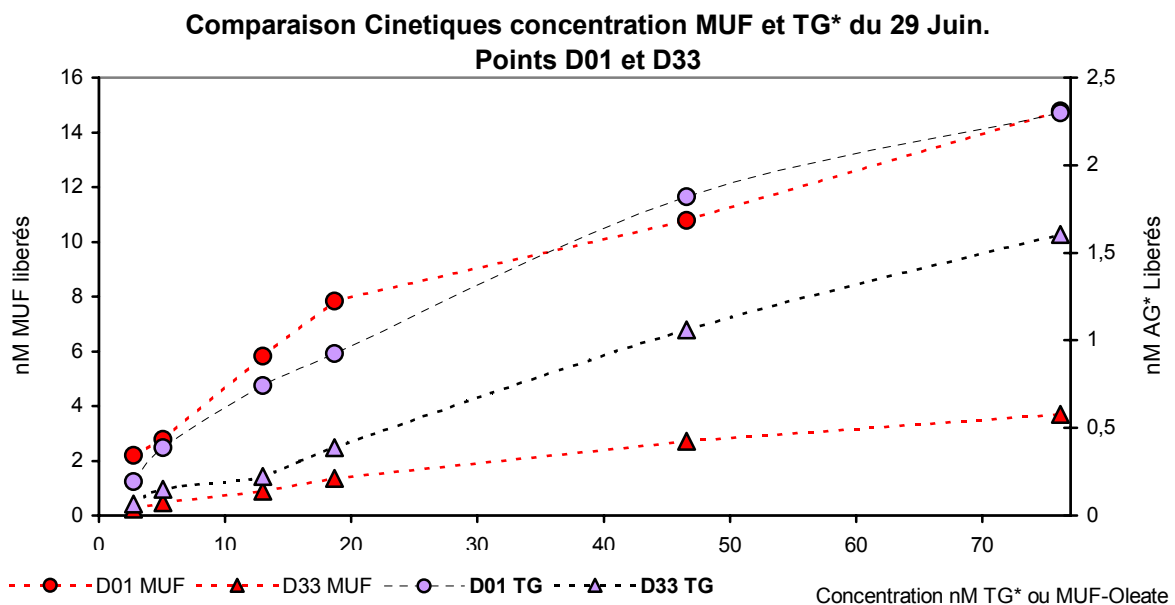


Figure 14- Cinétiques concentration MUF et TG* aux points D01 et D33.

La figure 14 permet d'observer les mêmes caractéristiques que pour la figure 13. Chaque méthode prise indépendamment permet de mettre en évidence une plus forte activité d'hydrolyse au point D01 qu'au point D33, les valeurs données par les deux méthodes sont cependant différentes. Une fois encore, la méthode MUF donne des vitesses d'hydrolyse plus forte que pour la méthode TG*.

Les valeurs des Vmax apparents aux points D01 pour les deux méthodes ont été calculées (Tableau ci dessous), ils montrent une plus grande labilité du substrat MUF par rapport au substrat TG*.

	V _{max} _{apparent} par Hanes Woolf	V _{max} _{apparent} par Kinetics
Méthode MUF	21.2	18.1
Méthodes TG*	4.2	3.9

COMPARAISON DES ACTIVITES CORALLIENNES

J'ai mesuré les vitesses d'hydrolyse et réalisé des cinétiques concentrations sur de l'eau prélevée près de polypes coralliens ou d'eau provenant du site eutrophe D01 (*Figure 15*).

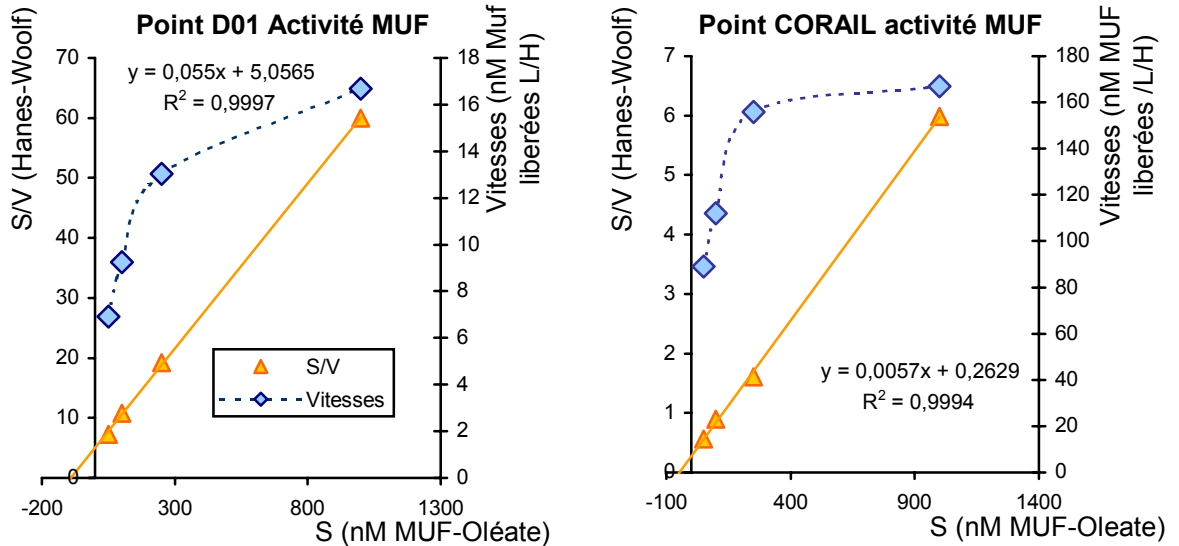


Figure 15- Cinétiques Concentration : comparaison des activités MUF entre Corail/D01.

La figure 15 met en évidence une activité hydrolytique très forte dans le corail par rapport au point D01 qui est déjà très eutrophe. Les Vmax apparents calculés sont indiqués dans le tableau ci dessous :

Vmax apparents exprimés en nM/L/H	Vmax apparent global calculé par Kinetics	Vmax apparent global calculé par linéarisation de Hanes-Woolf
Point D01	16,77	18,18
Point Corail	179,4	175,43

On sait que les polypes coralliens exsudent beaucoup de matière organique sous forme de mucus. Ils constituent donc un microsysteme naturel très eutrophe où les activités d'hydrolyse bactérienne mesurées seraient supérieures à celles régnant dans l'eau environnante.

Pour une série de points coralliens et une série de points provenant de l'eau environnante, les vitesses d'hydrolyse du substrat MUF-Oléate sont comparées aux vitesses d'hydrolyse du substrat TG* (Quantité de substrat utilisé=12.5nM équivalent à 12.5 nM de liaisons ester (MUF ou TG*)). Pour les deux méthodes et les deux expériences réalisées (sorties du 14 mai et du 6 juin), les valeurs des vitesses d'hydrolyse « Coralliennes » et « Environnantes » ainsi que leurs moyennes sont calculées. (*Figure 16 A,B,C,D*).

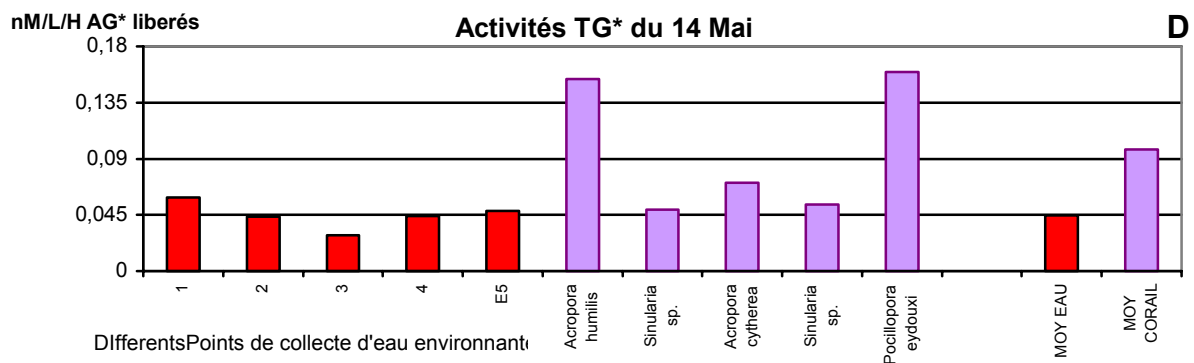
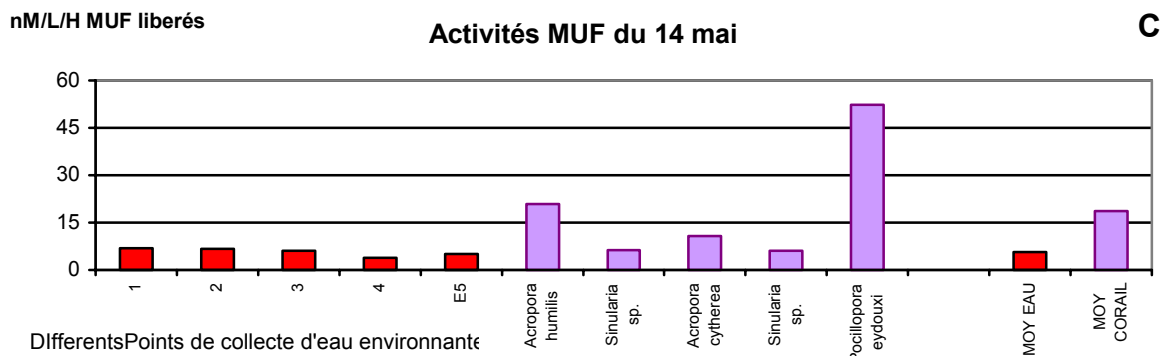
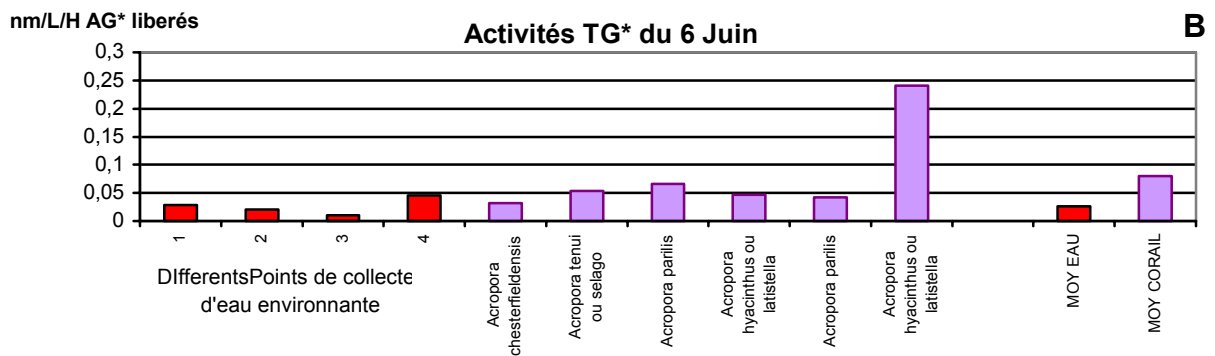
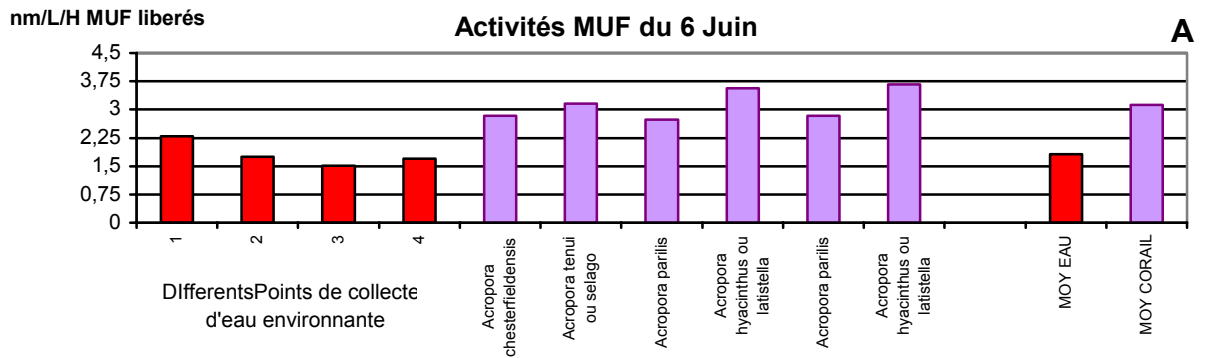


Figure 16-A,B,C et D -Histogrammes : Vitesses d'hydrolyses des substrats MUF et TG* le 6 et 14 Juin entre des sites coralliens et des points d'eau environnants.

Les figures 16 A,B et 16 C,D montrent que sur plusieurs mesures d'activité à proximité d'espèces différentes de polypes coralliens, les deux méthodes MUF et TG* confirment que les activités d'hydrolyse au niveau du corail sont toujours (Sauf point Eau 4 et Eau 1 méthode TG* du 6 et du 14 Juin respectivement) supérieures aux activités mesurées dans de l'eau environnante.

Encore une fois, on remarque que la méthode MUF-Oléate donne des valeurs d'activités toujours plus fortes que la méthode TG*. (facteur 2 à 10 environ).

EXPERIENCES DE CLASSES DE TAILLE

Ces expériences ont été réalisées avec la méthode MUF-Oléate. Un point corallien a été comparé avec un point d'eau environnante (*Figure 17*). La vitesse d'hydrolyse du MUF-Oléate est calculée pour chaque fraction.

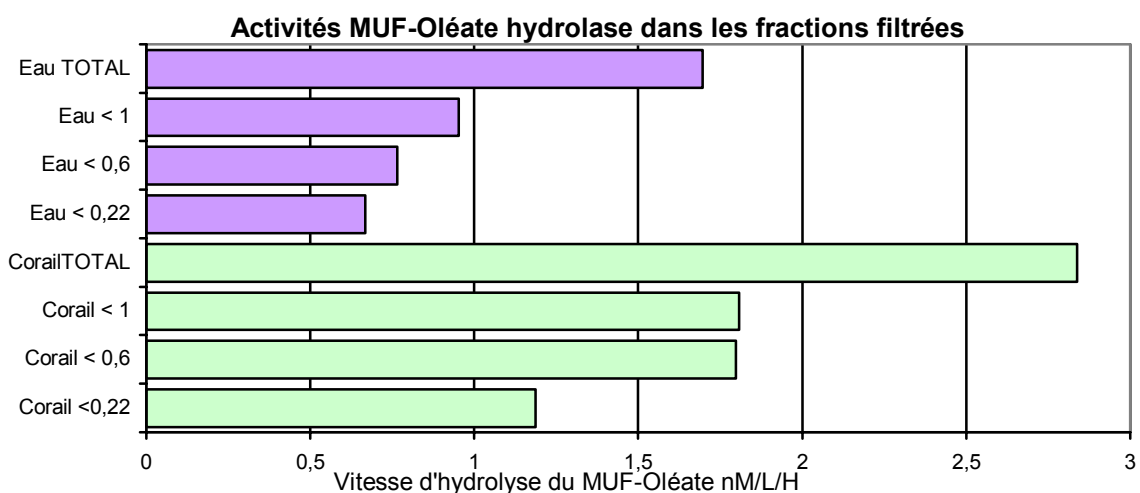


Figure 17-Activités des différents filtrats d'eau environnante et d'eau corallienne.

La figure 17 montre la répartition des activités hydrolytiques dans les fractions filtrées. On remarque que les activités bactériennes de l'eau sont, pour chaque fraction, inférieures aux activités du corail.

Les activités sont ensuite converties pour représenter les 4 fractions, libre, particulière, bactérienne et intermédiaire (*Figure 18*).

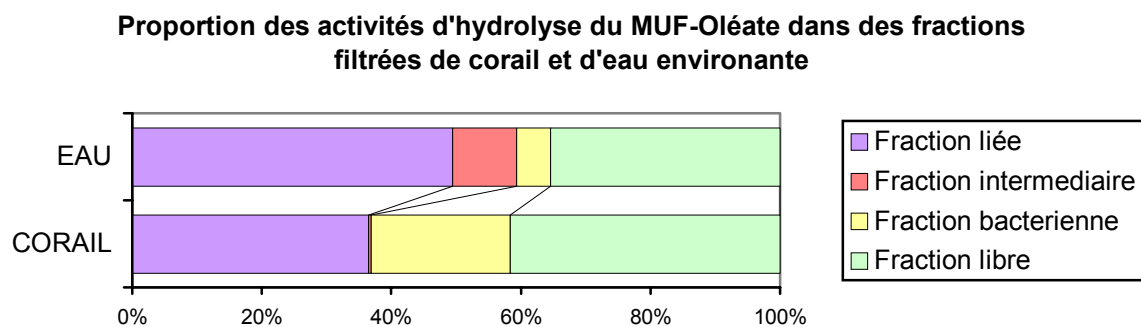


Figure 18-Localisation des activités converties.

La figure 18 montre que les activités ne sont pas réparties dans les mêmes fractions entre le corail et l'eau environnante. Alors que la fraction libre ne fait pas preuve de beaucoup

de variabilité en détenant entre 35 et 40% de l'activité totale pour l'eau et le corail respectivement, on remarque qu'il y a quasi disparition de l'activité intermédiaire dans le corail (10% pour l'eau 1% pour le corail). L'activité bactérienne est beaucoup plus forte dans le corail que dans l'eau (20% de l'activité totale pour le corail contre 5% pour l'eau environnante), ceci pourrait confirmer la thèse que l'écosystème corallien mobilise plus de bactéries.

Finalement, les activités enregistrées dans la fraction particulaire sont, par comparaison, plus importantes dans l'eau que dans le corail. Les bactéries libres joueraient donc un rôle prédominant par rapport aux bactéries fixées dans le recyclage de la MO lipidique du milieu corallien de Nouvelle Calédonie.

CONCLUSION

Ces résultats permettent de donner un premier aperçu de la pertinence de la méthode TG* par rapport à la méthode MUF pour ce qui est de l'évaluation des vitesses d'hydrolyse des lipides marins. Dans toutes les expériences menées, les activités TG* lipase étaient toujours inférieures à celles enregistrées avec la méthode MUF. Le calcul des rapports entre les activités n'est pas constant et oscille entre une valeur comprise entre 3 et 10. Finalement, il apparaît que les deux méthodes seraient capables de mettre en évidence les mêmes différences entre plusieurs écosystèmes, d'un point de vue qualitatif mais pas quantitatif.

Ces premiers résultats peuvent permettre de statuer sur la non spécificité de la méthode MUF, bien que la méthode TG* soit toujours en cours de validation. Le MUF-Oléate semble en effet être plus facilement clivé que les triglycérides naturels, puisque la méthode MUF génère des vitesses d'hydrolyse supérieures. Le MUF-Oléate est un substrat pouvant donc être utilisé en routine, assez facilement pour caractériser ou différencier grossièrement des écosystèmes naturels. En revanche, avec l'utilisation de ce substrat on risque de surévaluer les valeurs des constantes d'hydrolyse des lipides puisque la liaison ester de la MUF-Oléate apparaît plus labile que celles des substrats naturels.

La méthode TG*, est plus lourde à mettre en place que la méthode MUF, elle requiert l'utilisation de produits radioactifs pas toujours commodes à utiliser *in situ* dans des milieux naturels. Cette méthode est de plus limitée à des expériences où les gammes de concentration en TG* utilisées sont faibles. Le TG*, peu soluble dans l'eau, de mer ne permet en effet pas l'utilisation de plus de 100nM de liaisons ester TG* contre plus de 5000nM pour la méthode MUF. La méthode TG* permet donc de travailler sur des concentrations traces naturelles, mais pas en concentrations saturantes de tous les systèmes enzymatiques en présence. Cette méthode, spécifique, couplée avec la possibilité d'analyser simultanément la concentration naturelle en TG* dans le milieu (méthode IATROSCAN), semble cependant plus à même d'être utilisée pour calculer des vitesses réelles d'hydrolyse naturelle.

En ce qui concerne la caractérisation de l'écosystème corallien, il semblerait que ce milieu constitue un microsysteme riche en MO et mobilisant les bactéries libres en son sein.

Pour conclure, une des ouvertures ambitieuses de ce travail pourrait être de dégager des mesures d'activités hydrolytiques bactériennes réelles par une approche de biologie moléculaire. Cette approche consisterait à isoler et caractériser les fonctions génétiques ainsi que les systèmes de régulation liés à l'expression de l'activité lipase pour chaque population bactérienne potentiellement apte à les exprimer. Il pourrait donc être possible de calculer une activité hydrolytique par cellule qui tiendrait compte de la diversité des composantes de la communauté bactérienne du milieu. Ces travaux sont actuellement en cours de développement au sein du laboratoire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Beisson F. 1999: Use of naturally fluorescent triacylglycerols from *Parinari glaberrimum* to detect low lipase activities from *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of Lipid Research*. Vol 40: 2313-2321.
- Beisson F. et al. 2000: Methods for lipase detection and assay : a critical review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol* 2000. 133-153.
- Bligh E.G & Dyer W.J. 1959: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917
- Chrost, 1991: Microbial enzymes in aquatic environments. *Springer Verlag*, New York
- Foreman, C., Franchini, P., Sinsabaugh R., The trophic dynamic of riverine bacterioplankton 1998: Relationship among substrate availability, ectoenzyme kinetics, and growth. *Limnology Oceanography*, 43, 1344-1352.
- Garret and Grisham. 2000: Biochimie, Traduction de la deuxième édition. Ed. DeBoeck Université.
- Gordillo J. et al. 1998: Effect of light intensity, CO₂ and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*.
- Goutx M. 1994: Les classes de lipides : Indices biochimiques des flux de matière dans le front Alméria-Oran. *Océanis*. Vol 20.6 121-138.
- Hoppe H-G. 1983: Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water : measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Marine Ecology Progress Series* Vol 11:299-308.
- Le Calvez F. 1999: Etude qualitative et quantitative du contenu lipidique de larves cypris de *Balanus amphitrite* par la technique chromatographique IATROSCAN MK5. Rapport de Maîtrise de Biochimie. Université de Caen.
- Pascale M. 2000: Dénombrement de bactéries par la méthode DAPI et essais de mesure de l'activité lipase par la méthode MUF-Oléate, expérimentation dans le programme EURAPP. Rapport de Fin de maîtrise. Université de la Méditerranée.
- Rath J., C. Schiller and G.J. Herndl 1993: Ectoenzymatic activity and bacterial dynamics along a trophic gradient in the Caribbean Sea. *Marine Ecology - Progress Series*, 102(1-2): 89-96.
- Riemann, L., Steward, G. F., and Azam, F. 2000: Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Applied Environmental Microbiology*, 66. 578-587.
- Striby L. 2000: Biogéochimie de la matière organique dans deux écosystèmes marins. Cas d'une structure unidimensionnelle verticale (mer Ligure) et d'une structure physique frontale (Front Alméria-Oran). Variations spatio-temporelles de la fraction lipidique à petite échelle. Université de la Méditerranée, Marseille.
- Striby L. Lafont R. and Goutx M. 1999: Improvement in the Iatroscan thin layer chromatographic-flame ionisation detection analysis of marine lipids. Separation and quantification of monoacylglycerols and diacylglycerols in standards and natural samples. *Journal of Chromatography A* : 371-380.
- Torréton J-P.2000: Nutrient stimulation of bacterioplankton growth in Tuamotu atoll lagoons. *Aquatic Microbial Ecology*. Vol 21 : 125-137

TRAVAIL EFFECTUE

Le stage INSA/DEA que j'ai effectué concerne la mesure des activités lipolytiques. Un protocole basé sur l'utilisation d'un substrat triglycéride tritié et le dosage des acides gras libres marqués produits de l'hydrolyse a été récemment mis au point au laboratoire. Compte tenu de ces considérations, l'objectif de mon stage a été:

- Effectuer des mesures d'activité lipase par les communautés bactériennes naturelles du milieu marin en utilisant une méthode dite classique, celle ci utilisant un analogue fluorescent de triglycéride, le MUF- Oléate.
- Mesurer en parallèle, sur les mêmes échantillons, l'activité lipase par une méthode innovante utilisant des triglycérides marqués au Tritium, en collaboration avec Nicolas Bourguet étudiant en thèse.
- Mesurer la concentration en substrat naturel afin de convertir les mesures d'activité en un taux d'hydrolyse réel de la matière organique présente dans le milieu. Cette mesure se fait suivant une méthode d'analyse des lipides préalablement extraits des échantillons.
- Tester la pertinence de la nouvelle méthode par rapport à la méthode MUF-Oléate dans différents sites marins.

Pour atteindre ces objectifs j'ai participé à deux missions en mer au cours desquelles ont été effectuées des mesures d'activité enzymatiques et des récoltes d'échantillons:

- Mission océanographique DYFAMED en mer Méditerranée.
 - Mission océanographique NOUMEA dans le lagon Néo-Calédonien.
-