

ISSN 1424-4993

Ecole doctorale en microbiologie
Piora, 2007

Triangle Azur
Universités de Genève Neuchâtel Lausanne

Actes et contributions scientifiques

MILIEUX ALPINS ET CHANGEMENT GLOBAL

Vol. 2

**Diversité et mobilité des algues de neige
dans les Alpes suisses**

par

Yannick Bischoff

*sous la responsabilité de
Raffaele Peduzzi, Mauro Tonolla et Renata Boucher-Rodoni*

Edizioni Centro Biologia Alpina
Piora, 2007

Liste des abréviations

<i>ACP</i>	Analyse en Composantes Principales
<i>ADN</i>	Acide désoxyribonucléique
<i>bp</i>	paire de bases
<i>CO₂</i>	dioxyde de carbone
<i>DGGE</i>	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ou Electrophorèse sur Gel en Gradient de Dénaturation
<i>EMBL</i>	European Molecular Biology Laboratory
<i>FISH</i>	Fluorescence In Situ Hybridization ou Hybridation in situ par fluorescence
<i>FNS</i>	Fonds national suisse de la recherche scientifique
<i>GE</i>	Genève (canton suisse)
<i>GR</i>	Grisons (canton suisse)
<i>ICM</i>	Institut Cantonal de Microbiologie (Bellinzona, Tessin)
<i>LD</i>	Limite de détection
<i>min</i>	minutes
<i>PAR</i>	Photosynthetically Available Radiation ou radiation active dans la photosynthèse
<i>PCR</i>	Polymerase chain reaction ou Réaction de Polymérase en Chaîne
<i>Rpm</i>	Rounds Per Minute ou nombre de rotations par minute
<i>SAG</i>	Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen, collection d'algues de l'université de Göttingen
<i>SLF</i>	Institut fédéral pour l'étude de la neige et des avalanches (SLF) à Davos (GR)
<i>TI</i>	Tessin (canton suisse)
<i>UV</i>	Ultra Violet
<i>WSL</i>	Institut fédéral de recherches sur la forêt, la neige et le paysage (WSL) à Birmensdorf (ZH)
<i>ZH</i>	Zürich (canton suisse)

Résumé

La neige abrite de nombreux microorganismes dont les algues de neige. Les algues de neige sont notamment connues pour colorer la neige de différentes couleurs. Une étude phylogénétique (18S ADNr) de trois échantillons de neige rouge prélevés dans les Alpes suisses a montré la présence de 18 taxons correspondant aux genres *Chlamydomonas*, *Chloromonas*, *Trebouxia* et *Stichococcus*. Un taxon important (28 clones sur 106 au total) ne correspond à aucune séquence présente dans les banques de clones EMBL. Il pourrait s'agir d'une nouvelle espèce au sein ou proche du genre *Chloromonas*.

Les cellules végétatives de nombreuses algues de neige sont munies de flagelles et peuvent se déplacer activement en milieu liquide. Par contre, la configuration microscopique du manteau neigeux, la répartition et la dynamique de l'eau de fonte ne leur permet pas de se déplacer librement dans le manteau neigeux. La mobilité des algues de neige dans le manteau neigeux et sur de grandes distances a été étudiée en milieu naturel et en laboratoire. La vitesse maximale de progression de *Chlamydomonas augustae* (culture) en milieu liquide à 0 °C s'élève à 0,3 cm/min. Cette vitesse est suffisante pour permettre des déplacements dans de l'eau immobile, mais ne leur permet pas de nager contre l'écoulement de l'eau de fonte dans la neige. L'importance des processus de transport passifs comme le transport par le vent et avec l'écoulement d'eau de fonte ont été démontrés. Une nouvelle proposition sur le cycle de vie annuel des algues de neige est proposé.

Summary

The snow cover constitutes an habitat for numerous microorganisms and snow algae. Snow algae are well known for colouring the snow surface in different colours. A 18S rDNA of three red snow samples from the Swiss Alps has shown the presence of snow algae from the genus *Chlamydomonas*, *Chloromonas*, *Trebouxia* and *Stichococcus*. An important taxa (28 clones from 106) corresponded to no sequence from the EMBL library. It could constitute a new taxa inside or close to the genus *Chlamydomonas*.

Vegetative cells of most snow algae are provided with two flagella and can actively move in a liquid environment. On the contrary, the microstructure of the snow, the repartition and the dynamic of liquid water in the snow cover impede the free positioning of snow algae. The mobility of snow algae inside the snow cover and over larger distances have been studied in the natural environment as well as in the laboratory. The maximal progression speed of *Chlamydomonas augustae* (cultivated) in a liquid media was 0.3 cm/min. This allows displacements in still water, but is not sufficient to progress against the meltwater fluxes. The importance of other passive transport mechanisms such as wind transport and meltwater transport have been demonstrated. A new proposition on the annual life cycle of snow algae has been established.

Table des matières

RESUME	5
1 Introduction	11
1.1 Contexte, hypothèses et objectifs	13
1.2 État de la recherche	14
1.2.1 La neige est un milieu vivant	14
1.2.2 Cycle de vie des algues de neige	15
1.2.3 Alternatives au cycle de vie classique	19
1.3 Notre approche	20
2 Matériel et Méthodes	21
2.1 Expériences en milieu naturel	23
2.1.1 Sites expérimentaux	23
2.1.2 Monitoring des températures de l'air et de la neige	24
2.1.3 Profils de neige et échantillonnage	25
2.1.4 Écoulement de l'eau dans la neige	29
2.1.5 Transport par le vent	30
2.2 Analyse des échantillons de neige	32

2.2.1	Observations microscopiques	32
2.2.2	Comptages	32
2.2.3	Analyse chimique	36
2.3	Phylogénie	38
2.3.1	Sites d'échantillonnage	38
2.3.2	Extraction, amplification, purification et stockage de l'ADN	40
2.3.3	Clonage, séquençage et analyse phylogénétique	40
2.3.4	Electrophorèse sur Gel en Gradient de Dénaturation	41
2.4	Expériences en microcosme	42
2.4.1	Cultures d'algues	42
2.4.2	Mobilité	45
2.4.3	Phototaxis	48
3	Résultats	51
3.1	Diversité biologique de la neige	53
3.1.1	Diversité génétique	53
3.1.2	Diversité morphologique	57
3.1.3	Structure des populations d'algues de neige	61
3.2	Mobilité des algues de neige en milieu naturel	67
3.2.1	Conditions environnementales	67
3.2.2	Composition chimique du manteau neigeux	72
3.2.3	Développement des algues de neige sur le terrain	81
3.2.4	Relations entre les paramètres physico-chimiques du manteau neigeux et le développement des algues de neige	83

3.3	Transports passifs en milieu naturel	86
3.3.1	Flux latéraux	86
3.3.2	Transport par le vent	89
3.4	Mobilité des algues de neige en laboratoire	91
3.4.1	Cultures	91
3.4.2	Mobilité en milieu liquide	92
3.4.3	Mobilité dans la neige	93
4	Discussion	95
4.1	Contributions scientifiques du projet	97
4.1.1	Évaluation de la diversité biologique de la neige	97
4.1.2	Comportement des algues de neige en milieu naturel	98
4.1.3	Comportement des algues de neige en laboratoire	99
4.1.4	Transport sur de grandes distances	100
4.2	Proposition sur la circulation des algues de neige	102
4.3	Principales difficultés rencontrés	104
4.4	Perspectives de recherche	106
5	Conclusion	109
	Remerciements	119
	Publications et formation	121
	Liste des figures	123
	Liste des tableaux	126
	ANNEXES	127

Chapitre 1

Introduction

1.1 Contexte, hypothèses et objectifs

La neige, blancheur éternelle, synonyme de pureté n'est ni immuable, ni pure! Le manteau neigeux subit de constantes modifications selon les conditions météorologiques et abrite une multitude d'organismes vivants. Les concentrations peuvent être telles qu'une coloration visible de la neige survient (figure 1.1). Les organismes vivants de la neige constituent un écosystème complet dans lequel les algues de neige jouent le rôle fondamental de producteurs primaires. Les populations d'algues de neige présentes en Suisse ont probablement été parmi les premières étudiées puisqu'elles ont déjà été reportées au 19^{ème} siècle par Perty (1852) d'abord puis par Chodat (1896).

Les algues de neige parviennent à survivre aux conditions extrêmes retrouvées dans la neige et aux changements continus grâce à un cycle de vie particulièrement bien adapté. Si les algues de neige passent le gros de l'hiver sous la neige au niveau du sol, elles doivent au printemps migrer à travers la couverture neigeuse vers la surface de la neige afin de bénéficier de la lumière dont elles ont besoin pour se reproduire.

Cette migration vers la surface est en contradiction avec les connaissances actuelles sur les propriétés physiques du manteau neigeux. En effet, si au printemps les algues sont munies de deux flagelles qui leur permettent de se déplacer en milieu liquide, la dynamique de l'eau de fonte et la répartition de l'eau liquide entre les cristaux de neige font obstacle à la progression des algues.

Le premier objectif de cette étude était d'obtenir une image de la diversité des populations d'algues de neige des Alpes suisses à l'aide d'observations et d'outils de microbiologie moléculaire. Le second objectif était d'apporter un nouvel éclairage sur la mobilité des algues de neige dans le manteau neigeux.

Les hypothèses de départ sur lesquelles repose cette étude sont les suivantes :

- La diversité des populations d'algues de neige dans les Alpes suisses est inconnue. Des différences ou des similitudes entre les populations du Nord des Alpes et du Sud des Alpes peuvent fournir des indications sur le transport à grandes distances des algues de neige.
- La migration active des algues de neige à travers le manteau neigeux est difficile et ne suffit pas à expliquer le cycle de vie des algues de neige.
- D'autres transports passifs tels que le transport par le vent et avec l'écoulement de l'eau de fonte sont probables, mais doivent être démontrés.



FIG. 1.1 – Neige rouge au Piatto della Miniera (TI) le 15 juillet 2004. Photo : Mauro Tonolla.

1.2 État de la recherche

1.2.1 La neige est un milieu vivant

Le manteau neigeux est un milieu à priori hostile à la vie à cause des conditions extrêmes qui y règnent tant d'un point de vue physique que chimique. Tout organisme vivant dans la neige est soumis 1) à des températures très basses en hiver, 2) à un rayonnement ultra-violet très important en surface et à l'obscurité au dessous d'un manteau neigeux épais, 3) à un environnement pauvre en nutriments et 4) à de constantes modifications du milieu pouvant aller jusqu'à la disparition complète du milieu en été. En été, l'absence de neige peut conduire les organismes à devoir faire face à des températures très élevées et à une absence d'eau.

Malgré les conditions difficiles qui y règnent, une multitude d'organismes sont connus pour y vivre (Hoham and Duval, 2001; Leya et al., 2000). Ces organismes forment un écosystème complet. Les algues de neige jouent le rôle de producteurs primaires et produisent leur énergie et composés primaires à partir de lumière, de CO_2 et de nutriments minéraux. Les composés organiques qu'elles produisent sont essentiels pour les autres organismes de l'écosystème tels que rotifères, protozoaires, insectes, vers ou araignées. Finalement, de nombreuses bactéries et champignons participent à la minéralisation des composés organiques produits par les producteurs primaires et consommateurs (Hoham, 1989; Hoham et al., 1993). Sans les algues de neige, la vie des autres organismes ne serait pas possible.

La présence d'algues de neige provoque dans certains cas une coloration de la neige. Une coloration rouge est typique des zones alpines très exposées au rayonnement solaire tandis qu'une couleur verte apparaît plus régulièrement dans les zones boisées là où le rayonnement solaire est réduit et les nutriments plus nombreux. Les algues de neige ont été signalées dans toutes les régions alpines du monde (Hoham and Duval, 2001) et dès 1850 en Suisse (Chodat, 1896; Perty, 1852). La diversité des algues de neige est élevée puisque plus de 350 espèces différentes sont connues (Kol, 1968). Les dernières avancées dans l'étude des populations de neige utilisent des outils de biologie moléculaire comme l'ont fait par exemple Hoham avec les algues de neige (analyse du gène 18S) (Hoham et al., 2002) et Segawa avec les populations bactériennes (analyse du gène 16S) (Segawa et al., 2005).

1.2.2 Cycle de vie des algues de neige

Les algues de neige ont su adapter leur cycle de vie aux conditions du manteau neigeux. Les paragraphes suivants décrivent le cycle théorique d'algues de neige flagellées telles que *Chlamydomonas nivalis* communément admis dans la littérature (figure 1.2). Nous verrons aussi en détail les raisons qui nous font croire que certains aspects de ce cycle de vie nécessitent une étude plus approfondie.

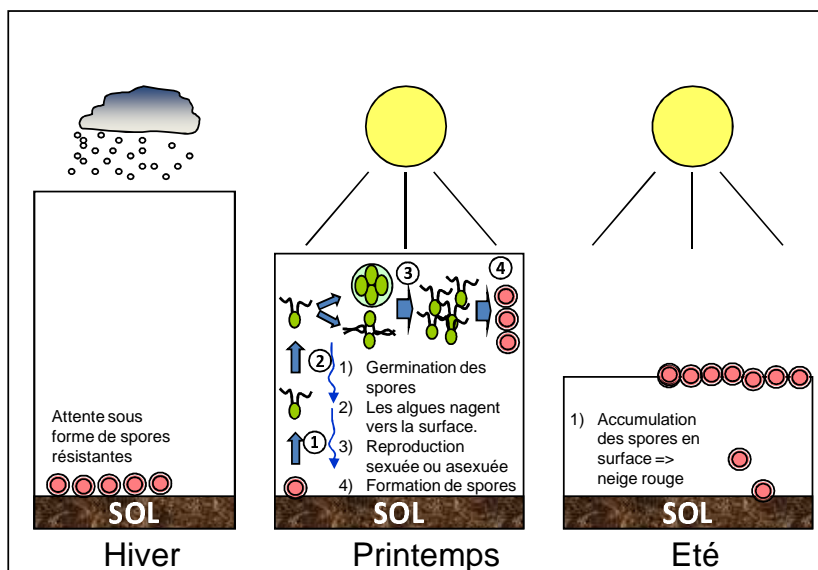


FIG. 1.2 – Cycle de vie typique des algues de neige tel que classiquement décrit dans la littérature.

Période de dormance

Avant les premières chutes de neige, en automne, les algues de neige reposent à la surface du sol sous la forme de cellules sphériques d'un diamètre de 15 à 50 μm : les spores (Grinde, 1983). En absence de neige, les températures

à la surface du sol peuvent atteindre des températures très basses au début de l'hiver (absence de l'isolation du manteau neigeux) ou très hautes en été. Les spores d'algues de neige sont extrêmement résistantes. Des cellules se sont révélées viables après une exposition à -196°C et après des années de sécheresse (Hoham and Duval, 2001). La résistance aux températures très basses est due à la production d'acides gras non saturés qui augmentent la fluidité des membranes (Bidigare et al., 1993). Les spores résistent aussi à l'absence totale d'eau (Hoham and Duval, 2001).

Pendant le gros de l'hiver les algues de neige restent sous forme de spores à la surface du sol sous le manteau neigeux. Les conditions y sont clémentes puisque la température reste stable à 0°C . Par contre, il n'y a que très peu de lumière et l'eau liquide est absente. La transmission de la lumière dans la neige dépend de la longueur d'onde et des propriétés de la neige (densité, contenu en eau liquide, taille et forme des grains). Plus de la moitié du rayonnement ultraviolet ($\lambda < 400\text{nm}$) est absorbée dans les premiers centimètres du manteau neigeux. Les UVs ne sont plus détectables à 8 cm de profondeur (Gorton and Vogelmann, 2003). Sous une couverture neigeuse de 110 cm , au maximum 1% de la radiation active pour la photosynthèse (PAR) peut atteindre le sol (Curl et al., 1972).

Germination et migration

Au printemps, les spores germent et donnent naissance à quatre cellules filles. Ces cellules végétatives sont vertes et équipées de deux flagelles qui les rendent mobiles en milieu liquide (Kawecka and Drake, 1978). La germination peut être due à 1) l'augmentation de la radiation PAR qui arrive au niveau du sol à cause de la diminution de l'épaisseur de neige et à la modification de la microstructure de la neige (Warren, 1982), 2) à la présence d'eau liquide et 3) au pulse ionique de l'eau de fonte agissant comme un signal chimique (Davies et al., 1987).

Après germination, les cellules végétatives se trouvent toujours au niveau du sol mais n'ont pas suffisamment de lumière pour pouvoir se reproduire. Elles doivent alors migrer vers la surface de la neige. Les mécanismes de la migration ne sont pas encore suffisamment étudiés. L'hypothèse communément admise est que les algues de neige remontent à contre courant ou dans un film d'eau entourant les grains de neige (Grinde, 1983; Hoham et al., 1998; Painter et al., 2001). La neige humide est un milieu poreux caractérisé par la présence simultanée des trois phases de l'eau. La glace forme la matrice solide du matériau tandis que les pores contiennent de l'eau liquide et de la vapeur d'eau. La forme de la matrice solide, c'est à dire la microstructure de la neige, n'est pas stable dans le temps. La métamorphose de la neige, due aux gradients de température et de pression de vapeur transforment les fines structures des cristaux de neige fraîche en cristaux plus grands et arrondis (Colbeck, 1987; Fierz and Baunach, 2000; Baunach et al., 2001).

Dans la neige humide, le flux d'eau de fonte n'est homogène ni au cours du temps ni dans l'espace. Les flux préférentiels sont des zones saturées en eau ou l'eau s'écoule rapidement (Schneebeli, 1995; Pomeroy and Brun, 2001). A

cause de la stratification du manteau neigeux (Pielmeier, 2003), l'écoulement n'est pas seulement vertical, mais peut aussi parcourir de grandes distances horizontalement si une couche imperméable telle qu'une couche de glace ou une barrière capillaire est présente (Jordan, 1994; Waldner, 2002).

La répartition microscopique de l'eau liquide et de sa dynamique dépend du contenu en eau liquide et des caractéristiques des grains de neige. Cette répartition et cette dynamique interfère avec la mobilité des microorganismes présents dans la neige humide. L'écoulement de l'eau dans la neige est très difficilement mesurable et n'est encore qu'en partie connu. Il est toutefois possible d'obtenir une image de la répartition de l'eau liquide autour des grains de neige en faisant geler très rapidement un échantillon de neige humide et en faisant des coupes minces de l'échantillon. Les zones où l'eau était liquide contiennent des petites bulles d'air et peuvent être différenciées de la glace (figure 1.3). On découvre alors qu'avec un contenu en eau normal (4-5% du volume), la tension de surface retient 80% de l'eau liquide dans des petits menisques se formant aux points de contacts entre les grains (Brzoska et al., 1998). En considérant que les 20% restants constituent le fameux film d'eau dans lequel les algues de neige sont supposées progresser, on constate que l'épaisseur du film d'eau ne peut dépasser quelques micromètres d'épaisseur (en considérant pour modèle de la neige un arrangement de sphères de diamètre égal au diamètre moyen des grains de neige). Des résultats semblables ont été obtenus par Wakahama (1968). Or les cellules végétatives des algues de neige mesurent en moyenne 10 à 30 μm , soit au minimum trois fois plus que l'épaisseur du film d'eau. L'hypothèse que les algues de neige nagent librement dans le film d'eau entourant les cristaux de glace semble alors improbable.

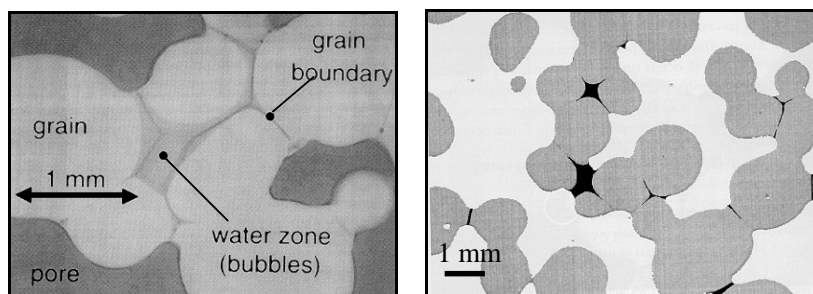


FIG. 1.3 – Visualisation de la répartition de l'eau liquide dans de la neige humide. À gauche, image originale, et à droite après traitement d'image (Brzoska et al., 1998).

En cas de contenu en eau liquide plus élevé comme c'est le cas à l'intérieur des flux préférentiels, l'eau liquide occupe une large part des pores, voire les remplit complètement. Dans ce cas, le flux d'eau est très rapide, de l'ordre de 12 à 30 mm/s (Wakahama, 1968). Cette valeur représente la vitesse d'écoulement de l'eau dans les pores et ne doit pas être confondue avec les vitesses de percolation telles qu'observées à l'aide de traceurs. La vitesse de progression en milieu liquide des algues du genre *Chlamydomonas* sont quant à elles de l'ordre de 0.1 à 0.2 mm/s , soit 60 à 300 fois moins rapides que les vitesses d'écoulement de l'eau (Harris, 1989). Il semble donc très difficile que les algues de neige puissent nager vers la surface à contre courant.

Il y a cependant un cas où la neige est entièrement saturée en eau et où l'eau est immobile. C'est le cas dans la zone capillaire que recouvre une couche imperméable (sol, croûte de glace) ou une barrière capillaire (zone à gros grains recouvrant une zone à grains fins). L'épaisseur maximale d'une telle zone est de l'ordre de 20 cm (Coléou et al., 1999). Dans cette zone, les algues de neige sont libres de se déplacer à leur guise, mais au maximum jusqu'à 20 cm du sol. Or, des algues de neige peuvent être observées avec des épaisseurs de neige supérieures.

Croissance

Que ce soit par migration à travers le manteau neigeux ou par d'autres processus que nous tenterons de découvrir dans cette étude, les algues de neige se retrouvent proches de la surface de la neige à une hauteur offrant suffisamment de lumière visible pour la photosynthèse et pas trop de rayonnement ultraviolet. C'est alors que la phase de reproduction est la plus active. La reproduction peut être sexuée ou asexuée (Harris, 1989).

Pendant cette période, la disponibilité des nutriments est un point critique. En effet, le manteau neigeux est considéré comme étant un milieu oligotrophe et les concentrations en nutriments sont en général très basses (Jones, 1991). La provenance des éléments chimiques est soit une liaison avec les cristaux de glace lors de leur formation dans l'atmosphère, soit des dépositions sèches ou humides, soit encore un apport de particules par le vent ou des animaux (Tranter and Jones, 2001). L'activité biologique du sol peut être source d'éléments carbonés comme le CO_2 ou azotés (nitrification/dénitrification) (Jones, 1999). Les composés les plus fréquemment mesurés dans la neige sont Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , Cl^- , NO_3^- et SO_4^{2+} . La plupart des analyses chimiques de la neige (Davies et al., 1987; Kuhn, 2001; Sigg and Netfel, 1987) ne mentionnent pas les phosphates ou alors ils sont inférieurs aux limites de détection des méthodes utilisées (Stoekli et al., 2002). Hoham and Duval (2001) mentionnent des concentrations de phosphates de l'ordre de 1.6 à 2.2 $\mu\text{g}/\text{l}$ de P- PO_4 (jusqu'à 18 $\mu\text{g}/\text{l}$ en forêt). Les phosphates sont donc probablement un facteur limitant de la croissance des algues. Les concentrations varient aussi au cours du temps. Par exemple, lors du début du processus de fonte, une grande part des ions facilement échangeables sont emportés de sorte que les premières vagues d'eau de fonte sont très concentrées (pic ionique) (Devarences, 1994). Ensuite, les concentrations de l'eau de fonte diminuent au fil du temps (Davies et al., 1987). Attention, ce phénomène n'est observable que si l'on analyse l'eau qui s'écoule dans le manteau neigeux et non si l'on fait fondre des échantillons de neige. D'autres apports de nutriments sont par exemple le dépôt de sable du Sahara (Schwikowski et al., 1997). Le pH de la neige est variable, mais généralement légèrement acide. Il peut s'étendre de 3.2 (Hoham et al., 1983) à 7.6 (Newton, 1982). Les conditions locales jouent donc un grand rôle pour déterminer si la croissance des algues de neige est possible en cet endroit ou non (Müller et al., 2001).

Durcissement des conditions, coloration de la neige et formation de spores

Proche de la surface de la neige, les conditions de vie peuvent se dégrader assez rapidement. Avec la fonte de la neige, les algues peuvent se retrouver très proches de la surface. A la surface, le rayonnement solaire est très important. En tenant compte des phénomènes de réflexion, les flux photoniques peuvent atteindre $4500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ voire $6000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ localement (Gorton et al., 2001). Comme le rayonnement ultraviolet (UV) est dommageable pour les cellules vivantes (dégâts à l'ADN, aux membranes et photoinhibition), les cellules doivent développer des systèmes de protection. Deux mécanismes sont connus pour les algues de neige. La production de pigments antioxydants comme l'astaxanthine (caroténoïde secondaire) permet d'absorber une partie des radiations et de protéger les cellules (Bidigare et al., 1993). Ce sont ces pigments, combinés à de grandes concentrations d'algues de neige qui provoquent la coloration de la neige. Le deuxième mécanisme de protection est la réparation de l'ADN endommagé (Gorton and Vogelmann, 2003). Ce sont probablement ces mécanismes qui permettent à des algues de neige enfermées dans le pergélisol depuis des millions d'années à l'obscurité et exposée au rayonnement radioactif naturel de la terre d'être encore viables (Vishnivetskaya et al., 2005). Proche de la surface, les algues de neige seront aussi soumises à des cycles de regel. Les cellules végétatives sont moins résistantes que les spores. Néanmoins, les cellules végétatives de certaines espèces peuvent survivre à des températures de -30°C (Stein and Amundsen, 1967).

Face à ces conditions lumineuses de plus en plus dures, et à la diminution des nutriments, les cellules végétatives forment à nouveau des spores (Hoham, 1980). Les cellules qui n'ont pas formé de spores ne survivent pas longtemps en surface. Lorsque la neige fond, les cellules d'algues de neige ont tendance à rester en surface (Grinde, 1983). Ainsi les concentrations en surface augmentent continuellement jusqu'à ce que le phénomène soit visible à l'oeil nu. Lorsque le manteau neigeux disparaît complètement, les cellules se retrouvent sur le sol jusqu'au prochain cycle.

1.2.3 Alternatives au cycle de vie classique

Peu d'alternatives sont proposées au cycle classique présenté au paragraphe précédent, malgré son incompatibilité avec les connaissances actuelles sur les propriétés physiques du manteau neigeux. Pourtant on est en droit de se demander aussi comment font les organismes qui ne sont pas mobiles par eux mêmes, mais que l'on trouve tout de même dans la neige.

Le fait que l'eau de fonte peut s'écouler latéralement est succinctement mentionné par Hoham et al. (1998) mais sans faire de lien avec le transport des algues de neige. Par contre, Müller et al. (2001) propose une circulation des algues de neige dans les pentes raides proches de la mer. Il évoque un hypothétique transport des algues de neige avec l'eau de fonte et le vent.

1.3 Notre approche

Dans la suite de cette étude, nous allons explorer la diversité des populations d'algues de neige avec des outils de biologie moléculaire modernes mais aussi par une approche plus classique de microscopie optique.

Nous allons aussi observer en détail les déplacements des algues de neige dans leur milieu naturel en prenant soin de décrire au mieux les conditions environnementales qui les entourent. D'autres modes de transport passifs comme le vent et les flux d'écoulement naturels dans le manteau neigeux seront traités. Enfin, de sorte à s'affranchir de l'hétérogénéité naturelle qui entache les résultats obtenus lors d'observations de terrain, des essais réalisés en laboratoire sur des algues de neige flagellées seront présentés.

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

2.1 Expériences en milieu naturel

2.1.1 Sites expérimentaux

L'ensemble des observations de terrain se sont déroulées dans les Alpes suisses (figure 2.1). Un suivi régulier des conditions météorologiques, du manteau neigeux ainsi que de l'évolution des populations d'algues de neige a été effectué de manière intensive sur le site principal de Sertig (GR). D'autres observations plus ponctuelles ont été effectuées principalement dans la région de Davos (GR) et de Piora (TI). Chacun des sites est décrit en détail ci-dessous.

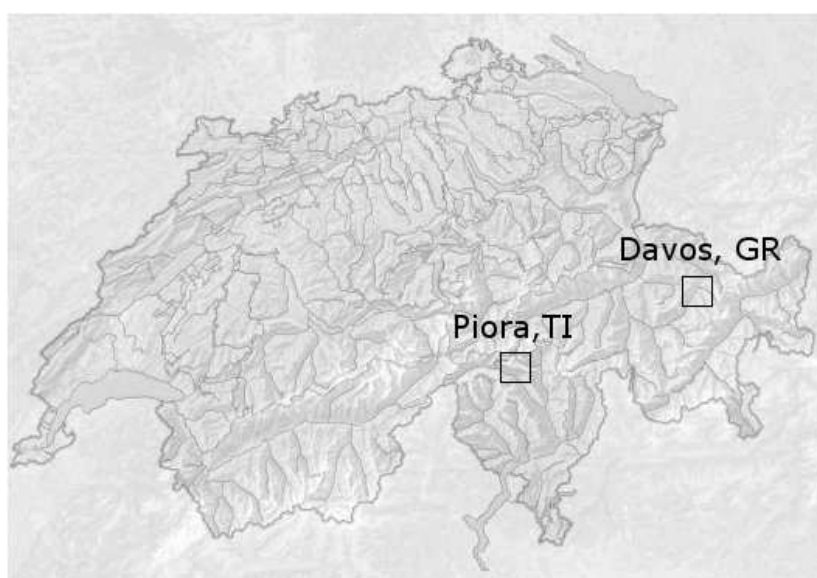


FIG. 2.1 – Carte topographique de la Suisse et position des sites expérimentaux de Davos, (GR) et de Piora (TI). Fond de carte : Geodata swisstopo 2006.

Site principal

Deux saisons de mesures (de décembre à mi-mai) ont été réalisées en 2004 et 2005¹ sur le site principal de Sertig (coordonnées 784305/177150, altitude 1860 *m*). Ce site a été choisi car une importante floraison d'algues de neige y a été observée en 2002 et 2003. De plus, le site était facilement accessible en voiture pendant tout l'hiver (20 minutes de Davos).

Le site de Sertig était situé sur un terrain plat en fond de vallée (figure). Il s'agissait d'une prairie alpine sur laquelle il y a parfois du bétail en été. Ce terrain était bordé d'une part par une rivière et d'autre part par un chemin

¹Convention d'écriture : Le cycle de vie des algues de neige étant plutôt concentré sur le printemps, nous désignerons les saisons de mesure par l'année de leur printemps, même si elles ont en fait débuté avant le premier janvier. Ainsi la désignation « saison 2004 » désigne l'hiver 2003–2004 et le printemps 2004

pédestre très fréquenté en hiver (promeneurs et skieurs de randonnée). Pour éviter la perturbation des expériences menées par les touristes, une surface de $25 \times 25 \text{ m}$ a été délimitée à l'aide d'une barrière et un panneau d'information a été monté près du chemin. Le tout a été réalisé en accord avec le propriétaire du terrain.

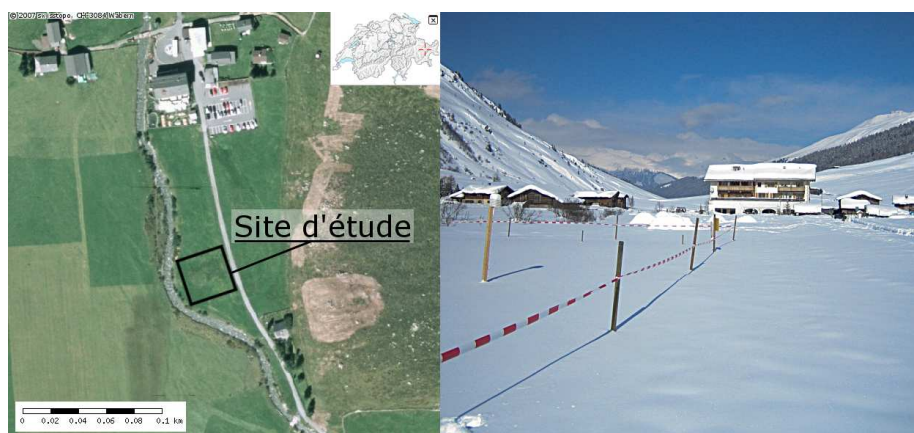


FIG. 2.2 – Site principal de Sertig. A Gauche plan de situation, à droite vue hivernale en direction de Sertig Sand (GR). Photo aérienne : Geodata swisstopo 2007.

Sites secondaires

D'autres observations ont été réalisées dans la région de Davos (GR) et de Piora (TI). Il s'agissait en général d'observations ponctuelles qui allaient de la simple observation visuelle à la réalisation d'un profil de neige complet avec prélèvement d'échantillons de neige.

2.1.2 Monitoring des températures de l'air et de la neige

L'évolution saisonnière des températures de l'air, de la neige et du sol ont été mesurées sur le site principal de Sertig à l'aide de 11 enregistreurs de température (HOBO® Pro Temp). Ces enregistreurs ont une précision de $\pm 0,2^\circ\text{C}$ et ont été calibrés en les emballant dans un sachet étanche et en les plaçant pendant trois heures dans un bain à 0°C composé de neige et d'eau mélangés. Les erreurs mesurées ont ensuite servi à corriger les valeurs indiquées par les enregistreurs. Deux saisons d'hiver ont été couvertes avec un intervalle de mesure de 30 minutes entre chaque mesure.

Les mesures de la première saison (05.02.2004 – 18.05.2004) ont visé deux objectifs : 1) obtenir une image de la variabilité spatiale des températures sur le site expérimental et 2) d'enregistrer l'historique des températures à l'intérieur du manteau neigeux. Cinq enregistreurs ont été fixés à différentes hauteurs le long d'un mât en bois. L'enregistreur le plus haut (250 cm) était dédié à la mesure de la température de l'air et était muni d'une protection contre le rayonnement

solaire (HOBO®). Les 4 autres ont été directement fixés au mât aux hauteurs de 50 *cm*, 15 *cm*, 0 *cm* et -15 *cm*. Les températures à 15 *cm*, 0 *cm* et -15 *cm* ont de plus été mesurées à deux emplacements supplémentaires du site expérimental. Les enregistreurs mesurant la température à la surface du sol et à -15 *cm* de profondeur ont été protégés par un sachet en plastique et enterrés dans le sol avant que le sol ne gèle.

Pour la deuxième saison de mesures (05.11.2004 – 18.05.2005), la température de l'air a de nouveau été mesurée à 250 *cm* de hauteur. Les mesures de la saison précédente ayant montré une faible variabilité spatiale, il était plus intéressant d'affiner la résolution du profil vertical de température à l'intérieur du manteau neigeux. C'est pourquoi 9 autres enregistreurs ont été placés le long du mât à 120 *cm*, 90 *cm*, 75 *cm*, 60 *cm*, 45 *cm*, 30 *cm*, 15 *cm*, 0 *cm*, et -15 *cm*) par rapport à la surface du sol.

2.1.3 Profils de neige et échantillonnage

Les profils de neige ont été réalisés conformément à la méthode habituelle utilisée par le service de prévention des avalanches du SLF (Schweizer and Wiesinger, 2001). La réalisation d'un profil de neige consiste en trois étapes : une description de l'endroit, un profil de battage et un profil stratigraphique. La saisie, le calcul et la représentation graphique des données relatives aux profils de neige ont été réalisés à l'aide du logiciel Schneeprofil SPP (Sommer Mess-Systemtechnik). Un exemple de profil de neige est visible à la figure 2.3.

Handprofil

Ort: **GR Sertig Sand**

Beobachter: Bischoff/Matzel
 Höhe ü. M. 1860 m
 Exposition: flach
 Wetter/Niederschlag: schön, klar
 LKNr: 1217 Bemerkungen:

Datum/Zeit: **15.03.2005 09:10**
 Station: 219
 Koordinaten: 784305 / 177150
 Neigung: 0 Grad

Profilnr: 0
 Temp.: 0.5 °C
 sonnig (0/8)
 Windrichtung: N
 -stärke: 2 km/h

Gesamtwasserwert: 267.2 mm (HS: 92.5 cm)

Mittl. Raumgew.: 289 kg/m³

Mittl. Rammwiderstand: 26 N

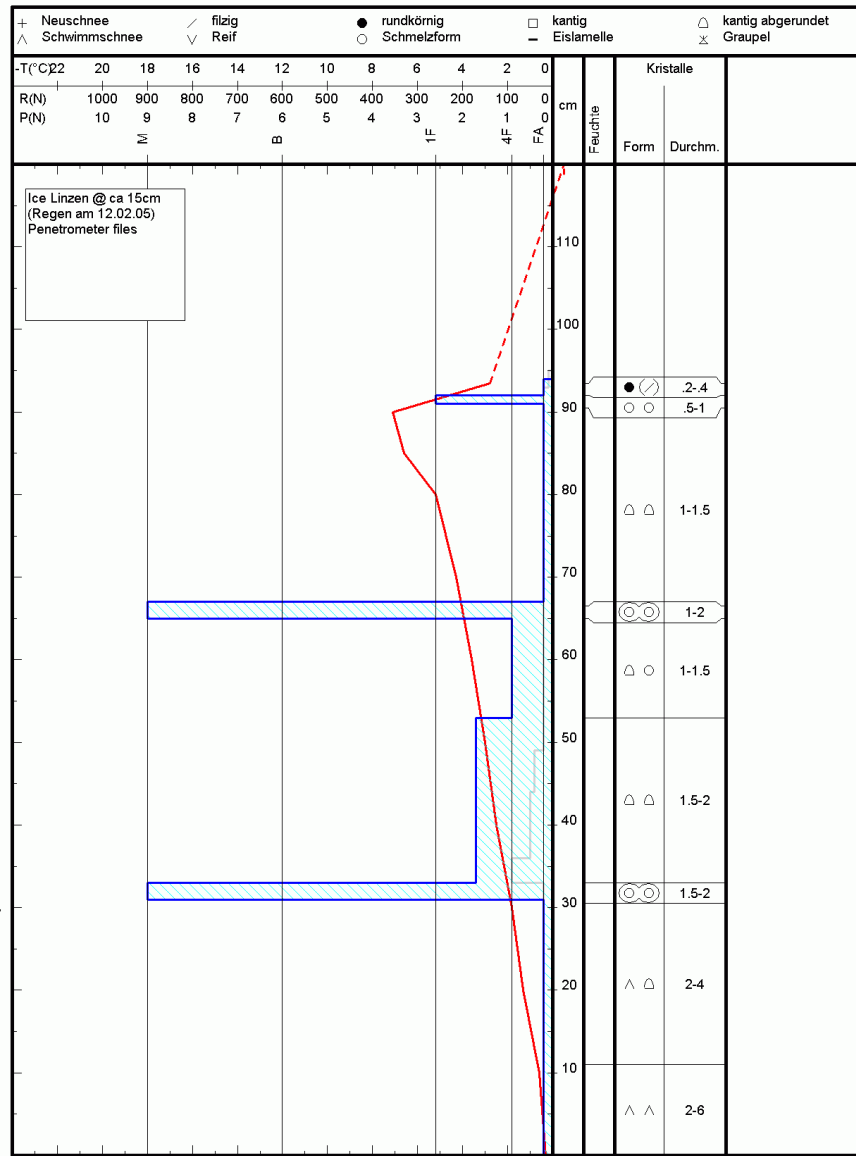


FIG. 2.3 – Exemple d'un profil de neige réalisé le 15.05.2005 sur le site principal de Sertig (Davos, GR).

Description de l'endroit

Lors de la réalisation d'un profil de neige, les caractéristiques de l'endroit sont systématiquement relevées. Il s'agit de paramètres temporels (heure, date), spatiaux (nom de l'endroit, altitude, coordonnées, exposition, déclivité) et météorologiques (température de l'air, nébulosité, précipitations, direction et force du vent).

Profil de battage

Cette mesure est réalisée au moyen d'une sonde de battage et permet d'établir un profil vertical de la résistance au battage du manteau neigeux (Salm, 1983). Le profil est réalisé à l'aide d'une sonde en aluminium munie d'une tête conique que l'on peut allonger en fonction de la hauteur de neige. Chaque mètre de la sonde pèse 1 kg. Cette sonde est surmontée d'un guide métallique sur lequel peut coulisser un mouton de 1 kg. Le mouton est lâché sur la sonde à partir d'une hauteur déterminée variant de 1 cm à 50 cm. Le choc du mouton sur la sonde va provoquer un enfoncement de la sonde inversement proportionnel à la résistance de la neige. Cette résistance est exprimée en Newton [N] et est calculée selon la formule 2.1.

$$R = \frac{E_{tot}}{\Delta} = \frac{1}{\Delta}((P g h) + (P + Q) g \Delta) \quad (2.1)$$

Où R = résistance au battage [N], Δ = enfoncement [m], h = hauteur de chute du mouton [m] P = masse du mouton [kg], Q = masse de la sonde [kg] et g = constante de gravité terrestre [m/s^2]. Le principal défaut de cette méthode est son incapacité à discerner les couches fragiles de faible épaisseur.

Profil stratigraphique

Le profil stratigraphique consiste en une analyse minutieuse du manteau neigeux. Chaque couche du manteau neigeux va être identifiée et décrite selon les paramètres définis dans le tableau 2.1 (Good et al., 1991). Ces paramètres ne représentent pas tous des grandeurs physiques du manteau neigeux. Il s'agit plutôt d'indicateurs permettant une description fidèle et reproductible du manteau neigeux. Toutefois, la qualité du profil (surtout pour la détermination des cristaux de neige et de leur taille) dépend aussi de l'observateur. Il est donc important que ce soit le même observateur qui fasse les mesures.

Echantillonnage

Deux échantillons ont été prélevés pour chaque couche identifiée lors du profil stratigraphique. Les échantillons ont été prélevés verticalement à l'aide d'un

TAB. 2.1 – Paramètres mesurés lors du profil stratigraphique selon Colbeck et al. (1990) et tel qu'utilisé au SLF.

Paramètre	Description	Méthode de mesure
Position	Position de la limite supérieure et inférieure de la couche.	Mesuré en <i>cm</i> à partir du sol.
Humidité	Valeur empirique allant de 1 (sec) à 5 (très mouillé).	Évaluation de la consistance et observation à la loupe.
Forme des grains	Classification des grains selon leur forme	Observation à la loupe.
Taille des grains	Taille moyenne des grains en <i>mm</i> .	Observation à la loupe et mesure sur une grille imprimée.
Dureté	Mesure empirique allant de 1 (mou) à 6 (glace).	Essai d'enfoncement de divers objets dans la neige (poing, 4 doigts, 1 doigt, crayon, couteau).
Température	Mesure de la température de la neige tous les 10 <i>cm</i> .	Thermomètre de poche TH310 (Milwaukee). Le profil doit être à l'ombre. Le thermomètre doit être protégé du soleil pour la mesure de la température de surface.
Densité	Mesure de la densité de la neige en kg/m^3 .	Cylindre calibré et balance.

cylindre en aluminium servant aussi à la détermination de la densité de la neige (tableau 2.1). Le premier échantillon était recueilli dans une boîte en plastique (Tupperware) et le deuxième dans un sac de congélation étanche. Tous les échantillons ont été ramenés au laboratoire dans une caisse en plastique remplie partiellement de neige afin d'éviter que les échantillons ne fondent pendant le transport.

Le premier échantillon a été laissé à température ambiante jusqu'à ce qu'il soit complètement fondu puis a été préparé pour l'observation au microscope dans un délai maximum de 6 *h*. Si l'observation dans ce délai n'était pas possible, environ 20 *ml* de l'échantillon ont été prélevés et fixés avec 0.4 % d'une solution de Lugol (5 *g/l* de Iode et 10 *g/l* de Iodure de potassium) puis conservés à 4 °C jusqu'à l'observation. Les bacs en plastique ont été réutilisés pour chaque profil après un nettoyage approfondi et un rinçage à l'alcool à 70%.

Le second échantillon a été immédiatement transféré à -20 °C et à l'obscurité en vue d'analyses futures (nouvelle observation, analyse chimique). L'effet de cette congélation sur l'intégrité des échantillons a aussi été évalué.

De nombreux autres échantillons ont été prélevés dans des flacons de 50 *ml* stériles (VWR) ou dans des flacons en PP de 40 *ml* non stériles (Faust). Ces échantillons ont soit été congelés immédiatement à -20°C soit été rapidement observés.

2.1.4 Écoulement de l'eau dans la neige

Comme vu précédemment, l'écoulement de l'eau dans la neige joue un rôle dans la répartition des algues de neige (Grinde, 1983). Les flux d'eau à l'intérieur du manteau neigeux sont susceptibles de provoquer le déplacement des algues en direction du sol ou latéralement. Deux expériences ont été planifiées pour montrer l'importance de ce phénomène.

Imperméabilisation du sol

Une bâche en plastique de 4×5 *m* a été fixée sur le sol dans trois sites différents. L'idée était d'exclure tout transport vertical d'algues à partir du sol. Ainsi, si des algues de neige étaient présentes au-dessus de la bâche, elles ne peuvent provenir que par les côtés ou par le haut avec le vent. Des échantillons de neige ont été régulièrement prélevés au-dessus de la bâche.

Essais de traçage

L'écoulement de l'eau dans la neige a été mis en évidence à deux reprises par l'emploi d'un traceur. 2 *l/m*² d'une solution d'un colorant alimentaire (Brilliant Blue 2 *g/l*) ont été répandus sur une surface de 1x4 *m* à l'aide d'un pulvérisateur de jardin (figure 2.4). Après une période de 4 heures, des profils ont été creusés dans la neige afin de suivre les voies d'écoulement de l'eau.



FIG. 2.4 – Répartition de 2 l/m^2 de Brilliant Blue (2 g/l) sur une surface $1 \times 4 \text{ m}$ lors de l'essai de traçage pour mettre en évidence l'écoulement de l'eau dans le manteau neigeux.

2.1.5 Transport par le vent

Le transport des algues de neige par le vent pourrait être un moyen de transport sur de grandes distances d'une part, et un processus pour coloniser des pentes lorsque la progression depuis le sol n'est pas possible d'autre part. Quinze pièges à particules ont été installés dans la région de Parsenn (Davos, GR). Les pièges étaient constitués d'un bloc en bois ($5 \times 5 \times 10 \text{ cm}$) surmonté d'un morceau de tôle de $15 \times 15 \text{ cm}$ comme protection contre les intempéries (figure 2.5). Une lame de microscope enduite de vaseline était fixée sur chacune des 4 faces. Grâce à la vaseline, les particules transportées par le vent restaient collées à la lame. Chaque piège était implanté dans le terrain à l'aide d'un fer à béton ($\varnothing 12 \text{ mm}$) et orienté de sorte que les 4 faces soient orientées respectivement au N, S, E et O. Selon la hauteur de la neige, la hauteur des pièges par rapport à la surface de la neige (ou du sol) variait de 30 cm à 100 cm . L'implantation d'un piège sur le terrain est illustrée à la figure 2.6. Les pièges étaient regroupés en 3 groupes topographiques : crêtes (exposées au vent), combes (abritées du vent) et grande pente (pente homogène). Les pièges ont été exposés au vent pendant 5 périodes de 14 à 36 jours.

A la fin de chaque période d'exposition, les lames de microscopes attachées sur les 4 faces du support en bois ont été changées. De nouvelles lames enduites de vaseline ont été installées tandis que les lames exposées ont été ramenées au laboratoire pour observation. En tout, quelques 300 échantillons ont été analysés.

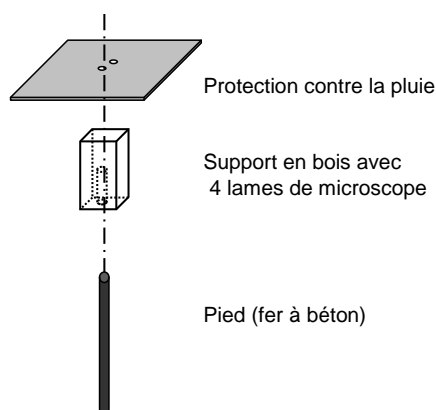


FIG. 2.5 – Schéma de la composition d'un piège pour l'interception des particules atmosphériques transportées par le vent.



FIG. 2.6 – Piège sur le terrain le 10.06.2005. Situation exposée au vent, la neige a été soufflée.

L'analyse des lames a été faite au microscope. Auparavant, les lames ont dû être préparées : elles ont été fixées avec le milieu de montage (Eukitt) et recouvertes d'un couvre objet. Le mélange de la vaseline et du milieu de montage n'est pas difficile si les lames et le milieu de montage sont tous deux à température ambiante. Les propriétés optiques du milieu de montage sont un peu réduites par la présence de la vaseline, mais restent suffisantes pour l'observation d'algues de neige ou de pollens (diamètre supérieur à $5 \mu\text{m}$ et naturellement colorés).

L'observation au microscope a été réalisée avec un grossissement de $100\times$. Compter la totalité de la surface de chaque lame n'est pas possible pour des raisons de temps. C'est pourquoi seules 2 à 3 bandes de la largeur du champ de vision et de la longueur de la lame ont été comptées. Les résultats sont exprimés en nombre d'individus comptés par cm^2 de la lame. Une analyse quantitative par m^3 d'air par exemple n'était pas possible avec cette méthode. Il s'agit donc de valeurs indicatives.

2.2 Analyse des échantillons de neige

2.2.1 Observations microscopiques

Préparation des échantillons

Certains échantillons ont été observés sans fixation afin de pouvoir analyser les microorganismes vivants. L'observation d'organismes vivants permet d'obtenir des informations sur leur comportement mais empêche souvent une observation détaillée et compromet toute tentative de comptage. Pour la plupart des échantillons, 0.4% d'une solution de Lugol (5 g/l de Iode et 10 g/l de Iodure de potassium) ont été utilisés comme fixatif. Le Lugol a pour effet de colorer les échantillons d'une couleur jaune-brun. Si une visualisation fidèle des couleurs est nécessaire, il est possible de supprimer la coloration due au Lugol avec une solution de Thiosulfate (450 g/l).

Microscopie et microphotographie

La plupart des observations ont été réalisées avec un microscope Olympus BX51 muni des objectifs 4×, 10×, 20×, 40× et 100× (à immersion) ainsi que d'oculaires de 10× (l'un d'eux avec une grille). La plupart des observations ont été réalisées à 200× ou 400× ce qui est suffisant pour observer des organismes de la taille des algues de neige (10 à 50 μm).

Des photographies digitales ont été réalisées au microscope grâce à une caméra Leica DC 200 montée avec un adaptateur Canon C-mount U-CMAD3 et U-TV1x-2 (grossissement 1×). Dans certains cas, des photos ou des petits films ont été réalisés à l'aide d'un appareil photo digital compact (Canon IXUS 40) directement à travers l'oculaire. Cette méthode permet une très bonne mise au point, mais le champ de vision est réduit.

Pour chaque objectif, la taille du champ de vision et de la grille de l'oculaire ont été mesurés à l'aide d'un micromètre afin de pouvoir mesurer la taille des organismes observés. De la même manière, la taille réelle des images obtenues avec la caméra digitale a pu être définie, ce qui permet un calibrage des images de sorte à pouvoir mesurer un objet directement sur la photo.

2.2.2 Comptages

La méthode de quantification des algues de neige dans les échantillons naturels a du être adaptée à plusieurs reprises. La principale difficulté réside dans la diversité des organismes présents ainsi que des diverses particules minérales ou végétales apportées par le vent et présents dans les échantillons (pollens, débris végétaux, grains de sable). La deuxième source de difficulté est la répartition

non homogène des organismes dans l'échantillon. Il arrive en effet souvent que certaines cellules s'agglutinent ce qui augmente la variabilité du résultat. Le comptage d'algues de neige issues des cultures est beaucoup plus aisé : les cellules ont plus ou moins toutes la même taille, il n'y a pas de corps étrangers et la répartition des cellules est homogène. Le comptage des cultures a pu être automatisé à partir d'images digitales.

Les procédures exactes du comptage manuel et du comptage automatique sont décrites ci-dessous.

Comptage Manuel

Le comptage manuel s'effectue en général avec une chambre de comptage. Il s'agit toujours d'une lame de microscope spéciale munie d'une petite cuve dont le volume est calibré. La quantification se fait soit en comptant la totalité du contenu de la cuve, soit en comptant une surface définie (grillage calibré au fond de la cuve ou surface couverte par le champ de vision). Connaissant la profondeur de la cuve, il est possible de calculer le volume observé et d'en déduire des concentrations en *cellules/ml*. Il est tout d'abord nécessaire de fixer l'échantillon (0.4% Lugol) et de laisser sédimenter les cellules quelques minutes afin d'être certain que tous les organismes se sont déposés au fond de la cuve. Dans le cas contraire, les organismes peuvent se trouver dans un plan supérieur et risquent d'être invisibles au microscope à cause de la faible profondeur de champ.

Deux dispositifs de comptage ont été utilisés : un hémocytomètre (Neubauer improved, 0,1 mm de profondeur) et une chambre de comptage (PhycoTech, 0,35 mm de profondeur, volume de 0.07 ml). L'hémocytomètre s'est révélé inutilisable avec les échantillons naturels car très souvent les organismes s'agglutinent entre eux et restent coincés à l'entrée de la cuve, laissant la surface de comptage vide. Si au contraire, un amas de cellules parvient à pénétrer dans la cuve, la concentration obtenue est très fortement surestimée. De meilleurs résultats ont été obtenus avec la chambre de comptage (PhycoTech²). La cuve s'est toujours correctement remplie et la répartition non homogène peut être résolue en comptant l'intégralité de la cuve (au prix d'un travail important car les dimensions de la cuve sont beaucoup plus importantes que le champ de vision).

²La société Phycotech semble malheureusement ne plus exister. La chambre de comptage de type Palmer-Maloney a des caractéristiques semblables et peut probablement remplacer efficacement le dispositif utilisé.

Inconvénients de la chambre de comptage utilisée (Phycotech) :

- *Faibles concentrations.* Il faut compter l'entier de la cuve voir plusieurs fois la cuve pour obtenir un nombre correct d'unités observées. Une solution serait de laisser sédimenter l'échantillon dans un cylindre et de faire l'observation à l'aide d'un microscope inversé.
- *Fortes concentrations.* Trop d'organismes présents dans la cuve rend le comptage manuel très long. Il est possible d'y remédier de deux manières : 1) en diluant l'échantillon et 2) en ne comptant qu'une portion de la cuve (diagonales, ou points aléatoires). Les résultats sont ensuite calculés en fonction de la surface observée (définie en mesurant le champ de vision à l'aide d'un micromètre).
- *Comptage simultané de différentes espèces ayant des concentrations différentes.* Une dilution n'est dans ce cas pas applicable. En effet, une dilution compromet le comptage, voire même la détection d'espèces peu abondantes. La seule solution serait de compter plusieurs fois la chambre entière avec des dilutions différentes pour chaque type d'organisme. Ceci n'est pas réalisable sur un nombre important d'échantillons. En effet, en période de haute activité des algues de neige, jusqu'à un profil de neige par jour comprenant cinq à six échantillons ont été réalisés.
- *Temps à disposition pour le comptage limité.* A cause de la chaleur apportée par le microscope, le contenu de la cuve commence à s'évaporer au bout de 10 *min* environ, rendant la poursuite du comptage impossible.

C'est pourtant cette méthode qui a donné les meilleurs résultats pour le comptage d'échantillons naturels. Pour la saison de mesure 2004, toutes les observations ont été classifiées dans deux catégories : cellules végétatives (vertes) et spores (rouges ou oranges). Ceci ne décrivant toutefois pas fidèlement la diversité des échantillons, une classification en morphotypes plus détaillée a été utilisée pour l'observation des échantillons de la saison 2005. Les morphotypes ont été définis selon des critères morphologiques. Pour chaque échantillon, le nombre d'individus de chaque morphotype présent a été compté séparément. Idéalement, un nombre minimum de 100 unités devrait être compté pour chaque échantillon, mais ce n'était de loin pas toujours possible, en particulier pour les morphotypes peu représentés.

Comptage automatique

Le comptage automatique a été effectué à partir d'images digitales prises dans la chambre de comptage (Phycotech). L'automatisation du comptage n'a été possible que pour le comptage des cultures.

Chaque culture a été homogénéisée et 300 μ l de culture ont été prélevés de manière stérile pour ne pas contaminer le reste de la culture et déposés dans un Eppendorf de 0,3 ml. 1,2 μ l de Lugol ont été ajoutés pour fixer l'échantillon. Le contenu de l'Eppendorf a été homogénéisé à nouveau et 90 μ l ont été prélevés et déposés dans la chambre de comptage. Un temps de sédimentation de 3 *min* a été observé et un contrôle visuel a été réalisé pour s'assurer que toutes les cellules reposent sur le fond de la cuve et sont visibles au microscope.

La caméra digitale (Leica DC200) à été réglée afin d'obtenir des images avec un contraste maximum sans chercher à reproduire fidèlement les détails des cellules. En vue du traitement informatique, il est en effet nécessaire que sur la photo chaque cellule se détache au maximum du fond et paraisse aussi homogène que possible. Il est presque possible d'obtenir une image en noir et blanc avec la silhouette des cellules se détachant clairement sur un fond blanc.

Pour chaque échantillon, 16 prises de vue ont été réalisées. Les 16 images ont été réparties sur la surface de la cuve en deux diagonales de 6 photos chacune, complétées par une photo dans chaque quadrant. Chaque photo (1280×1024 pixels) couvrait une surface réelle de $867 \times 693 \mu m$ (avec l'objectif de $10\times$).

Le traitement informatique a été réalisé à l'aide du logiciel Open Source ImageJ (Rasband, 2006). Ce traitement visait à déterminer rapidement le nombre de particules (cellules) présentes sur chaque photo. Connaissant la surface réelle de la photo et la profondeur de la cuve, il est ensuite possible de calculer une concentration en *cellules/ml*. Le fait de disposer de 16 photos par échantillon permet de calculer la concentration moyenne dans la cuve d'une manière fiable. Les étapes nécessaires au comptage informatique sont décrites en détail ci-dessous ainsi que les commandes ImageJ correspondantes. La figure 2.7 montre les effets de chacun des traitements sur l'image originale.

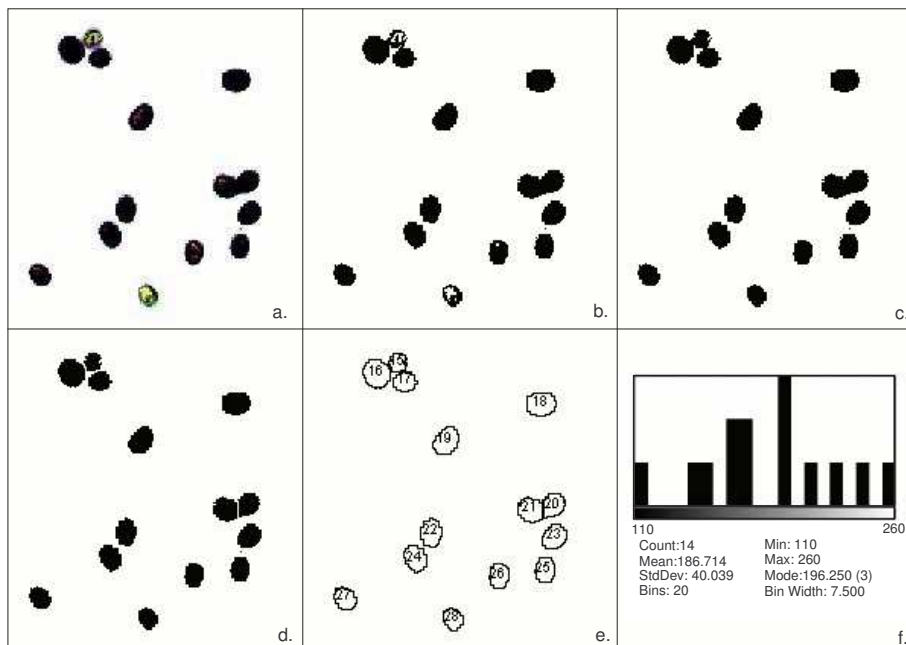


FIG. 2.7 – Détail des différentes étapes du processus de comptage automatique appliqué à un extrait de 200×200 pixels d'une photo prise au microscope. **a.** Image brute prise avec un fort contraste. **b.** Binarisation de l'image. **c.** Remplissage des trous. **d.** Séparation des particules adjacentes. **e.** Visualisation des particules comptées automatiquement. **f.** Histogramme est résultats du comptage automatique.

Binarisation de l'image. (figure 2.7 b.) L'ensemble des opérations qui suivent nécessitent une image binaire noir et blanc (deux couleurs). Le fait d'avoir au préalable pris la photo avec un contraste maximum rend cette transformation plus aisée et réduit le risque d'erreurs. (ImageJ : *Process > Binary > Threshold*)

Remplissage des trous. (figure 2.7 c.) La présence de trous (pixels blancs) à l'intérieur d'une cellule risque de séparer une seule cellule en 2 voir 3 particules lors des prochaines étapes du processus. Pour éviter ce genre d'erreur, les pixels blancs entourés de pixels noirs sont remplis de noir. (ImageJ : *Process > Binary > Fill Holes*)

Séparation des particules adjacentes. (figure 2.7 d.) Deux cellules ayant un contact ne serait-ce de un seul pixel seraient reconnues comme une seule particule. Afin d'éviter ce genre d'erreur, ImageJ propose une fonction basée sur les cartes de distances Euclidiennes qui permet de séparer des particules adjacentes. Pour plus de précisions, se référer à la documentation de ImageJ (ImageJ : *Process > Binary > Watershed*)

Comptage des particules. (figure 2.7 e. et f.) ImageJ propose une fonction de comptage des particules. Cette fonction, compte le nombre de particules et la taille des particules (nombre de pixels noirs adjacents). Comme un pixel noir unique est par défaut considéré comme une particule à lui seul, il est nécessaire de définir une taille de particule minimale en dessous de laquelle la particule ne sera pas prise en considération. Dans notre cas, la taille minimale d'une particule a été fixée à 40 pixels et la taille maximale à 3000 pixels. (ImageJ : *Analyze > Analyze Particles...*)

L'ensemble de ces opérations a été rassemblé dans une macro unique permettant de traiter en une seule opération les 16 images.

2.2.3 Analyse chimique

Mesure du pH et de la conductivité électrique juste après prélèvement des échantillons

La conductivité électrique et le pH ont été mesurés au laboratoire, juste après la fonte des échantillons de neige. Les échantillons ont été homogénéisés, puis la partie nécessaire à l'observation microscopique a été mise de côté. Le reste a servi à la mesure de la conductivité électrique avec le conductivimètre CDM 80. Cet appareil n'étant pas compensé en température, il était nécessaire de mesurer la température de l'échantillon puis de régler l'appareil en conséquence. La mesure a toujours été réalisée trois fois, puis la moyenne a été calculée.

La mesure du pH d'échantillons de neige n'est pas aisée. La plupart des électrodes de mesure du pH ne fonctionnent pas si la conductivité électrique est inférieure à $200 \mu S/cm$. Dans la neige, elle est fréquemment inférieure à $10 \mu S/cm$. Une goutte de KCL 1M a donc été ajoutée avant de mesurer le pH avec un pH-mètre (QPH 70, VWR). Ceci a pour effet de ramener la conductivité électrique dans la plage acceptée par le pH-mètre sans modifier la valeur du pH.

Analyse des cations, anions et nutriments

Un total de 203 échantillons provenant des saisons 2004 et 2005 ont été analysés par chromatographie ou spectrométrie au laboratoire central du WSL (Institut fédéral de recherche sur la forêt, la neige et le paysage, Birmensdorf, ZH). La conservation des échantillons entre leur collecte et leur analyse s'est faite à l'obscurité et à -20°C . La durée de conservation a été de quelques semaines à deux ans. Juste avant analyse, les échantillons ont été fondus, puis filtrés à $0.22\ \mu\text{m}$. Après filtration, les échantillons ont été stockés à 4°C jusqu'à leur analyse. Le tableau 2.2 décrit les composés analysés, les méthodes utilisées et leur limite de détection.

TAB. 2.2 – Analyse chimique : liste des composés analysés, des méthodes d'analyse et de leur limite de détection.

Composé	Méthode	Limite [mg/l]
NH_4^+	Flow Injection Atomic Spectrometry (Perkin-Elmer FIAS 300)	0.012
Al		0.015
Ca		0.100
Fe		0.015
K	Spectroscopie d'émission	0.200
Mg	Atomique ICP-OES	0.020
Mn	(Perkin-Elmer Optima 3000)	0.010
Na		0.080
P		0.050
S		0.080
Si		0.200
Cl^-		0.010
NO_3^-	Chromatographie Ionique IC	0.035
PO_4^{3-}	(Dionex DX 120)	0.150
SO_4^{2-}		0.050

2.3 Phylogénie

Tous les travaux de biologie moléculaire ont été réalisés à l'Institut Cantonal de Microbiologie du canton du Tessin (ICM, Bellinzona, TI)

2.3.1 Sites d'échantillonnage

La phylogénie d'échantillons de neige rouge, a été établie sur la base d'échantillons provenant de 3 sites. Deux d'entre eux, la vallée de Sertig et la vallée de Flüela, sont situés à proximité de Davos (GR) soit sur le versant nord des Alpes suisses. Le troisième site d'échantillonnage se situe sur le Piatto della Miniera dans la région d'Airolo (TI) soit sur le versant sud des Alpes. Les deux sites de la région de Davos sont distants de 8 *km* tandis que le site de la Miniera est éloigné d'environ 90 *km* des deux autres (tableau 2.3). Les noms des échantillons sont désignés par le nom du lieu où ils ont été prélevés suivi de l'années de prélèvement.

TAB. 2.3 – Échantillons pour l'établissement de la phylogénie.

Lieu	Échantillon	Date	Position	Coordonnées	Altitude
Sertig	Sertig03	01.05.2003	surface	784 3057/177 150	1860m
FlüelaA	FlüelaA04	16.06.2004	surface	790 790/183 095	2150m
Miniera	Miniera04	15.07.2004	surface	699 265/156 674	2525m

Des échantillons supplémentaires ont été analysés par Electrophorèse sur Gel en Gradient de Dénaturation (DGGE). Les échantillons additionnels provenaient des mêmes sites (Flüela et Sertig) mais ont été collectés en 2005. Un quatrième site situé aussi dans la vallée de Flüela a été ajouté pour son intérêt particulier (FlüelaB). Il s'agissait d'un champ de neige rouge recouvrant le lac du Schwarzsee situé en haut du col de la Flüela. Ce site est situé à 3 *km* seulement du site FlüelaA. Finalement, pour mettre en évidence une éventuelle structure verticale des populations au sein d'un profil de neige, des échantillons prélevés au milieu et en bas du manteau neigeux ont été ajoutés pour les sites FlüelaA et FlüelaB. Un résumé des échantillons ajoutés pour la DGGE est présenté dans le tableau 2.4.

TAB. 2.4 – Échantillons supplémentaires pour DGGE.

Lieu	Échantillon	Date	Position	Coordonnées	Altitude
	FlüelaA05 _{sup}	14.06.2005	surface		
FlüelaA	FlüelaA05 _{mil}	14.06.2005	milieu	790 790/183 095	2150m
	FlüelaA05 _{bas}	14.06.2005	bas		
FlüelaB	FlüelaB05 _{sup}	01.06.2005	surface	791 780/180 615	2383m
	FlüelaB05 _{bas}	01.06.2005	bas		
Sertig	Sertig05	02.05.2005	surface	784 305/177 150	1860m

Une autre curiosité a été de trouver un épais tapis d'algues rouge au fond de différentes fontaines en bois de la région de Piora (figure 2.8). Ce tapis semble être présent chaque année et a aussi été observé dans des fontaines en bois d'autres régions, avec comme point commun l'absence d'une alimentation permanente en eau. Une observation microscopique a montré que ces algues étaient morphologiquement très semblables aux algues communément trouvées dans la neige rouge. Deux échantillons ont été prélevés pour établir la phylogénie de ces fontaines. Les emplacements de ces fontaines sont reportés dans le tableau 2.5.

TAB. 2.5 – Échantillons d'eau fortement rouge en provenance de fontaines en bois.

Lieu	Échantillon	Date	Coordonnées	Altitude
Piora	Fontaine05a	03.09.2005	697 835/155 920	1955m
Piora	Fontaine05b	10.10.2005	697 565/155 860	1935m

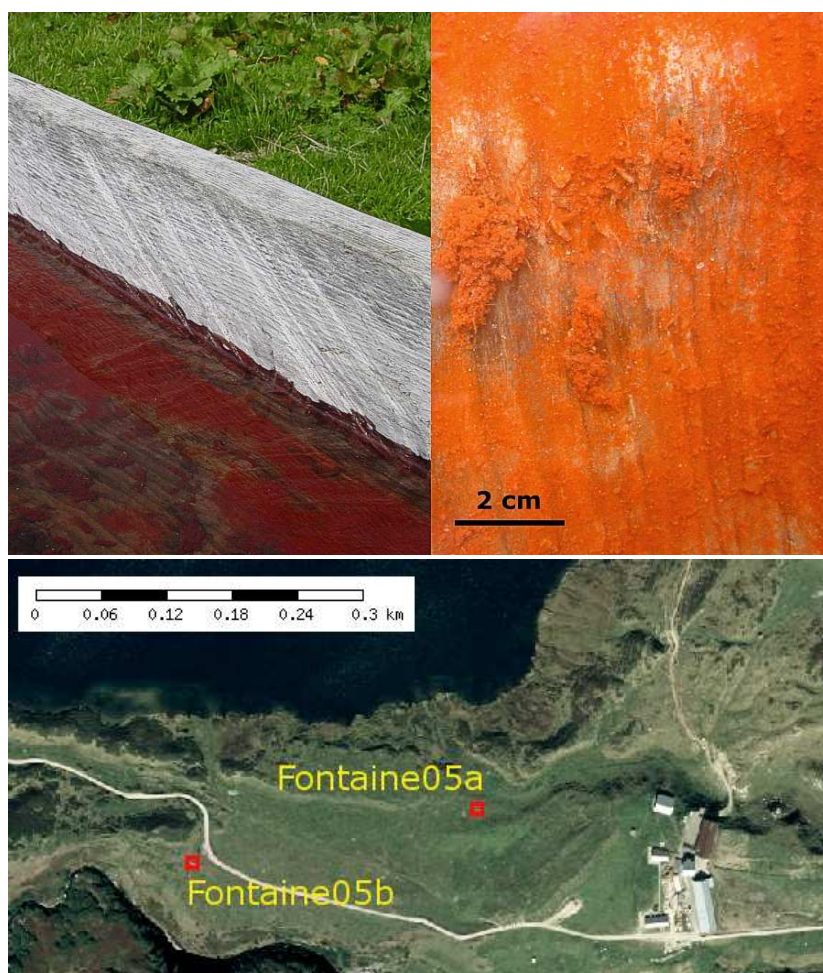


FIG. 2.8 – En haut, tapis d'algues rouge observé dans une fontaine en bois (Fontaine05a) le 28.08.2003 à Piora (TI). En bas, plan de situation et emplacement des deux fontaines.

2.3.2 Extraction, amplification, purification et stockage de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été effectuée selon la méthode décrite par Ausubel et al. (1989) pour tous les échantillons sauf pour les échantillons d'eau provenant des fontaines de Piora pour lesquels le kit d'extraction « PowerSoil™ Isolation Kit » (MoBio) a été utilisé. L'amplification du gène 18S a été effectuée par PCR (Polymerase Chain Reaction ou Réaction de polymérase en chaîne) à l'aide des amorces 18S1F et 18S2R (Hoham et al., 2002) en suivant le cycle de température suivant : 5 *min* à 94 °C, puis 35 cycles de 1 *min* à 94 °C, 45 *sec* à 50 °C, 2 *min* 30 *sec* à 72 °C, terminé par une période d'élongation de 10 *min* à 72 °C. Les séquences des amorces utilisées sont disponibles dans l'annexe C page 132. Les produits PCR ainsi obtenus ont ensuite été purifiés (Kit NucleoSpin® Extract II) et stockés à 4 °C pour de courtes périodes ou à -80 °C pour des durées plus longues.

2.3.3 Clonage, séquençage et analyse phylogénétique

Le clonage des fragments d'ADN à analyser a été fait à l'aide de vecteurs plasmidiques (TOPO TA Cloning® for Sequencing, Invitrogen). Les réactions de séquençage ont été faites avec le kit « BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit » (Applied Biosystem) en utilisant soit l'amorce 18S1F seule, soit la combinaison des amorces M13F(-20) et M13R situées sur le vecteur plasmidique. Le séquençage a été réalisé sur un séquenceur « ABI Prism 310 » (Applied Biosystem). Les séquences des amorces utilisées sont disponibles dans l'annexe C page 132.

L'analyse des séquences et la constitution de la phylogénie ont été réalisées à l'aide du logiciel MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004). Les séquences ont été alignées par la méthode Clustal W (Thompson et al., 1994) et la phylogénie construite avec la méthode Neighbor Joining (NJ) (Saitou and Nei, 1987) avec une correction de Kimura à 2 paramètres (Kimura, 1980). Les séquences obtenues ont été comparées à celles de la base de donnée de l'Institut Européen de Bioinformatique (EBI) à l'aide de leur programme Fasta (www.ebi.ac.uk/fasta33/). Les séquences ayant servi à établir la phylogénie avaient une longueur de 1600 paires de bases (pb).

Afin de déterminer si la diversité génétique des échantillons analysés a été couverte par les clones identifiés, des courbes de raréfaction (Heck et al., 1975) ont été calculées à l'aide du programme « Analytic Rarefaction 1.3 software package » (www.uga.edu/strata/software).

2.3.4 Electrophorèse sur Gel en Gradient de Dénaturation, DGGE

Cette technique d'électrophorèse permet de séparer des fragments d'ADN de même taille. Les fragments d'ADN migrent par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide dont le pouvoir dénaturant croît. La migration d'un fragment s'achève lorsqu'il se dénature, c'est à dire lorsque ses deux brins d'ADN se séparent. La dénaturation du fragment dépend de ses propriétés de fusion et donc du nombre et de la position des liaisons G-C (Guanine (G)-Cytosine (C)) qu'il contient. En effet, les liaisons G-C sont plus résistantes que les autres liaisons. Plus un fragment contiendra de liaisons G-C, plus il restera longtemps intact et plus il ira loin dans le gel. Pour éviter une séparation complète des deux brins, ils sont maintenus ensemble à une des extrémités grâce à l'utilisation d'une amorce GC-Clamp. Du coup, le fragment va se coincer dans le gel à cause de sa forme géométrique. Comme de nombreux fragments identiques s'arrêtent au même endroit, il se forme une bande visible après coloration. L'analyse des diverses bandes contenues dans un échantillon permet d'évaluer la diversité génétique de l'échantillon.

Les produits de PCR amplifiés avec les amorces 18S1F et 18S2R (Hoham et al., 2002) ont ensuite été analysés par DGGE. Les séquences des amorces sont disponibles dans l'annexe C.1. Le gel a été précédée par une nested-PCR en utilisant les amorces 18S1F et EUK516 GC Clamp pour éviter une dissociation complète des produits PCR dans le gel. Le cycle de température de la nested-PCR était le suivant : 5 *min* à 94 °C suivi de dix premiers cycles (1 *min* à 94 °C, 1 *min* entre 60 et 50 °C en commençant à 60 °C et en diminuant de 1 °C par cycle, et 2 *min* 30 sec à 72 °C) puis 20 cycles (1 *min* à 94 °C, 1 *min* à 50 °C, et 2 *min* 30 sec à 72 °C) plus 20 *min* à 72 °C. Pour la DGGE en elle-même, le système « The DCode™ Universal Mutation Detection System » (BIORAD) a été utilisé. Le gel a été chargé avec un volume de 20 μ l contenant 5 μ l de Loadin Buffer et 250 *ng* d'ADN. Après quelques essais, un gel de 6% de polyacrylamide et un gradient dénaturant de 30% à 55% se sont révélés être les mieux adaptés pour nos échantillons. Les gels ont été soumis à une tension de 100 V pendant 14h, puis colorés pendant 20 *min* dans un bain de 0.01 % de SYBR Green, puis photographiés.

Certaines bandes ont été découpées du gel de la DGGE et mises en suspension dans 20 μ l de TE pH 8 pendant une nuit puis amplifiées avec les amorces 18S1F et EUK516. Elles ont ensuite été séquencées. Les bandes dont la séquence était illisible ont été clonées. Les clones obtenus ont eux aussi été séquencés comme décrit au paragraphe 2.3.2.

2.4 Expériences en microcosme

2.4.1 Cultures d'algues

En vue des expériences en laboratoire, il était nécessaire d'obtenir des algues de neige au stade végétatif en quantités suffisantes. La culture d'algues de neige s'est donc avérée incontournable. Étant donné la difficulté d'isoler et de cultiver des algues issues du milieu naturel, il a été décidé d'utiliser des organismes déjà cultivés à la collection d'algues de l'Université de Göttingen (SAG : Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen). Toutefois, les algues sont conservées dans cette collection sous forme de cultures de maintenance. Le passage à une culture de masse n'est pas aisé. De plus, les taux de croissances pour les algues sont largement inférieurs à ceux des cultures bactériennes.

Organismes utilisés

Le critère de choix principal était la mobilité des cellules (présence de flagelles). Deux souches provenant de la collection d'algues SAG ont été retenues sur conseil du personnel de la collections d'algues SAG :

- *Chlamydomonas augustae* Skuja (SAG 26.86), généralement connue sous le nom de *Chlamydomonas nivalis* a été isolée à partir d'un échantillon de neige (Cascade Mts, USA) en 1968. Cette culture a été maintenue à l'aide du milieu Kuhl (Kuhl and Lorenzen, 1964) qui est un milieu assez pauvre utilisé pour les cultures de maintenance des algues vertes.
- *Chlamydomonas spec.* (SAG 75.94) provient d'un lac couvert de glace en Antarctique. Cette souche était cultivée dans un milieu saumâtre composé à moitié d'eau de mer (SAG 1/2 SWES). Cette souche n'a pas clairement été identifiée et est maintenue dans un milieu chimiquement très différent de la neige. Elle a été recommandée comme étant « bonne nageuse » par le personnel de la collection d'algues.

La culture de *Chlamydomonas sp.* a été rapidement écartée car aucune cellule n'était munie de flagelles. Elle ne satisfaisait donc pas nos critères. La culture de *Chlamydomonas augustae* était par contre parfaite : plusieurs stades de vie observables, bonne motilité et bonne résistance au froid lors d'essais préliminaires à 4 °C.

Milieus de croissance

Les cultures ont été reçues sous la forme de cultures solides. Elles ont d'abord été repiquées en milieu solide (milieu Kuhl utilisé par la SAG). Suite à l'absence de croissance même après plus d'un mois, deux autres milieux utilisés par Leya (2004) (TAP et BBM) ont été testés en milieu solide (8 g/l Agar (Difco, granu-

lated). Des essais ont aussi été effectués avec de l'eau de fonte filtrée et stérilisée. Les recettes des différents milieux sont présentés dans l'annexe A, page 127.

Le milieu TAP s'est montré être le meilleur et a été retenu. La suite des essais se sont déroulés en milieu liquide. L'obtention de cultures en milieux liquides était nécessaire pour pouvoir ensuite observer la mobilité des algues. Les taux de croissance étaient toujours trop faibles. La réflexion s'est alors portée sur le fait que les concentrations des milieux de culture étaient beaucoup plus élevées que les concentrations rencontrées dans la neige. Le milieu TAP a donc été décliné en quatre variantes afin d'être plus proche des concentrations habituelles de la neige.

- TAP0 : milieu TAP standard
- Variante TAP1 : identique à TAP0, mais pH 6.8 au lieu de 6.0.
- Variante TAP2 : réduction de 10× des concentrations de Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , Cl^- , SO_4^{2-} et réduction de 2× des concentrations de K^+ et PO_4^{3-} , pH 6.8.
- Variante TAP3 : semblable à la variante 2, ajout de 68 mg/l de NaNO_3
- Variante TAP4 : semblable à la variante 3, ajout de 59 mg/l de CaCl_2 .

Les concentrations en nutriments des différentes variantes sont présentées dans le tableau 2.6.

TAB. 2.6 – Comparaison de la composition chimique en mM de la neige, du milieu de culture TAP et de ses variantes. **Variante TAP1** : identique à TAP, mais pH 6.8 au lieu de 6.0. **Variante TAP2** : réduction de 10× de Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , Cl^- , SO_4^{2-} et réduction de 2× de K^+ et PO_4^{3-} , pH 6.8. **Variante TAP3** : semblable à la variante 2, ajout de 68 mg/l de NaNO_3 . **Variante TAP4** : semblable à la variante 3, ajout de 59 mg/l de CaCl_2 .

Composé	Neige (Stoeckli, 2002)	TAP0 + TAP1 (Harris, 1989)	TAP 2	TAP 3	TAP 4
Na^+	0.045	0.270	0.270	0.935	0.935
K^+	0.020	1.940	0.970	0.970	0.970
Ca^{2+}	0.018	0.340	0.034	0.034	0.434
Mg^{2+}	0.004	0.410	0.041	0.041	0.041
NH_4^+	0.008	7.480	0.748	0.748	0.748
Cl^-	0.030	8.220	0.822	0.822	0.657
NO_3^-	0.009	0.000	0.000	0.800	0.800
SO_4^{2-}	0.005	0.510	0.051	0.051	0.051
PO_4^{3-}	—	1.000	0.500	0.500	0.500

Conditions de culture

Les cultures ont été placées dans un incubateur de 720 l (Binder-KBW720) dont la température peut être réglée de 0 °C à 100 °C et dont le cycle de lumière peut être programmé sur une semaine.

Divers tentatives avec des températures comprises entre 0 °C et 20 °C avec un cycle de lumière 16 heures de jour et 8 heures de nuit (16 : 8) sont restées

infructueuses. Pour finir, les conditions de culture et de lumière ont été fixées à un cycle de lumière de 12 :12 et à une température de 8 °C comme préconisé dans la littérature (Harris, 1989; Leya, 2004).

Les cultures ont démarré uniquement avec un apport supplémentaire de CO₂. Cet apport s'est fait sous la forme d'air du laboratoire préalablement filtré additionné de 10% de CO₂ (0.4 l/min d'air et 0.04 l/min de CO₂). L'air du laboratoire provenait d'une pompe à air pour aquarium (Sera air 275R) et passait ensuite à travers deux récipients en plastique. Le premier était rempli de charbon actif en poudre et le deuxième d'ouate pour retenir les particules de charbon actif. Le CO₂ provenait d'une bouteille sous pression munie d'un détenteur précis (240 bar/3 bar). Le débit d'air était régulé par un débitmètre couvrant la plage de 0.1 à 1 l/min (KI Key Instruments) et le débit de CO₂ par un débitmètre allant de 0.04 à 0.5 l/min (KI Key Instruments). Ensuite, les deux gaz étaient mélangés et filtrés à 0.2 µm (Sartorius Midisart 2000). Ce mélange était ensuite utilisé pour aérer une culture de 1 l. Le trop plein d'air s'écoulait dans l'incubateur. La culture directement aérée a certes profité de l'apport en CO₂, mais il semble que toutes les cultures présentes dans l'incubateur en ont aussi profité. Ainsi, l'atmosphère enrichie en CO₂ dans l'incubateur a été suffisante pour améliorer considérablement la croissance des cultures.

Les cultures ont été repiquées toutes les deux à trois semaines dans du milieu de culture fraîchement préparé. Certaines cultures ont été gardées plus longtemps sans repiquage. Les cultures ont été inoculées de sorte à obtenir une concentration initiale de $1 \cdot 10^5$ cellules/ml environ.

Matériel

Trois types de récipients de culture ont été utilisés. Les cultures ont été démarrées dans un tube de réaction (100 mm × 12 mm) muni d'un bouchon métallique stérile mais pas hermétique (LABOCAP). Des volumes plus importants (100 à 400 ml) ont été cultivés d'abord dans des Erlenmeyers munis d'un bouchon du même type puis dans des flacons de cultures en plastique HDPE munis d'un bouchon de ventilation (NUNC-EasyFlask™).

Tout le matériel a été stérilisé dans un autoclave de table (CertoClav CV-EL 12L) à 121 °C pendant 20 min. Cet autoclave présente l'avantage d'être bon marché et de prendre peu de place, mais possède deux très gros désavantages. Tout d'abord, avec un volume de 12 l, la taille des récipients qu'il est possible de stériliser est très vite limitée. Deuxièmement, cet autoclave n'est pas contrôlé électroniquement et ne se prête normalement pas à la stérilisation de milieux de culture liquides. En effet, en fin de cycle, il est nécessaire de faire chuter la pression ce qui entraîne parfois l'ébullition des liquides et une certaine perte par évaporation. Pour limiter ce phénomène, une serviette humide a été appliquée autour de l'autoclave pour accélérer le refroidissement et limiter les pertes par ébullition. Ainsi, les concentrations finales du milieu de culture ne s'écartaient pas de plus de 5% des concentrations voulues.

Les conditions stériles nécessaires pour l'inoculation, le repiquage et le prélèvements des cultures ont été assurées en utilisant des pipettes à usage unique stériles et en travaillant dans l'environnement direct d'une flamme. Ces manipulations ont été réalisées sous une chapelle de laboratoire. La chapelle n'étant pas prévue pour assurer des conditions stériles, la ventilation était donc toujours éteinte lors de manipulations critiques. Avant toute opération, l'intérieur de la chapelle était nettoyé avec une solution désinfectante puis la solution désinfectante était vaporisée à l'intérieur de la chapelle avec les outils nécessaires à la manipulation. Lors de la manipulation, la vitre coulissante était baissée de sorte à garder le visage à l'extérieur, ne passant que les bras à l'intérieur de la chapelle. Des gants et une blouse de laboratoire étaient aussi utilisés. Tous les outils utilisés pour manipuler les cultures étaient stérilisés à la flamme ou passés à l'alcool pour les outils ne supportant pas la chaleur.

2.4.2 Mobilité

La mobilité des cellules végétatives issues de la culture de *Chlamydomonas augustae* a été testée en laboratoire en milieu liquide et dans des colonnes de neige.

Mobilité en milieu liquide

La mobilité de *Chlamydomonas augustae* dans son milieu de culture a été mesurée à l'aide d'observations microscopiques. 90 μl de la culture étaient injectés sans fixatif dans une chambre de comptage de 0.35 mm de profondeur puis observés au microscope avec un grossissement de 40 \times (Olympus BX51 ou Zeiss III RS). La trajectoire des cellules traversant le champ d'observation et le temps qu'elles ont mis ont été relevées sur un formulaire (figure 2.9). Le formulaire a ensuite été scanné et l'image ainsi obtenue a été calibrée dans le programme ImageJ (ImageJ : *Analyze* > *SetScale*) de sorte que le diamètre du champ de vision du formulaire soit identique au champ d'observation réel. Ensuite, la trajectoire de chaque cellule a été sélectionnée à l'aide de l'outil de sélection puis mesurée (ImageJ : *Analyze* > *Measure*). Ceci a permis d'obtenir la distance parcourue par chaque cellule en mm. Connaissant aussi le temps mis par la cellule pour parcourir cette distance, il est ensuite aisé de calculer sa vitesse.

Étant donné que les cellules végétatives de *Chlamydomonas augustae* réagissent à la lumière (phototaxis), la lumière émise par le microscope attire les cellules vers le bas de la cuve. Lors des premiers essais, les cellules entrant dans le champ de vision latéralement ont souvent changé de direction et ont nagé vers le bas de la cuve rendant impossible la mesure de la vitesse. Pour éviter au maximum cet effet non désirable, la luminosité du microscope a été réduite le plus possible et une source double de lumière froide (Leica KL 2500 LCD) a été utilisée pour illuminer la chambre de culture par les côtés. Pour chaque mesure, entre 14 et 21 cellules ont été comptées parmi les plus rapides. Les observations ont été réalisées en partie à température ambiante et en partie à 0 C.

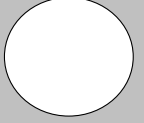
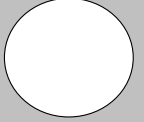
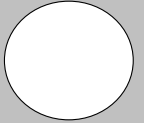
Test de mobilité en milieu liquide					Form N°	
	Date Heure	Conditions Grossissement Appareillage Temperature	Echantillon observé	Trajectoire	Durée [s]	Déplacement vertical (subjectif)
1						
2						
3						

FIG. 2.9 – Extrait du formulaire utilisé pour la détermination de la mobilité des algues de neige en milieu liquide. La trajectoire des cellules observées dans l'oculaire est reportée graphiquement dans le disque blanc et la durée requise par la cellule pour parcourir cette trajectoire est reportée dans la colonne « Durée ».

Cette méthode a le mérite d'être simple et peu coûteuse. Il faut toutefois considérer les observations suivantes :

- Les déplacements verticaux ne peuvent pas être pris en compte quantitativement. La vitesse calculée est donc plus petite ou égale à la vitesse réelle de la cellule.
- Les résultats dépendent grandement du choix des cellules observées. Étant donné les buts de cette étude, seule la vitesse des algues les plus rapides a été mesurée.
- Les conditions d'observation ne peuvent pas être complètement contrôlées à cause de la chaleur apportée par le microscope lui-même et de la source de lumière (lumière du microscope venant du bas, réflexions dans la chambre de comptage).
- La méthode dépend en partie de l'observateur. En effet, le temps de réaction de l'observateur joue un rôle pour le chronométrage des cellules. La précision du dessin de la trajectoire joue aussi un rôle.

Mobilité dans la neige

Pour s'affranchir de la variabilité spatiale implicite aux relevés de terrain, des expériences en laboratoire ont été menées dans la chambre climatique du SLF. Ce laboratoire climatisé a été spécialement conçu pour recréer des conditions alpines (Température de -15°C à $+35^{\circ}\text{C}$, humidité relative entre 30% et 85%, illumination jusqu'à $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Le principe était de préparer des colonnes de neige exemptes d'algues puis d'injecter des algues issues de la culture dans la partie inférieure de la colonne. Les colonnes étaient ensuite exposées à une source de lumière et la progression des algues suivie par échantillonnage à intervalles réguliers.

Le dispositif expérimental (figure 2.10) consistait en trois tubes de plexiglas ($\varnothing 8.2 \text{ cm}$, longueur 50 cm) remplis de neige et placés dans une caisse de plastique grise. L'extrémité supérieure des tubes dépassait de la caisse grise et était ainsi exposée à la lumière produite par les lampes de la chambre climatique. L'extrémité inférieure était terminée par une pièce en plastique en forme d'entonnoir prolongée d'un tuyau souple afin de permettre l'évacuation de l'eau de fonte. La caisse grise était ventilée avec de l'air pulsé à 0°C afin de prévenir toute surchauffe à l'intérieur de la caisse. Chaque tube était muni de 9 trous espacés de 5 cm afin de permettre l'inoculation de la neige et le prélèvement d'échantillons. Pendant l'expérience, ces trous devaient être bouchés pour éviter un courant d'air à l'intérieur de la colonne provoquant la sublimation de la neige autour des trous. L'inoculation consistait à injecter environ 40 ml de culture à l'aide d'un entonnoir prolongé par un tube souple lui-même connecté à une pipette pasteur. Le prélèvement d'échantillons était réalisé au travers des trous en utilisant la partie large d'une pipette pasteur. La neige ainsi prélevée était transvasée dans un petit Eppendorf en tapotant la pipette au-dessus de l'Eppendorf. L'échantillon était ensuite fixé avec $3 \mu\text{l}$ de Lugol. Après un laps de temps de 24 heures pour permettre aux cellules de sédimenter, les échantillons étaient comptés au microscope.

Deux types de comptages ont été utilisés. S'il était manifestement visible que l'échantillon contenait une grande quantité d'algues (dépôts visibles à l'oeil nu au fond de l'Eppendorf), l'échantillon était homogénéisé avec un agitateur et sa concentration en algues était déterminée à l'aide de la méthode de comptage automatique décrite plus haut (section 2.2.2). Si aucun dépôt n'était visible au fond de l'Eppendorf, $20 \mu\text{l}$ étaient prélevés *du fond* de l'Eppendorf et déposés sous forme de gouttelette sur une lame de microscope. Cette gouttelette était ensuite observée attentivement avec un grossissement de $100\times$ sans couvre objet. Cette deuxième méthode ne permet pas une évaluation quantitative de la concentration de l'échantillon, mais augmente les chances de déceler la présence de quelques algues issues de la culture (concentration des cellules par sédimentation au fond de l'Eppendorf).



FIG. 2.10 – Dispositif expérimental pour l'observation de la mobilité des algues de neige dans des colonnes de neige sous conditions contrôlées. Pendant l'expérience, le dispositif expérimental est fermé sur le côté à l'aide d'un couvercle de sorte que la lumière ne pénètre que par le haut des colonnes.

2.4.3 Phototaxis

L'effet de phototaxis (le mouvement d'un organisme vers la lumière) constitue l'un des points essentiels dans la théorie du déplacement des algues de neige. Il était donc nécessaire d'avoir une indication si les algues de la culture réagissaient à la lumière ou pas. Le dispositif expérimental était constitué de trois petits tubes en plexiglas d'un diamètre de 1 *cm* et d'une longueur de 6 *cm*. Les tubes étaient placés horizontalement dans un support de styropore et dans un carton pour mettre le corps des tubes à l'abri de la lumière et empêcher un réchauffement. Une des extrémités des tubes dépassait pour permettre une exposition à la lumière. Les tubes étaient ensuite remplis avec des algues de la culture et exposés à la lumière. Le déplacement des algues était observé visuellement. Trois trous, un au centre et deux à chaque extrémités du tube avaient été prévus pour prélever des échantillons et mesurer l'asymétrie de la distribution des algues (figure 2.11).

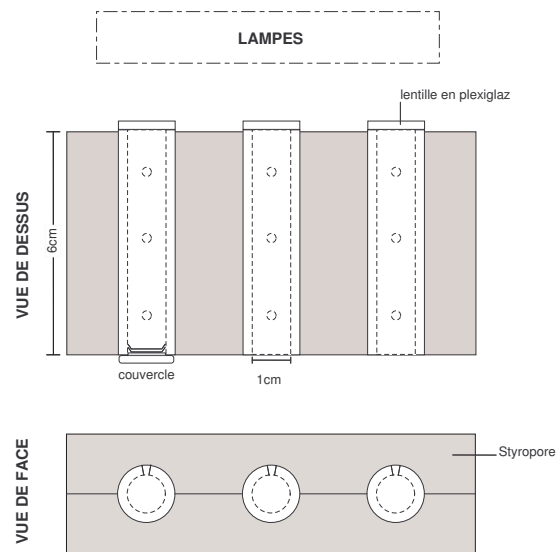


FIG. 2.11 – Dispositif expérimental pour l'évaluation de la phototaxis.

Plusieurs difficultés sont survenues avec cette méthode :

- Une partie des algues sédimentaient au fond des tubes ce qui rendait une évaluation quantitative impossible.
- Il était très difficile de remplir les tubes sans laisser une bulle d'air.
- Après un nettoyage à l'alcool, les tubes se sont fissurés et brisés en plusieurs morceaux. Ceci était probablement dû à l'évaporation rapide de l'alcool provoquant une baisse rapide et ponctuelle de la température du matériau induisant des contraintes internes. Probablement, certaines contraintes préexistaient depuis la fabrication du tube.

Pour compléter l'expérience, une boîte de Pétri recouverte de carton de tous les côtés avec une forme découpée dans le couvercle a aussi été utilisée. La culture homogénéisée était déposée dans le fond de la boîte de pétri, le couvercle avec sa forme découpée rajouté et le tout exposé à la lumière. Le résultat attendu était le regroupement des cellules à l'endroit de la découpe dans le couvercle.

Chapitre 3

Résultats

3.1 Diversité biologique de la neige

3.1.1 Diversité génétique

Nombre de clones et de taxons trouvés

Après élimination des séquences de mauvaise qualité, une bibliothèque de 106 clones a pu être établie. Parmi eux, 36 clones provenaient de l'échantillon Sertig03, 20 clones de FlüelaA04 et 50 de l'échantillon Miniera04. L'établissement de la phylogénie a montré le regroupement des clones en 6 taxons pour chacun des échantillons. La répartition des clones dans les différents taxons révèle la présence d'un taxon dominant pour l'échantillon Sertig03, de 2 taxons dominants pour l'échantillon Miniera04 alors que la répartition était plus équilibrée pour l'échantillon Flüela04 (figure 3.1).

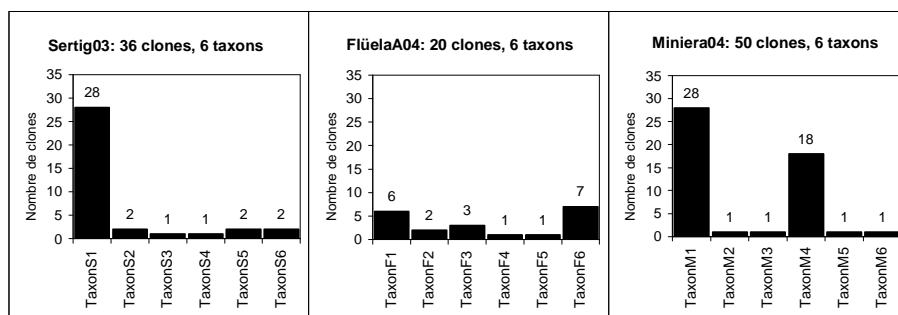


FIG. 3.1 – Diversité des clones pour chaque site d'échantillonnage.

Les courbes de raréfaction obtenues (figure 3.2) montrent que la diversité des échantillons Sertig03 et Flüela04 a été correctement couverte. Pour Miniera04, la courbe ne semble pas se stabiliser ce qui laisse supposer une diversité plus importante. Pour en être certain il faudrait toutefois analyser un nombre de clones plus élevé.

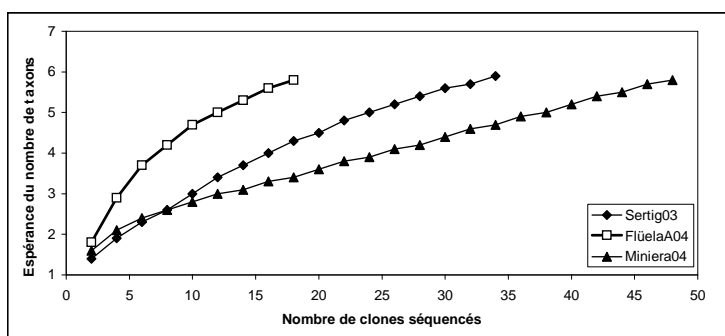


FIG. 3.2 – Courbes de raréfaction pour les bibliothèques de clones des différents sites d'échantillonnage. L'apparence asymptotique des courbes montre que la diversité des échantillons a été correctement couverte.

TAB. 3.1 – Répartition des 106 clones obtenus en 16 taxons différents et leur provenance. S=Sertig, F=Flüela, M=Miniera.

Taxon	Nb Clones	Provenance	Espèce apparentée
TaxonE1	28	S	<i>aucune</i>
TaxonE2	6	F	<i>aucune</i>
TaxonE3	1	F	<i>Chloromonas carrizoensis</i>
TaxonE4	1	F	<i>aucune</i>
TaxonE5	2	S	<i>Chloromonas brevispina</i>
TaxonE6	3	F, M	<i>aucune</i>
TaxonE7	1	S	<i>aucune</i>
TaxonE8	3	F	<i>aucune</i>
TaxonE9	2	S	<i>aucune</i>
TaxonE10	18	M, S	<i>Chloromonas cf. alpina</i>
TaxonE11	1	M	<i>aucune</i>
TaxonE12	1	M	<i>aucune</i>
TaxonE13	35	F, M	<i>Chlorococcus sp.</i>
TaxonE14	1	M	<i>aucune</i>
TaxonE15	1	M	<i>Trebouxia arboricola</i>
TaxonE16	2	S	<i>Stichococcus bacillaris</i>

D'une manière générale, les séquences obtenues pour un site lui sont spécifiques. Des séquences similaires ont rarement été trouvées dans plusieurs sites. En effet, sur 16 taxons identifiés, seuls trois d'entre eux (E6, E10 et E13) comprennent des séquences provenant de plusieurs sites différents (tableau 3.1). Il est intéressant de noter que le site de Miniera partage des séquences avec les sites de Flüela et de Sertig pourtant éloignés de près de 100 km alors que les sites voisins de Sertig et de Flüela ne partagent aucune séquence. Bien qu'il est difficile de tirer des conclusions sur la base de trois sites, ceci tend à montrer que les caractéristiques locales jouent un plus grand rôle sur les populations d'algues de neige que la région géographique. La présence d'espèces identiques à assez grande distance montre pourtant qu'un transport d'algues sur de grandes distances doit être possible.

Espèces apparentées

Parmi les 16 taxons identifiés, on constate une nette dominance des taxons E1, E10 et E13 (voir tableau 3.1). L'ensemble des taxons obtenus a été comparé aux séquences déposées dans la base de données EMBL. Les séquences des espèces typiques d'algues de neige déjà disponibles dans la base de donnée ont été ajoutées à notre bibliothèque de clones à titre comparatif. L'arbre phylogénétique obtenu est présenté à la figure 3.3.

Le Taxon E13, représentant le plus grand groupe avec ses 35 clones, comprend des clones provenant des échantillons Miniera04 et Flüela04. Une majorité de ses séquences sont 100% identiques aux séquences AF5114411 et AF514412 (*Chlorococcus sp.*). Le deuxième groupe le plus important, Le taxon E1, ne s'agrège parfaitement avec aucune séquence de la base de données EMBL. Il est constitué exclusivement de clones appartenant à l'échantillon Sertig03 et pourrait constituer un nouveau taxon au sein ou proche du genre *Chloromonas*. Le dernier groupe majoritaire, le taxon E10 (18 Clones), comprend une majorité de clones provenant de Miniera04 et un seul de Sertig02. Ce groupe comprend aussi les séquences AF517087 (*Chloromonas pichincha*), AF514401 (*Chloromonas cf. platystigma*) et AF514403 (*Chloromonas cf. alpina*).

Aucun des autres groupes formés de clones provenant de Flüela04 (E2, E4, E6 et E8) ne s'apparente avec des séquences connues, sauf le clone F90 (taxon E3) qui s'apparente d'assez loin à la séquence Aj410454 (*Chloromonas carrizoensis*).

Le groupe E5, issus de l'échantillons Sertig03, s'apparente à AF517092 (*Chloromonas brevispina*). Les séquences de E16 fusionnent avec AJ416106 (*Prasiola crispa*) et AJ616107 (*Stichococcus bacilliaris*). La séquence M35 (E15) est très proche de Z68700 (*Trebouxia jamesii*) et Z68705 (*Trebouxia arboricola*).

Les groupes restants sont isolés (E4, E7, E9, E11, E12 et E14).

Plusieurs groupes importants d'algues de neige connus (*Chlamydomonas augustae*, *Chloromonas nivalis*, *Chloromonas rosae*, *Haematococcus pluvialis* etc.) sont assez éloignés des séquences obtenues. Il faut encore noter que globalement, une grande partie des séquences obtenues sont assez proches les unes des autres, ce qui rend une classification selon le gène 18S très sensible aux moindres mutations. On remarquera par exemple le mélange des genres *Chlamydomonas* et *Chloromonas* ainsi que les deux séquences de *Chloromonas nivalis* AF517088 et AF514409 qui se positionnent éloignées l'une de l'autre. Ceci est probablement aussi dû aux difficultés de déterminer les espèces d'algues de neige avec des critères morphologiques (erreurs de classification).

L'analyse de l'échantillon d'eau fortement rouge prélevé dans une fontaine en bois de la région de Piora a montré que l'espèce dominante était *Haematococcus pluvialis* (100% de similitude). Bien que déjà trouvé dans des échantillons de neige ou dans des petites flaques sur le toit d'un magasin de jardinage (Leya, 2004), cet organisme n'a pas été détecté dans les échantillons de neige que nous avons récoltés.

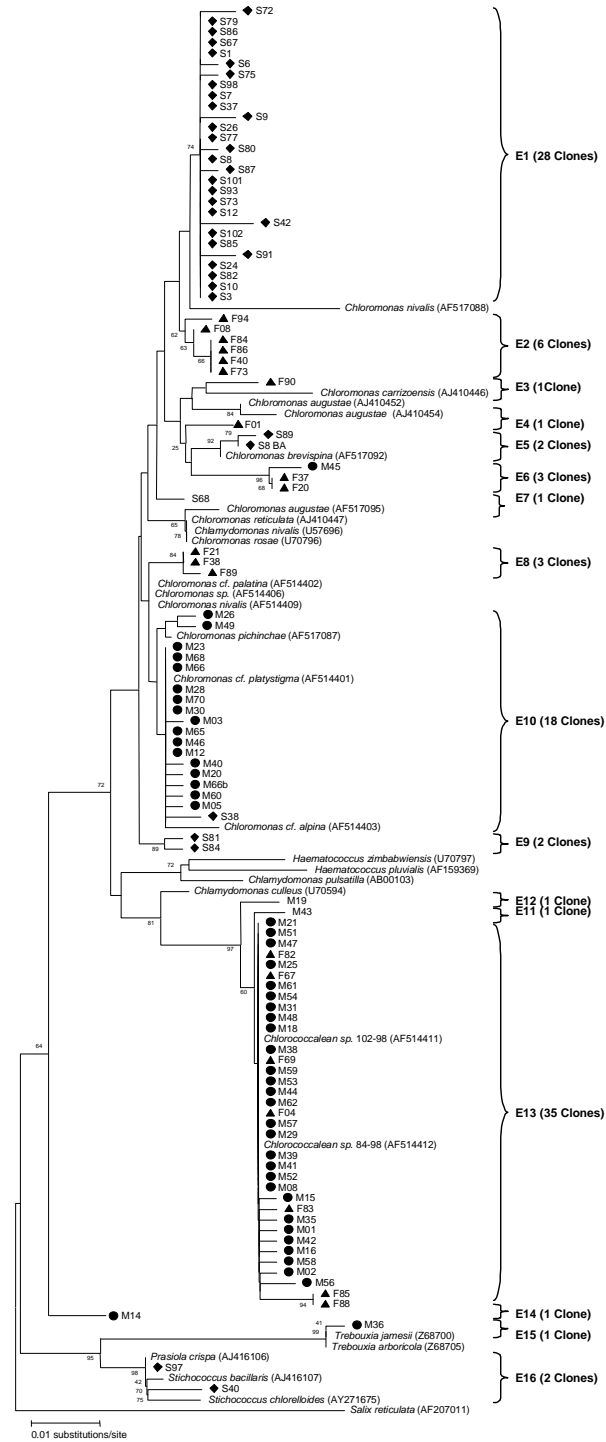


FIG. 3.3 – Arbre phylogénétique complet avec séquences supplémentaires de EMBL.
Légende : ◆ = Sertig03, ▲ = FlüelaA04, ● = Miniera04.

3.1.2 Diversité morphologique

Les nombreux échantillons de neige récoltés au cours de deux saisons de travail sur le terrain ont tous été observés par microscopie optique. Les organismes les plus couramment rencontrés ont été regroupés en morphotypes selon des critères morphologiques. Les différents morphotypes sont présentés dans le tableau 3.2. Dans la mesure du possible, la correspondance des organismes observés avec ceux détectés par analyse phylogénétique a été établie sur la base de critères morphologiques. Une tentative d'identification de l'espèce est aussi proposée.

Il n'est de loin pas possible d'identifier formellement une espèce à l'aide d'une simple observation microscopique. En effet, les espèces d'algues de neige subissent au cours de leurs différentes phases de vie des modifications très importantes de forme, de taille et de couleur. Par contre, des espèces différentes mais au même stade de vie (p.ex. cellules végétatives) sont souvent extrêmement proches. Les risques de confusion sont donc grands et il est possible que de nombreuses erreurs de classification aient eu lieu dans le passé.

Pour identifier plus formellement les espèces, il faudrait les isoler et les mettre en culture. L'identification peut se faire sur la base d'observations et de tests physiologiques ou alors par séquençage. Ce travail a été réalisé par Leya (2004) avec de nombreuses espèces d'algues de neige du Spitzberg. Nous n'avons par contre pas fait ce travail avec nos échantillons car il dépasserait les objectifs de cette étude. Une autre possibilité est d'utiliser des sondes d'acides nucléiques spécifiques pour mettre en évidence la présence d'organismes particuliers (hybridation *in situ*). Des essais préliminaires par hybridation fluorescente (FISH) ont été réalisés, mais sans succès. La raison en est probablement une perméabilisation insuffisante des membranes cellulaires particulièrement épaisses pour les spores.

TAB. 3.2 – Description des organismes fréquemment observés dans les échantillons de neige. La correspondance avec un taxon identifié et une proposition d'espèce sont proposés. Le tableau se poursuit sur les pages suivantes.


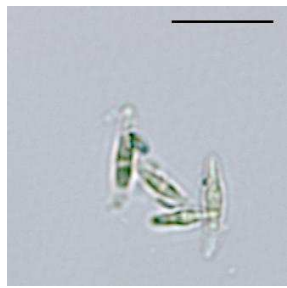
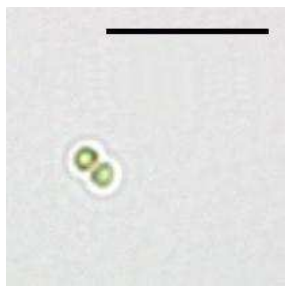

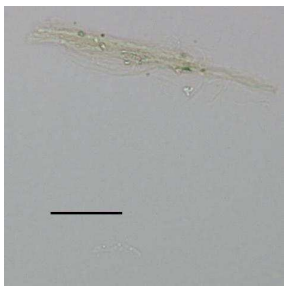
Photo — = 20 μm					
Désignation	Bâtonnets 1	Bâtonnets 2	Minisphère	Sphère	Filaments
Taxon	E16	aucun	non couvert par les amorces utilisées	E15	non couvert par les amorces utilisées
Espèce	<i>Stichococcus bacillaris</i>	<i>Euglena</i> ou <i>Chlorogonium elongatum</i>	Cyanobactéries. P.ex. <i>Chroococcus sp.</i>	P.ex. <i>Trebouxia arboricola</i>	Cyanobactéries ?
Description	Petites cellules oblongues vertes-jaunes. Souvent liées à d'autres cellules par leur pôle. Longueur 6-15 μm , largeur 2-4 μm .	Cellules allongées, symétriques, avec extrémités pointues. Noyau visible au centre. Longueur 15-20 μm , largeur 3-4 μm .	Petites paires de sphères d'apparence verte. Diamètre environ 2.5 μm .	Cellules sphériques et régulières fortement vertes. Diamètre 15 μm .	Filaments très fins, légèrement verts s'empilant parallèlement les uns aux autres. Longueur 20-40 μm , largeur 1-2 μm .

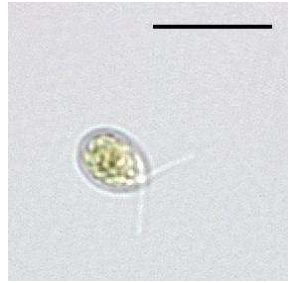
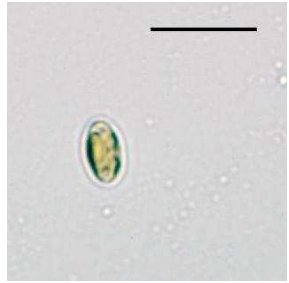
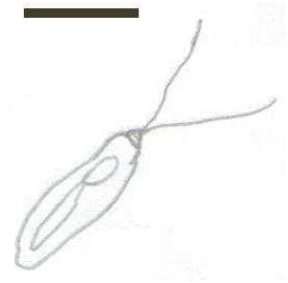
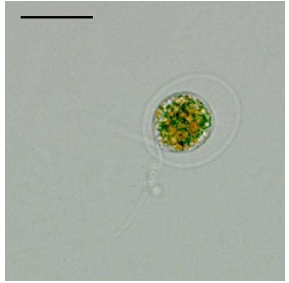
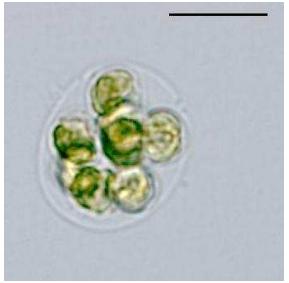

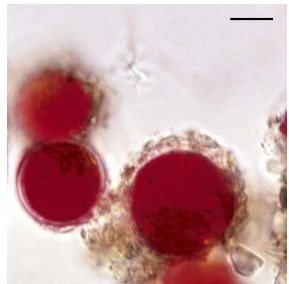
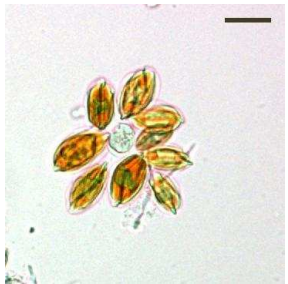

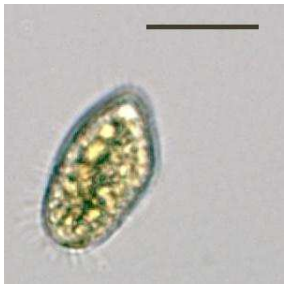
Photo — = 20 μm					
Désignation	Ovale 1	Ovale 2	Flagellée allongée (Dessin)	Flagellée rouge	Cellules filles
Taxon	E10	non	non	Fontaine Piora	non
Espèce	P. ex <i>Chloromonas platistyga</i>	Genre <i>Chloromonas</i> ou <i>Chlamydomonas</i>	p.ex. <i>Chloromonas nivalis</i> (cellule végétative)	<i>Haematococcus pluvialis</i>	P.ex. <i>Tetracystis</i> sp.
Description	Cellules ovales, assez larges de couleur verte à rouge souvent munies de flagelles. Globules lipidiques souvent visibles. Longueur 15-30 μm , largeur 8-15 μm .	Cellules vertes ovales assez petites, sans flagelles (peuvent avoir été perdues). Longueur 15 μm , largeur 8 μm .	Cellules oblongues, non symétriques munies de deux flagelles de la longueur du corps. Longueur 20-40 μm , largeur 5-10 μm	Cellules flagellées transparentes avec un centre très pigmenté rouge. Longueur 15-25 μm , largeur 8-12 μm .	Cellules mères contenant 8 cellules végétatives mobiles. Diamètre de la cellule mère 25-30 μm , cellules filles 5-7 μm .

Photo — = 20 μm					
Désignation	Spore verte	Spore rouge	Spore ovale	Coque	Cilié
Taxon	E13	non	non	non	non couvert par les amorces utilisées
Espèce	P.ex. <i>Chlorococum sp.</i>	<i>Chlamydomonas augustae</i>	<i>Chloromonas nivalis</i>	non déterminé	Cilié
Description	Cellules sphériques de couleur verte à orange avec une membrane très forte et structurée. Diamètre : 25 μm .	Cellules rouges sphériques typiques de la neige rouge. Diamètre 15-50 μm .	Cellule ovale aux extrémités pointues. Paroi cellulaire épaisse en forme de spirale. Longueur 15-40 μm , largeur 15 μm .	Petites cellules gris-brun de forme ovale avec extrémités pointues. Longueur 10 μm , largeur 5 μm .	Présent dans de nombreux échantillons proches du sol. Il abrite en son sein des algues. Longueur 40 μm , largeur 20 μm .

3.1.3 Structure génétique des populations d'algues de neige

L'analyse phylogénétique offre certes des résultats très précis sur la diversité génétique des échantillons analysés, mais elle demande un travail si important que seul un nombre limité d'échantillons peut être traité. La Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), permet d'obtenir rapidement, la structure de populations provenant de différents échantillons. Cette méthode permet d'obtenir une image des différences génétiques entre les différents organismes d'un échantillon. Cependant, tous les organismes ne sont pas détectés par cette méthode. Les organismes détectés sont définis par les amorces utilisées qui ciblent une séquence précise de l'ADN des organismes analysés.

L'amplification du gène 18S par PCR d'une grande partie des échantillons supplémentaires a échoué (intérieur et bas des profils de neige). Seuls deux échantillons de neige rouge (FlüelaA05_{sup} et FlüelaB05_{sup}) ont pu être amplifiés avec succès. Par contre, une amplification du 16S bactérien avec les amorces UniL et UniR (VandePeer et al., 1996) a été positive pour tous les échantillons. Il ne s'agit donc a priori pas d'un problème d'extraction de l'ADN, mais de PCR. En effet, il se peut que les amorces utilisées ne soient pas tout à fait adaptées à nos échantillons. Une autre source de dysfonctionnement possible serait des quantités d'ADN insuffisantes pour les organismes eucaryotes. Pour plusieurs échantillons il n'a en effet pas été possible de filtrer de grands volumes de neige fondue car les filtres étaient rapidement colmatés. Le colmatage des filtres indique probablement la présence de populations bactériennes importantes. Étant donné la taille importante des algues par rapport aux bactéries, il serait possible d'utiliser des filtres plus grossiers pour laisser passer une partie des bactéries, éviter le colmatage et rendre ainsi possible la filtration de volumes plus importants.

Utilisation de clones comme marqueurs

Une sélection de clones issus de la DGGE ont été utilisées pour deux raisons : 1) mettre au point la méthode et 2) pour servir de marqueurs dans les gels de la DGGE. Le gel obtenu après mise au point de la méthode montre une assez bonne définition (figure 3.4). L'étude des fragments d'ADN utilisés (18S1F-EUK516) permet une comparaison entre la similarité des séquences (figure 3.5) et leur positionnement dans le gel. On constate que les bandes des clones dont les séquences sont identiques (S10 et S8 ainsi que M25 et F67) se positionnent à la même hauteur. Par contre, un grand nombre de clones bien différents les uns des autres (comme par exemple F40 et M25 avec une distance de 0.04 substitutions par site) se positionnent aussi à la même hauteur. Les séquences les plus éloignées, S40 et S36, se positionnent à des hauteurs spécifiques. Ces différences peuvent être dues à des domaines de fusion multiples ou à des artefacts lors des réactions de PCR (Kisand and Wikner, 2003; Powell et al., 2003).

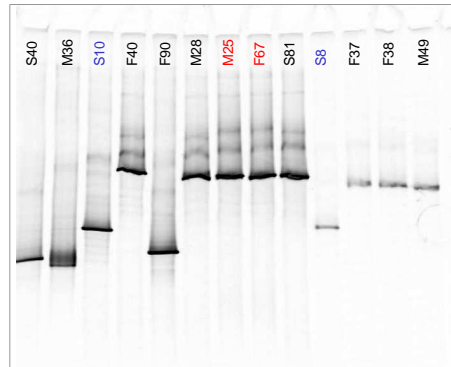


FIG. 3.4 – Gel DGGE d’une sélection de clones (18S1F-EUK516 + GC Clamp, env. 550 pb), 6% polyacrylamide, gradient dénaturant 30-55%, 14h, 100V).

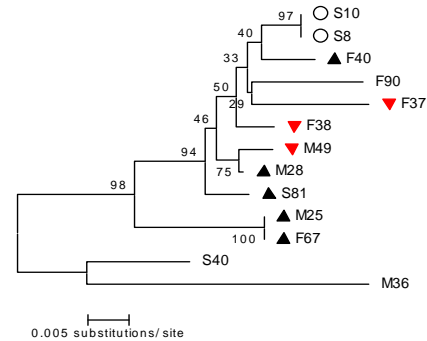


FIG. 3.5 – Arbre phylogénétique des clones présents dans le gel.

Profils DGGE d'échantillons naturels

Les trois échantillons naturels ayant servi à l'établissement de la phylogénie, les deux nouveaux échantillons dont l'amplification (18S) a fonctionné ainsi qu'une sélection de 9 clones ont été analysés dans un même gel. Comme mentionné plus haut, les clones ont été utilisés pour servir de marqueurs.

Sur le gel (figure 3.6), trois échantillons, FlüelaB05, FlüelaA04 et Miniera04 montrent une structure très semblable. Cette structure consiste en deux bandes fines très proches à hauteur h1 et d'une bande principale plus basse à hauteur h3. Cette bande inférieure se situe à la même hauteur que la bande principale des clones F40, M25, F38 et M49.

L'échantillon FlüelaA05 possède une bande unique très marquée à la hauteur h5, à la même hauteur que le clone F90. L'échantillon Sertig03 quant à lui consiste en trois bandes à hauteurs différentes. La bande B9b se situe à la même hauteur que les bandes inférieures des échantillons Flüela05b, Flüela04 et Miniera04. Les deux autres bandes ne correspondent à aucune autre bande.

Séquençage de bandes issues de la DGGE

Les 14 bandes marquées B1 à B9c de la figure 3.6 ont été découpées du gel DGGE en vue d'un séquençage. L'intégralité des bandes provenant des échantillons de neige a été analysée. Les 4 bandes secondaires se trouvant au-dessus de la bande principale des clones ont aussi été séquençées. En effet, les clones sont constitués d'une séquence unique et ne devraient former qu'une seule bande dans la DGGE. Parmi toutes les bandes découpées, 7 ont pu être séquençées directement, 4 avaient un caractère mixte et 3 étaient mixtes dès 150 paires de bases environ. Le résultat des 7 séquences obtenues est décrit dans ce paragraphe. L'analyse

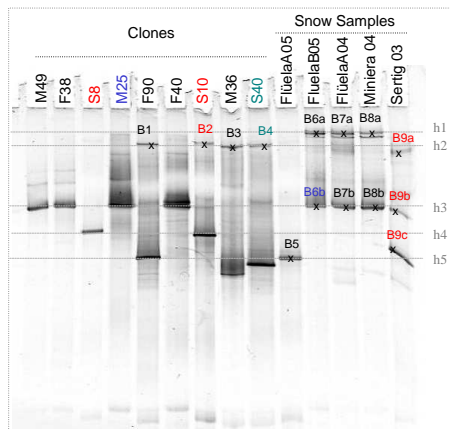


FIG. 3.6 – Gel DGGE d’une sélection de clones et d’échantillons de neige (18S1F-EUK516+GC Clamp, env. 550 pb), 6% polyacrylamide, 30-55% denaturing gradient, 14h, 100V. B1 à B9c : bandes découpées pour séquençage.

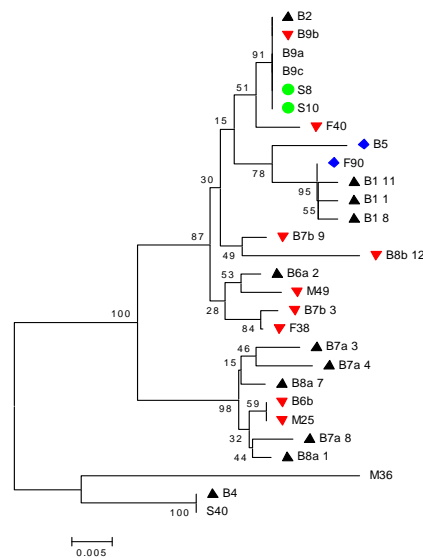


FIG. 3.7 – Arbre phylogénétique des clones et échantillons présents dans le gel.

de six bandes qui n’ont pas pu être séquencées correctement par clonage et séquençage est présentée au paragraphe suivant.

Les bandes B2 et B4 sont 100% identiques aux clones dont elles sont issues (figure 3.7). Cet effet est totalement indésirable et pourrait provenir d’artefacts lors de la PCR (Speksnijder et al., 2001). S’il s’agissait d’un échantillon naturel, on aurait conclu à tort à la présence de deux espèces dominantes.

Les bandes B1, et B3 ont un caractère mixte. Ceci n’est absolument pas normal puisqu’il s’agit à nouveau de clones, et donc de produits PCR théoriquement tous identiques. Ce résultat fait suspecter un artefact survenu lors de la PCR. L’analyse de ces bandes sera approfondie au paragraphe suivant.

Toutes les autres bandes sont issues de produits PCR obtenus à partir des échantillons de neige. La bande B5 (bande unique de l’échantillon FlüelaB05) concorde à 97,7% avec le clone F90. La bande B6b de l’échantillon FlüelaA05 présente une similitude de 100% avec les clones F4, F67, F69 et F82 (similaires à *Chloroacoccus sp.*). Ces clones sont issus d’un échantillon (FlüelaA04) prélevé une année plus tôt au même endroit. Il s’agit donc d’une espèce présente à cet endroit plusieurs années de suite.

Les bandes de l’échantillon de Sertig03, B9a, B9b et B9c sont très distinctes et très nettes dans le profil de la DGGE. Étonnamment, après séquençage, il s’avère que ces trois bandes ont une séquence 100% identique et égale au clone F90. Ceci constitue très clairement un effet non désirable puisque le but de la DGGE

est de pouvoir différencier des fragments différents mais de même longueur. Des fragments 100% identiques devraient donc pas provoquer des bandes différentes.

Les séquences des bandes B6a, B7a, B7b, B8a et B8b sont illisibles. Plusieurs de ces séquences ont fonctionné correctement mais étaient très courtes. Les séquences courtes étaient toutes complètement semblables à d'autres séquences correctes. Le signal était très fort au début puis disparaissait d'un coup. Ce phénomène pourrait être dû à une trop forte quantité d'ADN lors de la réaction de séquence provoquant une consommation rapide de réactifs en début de séquence et un manque de réactifs pour le reste de la séquence. Toutefois, ce phénomène est survenu à des produits de PCR quantifiés qui ont montré que ce n'était pas le cas. Ces bandes ont été étudiées plus en détail dans le paragraphe suivant.

Clonage et séquençage des bandes extraites de la DGGE présentant un caractère mixte

Le fait que la DGGE présente des bandes qui n'ont pas pu être séquencées montre les limites de la méthode à différencier fidèlement des fragments d'ADN différents mais de même longueur. Malgré tout, la DGGE reste un excellent outil de prospection d'échantillons naturels, les difficultés rencontrées proviennent probablement de la nature de nos échantillons et des amorces utilisées. Pour comprendre plus en détail les résultats de la DGGE, six bandes parmi celles dont le séquençage a échoué ont été clonées et séquencées à nouveau. Nous présenterons ici les résultats du clonage de ces bandes. A nouveau, parmi tous les clones obtenus, seuls certains ont pu être séquencés convenablement. Seuls les clones ayant pu être séquencés sont pris en compte. Les séquences sont nommées selon le nom de la bande dont elles sont issues (figure 3.6) suivi du numéro de leur clone. Ainsi, par exemple, la séquence B7b4 correspond au clone numéro 4 de la bande B7b.

La bande mixte B1 a montré après clonage la présence de 3 clones différents ayant chacun une substitution par rapport au clone original. Ceci est étonnant. D'une part, cette unique substitution ne devrait pas provoquer une bande totalement mixte telle que celle obtenue lors de la première tentative de séquençage, et d'autre part, ces substitutions ne devraient pas être présentes puisque ces séquences sont toutes issues d'un clone unique (F90) et devraient donc être identiques. Ces erreurs proviennent probablement d'erreurs d'incorporation de bases lors d'une réaction de PCR.

La bande B6a a donné lieu à 3 séquences lisibles. L'une d'elle, très courte, ne contenait que les amorces 18S1F et EUK516 collées l'une à l'autre. La seconde (B6b 8) était très courte, mais 100% égale à la bande B6b située largement plus bas dans le profil. La troisième séquence, B6a2, tout à fait lisible, ne correspond à aucune séquence de toute l'étude (similitude maximale de 97.8%).

La bande B7a a donné lieu à trois séquences assez différentes les unes des autres (de 97.9 à 98.6% de similitude). A nouveau, ces trois séquences ne correspondent à aucune autre séquence de l'étude.

La bande B7b a donné lieu à 5 séquences. La séquence B7b3 ne correspond à aucune autre séquence de l'étude, mais est égale à la séquence AY271674 (*Actinochloris sp.*). Les séquences B7b4, B7b7 et B7b10 étaient courtes (environ 100 bp) mais égales à B7b3. Une autre séquence assez différente (B7b9) a aussi été identifiée et se rapproche du cluster E10 (voir figure 3.3).

La bande B8a a donné lieu à deux séquences différentes. La première séquence est partagée par les clones B8a1, B8a2 et B8a3 sauf que la partie lisible de B8a2 et B8a3 était plus courte que B8a1. La deuxième séquence (clone B8a7) est légèrement différente avec 98.2% de similitude par rapport aux autres séquences. A nouveau, aucune séquence de toute l'étude ne leur correspond exactement.

Suite à une erreur de manipulation lors de la réaction de séquençage, les séquences des clones issus de la bande B8b ont du être refaites. Jusqu'ici, toutes les séquences ont été réalisées avec l'amorce 18S1f située sur le fragment d'ADN à séquencer. Ceci garantissait d'obtenir une séquence allant jusqu'au bout du fragment à analyser (la longueur du fragment séquençable est limitée), mais du coup le début de la séquence était perdu lors de la purification du produit de séquençage. Pour éviter ce phénomène, ces séquences ont été répétées en utilisant les amorces M13F puis M13R situées sur le plasmide servant au clonage. Ceci double le nombre de séquences à réaliser, mais permet une lecture intégrale du fragment qui nous intéresse. Cette manière de procéder a permis d'identifier un phénomène très étonnant : la séquence du clone numéro 12 de la bande B8b (clone B8b.12) est parfaitement lisible et semblable à d'autres séquences mis à part une addition de 58 bp en début de séquence (figure 3.8). Cette inclusion est composée de l'amorce 18S1F, de quelques nucléotides puis de l'amorce EUK516. La suite de la séquence est tout à fait normale et commence par l'amorce 18S1F. Cette séquence contient donc deux fois chaque amorce. La présence dans cette insertion de l'amorce EUK516 limite les possibilités d'erreurs à deux moments : La nested-PCR avant de faire le gel de la DGGE et la première PCR après avoir découpé la bande du gel. A aucune autre étape l'amorce EUK516 n'a été employée.

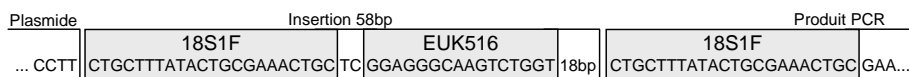


FIG. 3.8 – Insertion non-désirée de 58 bp en début de séquence.

Si l'erreur a eu lieu lors de la nested-PCR, cette insertion était déjà présente dans le gel et a forcément influencé la température de fusion du fragment et sa position dans le gel. Cette erreur a peut-être aussi eu lieu pour d'autres séquences ce qui pourrait expliquer le nombre élevé de séquences mixtes ou illisibles (cette insertion produit un déphasage d'une partie des fragments de la réaction). Malheureusement, la plupart des séquences ont été obtenues en utilisant l'amorce 18S1F impliquant la perte des 50 premières paires de bases lors de la purification et empêchant de vérifier si cette erreur a eu lieu ou pas.

Ce phénomène de fixation erronée des amorces est peut-être aussi à la base de d'artefacts indésirables tels que les bandes B9a à B9c qui ont une séquence identique lorsqu'on utilise comme nous l'avons fait l'amorce 18F1S, mais qui apparaissent à des hauteurs différentes. En utilisant les amorces M13F et M13R, on se serait peut-être rendu compte que le début de ces séquences n'est pas identique et que des différences visibles dans le gel en découle.

3.2 Mobilité des algues de neige en milieu naturel

3.2.1 Conditions environnementales

Variabilité spatiale de la température sur le site de Sertig

La variabilité spatiale de la température à différentes hauteurs au-dessus ou dans le sol a été évaluée au cours de la première saison de mesure sur le site de Sertig. La température aux hauteurs de 15 cm, 0 cm et -15 cm (dans le sol) a été mesurée en continu à trois points du site de mesure. Ces mesures ont donc eu lieu à l'intérieur de la neige pendant la majeure partie de la saison. Des différences importantes ont été mesurées en fin de saison. Ces différences étaient dues à la disparition complète du manteau neigeux à une date différente selon les points de mesure. Ces différences étaient dues à la microtopographie (léger creux, ombre) des points de mesure. Par contre, tant que la neige recouvrait l'ensemble du terrain de mesure, les températures étaient homogènes. L'écart type moyen de température entre les différents endroits pendant la période d'enneigement était de 0.03 °C, soit inférieur à la précision des enregistreurs de température. Ceci permet de considérer la température du manteau neigeux comme homogène sur le site d'étude.

Évolution des températures

Les 11 enregistreurs de température installés sur le site de Sertig ont permis de retracer l'évolution des températures de l'air et du manteau neigeux à différentes hauteurs. L'évolution des deux saisons de mesures étant assez semblable, nous ne présenterons ici que les résultats de la saison 2005¹.

La mesure des températures de la saison 2005 a commencé le 5 novembre 2004, soit bien avant les premières chutes de neige. La figure 3.9 montre l'évolution des températures à la surface du sol et à 2.50 m (température de l'air). La figure 3.10 montre la moyenne journalière des mêmes données.

Les mesures ont commencé avant les premières chutes de neige. L'amplitude journalière était alors importante (environ 10 °C) et la température de l'air est restée basse avec un minimum à -13.5 °C le 9 novembre. Jusqu'au 19 novembre, la température moyenne journalière s'est approché plusieurs fois des -10 °C. Au niveau du sol, les fluctuations journalières étaient importantes. L'absence de neige ou une faible épaisseur de neige ont provoqué un refroidissement important du sol. Le sol a gelé jusqu'à une température de -4.4 °C en surface et jusqu'à -1.2 °C à 15 cm de profondeur (non représenté sur la figure). Entre le

¹Convention d'écriture (rappel) : Le cycle de vie des algues de neige étant plutôt concentré sur le printemps, nous désignerons les saisons de mesure par l'année de leur printemps, même si elles ont en fait débuté avant le premier janvier. Ainsi la désignation « saison 2004 » désigne l'hiver 2003-2004 et le printemps 2004

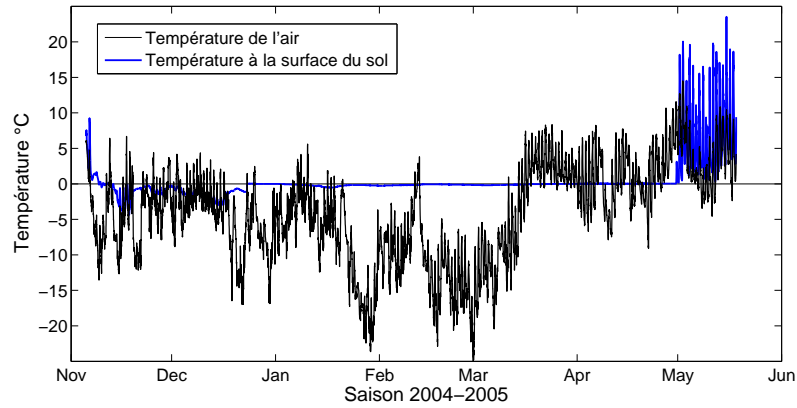


FIG. 3.9 – Évolution des températures de l'air et de la surface du sol mesurées sur le site de Sertig pendant la saison 2005.

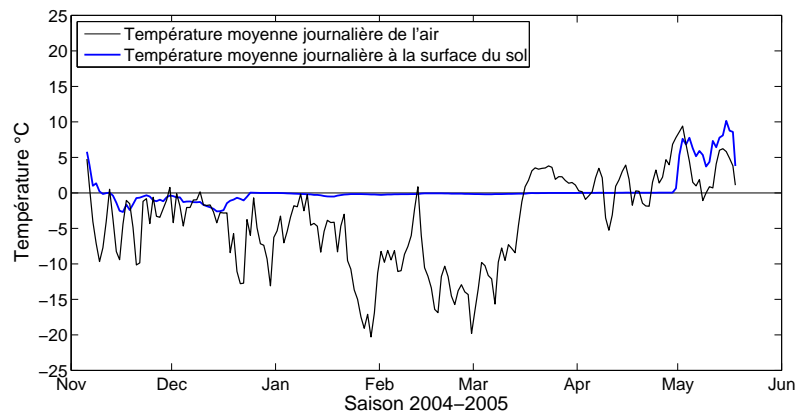


FIG. 3.10 – Moyennes journalières de la température de l'air et à la surface du sol.

19 novembre et le 23 décembre, les températures étaient assez stables. Si la température moyenne journalière est restée le plus souvent négative, elle a tout de même franchi les $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ tous les jours. Le 23 décembre, la température du sol est remontée soudainement à $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ et y est restée jusqu'au printemps. Cette date marque le début d'une couverture de neige importante qui isolera le sol des rigueurs de l'hiver. A partir de cette date, les températures moyennes journalières sont restées négatives avec deux épisodes très froids fin février et début mars (moyenne journalière proche de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Un réchauffement important est intervenu dès le 15 mars et a marqué le début de la période de fonte. Dès la disparition de la neige, le 2 mai, le sol s'est réchauffé fortement et sa température en surface a dépassé celle de l'air.

Constitution du manteau neigeux

Les deux saisons qui ont été suivies sur le site de Sertig (1860 m) ont montré des caractéristiques similaires. Les grandes lignes de l'historique de la saison 2005 sont décrites plus bas. La figure 3.11 permet une visualisation graphique des 5 principaux paramètres de la couverture neigeuse tout au long de la période de mesure. Le début de la saison (décembre à février) n'a pas été couvert car il est trop éloigné de la période d'activité des algues de neige.

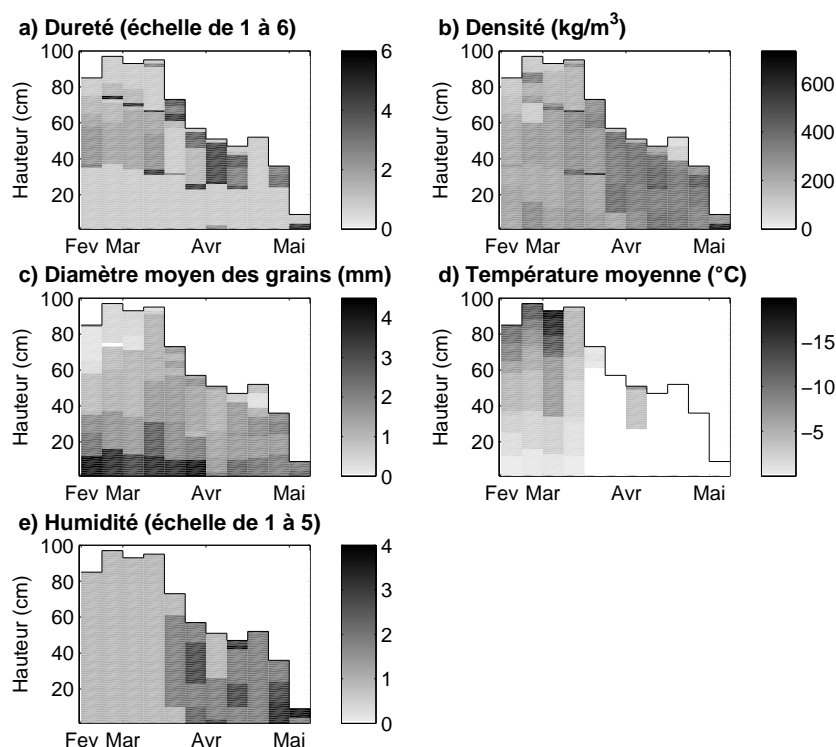


FIG. 3.11 – Évolution des principales caractéristiques du manteau neigeux au cours de l'hiver 2005, a) dureté, b) densité, c) diamètre moyen des grains de neige, d) température, e) humidité.

L'enneigement a été continu du 23 décembre 2004 au 2 mai 2005. Une couche de neige en gobelets d'une épaisseur de 30 cm s'est formée en début de saison et a persisté jusqu'au 29 mars. Cette couche s'est formée en raison du fort gradient de température à l'intérieur du manteau neigeux. Une telle couche constitue un danger important pour les adeptes des sports d'hiver à cause de son manque de cohésion. Au niveau microscopique, elle est caractérisée par des grains en forme de gobelets de grandes dimensions (2 à 5 mm). Sa porosité importante combinée à une microstructure assez grossière engendre une densité d'environ 250 kg/m^3 . Cette couche ne contient que très peu d'eau sous forme liquide. La présence d'eau liquide entraînerait une métamorphose rapide des grains vers des formes plus arrondies. Cette couche constitue donc a priori une barrière difficilement franchissable pour les algues de neige.

Un épisode plus chaud et accompagné de pluie est survenu autour du 12 février (figure 3.12). L'apport de précipitations sous forme liquide a provoqué un apport énergétique important qui s'est traduit par un réchauffement rapide et complet du manteau neigeux. Malgré les températures négatives qui ont suivi immédiatement cet épisode, le manteau neigeux a mis environ 4 jours pour se refroidir à nouveau. Ce refroidissement a engendré une couche de glace de 2.5 cm d'épaisseur qui a persisté presque toute la saison. Cette couche très dense et très dure peut aussi constituer un obstacle à la progression des algues à cause de sa faible porosité. Une telle couche favorise l'écoulement latéral de l'eau mais n'est toutefois pas totalement imperméable comme en témoigne l'observation de « flow fingers » (figure 3.13). Il s'agit d'une infiltration d'eau localisée qui a regelé dans les profondeurs du profil en formant une stalactite de glace de 1,5 cm de diamètre et 20 cm de hauteur. Ce phénomène montre bien l'aspect non homogène de l'écoulement de l'eau dans la neige. D'autres croûtes se sont formées plus tard dans la moitié supérieure du manteau neigeux. Elles étaient dues soit à une infiltration d'eau de fonte soit à des précipitations liquides. Ces croûtes étaient souvent de faible épaisseur (moins de 1 cm) et n'étaient souvent pas continues ni parallèles à la surface du manteau neigeux. Elles ont pu favoriser la rétention d'eau liquide proche de la surface du manteau neigeux.

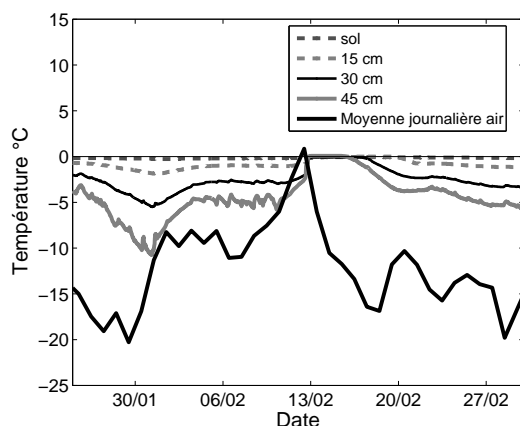


FIG. 3.12 – Températures à l'intérieur du manteau neigeux et moyennes journalières de la température de l'air autour de l'épisode pluvieux du 12 février 2005.

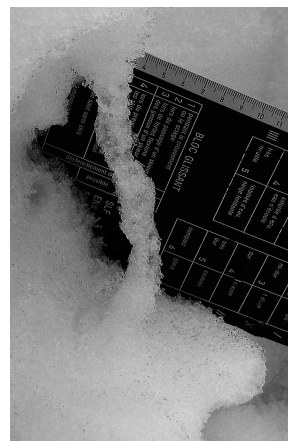


FIG. 3.13 – Observation d'un « flow finger » le 29 mars 2005. La neige meuble entourant le flow finger a été délicatement enlevée pour mettre en évidence cette structure plus dure.

Le réchauffement a été très important dès le 15 mars. Le profil de température du manteau neigeux est devenu isotherme (0°C) sur toute sa hauteur. Ceci a entraîné une modification rapide de la microstructure du manteau neigeux. La métamorphose destructive entraîne effectivement la réduction des grains de forme complexe vers des grains arrondis d'assez grandes dimensions (1.5 à 2 mm). La densité de la neige augmente et dépasse souvent 450 kg/m³. La présence d'eau liquide est parfois visible entre les grains de neige avec une simple loupe. Cette constitution du manteau neigeux est plus favorable au développement des

algues de neige. Comme décrit dans l'état des connaissances, il semble néanmoins difficile que les algues de neige puissent nager vers la surface en raison de l'écoulement rapide de l'eau de fonte ou de la tension de surface que retient l'eau entre les grains de glace sous forme de ménisques.

Le regel nocturne des couches supérieures du manteau neigeux a parfois été important. C'était particulièrement le cas le 4 avril où une température négative durant 12 heures et atteignant -8.8°C à la surface de la neige a entraîné un regel de 30 cm d'épaisseur. Ce jour là, il a fallu creuser le profil à l'aide d'une barre à mine.

Autant pour la saison 2004 que pour la saison 2005, la fin de saison sur le site de Sertig a été très brutale en raison de pluies intenses qui ont occasionné la fonte rapide du manteau neigeux. Ainsi, le manteau neigeux a disparu le 2 mai 2005 alors qu'une semaine plus tôt il était encore de 35 cm. En 2004, la neige a disparu le 12 mai 2004, perdant 27 cm en une semaine. Ce phénomène n'est clairement pas favorable au développement des algues de neige qui voient leur milieu disparaître avant que leur cycle de vie ne soit terminé. En effet, autant en 2004 qu'en 2005, la disparition rapide du manteau neigeux n'a pas permis l'apparition de neige rouge sur le site d'étude.

3.2.2 Composition chimique du manteau neigeux

Répartition des concentrations (saisons 2004 et 2005)

La structure des données de chaque élément analysé est représentée à l'aide d'histogrammes (figure 3.14). La distribution des données est fortement asymétrique. Ceci témoigne qu'un grand nombre de valeurs sont proches ou inférieures à la limite de détection. Ce phénomène peut, bien entendu, affecter l'analyse des résultats. Ces résultats sont toutefois conformes à nos attentes. En effet, les méthodes choisies (voir section 2.2.3) sont suffisamment sensibles pour caractériser un milieu où une croissance microbienne est possible. Des méthodes plus poussées auraient pu combler cette lacune, mais n'auraient que peu influencé les résultats.

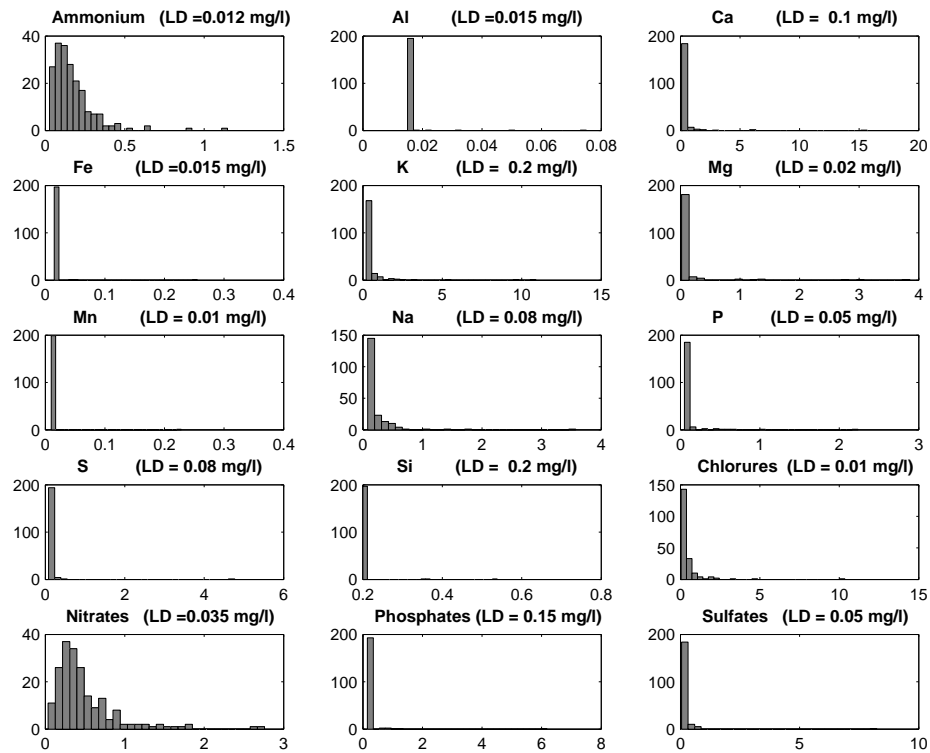


FIG. 3.14 – Distributions des différents composés chimiques analysés. La forte asymétrie des données témoigne d'un nombre important d'échantillons ayant une concentration faible, voire inférieure à la limite de détection.

Le pH et la conductivité ont été mesurés directement après le prélèvement des échantillons. L'histogramme de ces deux paramètres (figure 3.15) montre que le pH ne varie pas beaucoup entre les différents échantillons. Il s'étale entre 4.5 et 6.7 avec une moyenne à 5.6. La majorité des échantillons avaient une conductivité électrique inférieure à $10 \mu S/cm$. La conductivité maximale était de $37.9 \mu S/cm$ tandis que la valeur moyenne se situe à $6.8 \mu S/cm$. Le milieu est

donc légèrement acide tandis que la conductivité électrique est très faible (10× moins que l'eau du robinet).

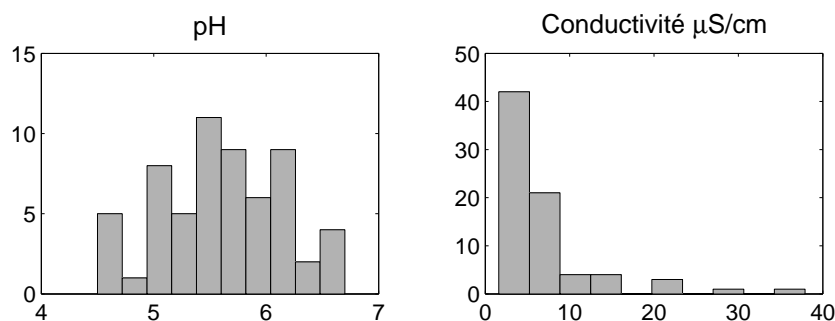


FIG. 3.15 – Histogramme du pH et de la conductivité électrique des 78 échantillons de neige prélevés sur le site de Sertig pendant la saison 2005.

Limite de détection des méthodes analytiques et validité des résultats (saisons 2004 et 2005)

Le tableau ci-dessous (tableau 3.3) regroupe l'ensemble des composés analysés, rappelle la limite de détection en vigueur et montre le nombre d'échantillons dont la valeur mesurée est supérieure à la limite de détection.

TAB. 3.3 – Résultat des analyses chimiques : liste des composés analysés, limite de détection correspondante (LD) en *mg/l* et nombre d'échantillons sur 200 dont la valeur est supérieure à LD.

	LD	nbr > LD
NH_4^+	0.012	200
Al	0.015	7
Ca	0.1	129
Fe	0.015	4
K	0.2	57
Mg	0.02	110
Mn	0.01	1
Na	0.08	119
P	0.05	85
S	0.08	56
Si	0.2	3
Cl^-	0.01	200
NO_3^-	0.035	196
PO_4^{3-}	0.15	14
SO_4^{2-}	0.05	160

On constate que pour 5 des composés (4 métaux : Al, Fe, Mn, Si et un nutriment : les phosphates) moins de 10% des échantillons ($n = 200$) ont une concentration supérieure à la limite de détection. Les métaux concernés, mon-

trant peu d'importance ont été écartés de l'analyse. Les phosphates ont tout de même été conservés car ils jouent un rôle très important dans le métabolisme des organismes.

Afin de bien saisir l'ampleur de l'erreur faite à cause de la présence de nombreuses mesures proches ou inférieures à la limite de détection (LD), nous allons maintenant calculer la concentration moyenne de chaque composé de deux manières : 1) en interprétant les concentrations inférieures à LD comme étant *nulles*, 2) en interprétant les concentrations inférieures à LD comme étant *égales à LD*. La vraie moyenne se situe quelque part entre les deux valeurs obtenues mais n'est pas connue (tableau 3.4).

TAB. 3.4 – Évaluation de l'incertitude sur la concentration moyenne (*mg/l*) due à la présence de valeurs inférieures à la limite de détection. La première moyenne est calculée en considérant les concentrations faibles comme étant nulles. La deuxième moyenne est calculée en considérant les concentrations faibles comme étant égales à la limite de détection (LD). La différence est calculée en % par rapport à la première moyenne.

	Moy (<LD → 0)	Moy (<LD → LD)	Différence %
NH ₄ ⁺	0.172	0.172	0
Al	0.001	0.016	1242
Ca	0.354	0.389	10
Fe	0.002	0.017	799
K	0.339	0.482	42
Mg	0.116	0.125	8
Mn	0.001	0.011	873
Na	0.174	0.206	19
P	0.066	0.095	43
S	0.064	0.122	90
Si	0.006	0.203	3127
Cl ⁻	0.439	0.439	0
NO ₃ ⁻	0.491	0.492	0
PO ₄ ³⁻	0.065	0.205	214
SO ₄ ²⁻	0.183	0.193	5

On constate que l'erreur peut être jusqu'à 12 fois supérieure à la valeur minimale probable. Toutefois, en éliminant les composés dont la pertinence a été jugée trop basse, l'erreur moyenne est de 24% avec un pic à 90% pour le soufre. Cette incertitude, bien qu'importante, est jugée acceptable pour notre étude d'autant plus que les résultats pour les principaux nutriments et minéraux, à l'exception des phosphates et du phosphore, sont très bons.

Évolution saisonnière (saisons 2004 et 2005)

Parmi les échantillons analysés, 99 échantillons proviennent des profils de neige effectués en hiver et au printemps 2004. Cette année là, tous les profils ont été effectués sur le site de Sertig. Par contre, les échantillons ont été prélevés selon un découpage arbitraire du manteau neigeux (tous les 10 ou 5 *cm*) et ne tiennent pas compte de la stratification naturelle du manteau neigeux. Du coup, une mise en relation entre les caractéristiques physiques et les caractéristiques chimiques de la neige n'est pas possible.

Pendant la saison 2005, 94 échantillons ont été prélevés, dont 76 sur le site de Sertig. Chaque échantillon dédié à l'analyse chimique correspondait à une couche du manteau neigeux. Ceci permet d'établir des liens entre la chimie de la neige, les caractéristiques physiques de la neige et la présence des algues de neige.

Saison 2004 : Évolution des concentrations en surface et proche du sol.

L'évolution chimique en surface et au fond du manteau neigeux au cours de la saison 2004 (figure 3.16) montre que les concentrations de presque tous les composés (sauf pour les nitrates) étaient en général plus importantes proche du sol qu'en surface. Un grand pic a été constaté pour presque tous les composés vers fin mars. Ce pic correspond à peu près au début de la période de fonte intensive et pourrait être occasionné par la libération des ions peu liés aux cristaux de glace lors de l'amorçage du processus de fonte et qui s'accumulent en bas du profil. Cependant, il est aussi très probable que cette valeur soit due à une contamination de l'échantillon lors de son prélèvement. Dès que le manteau neigeux est humide, il est en effet difficile de prélever les échantillons de neige proches du sol sans prélever en même temps quelques particules provenant du sol. Rappelons encore que le site d'étude se situe sur un pâturage sur lequel un apport de purin et de fumier a lieu pendant la saison chaude.

Les chlorures et le sodium présentent tous deux des pics simultanés début mars et début mai. Il s'agit probablement de contaminations lors des prélèvements (outils, mains, autre apport) ou au laboratoire (vaisselle etc.). Les prélèvements effectués pendant la saison 2005 ont par contre été réalisés et traités avec précautions pour éviter ce genre de contamination. L'évolution des concentrations en surface et proche du sol de l'année 2005 sont présentés à l'annexe B, page 131.

Le cas des nitrates est particulier tant en 2004 qu'en 2005. C'est en effet le seul composé dont les concentrations en surface sont plus élevées que celles en profondeur. C'est aussi le composé dont les concentrations en surface sont les plus élevées particulièrement pendant la saison froide. Avec un maximum de 2.8 mg/l et une moyenne de 1.1 mg/l en 2005 (maximum 1.8, moyenne 0.6 mg/l en 2004). Ceci montre qu'un apport important de nitrates se fait par la surface sous forme de déposition sèche ou avec les précipitations. Ce phénomène semble être spécifique au site de Sertig puisque les 18 échantillons analysés ne provenant pas de Sertig ont une moyenne de 0.2 mg/l et un maximum de 0.5 mg/l seulement. Il faut encore noter que le nitrate d'ammonium est parfois utilisé en grandes quantités pour durcir la neige en vue d'une compétition de ski. Toutefois, le site étant éloigné des pistes de ski, cette cause semble écartée. Des apports de nitrates par les vaches ou l'épandage sont bien entendu probables, mais n'explique pas leur présence à la surface de la neige.

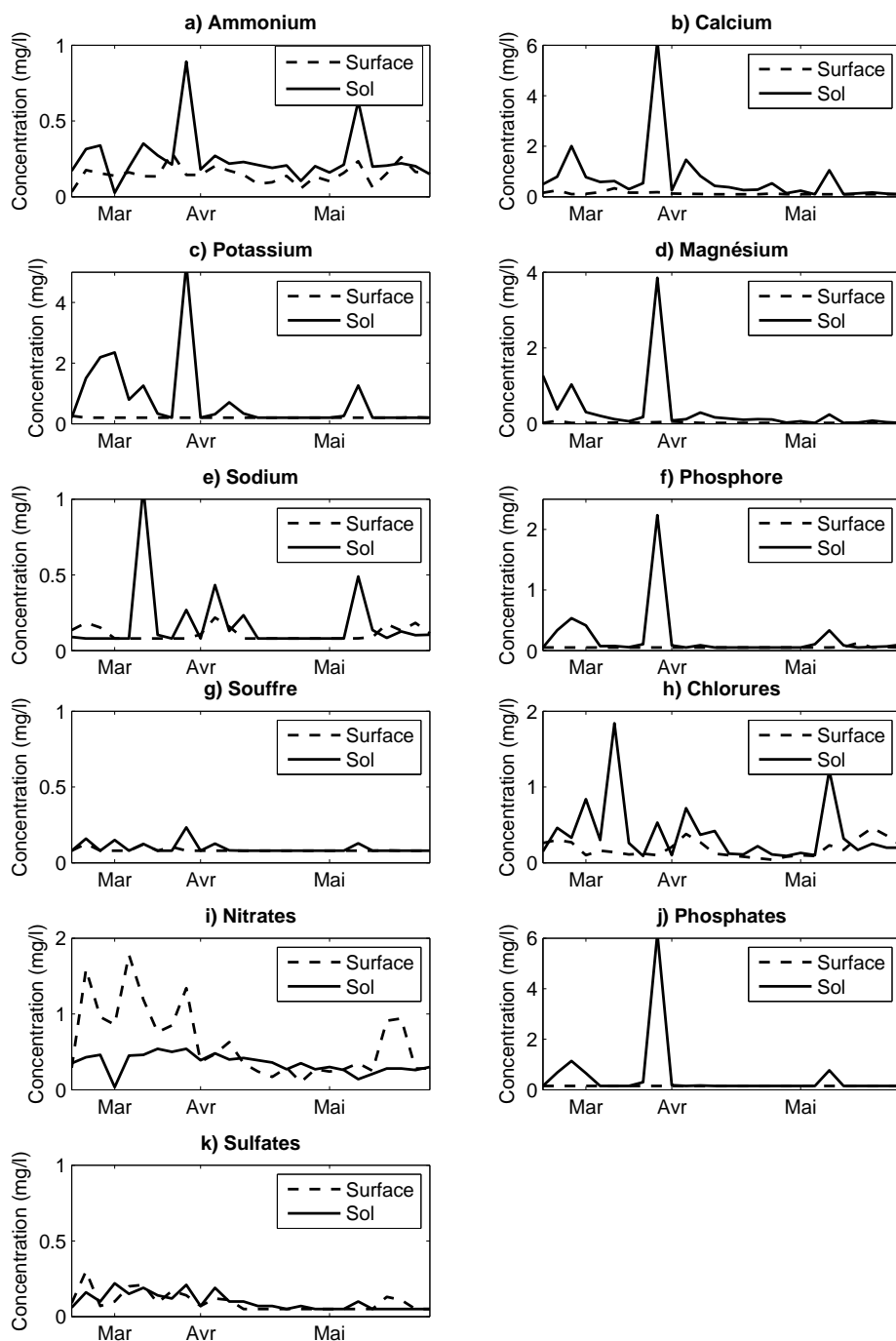


FIG. 3.16 – Évolution de la composition chimique en surface et au fond du manteau neigeux sur le site de Sertig pendant la saison 2004. (Saison 2005 présentée en AnnexeB, p. 131.)

Saison 2005 : Évolution détaillée de la composition chimique du manteau neigeux.

La figure 3.17 retrace l'évolution chimique du manteau neigeux pour la saison 2005. On retrouve les principaux composés analysés ainsi que la conductivité électrique.

Pour la plupart des espèces chimiques, les concentrations les plus élevées se trouvent soit à la surface du manteau neigeux soit au contraire au fond du manteau neigeux. Ceci montre clairement que tant l'atmosphère que le sol constituent une source de nutriments. L'échelle de valeurs indiquant la concentration d'un échantillon varie d'un paramètre à l'autre. Certains graphes comme le potassium, le phosphore ou les chlorures contiennent des échantillons dont la concentration est très élevée par rapport aux autres. Du coup, l'échelle de valeurs est décalée et les détails sont moins visibles pour le reste des échantillons. Ces valeurs extrêmes se retrouvent souvent directement à la surface ou directement au niveau du sol. Ces concentrations élevées sont probablement dues à des apports en composés chimiques importants lors de précipitations, de dépôts de sable du Sahara ou de remontées de l'eau du sol dans le manteau neigeux (zone capillaire). Pour les échantillons proches du sol, une contamination lors du prélèvement avec un peu de terre ou des débris végétaux n'est pas exclue.

Si les apports de nutriments en provenance de l'atmosphère sont probablement assez homogènes à l'échelle d'une région, cela n'est probablement pas le cas pour les apports venant du sol. Dans notre cas, le sol du site de Sertig est un sol riche en matières organiques puisqu'il s'agit d'une prairie qui est régulièrement enrichie par la présence de bétail et par l'épandage de fumier. Ainsi, les apports du sol relativement importants relevés ici sont probablement beaucoup plus limités sur un sol minéral en haute altitude.

On remarque aussi que certaines couches situées à l'intérieur du manteau neigeux ont des concentrations plus élevées que le reste du profil. Ce phénomène est bien visible sur les graphes de l'ammonium, du sodium, des nitrates, des phosphates et de la conductivité. Ces couches sont en réalité des croûtes ou des lamelles de glace. Les concentrations plus importantes relevées dans les croûtes ne sont pas étonnantes étant donné que ces couches sont souvent occasionnées par une accumulation en un endroit d'eau de fonte ou de pluie qui regèle par la suite.

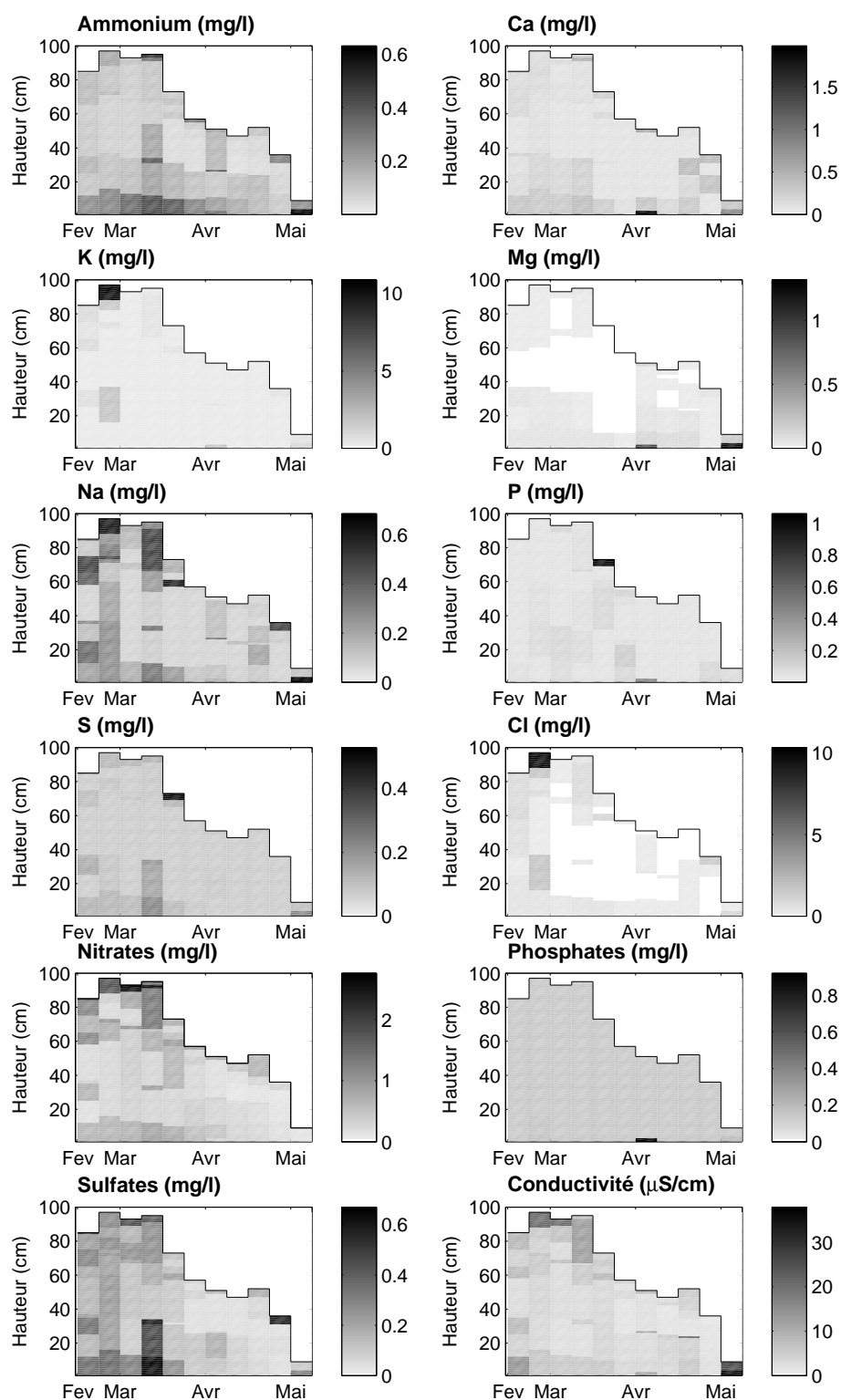


FIG. 3.17 – Évolution de la composition chimique du manteau neigeux (mg/l) et de la conductivité électrique ($\mu\text{S}/\text{cm}$) sur le site de Sertig au printemps 2005.

Relations entre les différents composés (saisons 2004 et 2005)

Les relations entre les différents composés analysés ont été étudiées à l'aide d'une analyse en composantes principale (ACP) dans le logiciel SPlus. Avant toute chose, il était nécessaire de centrer et réduire les données afin de s'affranchir de l'importance exagérée de certains paramètres par rapport à d'autres. Centrer et réduire consiste à soustraire la moyenne μ à chaque observation X_i et à normaliser le tout par l'écart-type σ . Les données centrées réduites Y_i correspondent donc à :

$$Y_i = \frac{X_i - \mu}{\sigma}$$

La réduction des 11 composés retenus en 2 composantes principales est représentée graphiquement à la figure 3.18. Cette représentation permet de visualiser les relations entre les différentes variables dans un espace de 2 dimensions défini par les deux composantes principales. Cette simplification facilite l'interprétation des résultats tout en conservant 65% de la variance totale. Les chiffres représentent les observations tandis que les flèches (vecteurs) représentent les différents composés. Deux vecteurs parallèles montrent une forte corrélation entre les deux variables qu'ils représentent tandis que deux vecteurs perpendiculaires montrent que les variables sont indépendantes. Il est ainsi possible de regrouper les différents composés en trois groupes. Le groupe 1 comprend les nitrates, les sulfates, les chlorures et le sodium. Le groupe 2 rassemble le potassium et le soufre tandis que le groupe 3 regroupe l'ammonium, le calcium, le magnésium, le phosphore et les phosphates.

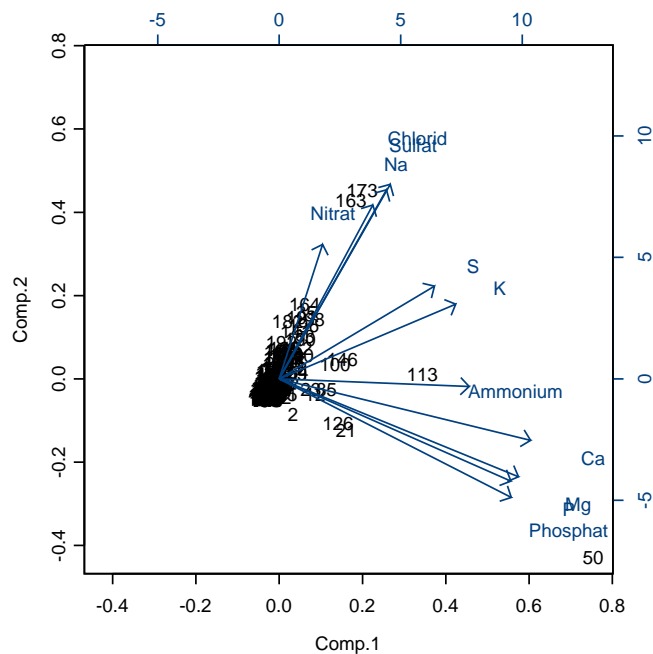


FIG. 3.18 – Représentation graphique des différents composés (flèches) ainsi que des mesures (chiffres) selon les deux premières composantes principales (variables centrées réduites). Cette représentation décrit 65% de la variance totale des mesures.

3.2.3 Développement des algues de neige sur le terrain (saisons 2004 et 2005)

Le développement temporel des algues a été suivi sur le site de Sertig pour les saisons 2004 et 2005. Pour la saison 2004, les échantillons de neige ont été prélevés tous les 10 *cm* en début de saison puis tous les 5 *cm*. Cette subdivision a été faite indépendamment du résultat du profil stratigraphique. Il en résulte une image assez grossière du développement des algues de neige pendant la première saison de mesures (figure 3.19). Par contre, pour la saison 2005 (figure 3.20), de nouvelles méthodes d'analyse ont été développées pour permettre le prélèvement et l'analyse de chaque couche des profils stratigraphiques. Les résultats sont plus précis et permettent une analyse plus détaillée tenant aussi compte des paramètres physico-chimiques du manteau neigeux.

Lors de la première saison d'observation, les premières algues de neige sont apparues sous forme de cellules végétatives le 14 avril, principalement dans le bas du profil. Les algues se sont rapidement propagées jusqu'à une hauteur de 30 *cm* et resteront présentes jusqu'à la fin de la saison. Une exception est la présence de quelques cellules végétatives à la surface du manteau neigeux le 23 avril. Les spores (en bas à droite sur la figure 3.19) semblent s'être formées très rapidement et resteront aussi présentes dans le profil jusqu'à la fin de la saison. A partir de début mai, plusieurs chutes de neige se sont produites. On constate ici que la neige fraîche n'a pas été colonisée par les algues de neige. Si l'épaisseur de neige a augmenté, la position des algues n'a pas changé.

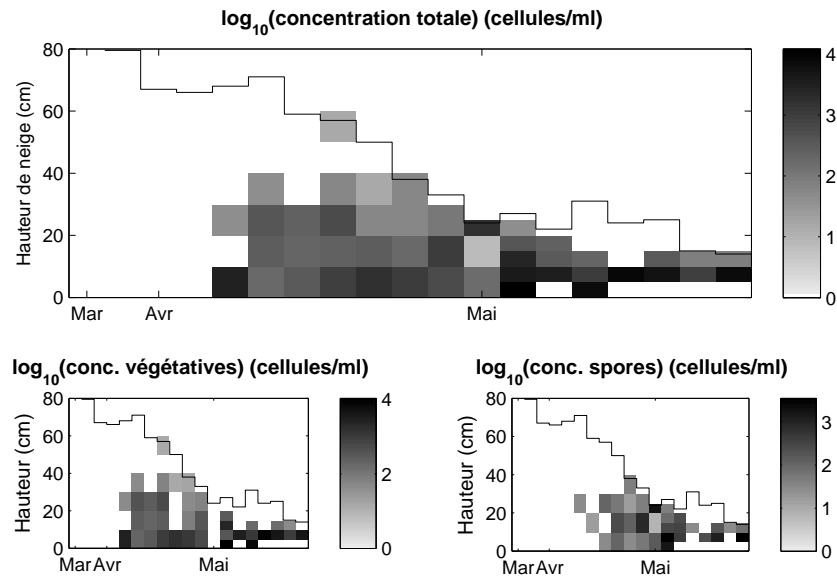


FIG. 3.19 – Développement des algues de neige sur le site de Sertig pendant la saison **2004**. Le graphe supérieur représente la concentration totale en algues de neige tandis que les graphes inférieurs font une distinction entre les cellules végétaives (*à gauche*) et les spores (*à droite*). La ligne continue représente la hauteur de neige totale.

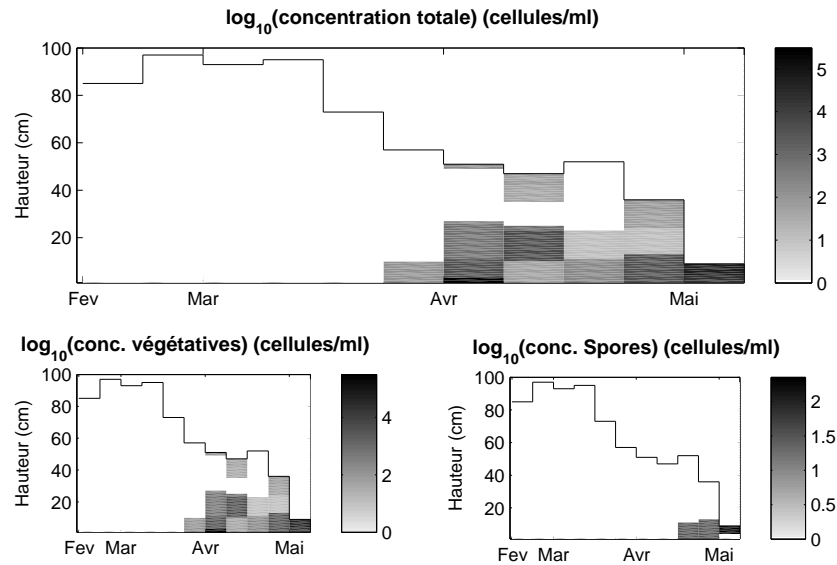


FIG. 3.20 – Développement des algues de neige sur le site de Sertig pendant la saison **2005**. Le graphe supérieur représente la concentration totale en algues de neige tandis que les graphes inférieurs font une distinction entre les cellules végétaives (*à gauche*) et les spores (*à droite*). La ligne continue représente la hauteur de neige totale.

En 2005, l'apparition des cellules végétaives (29 mars) a été plus précoce qu'en 2004 (14 avril). Par contre, la saison s'est aussi terminée plus en avance. Les algues semblent s'être développées d'une part à partir du sol jusqu'à 25 cm de hauteur et d'autre part à partir de la surface. Ce développement à partir de la

surface pourrait signifier un apport d'algues par le vent suivi d'un développement proche de la surface. Les premières spores de 2005 sont apparues le 20 avril soit à peu près à la même date qu'en 2004. Par contre, le développement des spores n'a été que très limité et confiné au bas du profil. Le manteau neigeux a rapidement disparu en raison de fortes chutes de pluie. La coloration de la neige n'a pas pu être observée.

Ces résultats permettent de se faire une idée du développement des algues de neige dans un manteau neigeux naturel. Toutefois, il n'est pas possible d'en tirer une information quantitative sur la migration des algues de neige. En effet, les résultats présentés ici sont le fruit de profils de neige réalisés sur un même site, mais pas exactement au même endroit. Comme la réalisation d'un profil stratigraphique implique de creuser un trou, le profil suivant doit être réalisé un peu plus loin. La distance typique entre deux profils est de 2 à 3 m. La variabilité spatiale de la distribution des algues de neige est importante même à quelques mètres d'écart. Il en résulte que l'évolution constatée entre deux profils est due d'une part à la durée écoulée, mais aussi à la distance qui les sépare. Étant donné le nombre important d'échantillons, il était nécessaire de classer rapidement et visuellement les organismes observés lors du comptage des échantillons. La séparation s'est faite selon les critères suivants :

- Cellules végétatives : cellules de taille petite à moyenne ($< 30 \mu m$), flagellées ou non, de couleur souvent verdâtre avec une membrane cellulaire plutôt mince.
- Spores : cellules de taille moyenne à grande ($> 20 \mu m$), membrane cellulaire épaisse, absence de flagelles, coloration souvent rouge ou orangée.

3.2.4 Relations entre les paramètres physico-chimiques du manteau neigeux et le développement des algues de neige (saison 2005)

Ces résultats sont principalement basés sur les données récoltées sur le site de Sertig en 2005. En effet, le prélèvement, l'analyse microscopique et l'analyse chimique systématique de toutes les couches des profils stratigraphiques permettent de mettre en évidence certaines relations entre les caractéristiques physiques et chimiques du manteau neigeux et la présence ou l'absence d'algues de neige.

Répartition des algues de neige selon la forme des grains (saison 2005)

La figure 3.21 montre dans quel type de neige des algues ont été trouvées. On constate que la plupart des algues ont été trouvées dans de la neige de type « forme de fonte (○) ». Les spores ont même été trouvées exclusivement dans ce type de neige. On détecte aussi quelques cellules végétatives dans la neige de type : « grains angulaires (□) », « grains angulaires à arrêtes arrondies (◻) », « gobelets (∧) », et « croûte de glace (■) ». Il s'agit toujours de couches de

neige assez âgées. Aucune algue n'a été trouvée dans de la « neige fraîche (+) », « peu transformée(/) » ou « à petits grains (•) ».

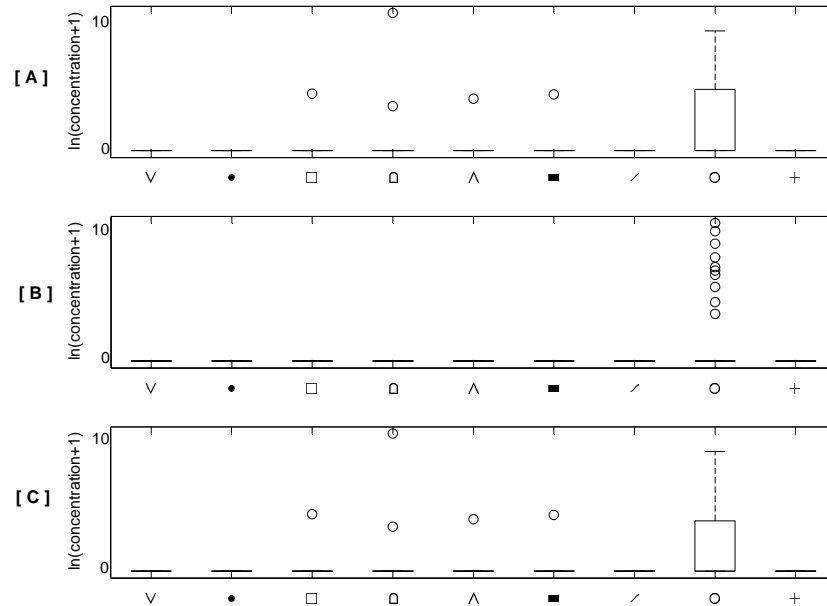


FIG. 3.21 – Boxplot de la concentration en algues de neige selon la forme des grains. **A.** concentration totale, **B.** spores, **C.** cellules végétatives. (V = givre de surface, • = petits grains, □ = grains angulaires, ◻ = angulaires arrondis, ∧ = grains en gobelets, ■ = glace, / = grains peu transformés, ○ = formes de fonte, + = neige fraîche).

Humidité de la neige (saison 2005)

La figure 3.22 montre la répartition des concentrations en algues selon l'humidité de la neige. On constate qu'aucune algue n'a été décelée dans de la neige sèche, n'ayant encore pas amorcé de processus de fonte. Les rares couches « sèches » contenant des algues sont des croûtes de regel ayant complètement gelé à cause d'un refroidissement important. De plus, plus l'humidité de la neige est élevée, plus les concentrations sont élevées. Ceci est en particulier vrai pour les échantillons de neige « très mouillée » puisqu'ils contenaient tous des algues. Ce résultat doit être interprété avec précaution puisque la catégorie « très mouillée » n'est représentée que par 3 échantillons.

Conductivité et pH (saison 2005)

Les figures 3.23 et 3.24, montrent le pH et la conductivité électrique des échantillons de la saison 2005, classés selon la présence ou l'absence d'algues. Bien que les conductivités les plus élevées se situent dans le groupe des échantillons contenant des algues, il n'y a pas de grande différence entre les échantillons qui contiennent des algues et ceux qui n'en contiennent pas. Étant donné que la

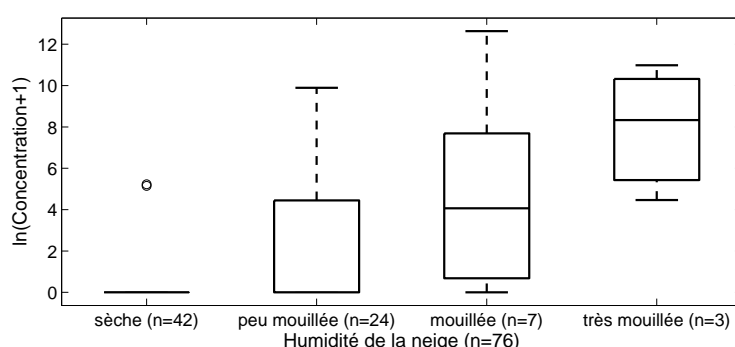


FIG. 3.22 – Répartition des algues selon l'humidité de la neige (n = nombre d'échantillons).

conductivité électrique des échantillons devrait être proportionnelle à la quantité de nutriments présents, ce résultat est assez surprenant.

Par contre, le pH est clairement différent selon la présence des algues de neige. Les échantillons ne contenant pas d'algues de neige sont légèrement plus acides que les échantillons qui contiennent des algues. La différence n'est pas très élevée (0.5 pH) mais assez clairement marquée. Cette différence peut s'expliquer par la photosynthèse qui a tendance à augmenter le pH dans les échantillons qui contiennent des algues.

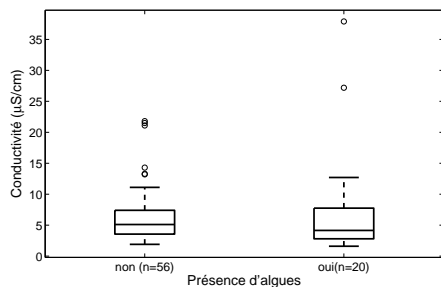


FIG. 3.23 – Conductivité électrique constatée en l'absence et en présence d'algues de neige.

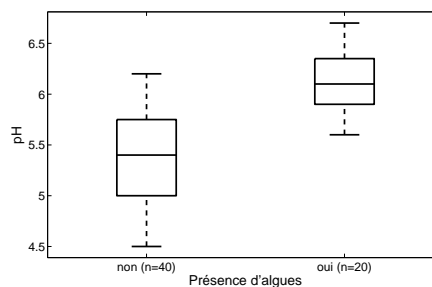


FIG. 3.24 – pH constaté en l'absence et en présence d'algues de neige.

Effet de l'apparition des algues (saison 2005)

En regardant l'évolution des concentrations des différents composés (figure 3.25), on se rend compte d'une diminution des concentrations dans les couches inférieures du manteau neigeux dès l'apparition des premières algues de neige. Cette diminution découle vraisemblablement d'une consommation des nutriments de la part des algues de neige, mais peut aussi être due à une élimination des différents composés avec l'eau de fonte. L'apparition des algues de neige étant simultanée avec le processus de fonte, il n'est pas possible de distinguer les deux phénomènes.

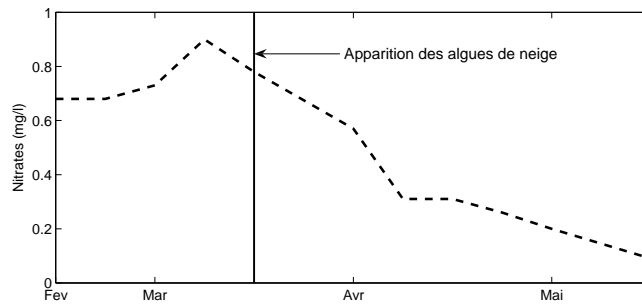


FIG. 3.25 – Diminution des concentrations en nitrates dans les couches profondes du manteau neigeux et date d'apparition des algues de neige.

3.3 Transports passifs en milieu naturel

3.3.1 Flux latéraux

Observations

L'écoulement de l'eau de fonte (ou de pluie) à travers le manteau neigeux joue un rôle fondamental sur la mobilité des algues de neige. En effet, les algues de neige évoluent dans la phase liquide du manteau neigeux pour des raisons physiologiques (besoin d'eau liquide) et physiques (tension superficielle). Les mouvements de la phase liquide participent donc obligatoirement à leur positionnement dans le manteau neigeux. De plus, l'écoulement de l'eau liquide dans le manteau neigeux n'est pas exclusivement vertical.

Cette dépendance entre l'écoulement de l'eau et le positionnement des algues de neige dans le manteau neigeux a été mise en évidence le 30 juin 2004 dans la région de Parsenn (Davos, GR). Une neige légèrement rouge a été trouvée en surface avec une épaisseur de neige de 1.80 m. Avec autant de neige, les algues ne peuvent pas venir du sol car le manque de lumière empêche leur germination (Curl et al., 1972). En effectuant un profil transversal, une bande rouge de 5 à 10 cm d'épaisseur située à 10 cm de profondeur parallèlement à la surface a été observée (figure 3.26).

Cette configuration était certainement due à un écoulement latéral de l'eau de fonte le long d'une couche de neige imperméable (croûte de regel par exemple). Dans ce cas, cette eau de fonte a probablement été chargée d'algues de neige provenant du haut de la pente là où la hauteur de neige était limitée. Les algues ainsi transportées de manière passive et idéalement positionnées dans le manteau neigeux ont pu poursuivre leur développement jusqu'à la coloration de cette couche. Aucune algue de neige n'a été trouvée dans les couches inférieures du manteau neigeux.



FIG. 3.26 – Vue latérale de la partie supérieure du profil de neige du 30.06.2006. On constate nettement une couche colorée à environ 10 *cm* de profondeur et parallèle à la surface de la neige. La hauteur de neige était de 1.80 *m*.

Essais de traçage

Un essai de traçage des écoulements latéraux avec un colorant alimentaire a été réalisé le 6.7.2004. Cet essai a été effectué sur le site décrit au paragraphe précédent, quelques jours après l'observation d'une couche de neige rouge proche de la surface (figure 3.26). Les essais consistaient à mettre en évidence la présence d'écoulements latéraux pour confirmer leur importance sur le positionnement et le développement des algues de neige.

Aucun écoulement latéral important n'a pu être démontré. L'écoulement latéral maximal constaté était de environ 1 *m* et était situé assez profondément dans le manteau neigeux (figure 3.27). Au moment de l'essai il n'y avait donc pas de couche imperméable ou de discontinuité dans la partie supérieure du manteau neigeux qui permettrait un écoulement latéral et le transport passif des algues de neige. Par contre, cela ne signifie pas que cette couche n'a pas existé plus tôt dans la saison et n'a pas été responsable de la présence d'une couche rouge proche de la surface. En effet, les conditions du manteau neigeux évoluent constamment et les conditions favorables à un écoulement latéral n'étaient probablement pas réunies au moment de l'essai. En particulier, en admettant que la couche imperméable était une croûte de regel, les températures élevées qui ont suivi ont pu faire fondre cette couche. Il n'y a aucune information disponible pour savoir quand l'entraînement des algues de neige a pu avoir lieu. Il est possible que ce processus se soit déroulé plusieurs semaines avant l'essai.



FIG. 3.27 – Profil transversal après 4 heures d’infiltration d’un colorant alimentaire à travers le manteau neigeux. En profondeur on constate une barrière capillaire qui retient un peu la couleur. Toutefois, l’écoulement latéral reste très limité.

Imperméabilisation du sol

Un autre essai a consisté à isoler le manteau neigeux à l’aide d’une bâche en plastique imperméable installée sur le sol avant les chutes de neige. Cette barrière artificielle interdit toute migration verticale des algues de neige. La présence d’algues de neige au-dessus de cette bâche indique qu’un transport latéral ou qu’un transport par le vent a eu lieu.

Une bâche a été installée sur le site de Sertig, l’autre dans la vallée de Flüela à 2230 m d’altitude. Les deux sites sont constitués d’un terrain presque plat.

A *Sertig*, aucune neige rouge n’a été constatée au-dessus de la bâche. Sur l’ensemble du site, seuls quelques endroits très localisés sont devenus rouges quelques jours avant la disparition complète de la neige. La présence d’une coloration rouge n’est donc pas un indice suffisant. Le 2 mai 2005, 5 échantillons de neige ont été prélevés au-dessus de la bâche : aux 4 coins (à 30 cm) du bord et au milieu (2 m du bord). Tous les échantillons contenaient des algues de neige. Sur les bords, les concentrations s’étendaient de 115 à 486 *cellules/ml* avec une moyenne de 357 *cellules/ml*. Au milieu, la concentration était de 128 *cellules/ml*. Il ne s’agit pas de concentrations très importantes, mais les concentrations trouvées sont suffisamment élevées pour exclure une contamination accidentelle. Une alternative au transport vertical a donc bel et bien dû avoir lieu. De plus, la diversité des espèces trouvées (de 2 à 5 espèces par échantillon) parle plutôt en faveur d’un transport passif. Il n’est pas possible de dire si ces organismes se sont déplacés avec le vent ou avec des écoulements latéraux. Le

fait que la concentration soit plus faible au milieu de la bâche indiquerait une progression locale à partir des bords.

Dans la vallée de Flüela, aucun échantillon n'a été prélevé. Par contre, de la neige rouge a été constatée à un des coins de la bâche à environ 35 cm du bord. La coloration rouge visible à l'oeil nu indique une concentration importante de plusieurs milliers de cellules par millilitre.

3.3.2 Transport par le vent

Très souvent, des pollens de conifères ont été décelés dans les échantillons de neige rouge. Les spores des algues de neige sont de taille et de forme assez semblable aux pollens. A priori, elles pourraient aussi se déplacer par le vent. Quinze pièges servant à collecter les particules présentes dans l'atmosphère sur des lames de microscope ont donc été installés dans le domaine skiable de Parsenn (Davos, GR) entre 2550 et 2700 m. Les pièges étaient positionnés entre 30 et 80 cm au-dessus du sol et capturaient donc les particules en suspension. Les pièges ont été exposés pendant 5 séries de 13 à 33 jours à partir du 10 juin jusqu'au 27 septembre 2005 (tableau 3.5). Chaque piège permettait une mesure indépendante selon les 4 points cardinaux (Nord, Sud, Est et Ouest). Ainsi, pour chaque série, 60 lames de microscope ont été collectées.

TAB. 3.5 – Périodes d'exposition des pièges à particules et conditions d'enneigement.

Série	Dates	Durée (j)	Couverture neigeuse
1	10.06. - 24.06.2005	14	continue
2	24.06. - 07.07.2005	13	névés étendus, surfaces rouges
3	07.07. - 20.07.2005	13	névés, surfaces rouges
4	20.07. - 25.08.2005	36	restes, localement rouge
5	25.08. - 27.09.2005	33	pas de neige

Sur toute la période de mesures, seules 14 algues de neige ont pu être détectées (tableau 3.6). Six ont été trouvées lors de la première série, 3 lors de la deuxième série, 4 lors de la troisième série, puis une seule jusqu'à la fin des mesures. Les cellules trouvées étaient des spores sphériques rouges. Cette distribution des algues dans l'atmosphère correspond à la période de développement des algues et à l'apparition des zones de neige rouge. Une augmentation des concentrations d'algues dans l'atmosphère était attendue avec la disparition du manteau neigeux à cause des possibilités de décollage facilitées (sol sec) mais n'a pas été constatée.

Par contre, de très nombreux pollens ont été détectés pendant les trois premières séries de mesures. Comme avec les algues, l'abondance de pollens dans l'atmosphère a diminué à chaque série. A partir de la quatrième série, plus aucun pollen n'a été détecté.

TAB. 3.6 – Nombre d’algues de neige et de pollens détectés pour chaque série de mesures.

Série	Pollens	Algues
1	1256	6
2	366	3
3	13	4
4	6	1
5	0	0

Il n’est pas possible de quantifier exactement leur concentration dans l’atmosphère à cause de la méthodologie simple utilisée. Par contre, il est possible de comparer le nombre de pollens et le nombre d’algues détectées. Ainsi, en se limitant aux trois premières séries, 13 algues ont été détectées sur 180 lames de microscope analysées contre 1635 pollens.

La présence de nombreux pollens montre que la méthode fonctionne correctement tant que l’on n’attend pas de résultat quantitatif. De plus, la direction des vents dominants pendant chaque période est en adéquation avec la répartition des particules selon les points cardinaux. Un épisode de vent et de précipitations chargés de sable du Sahara a eu lieu le 28 juillet 2005 et était très visible sur les pièges exposés.

3.4 Mobilité des algues de neige en laboratoire

3.4.1 Cultures

Comme décrit dans le chapitre « Méthodes », divers milieux ont été testés. Des essais avec le milieu Kühl, BBM, TAP et avec de l'eau de fonte ont été réalisés. Ils ont tous échoué sauf pour le milieu TAP. Cependant, les taux de croissances étaient toujours très bas. C'est en modifiant le milieu TAP pour s'approcher de la composition de la neige et en enrichissant les cultures en CO_2 que la croissance a réellement commencé.

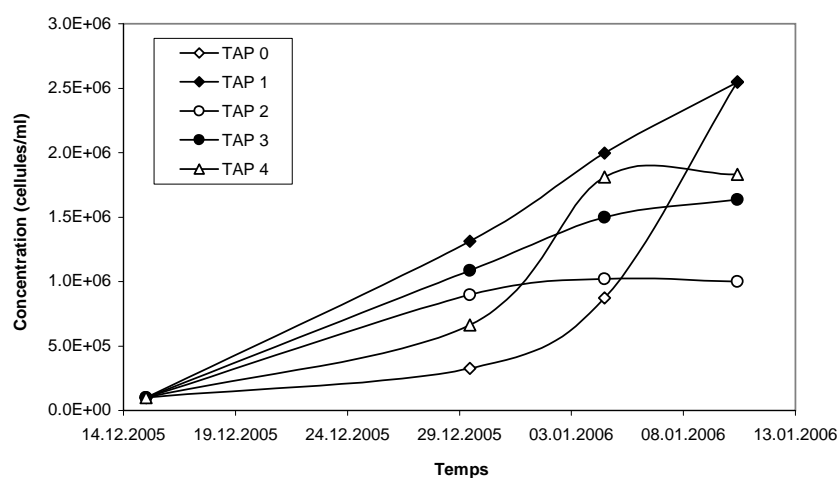


FIG. 3.28 – Croissance de *Chlamydomonas augustae* dans divers variantes du milieu TAP. Cultures à 8°C , enrichissement avec du CO_2 , cycle de lumière 12 :12.

Pour toutes les variantes du milieu TAP² ainsi que pour le milieu original, une croissance a pu être mesurée (figure 3.28). Les milieux de croissance modifiés ont permis une croissance plus élevée que le milieu TAP standard. Le milieu TAP1, dont seul le pH avait été modifié vers la neutralité a montré les meilleures performances. Par contre, la culture avec le milieu standard a rattrapé et même dépassé les autres cultures au bout de 20 jours. Le milieu TAP1 a été choisi comme milieu de base pour la culture de masse de *Chlamydomonas augustae*.

Un autre effet des différents milieux de culture a été constaté sur la morphologie des algues de neige. En effet, au bout de 5 semaines, les cultures avec les concentrations initiales (TAP0 et TAP1) avaient un diamètre moyen de $4.7 \mu\text{m}$ contre $5.5 \mu\text{m}$ pour les cultures dont les concentrations étaient réduites.

Une fois que la croissance a démarré, les cultures ont été entretenues dans leur phase de croissance avec succès en transplantant toutes les 2 à 4 semaines quelques millilitres de culture dans un milieu frais de sorte à obtenir une concentration initiale de $1 \times 10^6 \text{ cellules/ml}$.

²La composition des différents milieux est décrite dans les méthodes en page 42.

Après plusieurs semaines de croissance, l'apport de CO_2 a été stopé. Curieusement, cela ne semble pas avoir eu d'incidence majeur sur la croissance des cultures. Les conditions optimales de culture restent donc obscures. Par contre, le but d'obtenir suffisamment de cellules végétatives pour les essais en laboratoire a été atteint puisque un total d'environ 10 l (en flacons de 300 ml) avec une concentration moyenne de 3×10^6 *cellules/ml* a pu être produite.

3.4.2 Mobilité en milieu liquide

Les essais sur la mobilité des algues issues de la culture se sont déroulés tout au long du printemps 2006. La mobilité des algues a tout d'abord été mesurée à température ambiante (20°C) puis pendant une longue durée à 0°C (la température de l'eau liquide dans la neige). Suite à une panne de la chambre climatique, la température de 8°C a aussi pu être testée.

Au total, la trajectoire de 234 algues de neige a pu être mesurée et la vitesse correspondante a été calculée. La figure 3.29 montre les vitesses de progression mesurées. A 20°C , la vitesse maximale était de 0.54 *cm/min* et la moyenne de 0.36 *cm/min*. A 0°C , la vitesse était sensiblement plus basse avec un maximum à 0.31 *cm/min* mais une moyenne à 0.09 *cm/min* seulement. Les vitesses de progression étaient les plus élevées à 8°C avec un maximum de 0.77 *cm/min* et une moyenne de 0.54 *cm/min*. Cette température de 8°C correspond aussi à la température de la culture.

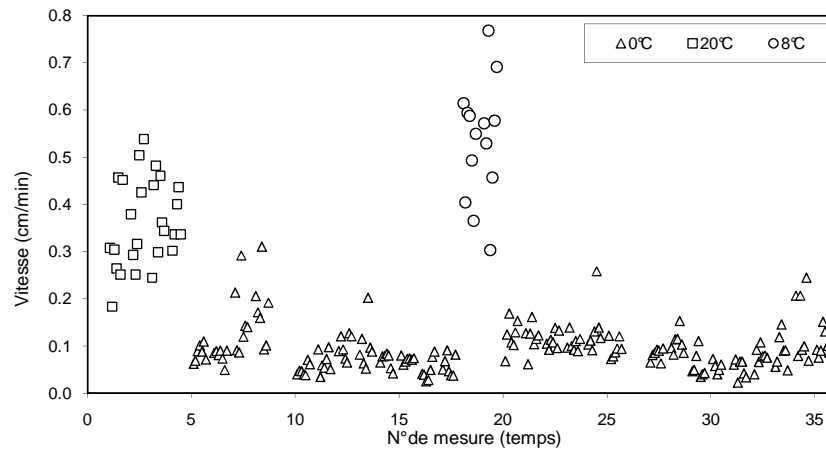


FIG. 3.29 – Vitesses constatées (*cm/min*) des cellules mobiles de la culture de *Chlamydomonas nivalis* à différentes températures.

Il faut bien noter que les vitesses moyennes ci-dessus ne sont pas représentatives de la vitesse moyenne des algues de la culture. En effet, dans presque toutes les mesures, la majorité des cellules étaient immobiles. Les algues observées ont donc été choisies parce qu'elles étaient mobiles. Le résultat est donc fortement et volontairement biaisé. Par contre, les vitesses constatées sont réelles. C'est à dire que les mesures apportent une preuve que les algues de neige sont, au minimum, capables de progresser aux vitesses constatées en milieu liquide. En

tenant compte de la valeur moyenne à 0 °C, les algues de neige mettraient 1 heure pour parcourir 6 *cm* et 17 heures pour parcourir 1 *m* (5 heures pour la plus rapide).

3.4.3 Mobilité dans la neige

Nous avons donc montré au paragraphe précédent que les algues de neige issues de la culture étaient mobiles, même à 0 °C. Dans la neige humide, la température est aussi fixée à 0 °C. La température ne change donc pas. Par contre, la configuration et la dynamique de l'eau liquide autour des grains de neige ne sont bien entendu pas comparables. Trois séries de test en utilisant des conditions de neige différentes ont été réalisées (tableau 3.7).

TAB. 3.7 – Essais de mobilité des algues de neige dans des colonnes de neige en laboratoire. Chaque essai consistait en trois réplifications (3 colonnes).

Date	Type de grains	Diamètre	Température
01.06.2006	arrondis	0.75 <i>mm</i>	0 °C
26.06.2006	fonte	1-1.5 <i>mm</i>	0 °C
03.07.2006	fonte	1.5-2 <i>mm</i>	0 °C

Les colonnes de neige ont été inoculées avec environ 40 *ml* de culture au niveau du trou inférieur. La mesure de la progression se faisait en prélevant un peu de neige dans les trous au-dessus du point d'inoculation. Dans aucun cas et dans aucune colonne, les algues de neige n'ont réussi à progresser jusqu'au trou suivant. Puisque les trous étaient espacés de 5 *cm*, on peut dire que le déplacement vertical des algues de neige était compris entre 0 et 5 *cm*. La durée maximale d'un essai était de 3 jours. Il n'était pas possible de prolonger plus longtemps l'essai car la fonte des colonnes était trop importante. Toutefois, il est possible d'affirmer que ce n'est pas la durée de l'expérience qui a limité les déplacements des algues dans la neige. En effet, en tenant compte des vitesses mesurées à 0 °C (0.1 *cm/min* en moyenne), il faudrait environ 50 minutes à une algue pour parvenir au premier point de mesure (5 *cm* du lieu d'inoculation). La durée d'expérience de 3 jours n'est donc pas un facteur limitant.

Un dernier essai a eu lieu en implantant les trois colonnes de plexiglas directement dans le manteau neigeux. Cet essai a eu lieu en milieu naturel sur un névé dans le domaine skiable de Parsenn les 12 et 13 juillet 2006. Lors de cet essai, quelques algues sont parvenues à progresser de 5 *cm* en un jour dans l'une des colonnes.

Chapitre 4

Discussion

4.1 Contributions scientifiques du projet

4.1.1 Évaluation de la diversité biologique de la neige

Microscopie optique

L'observation par microscopie optique d'un grand nombre d'échantillons a permis d'obtenir une évaluation de la diversité biologique des populations d'algues de neige. Plus de 300 échantillons ont été prélevés dans les Grisons et au Tessin et ont été observés par microscopie optique. Les organismes détectés ont été regroupés en morphotypes selon des critères morphologiques. Comme détaillé dans les résultats (section 3.2.3), un total de 16 morphotypes ont pu être identifiés. Cette approche a permis l'étude d'un grand nombre d'échantillons mais avec un détail limité.

Étude phylogénétique

Une étude phylogénétique du gène 18S a permis d'obtenir une image détaillée de la diversité génétique de trois échantillons de neige rouge. 106 clones se regroupant en 16 taxons ont pu être identifiés. Le calcul de courbes de raréfactions (Heck et al., 1975) a montré que la diversité totale des échantillons a été correctement couverte. La plupart des taxons identifiés correspondent d'assez près à des espèces connues et déposées dans la base de donnée EMBL (www.ebi.ac.uk). Les espèces trouvées sont pour la plupart des organismes communément trouvés dans la neige comme *Chloromonas pichincae*, *Chloromonas cf. platystigma*, *Chloromonas cf. alpina* et *Chlorococcus sp.*. Par contre, un taxon important comprenant 28 clones ne correspond à aucune séquence de la banque de clones EMBL. Ce taxon pourrait constituer un nouveau taxon à l'intérieur ou proche du genre *Chloromonas*. Cette approche a donc permis une étude détaillée d'un nombre limité d'échantillons.

Comparaison des deux approches

Bien que leurs méthodologies soit très différentes, les résultats obtenus par microscopie optique sont cohérents par rapport à ceux obtenus avec l'étude phylogénétique. Ces deux approches sont clairement complémentaires. L'observation par microscopie optique permet le traitement d'un nombre élevé d'échantillons mais avec un niveau de détail faible. Cette méthode n'est en effet basée que sur des critères morphologiques dont l'appréciation peu différer d'un opérateur à l'autre. L'étude phylogénétique permet quant à elle une étude très détaillée, mais sa grande demande en temps limite très fortement le nombre d'échantillons qu'il est possible d'étudier.

En définitive, l'étude phylogénétique a permis de déterminer en détail la composition de populations d'algues issues de trois échantillons de neige rouge. Grâce

à la relative rapidité de l'observation microscopique directe, il a été possible d'analyser un grand nombre d'échantillons et de mettre en relation la diversité biologique trouvée avec d'autres caractéristiques du manteau neigeux comme la microstructure de la neige ou sa composition chimique.

Entrevue d'un potentiel important

Tout le travail sur la phylogénie a été fortement axé sur l'étude d'une population spécifique d'organismes eucaryotes sélectionnés par l'emploi des amorces 18S1f et 18S1R développées par Hoham et al. (2002). Nous avons vu que l'emploi de ces amorces n'a pas permis d'amplification de l'ADN pour de nombreux échantillons. Par contre, en utilisant des amorces plus larges du gène 16S, une amplification assez forte a été constatée pour tous les échantillons. Ceci fait suspecter la présence d'importantes populations bactériennes, comme constaté par Segawa et al. (2005). Afin de focaliser nos efforts sur les algues de neige, les populations bactériennes n'ont pas été étudiées en détail. Toutefois cela constitue un potentiel de recherche important.

4.1.2 Comportement des algues de neige en milieu naturel

Observations détaillées et systématiques du développement des algues de neige

La réalisation de quarante-deux profils de neige réalisés pendant les saisons 2003-2004 et 2004-2005 sur le site de Sertig (Davos, GR) ont permis de retracer l'évolution saisonnière des algues de neige et de mettre en relation cette évolution avec des paramètres physiques et chimiques du manteau neigeux. Un total d'environ 280 échantillons ont été analysés.

La majorité des échantillons contenant des algues de neige étaient situés au maximum 30 à 40 centimètres au-dessus du sol. Les cellules végétatives apparaissent avant les spores et proches du sol. Pour la saison 2004-2005, un apport d'algues par la surface suivi d'un développement à partir de la surface semble s'être produit. Les algues de neige ne sont présentes que dans la neige humide (présence d'eau liquide et température de 0 C). La microstructure de la neige joue un rôle important pour le développement des algues de neige. Les plus fortes concentrations d'algues ont été constatées lorsque les cristaux de type « formes de fonte » étaient dominants. Des algues de neige (cellules végétatives uniquement) ont aussi été trouvées dans des couches de neige relativement anciennes dont les grains étaient angulaires, angulaires arrondis ou en gobelets. Aucune cellule d'algue n'a été trouvée dans les formes de neige fraîche.

La composition chimique du manteau neigeux a aussi été suivie. D'une manière générale, les concentrations en nutriments retrouvés dans la neige étaient faibles. L'apport de nutriments s'est fait à la fois par la surface (déposition sèche ou humide) et par le sol (échanges liquides et gazeux avec le sol). Le pH

des échantillons est légèrement acide (pH moyen : 5.6). Une accumulation de nutriments dans les croûtes du manteau neigeux a été constatée. De plus, leurs concentrations ont diminué avec l'apparition et la croissance des algues de neige. Ceci montre une consommation de nutriments par les algues.

Toutes ces observations sont à considérer avec prudence. Il s'agit d'observations réalisées pendant deux années, mais à un seul endroit. De nombreux paramètres spécifiques au lieu d'observation influencent le développement des algues de neige. En conséquence, ce déroulement pourrait être différent en d'autres lieux.

Autres observations ponctuelles d'importance

Quatre autres observations en milieu naturel semblent être d'une grande importance pour la compréhension de la circulation globale des algues de neige. 1) La présence d'algues a été constatée à des endroits où l'épaisseur du manteau neigeux était proche de deux mètres. A ces endroits, une migration des algues à partir du sol est impossible car la lumière disponible au niveau du sol n'est pas suffisante pour permettre la germination des spores d'algues de neige (Curl et al., 1972). Cette observation montre clairement que d'autres processus participent à la mobilité des algues de neige. 2) Dans certains cas, une couche très rouge parallèle à la surface et située à environ 15 cm de profondeur a été constatée. Ceci est un indice très important en faveur d'un transport des algues de neige avec les flux d'eau présents dans la neige pendant le processus de fonte. Selon la configuration du manteau neigeux, ces flux peuvent être horizontaux et parcourir latéralement plusieurs dizaines de mètres. Les tentatives pour reproduire ce phénomène (essais de traçage) ont échoué. 3) En fin de saison, dans la vallée de Flüela, des populations d'algues de neige ont été observées proche des crêtes, aux endroits typiques d'accumulation de neige pendant l'hiver. Ceci signifie soit que les conditions spécifiques à ces endroits sont favorables au développement des algues de neige, soit que le vent joue un rôle important dans la répartition des algues de neige. 4) D'une manière générale, les plus grandes populations d'algues de neige se trouvent aux endroits où l'épaisseur de neige ne dépassait pas 20 cm. Or, ceci permet aux algues de disposer de suffisamment de lumière pour leur développement même si elles sont proches du sol. De plus, les remontées capillaires (aussi limitées à une épaisseur de 20 cm au-dessus d'une zone imperméable) peuvent permettre une libre circulation des algues de neige.

4.1.3 Reproduction du comportement des algues de neige en laboratoire

Les essais en laboratoire étaient basés sur une culture de cellules végétatives de l'algue de neige *Chlamydomonas augustae*. L'établissement des conditions de culture pour obtenir une croissance importante a été difficile mais finalement tout de même couronnée de succès. Le plus difficile a été de provoquer le démarrage de la croissance. Une forte croissance s'est produite suite à l'adaptation des milieux de culture et suite à l'enrichissement des cultures avec du CO₂. Par

contre, par la suite, une bonne croissance a pu être maintenue dans un milieu de culture standard et sans enrichissement de CO₂. Les conditions de culture optimales pour une culture de masse de *Chlamydomonas augustae* n'ont pas pu être établies avec certitude. Grâce au succès de la culture, des essais de mobilité en milieu liquide et dans de la neige ont pu être réalisés.

Les essais de mobilité en milieu liquide ont montré l'aptitude des algues à se déplacer en milieu liquide même à une température de 0 °C. Par contre aucun déplacement vers le haut n'a pu être identifié pour les mêmes algues dans de la neige humide à 0 °C. Ceci ne signifie toutefois pas forcément que les algues sont incapables de nager vers la surface. Un essai similaire où une colonne de neige inoculée par les algues de la culture a été placée à l'extérieur dans des conditions naturelles a aussi été réalisé. Dans cet essai, une progression de quelques cellules sur une distance de 10 cm a été constatée. C'est un signe que l'absence de progression verticale des algues en laboratoire est plutôt due à une reproduction imparfaite des conditions naturelles qu'à une incapacité des algues à se mouvoir dans la neige. Une multitude de paramètres pourraient inhiber la mobilité des algues de neige, dont :

- Le changement d'environnement chimique brutal entre le milieu de culture et la colonne de neige.
- Un environnement lumineux mal maîtrisé (intensité, effets de bord, cycle, etc.).
- Des colonnes de neige artificiellement homogènes (voulu en opposition à l'hétérogénéité rencontrée sur le terrain).
- Des dimensions de la colonne non adaptées (effets de bords).
- L'absence d'autres organismes ?

4.1.4 Transport sur de grandes distances

La répartition mondiale de nombreuses espèces d'algues de neige montre qu'un transport sur de grandes distances doit être possible. Comme les spores d'algues de neige ont des caractéristiques assez semblables aux pollens, le transport par le vent a été envisagé.

Déductions sur la circulation à grande échelle des algues de neige à l'aide d'outils génétiques

Les résultats de l'étude phylogénétique ne permettent pas de formuler des conclusions sur le transport des algues de neige sur de grandes distances. En effet, des espèces présentes sur le site de Sertig n'ont pas été trouvées dans le site de Flüela, pourtant séparé que de quelques kilomètres. A l'inverse, les sites de Flüela et de Piora sont distants de près de 100 km et situés géographiquement soit sur le versant nord des Alpes soit sur le versant sud des Alpes mais sont assez semblables du point de vue génétique notamment à cause de la présence d'espèces communes comme *Chlorococcus sp.*

Cette approche ne permet l'analyse d'un nombre limité d'échantillons. En effet, avec aussi peu d'échantillons, la structure des populations d'algues de neige dépend plus des paramètres locaux que de leur situation géographique (Nord ou Sud des Alpes).

Étude des particules transportées par le vent

L'étude des particules transportées par le vent à l'aide de 15 pièges disséminés dans le domaine skiable de Parsenn (Davos, GR) a montré que le transport de cellules d'algues de neige (spores) était possible, mais très limité. Par contre, la méthode employée s'est révélée être adaptée puisque de nombreux pollens et un épisode de sable du Sahara ont été détectés.

Cependant, une réserve importante doit être émise : les pièges étant placés sensiblement plus haut que la surface du sol (ou de la neige) de sorte que seules les particules en suspension susceptibles de parcourir de longues distances ont pu être détectées. Or, un transport de cellules important par saltation ou reptation à proximité de la surface ne peut pas être exclu. Ce processus pourrait jouer un rôle très important à l'échelle locale mais n'a pas été étudié.

Le caractère limité du transport d'algues de neige par le vent peut être nuancé en tenant compte de la comparaison avec les pollens. Premièrement, l'abondance de pollens en région alpine est largement supérieure que celle des algues de neige. En effet les régions boisées sont plus courantes que les régions recouvertes de « neige rouge ». De plus, les conditions d'envol sont plus favorables pour un pollen relâché à plusieurs mètres du sol que pour une spore d'algue de neige, collée à la surface humide, voir gelée, de la neige. En conséquence, les quelques algues détectées par les pièges installés ont une déjà à elles seules une importance significative.

Au vu de cette remarque, les quelques algues détectées par nos pièges sont peut-être beaucoup plus significatives que ce que l'on pense de prime abord en regardant les résultats des pièges.

4.2 Proposition sur la circulation des algues de neige

Une vision synthétique de tous les résultats et observations obtenus permet d'émettre de nouvelles hypothèses sur le cycle de vie annuel des algues de neige qui est à la fois compatible avec la physique du manteau neigeux, la biologie des algues de neige et les observations sur le terrain.

Les hypothèses énoncées ici consistent à présenter la circulation des algues de neige comme une combinaison de trois types de transport : un transport actif des algues de neige à l'aide de leurs flagelles, un transport passif avec l'écoulement de l'eau de fonte et un transport passif par le vent. Le cycle de vie proposé se résume en 4 phases (figure 4.1) :

Phase 1 : Développement avec hauteur de neige réduite

Le développement des algues de neige commence proche du sol ou aux endroits où la hauteur du manteau neigeux est limitée. Lorsque la neige est peu épaisse, il n'y a pas de barrières physiques au développement des algues de neige. Elles disposent de suffisamment de lumière sans devoir se déplacer vers la surface et les remontées capillaires offrent un manteau neigeux en grande partie saturé en eau qui permet aux algues de se déplacer activement à l'aide de leurs flagelles.

Ces conditions favorables au développement des algues de neige se trouvent par exemple dans les pentes ensoleillées, proche des crêtes ou alors assez tard dans la saison. La plupart du temps, ces conditions ne durent que quelques jours ou au mieux quelques semaines. Ensuite, la disparition rapide du manteau neigeux menace ce milieu. La rapidité du développement des algues est donc probablement un facteur important.

Phase 2 : Transport passif avec l'écoulement de l'eau de fonte

Les algues de neige ayant commencé à se développer, sont emportées plus bas d'une manière passive, en profitant de l'écoulement latéral de l'eau de fonte. Les conditions requises pour permettre un écoulement latéral de l'eau de fonte sont principalement la présence d'une couche imperméable. Cette couche est en général constituée par une croûte de regel qui se forme suite à des journées très chaudes ou à de la pluie. Cette étape pourrait aussi être assurée par un transport par le vent (saltation ou reptation, non observé et non étudié dans cette étude).

Phase 3 : Continuation du développement

Grâce au transport passif avec l'écoulement de l'eau de fonte ou le vent, les algues peuvent se retrouver proches de la surface, même si l'épaisseur de neige est très importante. A cet endroit, les conditions sont aussi favorables au développement des algues. Ainsi, le transport latéral de petites quantités d'algues peut donner lieu à des populations importantes à des endroits où les algues ne peuvent théoriquement pas provenir directement du sol.

Phase 4 : Redistribution par le vent

Une redistribution globale des algues de neige peut avoir lieu grâce au transport par le vent. Cette étape n'est toutefois pas indispensable pour assurer le cycle de vie annuel des algues de neige. Il s'agit plutôt d'un moyen pour disséminer l'espèce vers d'autres régions. Au niveau local, même si une partie des algues de neige s'étant développées à un endroit sont emmenées plus loin avec des écoulements latéraux, une certaine quantité d'algues restera sur place pour assurer le départ de la croissance l'année suivante.

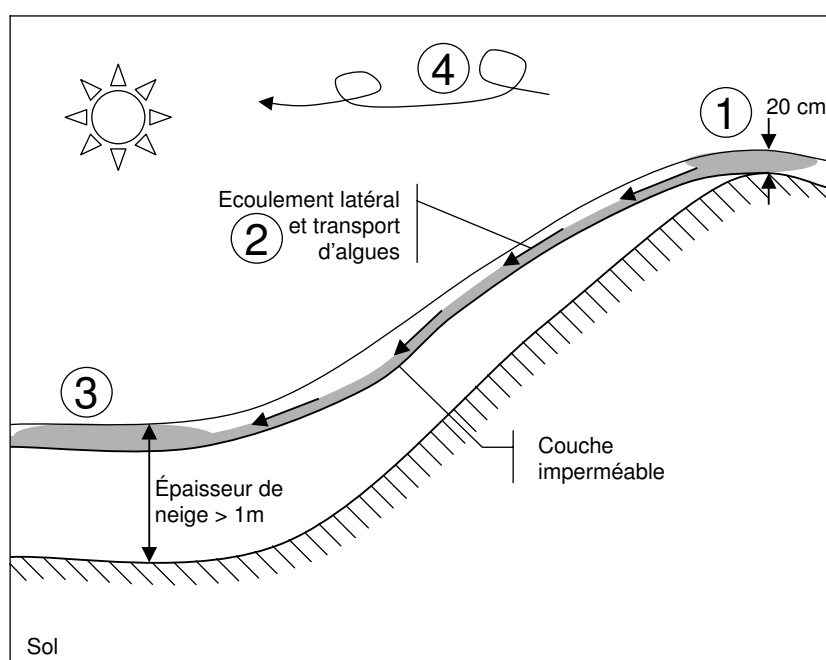


FIG. 4.1 – 1. Les algues de neige se développent à un endroit avec peu de neige (zone capillaire, bonne pénétration de la lumière). 2. Un écoulement latéral d'eau de fonte se forme sur une couche imperméable (p.ex. croûte de regel) et emporte des algues de neige. 3. Les algues de neige se retrouvent proches de la surface malgré un manteau neigeux épais et continuent leur développement. 4. Une quantité limitée d'algues de neige est transportée par le vent.

4.3 Principales difficultés rencontrés

Comme dans tout projet de recherche, les difficultés rencontrées sont nombreuses. Considérant qu'elles font partie intégrale des résultats et qu'elles peuvent être riches en enseignements, en voici une liste succincte :

Difficultés liées aux méthodes génétiques

Les besoins en temps de l'analyse génétique sont énormes, ce qui limite beaucoup le nombre d'échantillons qu'il est possible d'analyser. Du coup, une interprétation statistique des résultats est impossible. La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) permet de mettre en évidence des différences à l'intérieur de fragments d'ADN de même longueur. Cette méthode permet d'obtenir assez rapidement une évaluation de la diversité génétique d'un nombre important d'échantillons. Elle a été utilisée sur une dizaine d'échantillons de neige. Une analyse plus précise des résultats de la DGGE est possible en s'aidant des résultats de l'étude phylogénétique. Un nombre important de bandes issues de la DGGE n'a pas pu être séquencé (séquences illisibles) ce qui est un indice que la DGGE ne s'est pas très bien déroulée. De plus, certains fragments d'ADN identiques (vérifié par séquençage) ont montré des profils différents lors de la DGGE. Au contraire, des fragments d'ADN fortement différents ont montré des profils DGGE similaires.

Un début d'explication à ce phénomène a été identifié un peu par hasard lors du clonage-séquençage des bandes mixtes issues de la DGGE (voir section 3.1.3). En effet, nous avons remarqué que certaines amorces étaient présentes deux fois au début du fragment à analyser. Cela va sans dire que cet artefact non-désiré va modifier le comportement du fragment dans le gel et donc le résultat de la DGGE.

D'une manière générale, les artefacts rencontrés peuvent survenir soit lors de la DGGE elle-même (domaines de fusion multiples par exemple (Kisand and Wikner, 2003) soit lors de la réaction de nested-PCR (Speksnijder et al., 2001).

Difficultés liées aux mesures sur le terrain

Sur le terrain, la distribution spatiale des algues de neige est très variable même à petite échelle ($<$ à 1 m) et rend l'interprétation des profils difficile. Comme il n'est pas possible de réaliser plusieurs profils au même endroit sans perturber complètement l'organisation du manteau neigeux, les profils se font tous à une bonne distance les uns des autres (au minimum 1.5 m). Du coup, les différences entre les échantillons sont dues à la fois à l'évolution des algues de neige et à la variabilité spatiale du lieu. Il n'est pas possible de dissocier chaque effet.

L'analyse microscopique des échantillons a été difficile et a nécessité beaucoup de temps (comptage des algues). La difficulté principale était le changement de

la nature des échantillons au cours de la saison (évolution énorme du nombre de cellules, changement de la taille des cellules, difficultés d'identification des cellules, concentrations très hétérogènes selon les espèces présentes, cellules qui s'agglutinent ensemble, lyse des cellules avec les changements de température). Du coup, les méthodes de comptage ont dû être constamment adaptées ce qui affecte l'homogénéité des données et la qualité des résultats.

Difficultés liées aux essais de microcosme en laboratoire

Tous les essais prévus étaient basés sur une culture d'algues. Malgré de gros efforts pour l'élaboration d'un milieu de croissance et de conditions de croissances adéquates, la culture n'a été effective que quelques mois avant la fin du projet, provoquant d'importants retards et réduisant la quantité d'essais réalisables.

De plus, il a fallu compter avec de nombreuses pannes matérielles : panne de l'incubateur juste après le démarrage des cultures, grosses variations de température (jusqu'à + 30 °C) lors d'essais devant se dérouler à 0 °C etc.

Comme pour tous les essais d'écologie, la reproduction en laboratoire des conditions naturelles est un point particulièrement délicat. Aussi sophistiquées soient-elles, les installations techniques sont soumises à de nombreuses limites. En tentant de standardiser et homogénéiser les conditions de test, il est certes possible de s'affranchir de la complexité et de l'hétérogénéité qui entache les résultats obtenus sur le terrain, mais en même temps, le risque de négliger certains aspects ayant une importance fondamentale pour les organismes à étudier est grand.

4.4 Perspectives de recherche

Exploration de la diversité microbienne avec des outils génétiques

Un potentiel encore important réside dans l'exploration des populations microbiennes vivant dans la neige. Même s'il existe encore de nombreux mystères à leur sujet, les algues sont de loin les organismes de la neige les plus étudiés. Par contre, les amplifications d'ADN réalisées sur le gène 16S avec des amorces larges a clairement montré qu'une population bactérienne était présente même dans les échantillons où aucune algue de neige n'a pu être décelée. La question de la mobilité des bactéries dans la neige se pose aussi. Elles bénéficient d'une taille plus petite, mais ne sont pour la plupart pas mobiles.

Par contre, l'établissement de la phylogénie complète d'échantillons de neige n'est à court terme pas suffisant pour répondre aux questions sur la mobilité des algues de neige. L'emploi de méthodes comme la DGGE où l'hybridation in situ pourraient contribuer à la compréhension du positionnement des algues de neige dans le manteau neigeux.

Les outils de biologie moléculaire pourraient aussi servir à résoudre d'autres questions sur le fonctionnement des algues de neige et des microorganismes en général. Par exemple, des amorces spécifiques au gène *nifH* responsable de la fixation de l'azote ont été développées par Matthias Noll (EPFZ) et pourraient être appliquées aux échantillons de neige.

Exploration de la mobilité des algues de neige sur le terrain et en laboratoire

La plupart des mesures réalisées sont plus qualitatives que quantitatives. A nouveau, pour aller plus loin, des avancées méthodologiques sont requises. Étant donné que le comptage des différentes algues de neige dans un nombre d'échantillons de neige important a été un des points les plus longs et complexes de l'étude, il serait souhaitable d'optimiser encore les méthodes de comptage en utilisant des moyens techniques appropriés (cytométrie de flux, spectroscopie, analyse des composants des cellules etc...)

Après l'établissement d'une méthode de comptage efficace, il serait intéressant de faire un bilan complet des flux et de la croissance des algues sur une surface donnée. A ce titre il faudrait être capable de : 1) quantifier les concentrations d'algues de neige au niveau du sol avant les chutes de neige , 2) de quantifier leur croissance « in situ », 3) de quantifier les échanges avec l'atmosphère, en particulier la saltation et la reptation.

Une grande partie du travail présenté se base sur les propriétés physiques du manteau neigeux au niveau microscopique (en particulier la répartition et la dynamique de l'eau liquide). Or ce domaine n'est de loin pas entièrement connu et constitue en lui seul un domaine de recherche à la pointe des connaissances

actuelles. Une avancée dans ce domaine serait nécessaire pour comprendre plus en détail la dynamique des algues de neige à l'intérieur du manteau neigeux.

Chacune des propositions ci-dessus constitue un défi de taille puisque les méthodes pour répondre à la problématique doivent encore être développées. A mon avis, seule une équipe interdisciplinaire solide serait à même de faire progresser l'état actuel de la recherche dans le domaine. En effet, les énigmes qu'il reste à résoudre sont hautement complexes et ne peuvent être résolues sans moyens humains et financiers conséquents.

Il reste cependant une expérience relativement simple à réaliser qui pourrait apporter quelques réponses sur les déplacements passifs des algues de neige dans le manteau neigeux. L'expérience consisterait à utiliser des micro-sphères fluorescentes (p.ex Polysciences Inc.) pour étudier la diffusion naturelle (passive) de particules de taille semblable à celle des algues. Les particules pourraient être placées au niveau du sol, à la surface de la neige ou en haut d'une pente. Ces particules seraient ensuite suivies en recherchant leur présence dans des échantillons avec un microscope à fluorescence. Des tailles de particules différentes permettraient d'évaluer la mobilité passive des algues de neige, mais aussi de bactéries. Cette méthode a déjà été utilisée avec succès à l'EPFZ pour retracer le déplacement de bactéries dans les sols (Schönholzer et al., 1999). La charge de travail pourrait par exemple convenir à un travail de Master.

Chapitre 5

Conclusion

De nouvelles informations sur la diversité des populations d'algues de neige sont maintenant disponibles. Nous avons décelé dans des échantillons provenant du Nord et du Sud des Alpes suisses la présence de nombreuses algues typiques de la neige appartenant aux genres *Chlamydomonas*, *Chloromonas*, *Trebouxia* et *Stichococcus*. De nombreuses séquences issues de nos échantillons de neige ne correspondent à aucune entrée dans les banques de clones de l'EMBL. C'est notamment le cas du taxon E1 qui est représenté par 28 clones. Il pourrait s'agir d'une nouvelle espèce à l'intérieur ou proche du genre *Chloromonas*. Si de nombreux échantillons de neige contenaient des algues, les populations bactériennes du manteau neigeux semblent encore beaucoup plus importantes. En effet, même pour des échantillons de neige non colorés, la présence d'ADN d'organismes procaryotes a été très marquée alors qu'aucun ADN d'algues de neige n'a pu être décelé (pas d'amplification lors de la PCR).

L'examen détaillé de l'évolution saisonnière des algues de neige en milieu naturel pose un éclairage nouveau sur leur cycle de vie. Il apparaît clairement que tant que la fonte du manteau neigeux ne s'est pas généralisée, aucune algue de neige n'est présente à l'intérieur du manteau neigeux. Ceci confirme la période de dormance pendant laquelle les spores d'algues de neige attendent au niveau du sol sous le manteau neigeux. Les premières algues de neige ont été détectées proche du sol alors que le manteau était humide. Cependant, des observations ont montré qu'un développement à partir de la surface est aussi possible. Il a été montré que des algues de neige se trouvent parfois à la surface du manteau neigeux alors qu'elles ne peuvent pas provenir du sol, que ce soit à cause de l'épaisseur de neige trop importante ou à cause d'une barrière artificielle placée par nos soins (feuille de plastique) qui isole le sol du manteau neigeux. Ceci montre bien que la migration active des algues de neige à elle seule n'est pas suffisante pour expliquer leurs déplacement.

La présence d'algues de neige en suspension dans l'air, même si elle s'est avérée être limitée a pu être démontrée. Le transport par le vent par saltation et reptation n'a pas été mesuré mais est à priori plus facile que par suspension. Ce processus est donc potentiellement un moyen de transport important pour les algues de neige. Des observations ont aussi été faites mettant en évidence le transport d'algues de neige avec les écoulements d'eau de fonte. Toutefois, la nature ne fait en général pas les choses gratuitement, et si les algues de neige sont munies de flagelles, elles doivent bien leur être utiles. Lorsque la fonte de la neige est importante, il se forme une zone capillaire dans laquelle les pores de la neige sont saturés en eau et où l'eau ne se déplace pas. Dans cette zone limitée à environ 20 cm, les algues de neige se servent de leurs flagelles pour pénétrer dans le manteau neigeux, pour se positionner par rapport à la lumière disponible, et pour se rencontrer en vue d'une reproduction sexuée. Par contre, elles ne seront pas capables de se déplacer activement en dehors de cette zone capillaire à cause de la vitesse des écoulements et de la répartition de l'eau de fonte autour des grains de neige. D'autres moyens de transports tels que le transport par des oiseaux, animaux, insectes (Collembolés), voire sous les skis des skieurs tel que trouvé dans la littérature (Hoham et al., 1993; Dybas, 1998) n'ont pas été traités. Ils sont probablement possibles et utiles pour la dissémination à grande échelle des espèces, mais restent très marginaux. En définitive,

les algues de neige utilisent une large palette de moyens de transports actifs et passifs pour mener à bien leur odyssée annuelle.

Il a été possible de mesurer les vitesses de progression en milieu liquide. Même aux températures trouvées dans le manteau neigeux (0 °C), des cellules végétatives de l'espèce *Chlamydomonas augustae* sont capables de se déplacer. Leur vitesse de déplacement leur permet sans autre de parcourir en quelques heures des distances égales à l'épaisseur du manteau neigeux, mais sont largement incapables de remonter à contre courant dans les écoulements d'eau de fonte. Il n'a pas été possible de recréer en laboratoire des conditions permettant le déplacement vertical des algues de neige dans la neige. Par contre, lors d'un essai similaire, mais se déroulant en milieu naturel, une progression de quelques centimètres a pu être mesurée. Quel joli pied de nez de la nature !

Les apports de cette étude sont nombreux, mais ne répondent pas à toutes les questions. Pour aller plus loin, il serait nécessaire d'évaluer chaque processus de transport utilisé par les algues de neige d'une manière quantitative. Cette approche permettrait d'avoir un idée plus précise de l'importance de chaque processus, mais nécessiterait encore des moyens assez importants. Aussi, il est évident que les spécificités du lieu d'étude joueront toujours un rôle considérable.

Bibliographie

- Amann, R. and Ludwig, W. (2000). Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiology Reviews*, 24 :555–565.
- Ausubel, F., R., B., Kingston, R., Moore, D., Seidmann, J., Smith, J., and Struhl, K. (1989). *Current protocols in molecular biology*. Green publishing Associates and Wiley Interscience, New York NY.
- Baunach, T., Fierz, C., Satyawali, P., and Schneebeli, M. (2001). A model for kinetic grain growth. *Annals of Glaciology*, 32 :1–6.
- Bidigare, R., Ondrusek, M., Kennicutt, M., Iturriaga, R., Harvey, H., Hoham, R., and Macko, S. (1993). Evidence for photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae. *Journal of Phycology*, 29 :427–434.
- Bischoff, H. and Bold, H. (1963). *Phycological studies. IV Some soil algae from Enchanted Rock and related algae species*. Pertinence Hall, Engelwood Cliffs, NJ.
- Brzoska, J., Coléou, C., and Lesaffre, B. (1998). Thin-sectioning of wet snow after flash freezing. *Journal of Glaciology*, 44(146) :54–62.
- Chodat, R. (1896). La flore des neiges du col des Ecandies. *Bulletin de l'Herbier Boissier*, 4(1) :879–889.
- Colbeck, S. (1987). Snow metamorphism and classification. In Jones, H. and Orville-Thomas, W., editors, *Seasonal Snowcovers : Physics, Chemistry, Hydrology*, volume C211 of *Mathematical and Physical Sciences*, pages 1–35. D. Reidel Publ. Comp., Dordrecht.
- Colbeck, S., Akitaya, E., Armstrong, R., Gubler, H., Lafeuille, J., Lied, K., McClung, D., and Morris, E. (1990). *The international classification for seasonal snow on the ground*. University of Colorado, Boulder CO, USA.
- Coléou, C., Xu, K., Lesaffre, B., and Brzoska, J. (1999). Capillary rise in snow. *Hydrological processes*, 13(12-13) :1721–1732.
- Curl, H., Hardy, J., and Ellermeier, R. (1972). Spectral absorption of solar radiation in alpine snow fields. *Ecology*, 53 :1189–1194.

- Davies, T., Brimblecombe, P., Tranter, M., Tsiouris, S., Vincent, C., Abrahams, P., and Blackwood, L. (1987). The removal of soluble ions from melting snow-pacs. In Jones, H. and Orville-Thomas, W., editors, *Seasonal Snowcovers : Physics, Chemistry, Hydrology*, volume C211 of *Mathematical and Physical Sciences*, pages 337–392. D.Reidel Publ. Comp., Dordrecht.
- Devarences, G. (1994). *Effet de la neige artificielle sur des écosystèmes montagnoux*. Maîtrise en sciences de l'eau, PhD Thesis, Université du Québec.
- Dybas, C. (1998). Alga rythms. *Adirondack Life*, 29(2) :20–25.
- Fierz, C. and Baunach, T. (2000). Quantifying grain shape changes in snow subjected to large temperature gradients. *Annals of Glaciology*, 31 :439–444.
- Good, W., Krüsi, G., von Niederhäusern, J., and Roth, A. (1991). Preparation and analysis of high contrast stratigraphic profiles. In *Symposium de Chamonix Cisa-IKAR, 4-8 juin 1991*, pages 40–45, Chamonix, France.
- Gormann, D. and Levine, R. (1965). Cytochrome f and plastocyanin : their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54 :1665–1669.
- Gorton, H. and Vogelmann, T. (2003). Ultraviolet radiation and the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Bauer)Wille. *Photochemistry and Photobiology*, 77(6) :608–615.
- Gorton, H., Williams, W., and Vogelmann, T. (2001). The light environment and cellular optics of the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Bauer) Wille. *Photochemistry and Photobiology*, 73(3) :611–620.
- Grinde, B. (1983). Vertical distribution of the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Chlorophyta, Volvocales). *Polar Biology*, 2(3) :159–162.
- Harris, E. (1989). *The Chlamydomonas sourcebook : a comprehensive Guide to Biology and Laboratory use*. Academic Press, Inc, San Diego, California.
- Heck, K. L., Vanbelle, G., and Simberloff, D. (1975). Explicit calculation of rarefaction diversity measurement and determination of sufficient sample size. *Ecology*, 56(6) :1459–1461.
- Hoham, R. (1980). Unicellular chlorophytes - snow algae. In Cox, E., editor, *Phytoflagellates*, pages 61–84. Elsevier North Holland, Inc., New York.
- Hoham, R. (1989). Snow microorganisms and their interaction with the environment. In *Proc. 57th Annual Western Snow Conf.*, pages 31–35, Ft. Collins, Colorado.
- Hoham, R., Bonome, T., Martin, C., and Leebens-Mack, J. (2002). A combined 18S rDNA and rbcL phylogenetic analysis of Chloromonas and Chlamydomonas (Chlorophyceae, Volvocales), emphasizing snow and cold-temperature habitats. *Journal of Phycology*, 38 :1051–1064.
- Hoham, R. and Duval, B. (2001). Microbial ecology of snow and freshwater ice. In *Snow ecology*, pages 168–228. Cambridge University Press, Cambridge.

- Hoham, R., Laursen, A., Clive, S., and Duval, B. (1993). Snow algae and other microbes in several alpine areas in New England. In *Proc. Annual Eastern Snow Conf.*, pages 165–173.
- Hoham, R., Mullet, J., and Roemer, S. (1983). The life history and ecology of the snow alga *Chloromonas polyptera* comb. nov. (Chlorophyta, Volvocales). *Canadian Journal of Botany*, 61 :2416–2429.
- Hoham, R., Schlag, E., Kang, J., Hasselwander, A., Behrstock, A., Blackburn, I., and Roemer, S. (1998). The effects of irradiance levels and spectral composition on mating strategies in the snow alga, *Chloromonas* sp.-D, from the Tughill Plateau, New York State. *Hydrological Processes*, 12(10-11) :1627–1639.
- Jones, H. (1991). Snow chemistry and biological activity : a particular perspective on nutrient cycling. In Davies, T., Tranter, M., and Jones, H., editors, *NATO ASI Series G : Ecol. Sci. Vol 28, Seasonal Snowpacks, Processes of Compositional Changes*. Springer-Verlag, Berlin.
- Jones, H. (1999). The ecology of snow-covered systems : a brief overview of nutrient cycling and life in the cold. *Hydrological Processes*, 13(14-15) :2135–2147.
- Jordan, R. (1994). Effects of capillary discontinuities on water flow and water retention in layered snowcovers. In Agrawal, K., editor, *SNOWSYMP-94 (International Symposium on snow and Related manifestations)*, pages 157–170, Manali (india).
- Kawecka, B. and Drake, B. (1978). Biology and ecology of snow algae. *Acta Hydrobiologica*, 20 :111–116.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16 :111–120.
- Kisand, V. and Wikner, J. (2003). Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. *Journal of Microbiological Methods*, 54(2) :183–191.
- Kol, E. (1968). Kriobiologie. Biologie und Limnologie des Schnees und Eises. In Elster, H. and Ohle, W., editors, *Die Binnengewässer*, volume 24. E. Schweizerbartsche Verlagbuchhandlung, Stuttgart.
- Kuhl, A. and Lorenzen, H. (1964). Handling and culturing of *Chlorella*. In Prescott, D., editor, *Methods in Cell Physiology*, volume 1, pages 159–187. Academic Press, New York.
- Kuhn, M. (2001). The nutrient cycle through snow and ice, a review. *Aquatic Sciences*, 63(2) :150–167.
- Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M. (2004). MEGA3 : Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5 :150–163.

- Leya, T. (2004). *Feldstudien und genetische Untersuchungen zur Kryophilie der Schneevalgen Nordwestspitzbergens*. PhD Thesis, Humboldt-Universität.
- Leya, T., Müller, T., Ling, H., and Fuhr, G. (2000). Taxonomy and biophysical properties of cryophilic microalgae and their environmental factors in Northwest Spitsbergen, Svalbard. In *57th Eastern Snow Conference*, Syracuse, New York, USA.
- Müller, T., Leya, T., and Fuhr, G. (2001). Persistent snow algal fields in Spitsbergen: Field observations and a hypothesis about the annual cell circulation. *Arctic Antarctic and Alpine Research*, 33(1) :45–51.
- Newton, A. (1982). Red-coloured snow algae in Svalbard - Some environmental factors determining the distribution of *Chlamydomonas nivalis*. *Polar Biology*, 1(3) :167–172.
- Painter, T., Duval, B., Thomas, W., Mendez, M., Heintzelman, S., and Dozier, J. (2001). Mapping snow algae concentration in the Sierra Nevada with imaging spectroscopy. In *Western Snow Conference (in press)*, Sun Valley, Idaho, USA.
- Perty, M. (1852). *Zur Kenntniss kleinster Lebensformen*. Jent and Reinert, Bern.
- Pielmeier, C. (2003). *Textural and mechanical variability of mountain snowpacs*. PhD Thesis, Universität de Berne.
- Pomeroy, J. and Brun, E. (2001). Physical properties of snow. In *Snow ecology*, pages 45–126. Cambridge University Press, Cambridge.
- Powell, S., Bowman, J., Snape, I., and Stark, J. (2003). Microbial community variation in pristine and polluted nearshore Antarctic sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 45(2) :135–145.
- Rasband, W. (1997-2006). *ImageJ*. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4) :406–425.
- Salm, B. (1983). *Guide pratique sur les avalanches*. Editions du CAS, Suisse.
- Schneebeli, M. (1995). Development and stability of preferential flow paths in a layered snow pack. In *Biogeochemistry of seasonally snow-covered catchments*, volume 228, pages 89–95. IAHS Publ.
- Schönholzer, F., Hahn, D., and Zeyer, J. (1999). Origins and fate of fungi and bacteria in the gut of *Lumbricus terrestris* L. studied by image analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 28(3) :235–248.
- Schweizer, J. and Wiesinger, T. (2001). Snow profile interpretation for stability evaluation. *Cold Regions Science and Technology*, 33(2-3) :179–188.

- Schwikowski, M., Novo, A., Baltensperger, U., Delmas, R., Gaeggeler, H. W., Kasper, A., Kuhn, M., Maupetit, F., Nickus, U., Preunkert, S., Puxbaum, H., Rossi, G. C., Schoener, W., and Wagenbach, D. (1997). Intercomparison of snow sampling and analysis within the alpine-wide snowpack investigation (SNOSP). *Water, Air, and Soil Pollution*, 93(1-4) :67–91.
- Segawa, T., Miyamoto, K., Ushida, K., Agata, K., Okada, N., and Kohshima, S. (2005). Seasonal change in bacterial flora and biomass in mountain snow from the Tateyama Mountains, Japan, analyzed by 16S rRNA gene sequencing and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1) :123–130.
- Sigg, A. and Netfel, A. (1987). Chemical transformations in a snow cover at Weissfluhjoch, Switzerland, situated 2500 m.a.s.l. In Jones, H. and Orville-Thomas, W., editors, *Seasonal Snowcovers : Physics, Chemistry, Hydrology*, volume C211 of *Mathematical and Physical Sciences*, pages 269–279. D.Reidel Publ. Comp., Dordrecht.
- Speksnijder, A., Kowalchuk, G. A., De Jong, S., Kline, E., Stephen, J. R., and Laanbroek, H. J. (2001). Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1) :469–472.
- Stein, J. and Amundsen, C. (1967). Studies on snow algae and fungi from the front range of Colorado. *Canadian Journal of Botany*, 45(11) :2033–2045.
- Stoeckli, V. (2002). Die Bedeutung der winterlichen Schneedecke für junge Fichten im Gebirgswald : Ergebnisse aus dem Lusiwald bei Davos. *Bauhinia*, 16 :23–32.
- Stoeckli, V., Rixen, C., and Wipf, S. (2002). Kunstschnee und Schneezusätze : Eigenschaften und Wirkungen auf Vegetation und Boden in alpinen Skigebieten. Schlussbericht eines forschungsprojektes am eidg. institut für schnee- und lawinenforschung slf, davos, Eidg. Institut für Schnee- und Lawinenforschung SLF, Davos.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). Clustal-W - improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22) :4673–4680.
- Tranter, M. and Jones, G. (2001). The chemistry of snow : Processes and nutrient cycling. In *Snow ecology*, pages 127–167. Cambridge University Press, Cambridge.
- VandePeer, Y., Chapelle, S., and DeWachter, R. (1996). A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Research*, 24(17) :3381–3391.
- Vishnivetskaya, T., Erokhina, L. G., Spirina, E. V., Shatilovich, A., Vorobyova, E. A., Tsapin, A. I., and Gilichinskii, D. A. (2005). Viable phototrophs : Cyanobacteria and Green Algae from the permafrost darkness. In Castello, J. and Scott, O., editors, *Life in Ancient Ice*, pages 140–158. Princeton University Press, Princeton and Oxford.

- Wakahama, G. (1968). Infiltration of melt water into snow cover. III. Flowing down speed of melt water in a snow cover. *Low Temperature Sciences*, 26(Series A) :77-86.
- Waldner, P. (2002). *Water and solute release from a subalpine snow cover*. PhD Thesis No 14 684, ETH Zürich.
- Warren, S. (1982). Optical proprieties of snow. *Review of geophysics and space physics*, 20(1) :67-89.

Remerciements

Je voudrais remercier Prof. Dr. Raffaële Pedduzi directeur de l'Institut Cantonal de Microbiologie de Bellinzona et du Laboratoire de Bactériologie et d'Ecologie Microbienne pour son rôle de directeur de thèse et pour avoir mis à ma disposition ses connaissances et le savoir-faire de son personnel. Je remercie particulièrement, Dr. Mauro Tonolla, Anna Paola Caminada et Dr. Michele Bottinelli qui m'ont initié aux techniques de biologie moléculaire sans oublier Nadia Ruggeri-Bernardi pour le travail important qu'elle a fourni et son suivi intensif.

J'aimerais aussi remercier Dr. Marcia Phillips et Dr. Veronika Stöckli pour leur soutien actif au SLF, leurs conseils et leurs encouragements. Un grand merci aussi à Nicole Schnetzler, Léonie Fierz et Nicole Lötscher qui, au travers de leur travail de diplôme ou de maturité professionnelle, ont contribué de manière significative à cette étude sans oublier Daniela Schmid, Franz Herzog, Christian Simeon, Fluri Michel, Bernhard. Zingg, Christian Pfamatter pour leur aide technique et sur le terrain. Merci beaucoup aussi à Dr. Armin Rist, Dr. Ariane Walz, Dr. Alejandro Casteller, pour la chaleureuse ambiance de bureau et leur amitié ...et la liste serait encore longue tant ces années passées à Davos et à Bellinzona ont été riches en rencontres et en amitié.

Un énorme merci à mon amie Valérie Herzig pour son soutien psychologique (souvent aussi technique), et pour ces belles années passées à ses côtés.

Je remercie encore le Fonds national suisse pour la recherche scientifique pour le financement de cette étude (Subside 200020-111730).

Publications et participations à des conférences

- Bischoff Y. (2002) *Die Schneedecke - ein verkanntes Ökosystem*, 182. Jahreskongress der SANW, (*présentation orale*), 18–20 septembre 2002, Davos, Suisse.
- Bischoff, Y. (2003) *Red snow algae on the red planet*, 3rd International Conference on Mars Polar Science and Exploration, (*poster*), 13–17 octobre 2003, Lake Louise, Canada.
- Bischoff, Y. (2004) *Ecologie nivale*, in : *Biologie de l'extrême en milieu alpin, Actes et contributions scientifiques*, Ecole d'été Piora 2003, Edizioni Centro Biologia Alpina Di Piora.
- Bischoff Y., Stöckli V., Philips, M., Schneebeli M. (2004) *Migration of snow algae in wet snow : integration of biological, chemical and physical parameters*, 5th Circumpolar Ecosystems International Workshop and Symposium, (*abstract et poster*), 25–29 février 2004, Churchill, Manitoba, Canada.
- Bischoff, Y. (2004) *Biodiversity in Extreme Environments : the Snow Cover as a Habitat*, Annual assembly of the Swiss Society of Microbiology, (*abstract et présentation orale*), 11– 12 March 2004, Lugano, Suisse.
- Bischoff Y. (2004) *Vivre dans la neige*, Swiss Alpina, Salon international pour l'équipement des stations alpines, (*poster*) 27–29 avril 2004, Martigny, Suisse.
- Bischoff, Y. (2006) *Les algues de neige, des nageuses de l'extrême*. Phil.Alp 2006, (*abstract et présentation orale*), 23–24 mars 2006, Glarus, Suisse.
- Bischoff Y. , Tonolla M. , Stoeckli V. , Peduzzi R. (2006). Mobility of snow algae in the Swiss Alps, International Conference on Alpine and Polar Microbiology, (*abstract et poster*), 27–30 mars 2006, Innsbruck, Autriche.
- Bischoff Y., N. Ruggeri, V. Stoeckli, M. Tonolla, R. Peduzzi (2006) *Mobility of snow algae : phylogeny, field and laboratory studies*. Swiss Microbial Ecology 2006, (*abstract et présentation orale*), 28–29 septembre 2006, Bellinzona, Suisse.

Cours et formation

- Advanced Course in Molecular Microbial Ecology, 12–19 juillet 2003. Centre de Biologie Alpine de Piora, Tessin.
- Stage d'écologie moléculaire, *Biologie de l'extrême en milieu alpin et milieu marin*, 25–30 août 2003, Centre de Biologie Alpine de Piora, TI.
- Scientific Writing Practice, 23–24 juillet 2003, Institut fédéral pour l'étude de la neige et des avalanches (ENA/SLF), Davos, GR
- Writing Up Research in English, 13–14 août 2003, Institut fédéral pour l'étude de la neige et des avalanches (ENA/SLF), Davos, GR
- Statistiques, 5–6 avril 2004 et 10–11 mai 2004, Institut fédéral pour l'étude de la neige et des avalanches (ENA/SLF), Davos, GR
- Analyse d'images, 7–10 juin 2004 Institut fédéral pour l'étude de la neige et des avalanches (ENA/SLF), Davos, GR.
- Stage d'écologie moléculaire, 23–27 août 2004, 22–24 août 2005, Alpine Center Piora, TI.
- Oral and poster Presentation in English, 13–14 octobre 2005, Institut fédéral pour l'étude de la neige et des avalanches (ENA/SLF), Davos, GR

Table des figures

1.1	Neige rouge au Piatto della Miniera (TI) le 15 juillet 2004.	14
1.2	Cycle de vie théorique des algues de neige.	15
1.3	Visualisation de la répartition de l'eau liquide dans de la neige humide.	17
2.1	Carte topographique de la Suisse et position des sites expérimentaux.	23
2.2	Site principal de Sertig.	24
2.3	Exemple d'un profil de neige.	26
2.4	Répartition d'un colorant alimentaire sur la neige pour mettre en évidence l'écoulement de l'eau dans le manteau neigeux.	30
2.5	Détail d'un piège utilisé pour analyser les particules transportées par le vent.	31
2.6	Implantation d'un piège sur le terrain.	31
2.7	Processus utilisé pour le comptage automatique.	35
2.8	Tapis d'algues rouge dans une fontaine en bois.	39
2.9	Extrait du formulaire utilisé pour la détermination de la mobilité des algues de neige en milieu liquide.	46
2.10	Dispositif expérimental pour l'étude de la mobilité des algues dans la neige.	48

2.11	Dispositif expérimental pour l'évaluation de la phototaxis.	49
3.1	Diversité des clones pour chaque site d'échantillonnage.	53
3.2	Courbes de raréfaction pour les bibliothèques de clones des différents sites d'échantillonnage.	53
3.3	Arbre phylogénétique de trois échantillons de neige rouge.	56
3.4	Gel DGGE d'une sélection de clones.	62
3.5	Arbre phylogénétique des clones présents dans le gel.	62
3.6	Gel DGGE d'une sélection de clones et d'échantillons de neige.	63
3.7	Arbre phylogénétique des clones et échantillons présents dans le gel.	63
3.8	Insertion non-désirée de 58 bp en début de séquence.	65
3.9	Évolution des températures de l'air et de la surface du sol.	68
3.10	Moyennes journalières de la température de l'air et à la surface du sol.	68
3.11	Évolution des principales caractéristiques du manteau neigeux au cours de l'hiver 2005.	69
3.12	Températures du manteau neigeux et de l'air autour de l'épisode pluvieux du 12 février 2005.	70
3.13	Observation d'un « flow finger » le 29 mars 2005.	70
3.14	Distributions des différents composés chimiques analysés.	72
3.15	Histogramme du pH et de la conductivité électrique.	73
3.16	Évolution de la composition chimique en surface et au fond du manteau neigeux.	77
3.17	Évolution de la composition chimique du manteau neigeux et de la conductivité électrique.	79
3.18	Représentation graphique des différents composés ainsi que des mesures selon les deux premières composantes principales (variables centrées réduites).	81

3.19 Développement des algues de neige sur le site de Sertig pendant la saison 2004	82
3.20 Développement des algues de neige sur le site de Sertig pendant la saison 2005	82
3.21 Relation entre la microstructure de la neige et les concentrations en algues de neige.	84
3.22 Répartition des algues selon l'humidité de la neige.	85
3.23 Conductivité électrique constatée en l'absence et en présence d'algues de neige.	85
3.24 pH constaté en l'absence et en présence d'algues de neige.	85
3.25 Diminution des concentrations de nitrates lors du développement des algues de neige.	86
3.26 Couche colorée parallèle à la surface.	87
3.27 Profil transversal après 4 heures d'infiltration d'un colorant alimentaire à travers le manteau neigeux.	88
3.28 Courbes de croissance de <i>Chlamydomonas augustae</i> dans divers milieux de culture.	91
3.29 Vitesses de progression des algues de neige en milieu liquide.	92
4.1 Proposition sur le cycle de développement des algues de neige.	103

Liste des tableaux

2.1	Paramètres mesurés lors du profil stratigraphique selon Colbeck et al. (1990).	28
2.2	Liste des composés analysés, des méthodes d'analyse et de leur limite de détection.	37
2.3	Échantillons pour l'établissement de la phylogénie.	38
2.4	Échantillons supplémentaires pour DGGE.	38
2.5	Échantillons d'eau fortement rouge provenant de fontaines en bois.	39
2.6	Comparaison de la composition chimique en <i>mM</i> de la neige, du milieu de culture TAP et de ses variantes.	43
3.1	Répartition des 106 clones obtenus en 16 taxons différents et leur provenance.	54
3.2	Description des organismes fréquemment observés dans les échantillons de neige.	58
3.3	Résultat des analyses chimiques.	73
3.4	Évaluation de l'incertitude sur la concentration moyenne (<i>mg/l</i>) due à la présence de valeurs inférieures à la limite de détection.	74
3.5	Périodes d'exposition des pièges à particules et conditions d'enneigement.	89
3.6	Dénombrement des algues de neige et des pollens détectés.	90
3.7	Essais de mobilité des algues de neige dans des colonnes de neige en laboratoire.	93

Annexes

A.1 Bold's Basal Medium (BBM)

Références : (Leya, 2004), milieu initialement développé par Bischoff and Bold (1963)

Solutions de base

	Solution	<i>g/400 ml</i>	Concentration
<ul style="list-style-type: none"> – Dissoudre les quantités suivantes dans 400 <i>ml</i> d'eau de bonne qualité (p.ex. Millipore), – utiliser 10 <i>ml</i> de chaque solution pour la préparation de 1 <i>l</i> de milieu. 	1-NaNO ₃	10 <i>g</i>	0.30 <i>M</i>
	2-CaCl ₂ • 2H ₂ O	1 <i>g</i>	0.02 <i>M</i>
	3-MgSO ₄ • 7H ₂ O	3 <i>g</i>	0.03 <i>M</i>
	4-K ₂ HPO ₄	3 <i>g</i>	0.05 <i>M</i>
	5-KH ₂ PO ₄	7 <i>g</i>	0.13 <i>M</i>
	6-NaCl	1 <i>g</i>	0.04 <i>M</i>

Extrait de terre

- Faire cuire 30 *min* 50 *g* de terre sèche (sans engrais) dans 500 *ml* d'eau,
- laisser sédimenter les particules solides, centrifuger le surnageant pendant 15 *min* à 5'500 Rpm,
- récupérer le surnageant et compléter à 500 *ml* avec de l'eau,
- stériliser en autoclave pendant 35 *min* à 121 °C.

Solution de vitamines

- Dissoudre les quantités de vitamines suivantes dans 100 *ml* d'eau.

	<i>g/100 ml</i>	Concentration
Thiamine HCl (vitamine B ₁)	0.1 <i>g</i>	3 <i>mM</i>
D-(+)-Biotine (vitamine H)	0.025 <i>g</i>	1 <i>μM</i>
Cyanocobalamine (vitamine B ₁₂)	0.015 <i>g</i>	0.1 <i>M</i>

- Ajuster le pH entre 4.5 et 5 avec HCl, autoclaver, répartir en petites portions et conserver à -20 °C. Utiliser 1 *ml* de chaque solution pour la préparation de 1 *l* de milieu.

Solution d'éléments traces

	<i>g/1000 ml</i>
– Dissoudre 0.75 <i>g</i> de Na ₂ EDTA (Titrplex III) dans 1 <i>l</i> d'eau en chauffant légèrement,	
– ajouter les sels suivants les uns après les autres en prenant soin de les dissoudre complètement.	
	FeCl ₃ • 6H ₂ O 97 <i>mg</i>
	MnCl ₂ • 4H ₂ O 41 <i>mg</i>
	ZnCl ₂ 5 <i>mg</i>
	CoCl ₂ • 6H ₂ O 2 <i>mg</i>
	Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O 4 <i>mg</i>

Préparation du milieu

- Ajouter 10 *ml* de solution de base dans 900 *ml* d'eau,
- ajouter 50 *ml* d'extrait de terre,
- ajouter 1 *ml* de la solution de vitamines,
- ajouter 6 *ml* de la solution d'éléments trace,
- compléter le volume à 1000 *ml* avec de l'eau
- ajuster le pH à 5,5 et stériliser 15 *min* à 121 °C.

A.2 Milieu TAP

Références : (Gormann and Levine, 1965), milieu prévu pour les algues qui utilisent NH_4^+ comme source d'azote.

Solution A (sels)

- Dissoudre les quantités suivantes dans 1000 *ml* d'eau de bonne qualité (p.ex. Millipore),
- utiliser 25 *ml* de solution A pour la préparation de 1 *l* de milieu.

	<i>g/1000 ml</i>	Concentration
NH_4Cl	15 <i>g</i>	0.30 <i>M</i>
$\text{MgSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$	4 <i>g</i>	0.016 <i>M</i>
$\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$	2 <i>g</i>	0.014 <i>M</i>

Solution B (phosphates)

- Dissoudre les quantités suivantes dans 100 *ml* d'eau de bonne qualité (p.ex. Millipore),
- utiliser 1 *ml* de solution B pour la préparation de 1 *l* de milieu.

	<i>g/100 ml</i>	Concentration
K_2HPO_4	28.8 <i>g</i>	1.7 <i>M</i>
KH_2PO_4	14.4 <i>g</i>	1.1 <i>M</i>

Solution C (éléments traces)

- Dissoudre 12.5 *g* de Na_2EDTA (Titriplex III) dans 150 *ml* d'eau en chauffant légèrement,
- dissoudre 4*g* de KOH dans 20 *ml* d'eau et utiliser cette solution basique pour ajuster le pH de la solution C à 5.0 avant chaque ajout d'élément trace,
- ne pas laisser le pH dépasser 6.7 (risque de précipitation de $\text{MnCl}_2 \bullet 4\text{H}_2\text{O}$),
- ajouter les éléments traces suivants dans l'ordre en prenant soin de les dissoudre complètement.

	<i>g/1000 ml</i>
$\text{FeSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$	1.25 <i>g</i>
$\text{ZnSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$	5.50 <i>g</i>
H_3BO_3	2.85 <i>g</i>
$\text{CoCl}_2 \bullet 6\text{H}_2\text{O}$	400 <i>mg</i>
$\text{CuSO}_4 \bullet 5\text{H}_2\text{O}$	400 <i>mg</i>
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \bullet 4\text{H}_2\text{O}$	280 <i>mg</i>
$\text{MnCl}_2 \bullet 4\text{H}_2\text{O}$	1.26 <i>g</i>

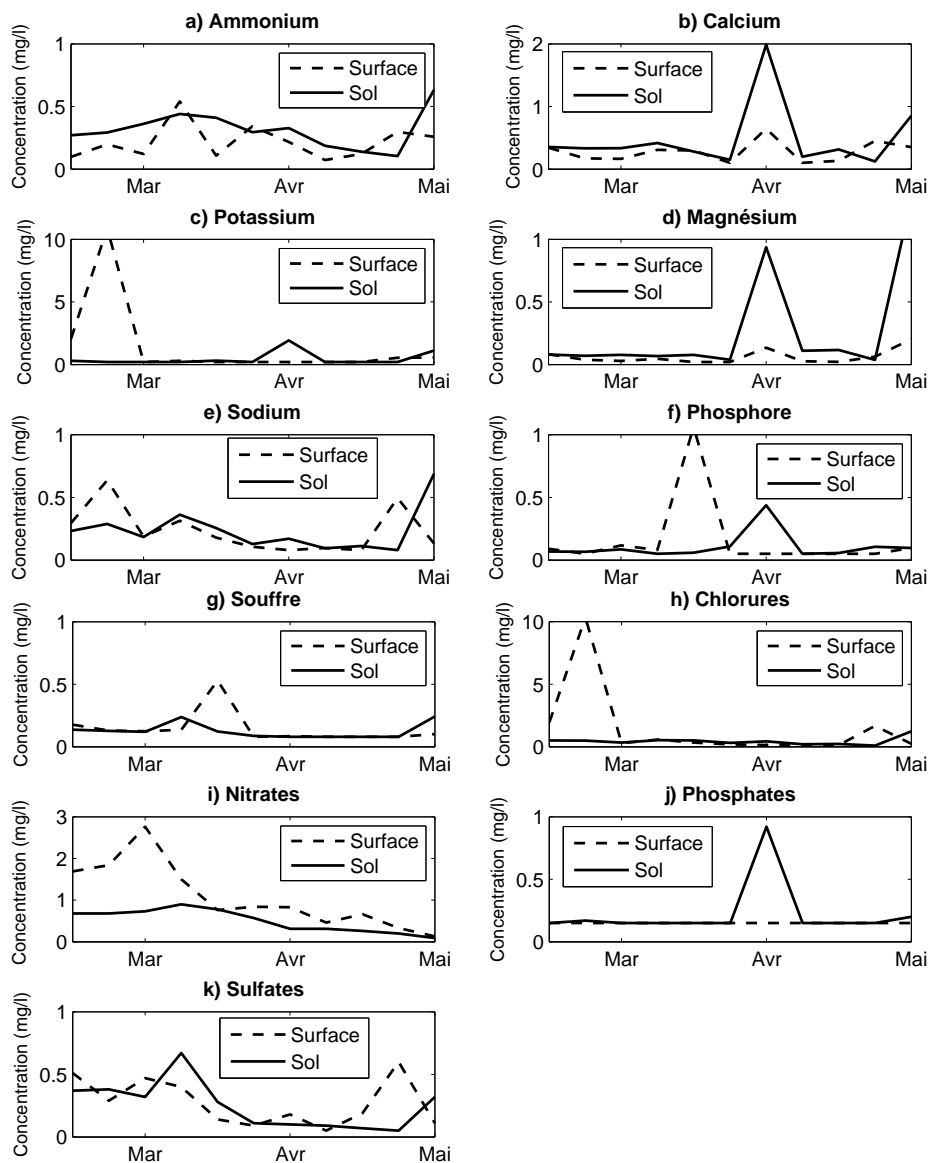
- Compléter le volume à 250 *ml* avec de l'eau,
- laisser la solution reposer pendant 2 semaines jusqu'à ce qu'elle se colore en rouge, puis filtrer sur du papier-filtre.

Préparation du milieu

- Dissoudre 12.42 *g* de TRIS (trishydroxyméthylaminométhane) dans 972 *ml* d'eau,
- Ajouter 25 *ml* de solution A,
- ajouter 1 *ml* de solution B,
- ajouter 1 *ml* de solution C,
- ajuster le pH à 6,0 avec de l'acide acétique,
- stériliser 15 *min* à 121 °C.

B.1 Saison 2005 : concentrations de surface et vers le sol

Le tableau ci-dessous retrace l'évolution au cours de la saison 2005 des concentrations de divers composés à la surface de la neige et proche du sol.



C.1 Séquences des amorces utilisées

Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le tableau suivant :

Amorce	Séquences 5' – 3'	Cible	Littérature
18S1F	CTGCT TTATA CTGCG AACT GC	18S ADNr FOREWARD (70-90) utilisé pour l'étude d'algues de neige des genre <i>Chlamydomonas</i> et <i>Chloromonas</i>	(Hoham et al., 2002)
18S2R	CTTCA CCAGC ACACC CAATC	18S ADNr REVERSE (1649-1668) utilisé pour l'étude d'algues de neige des genre <i>Chlamydomonas</i> et <i>Chloromonas</i>	(Hoham et al., 2002)
EUK516	ACC AGA CTT GCC CTC C	18S ADNr (502-517) Eucaryotes	(Amann and Ludwig, 2000)
UNIL	ATT CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA	16S ADNr bactérien (universel)	(VandePeer et al., 1996)
UNIR	ATG GTA CCG TGT TGA CGG GGC GGT GTA	16S ADNr bactérien (universel)	(VandePeer et al., 1996)
M13F(-20)	GTAAAACGACGGCCAG	Vecteur Plasmidique utilisé pour le clonage pCR [®] 2.1 TOPOup [®] (391-406)	manuel TOPO TA Cloning [®] for Sequencing, Invitrogen
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	Vecteur Plasmidique utilisé pour le clonage pCR [®] 2.1 TOPOup [®] (205-221)	manuel TOPO TA Cloning [®] for Sequencing, Invitrogen