

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE AIX-MARSEILLE

**Rôle de la température et des ressources nutritives dans le
contrôle des activités des bactéries marines hétérotrophes:
approches *in situ* et expérimentales**

Benjamin Céa
2014



THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE AIX-MARSEILLE

Institut Méditerranéen d'Océanologie (M.I.O)

Ecole Doctorale des Sciences de l'Environnement

**Rôle de la température et des ressources nutritives
dans le contrôle des activités des bactéries marines
hétérotrophes : approches *in situ* et expérimentales**

Par

Benjamin Céa

Pour obtenir le grade de

Docteur d'Aix-Marseille Université

Spécialité Océanographie

Soutenu le 18/12/2014 devant le jury composé de :

Dr. Ingrid Obernosterer	LOMIC, France	Rapporteur
Dr. Téléphore Sime-NGando	LMGE, France	Rapporteur
Pr. Bernard Quéguiner	MIO, France	Examinateur
Dr. Dolores Vaqué	ICM, Espagne	Examinateur
Dr. France Van Wambeke	MIO, France	Directeur
Dr. Dominique Lefèvre	MIO, France	Co-Directeur

A Clara, Ninon & Jonah

“Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes, ni les plus intelligentes, mais celles qui s’adaptent le mieux aux changements.”

Charles Darwin

“A l’origine de toute connaissance, nous rencontrons la curiosité ! Elle est une condition essentielle du progrès.”

Alexandra David-Néel

“La connaissance parle, mais la sagesse écoute”

Jimi Hendrix

REMERCIEMENTS

Parce que nous ne faisons jamais rien de bien seul, je vais tenter de remercier toutes les personnes sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir. Et si dans ces remerciements, j'oublie certains d'entre vous, sachez que votre soutien, qu'il ait été direct ou indirect, a été précieux dans cette course de fond qu'est la thèse.

Je tiens à remercier les membres de mon jury, le Pr. Bernard Quéguiner, le Dr. Ingrid Obernosterer, le Dr. Téléphore Sime N'Gando et le Dr. Dolors Vaqué d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Je remercie Richard Sempéré de m'avoir accueilli il y a 4 ans au sein du laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ma thèse au LMGEM puis au MIO. Ma petite fille Ninon commence tout juste à parler. Je suis sûr qu'elle est également pleine de gratitude pour son lapin en peluche.

J'ai réalisé ma thèse sous la supervision du Dr. France Van Wambeke et du Dr. Dominique Lefèvre. Mes remerciements les plus sincères vont à tous les deux pour votre disponibilité, vos conseils avisés et l'excellente formation que vous m'avez donnée. France, merci pour ta disponibilité, ta patience et ta gentillesse sans faille. Ta capacité à faire autant de choses à la fois sans montrer le moindre signe de stress est épatante, chapeau! Dom, tu as toujours su te libérer au moment opportun et te montrer d'une aide et d'une efficacité précieuse et je t'en remercie. Sache que tes encouragements, comme les « *bon travail Ben* », ont été une source d'énergie pendant cette thèse. Enfin, merci à tous les deux de m'avoir fait grandir scientifiquement et de m'avoir transmis votre vision de l'océanographie.

Merci à tous ceux qui ont collaboré de près à mon travail, notamment Pascale, Marie, Laure, Bruno, Patrick, Nicole, Jean-François, Gérald, Aude, Michel et l'équipe de L'Antedon II. Merci également à Melek, Sandra, Véronique, Melika, Fred, Karine, Bernard et Thierry. Votre aide et vos conseils m'ont permis de mener à bien mes recherches, dans la joie et la bonne humeur.

A tous ceux des 1^{er} et 2nd étages de l'ex-LMGEM avec qui j'ai partagé ces 4 années : Christian, Christos, Marc, Cathy, Madeleine, Elvira, Anne, Marco, Philippe, Patricia, Valérie et Cécile, un énorme merci. Un grand merci à Dominique Estivale, Brigitte et Dominique Poirot pour avoir facilité la partie administrative. Un merci tout particulier aux matheux, JC et David. JC pour le footing et ta pédagogie qui m'a permis de voir les mathématiques sous un autre angle. David pour ta coolitude, ton sens de l'humour, les séances de Carveboard et les fringues de Lou (Ninon lui dit encore merci).

Aux potes thésards et post doc : Max V, Morgan, Marie, Max S, Antho, Flo, Yo, Chiara, Ju, Anne, Sev, Medhi, Nico, Micka, Marion K, Marion F, Julien, Hugo, Arnaud, Mathieu, Anaïs, Yann, Axel, Yannick, Clément, Marine, Boris, Francesco et Tosca, merci pour les poilades et les bons moments passés ensemble. Une pensée spéciale à l'équipe des bras cassés de l'épopée mémorable *escalade-apnée*, aux pseudo-rappeurs du vidéoclip « *Je pèse* » ainsi qu'aux hommes des shootings photo des Dieux et des Reines du Labo (séries limitées 2012 et 2013).

Un merci tout spécial à Max V, ami et parrain de ma fille. Nos footings et nos entraînements vont me manquer. J'espère qu'on arrivera à se revoir aussi souvent que possible et qu'on réitérera une ou deux sessions surf sur la côte sauvage. Au plaisir l'ami !

A mes nombreux anciens colocs (ou presque colocs), Michka, Adri, Bapts, Marlenouchouchou, Rachel, Nel, Gaëlle, Rachele, Blandine, Sab et Gui merci pour votre amitié et votre présence à mes côtés durant toutes ces années. C'est une chance de vous compter parmi mes ami(e)s. Et vive les soirées aux 55 rue Dragon et au 122 rue Sainte Cécile, la coloc' des gens cools !

Clara, comment ne pas te remercier toi mon aimée, ma compagne, ma partenaire de vie et la mère de mes enfants. Merci pour ton aide durant la dernière ligne droite et ta ténacité à toute épreuve pour réaliser les corrections bibliographiques, orthographiques et grammaticales de mon manuscrit. Merci d'être toujours présente à mes côtés après cette longue période de rédaction. Je sais que ça n'a pas été facile pour toi de me supporter tous les jours. Et bien évidemment, merci à mon camion « *vroum vroum tut tut* » sans qui je ne t'aurais jamais rencontré et sans qui ni Ninon ni Jonah ne seraient nés.

Dans le désordre, merci du fond du cœur à mes amis d'enfance, Max & Elisa, Jo & Laura, Greg & Eve, Dada, Ju & Yves, avec lesquels c'est toujours une joie immense de se retrouver. Diantre que c'est bon d'avoir grandi avec vous les « gars »!

Enfin, à ma famille, mes parents, mon grand frère et ma petite sœur, il n'y pas de mot pour vous dire à quel point je vous suis reconnaissant. C'est grâce à vous si j'en suis arrivé là. Etant aujourd'hui père, je prends pleinement conscience du rôle essentiel que joue la famille dans notre construction personnelle. Alors, simplement merci de m'avoir toujours épaulé et d'avoir toujours cru en moi.

PLAN DU MANUSCRIT

CHAPITRE 1 : Introduction générale et objectifs de thèse	1
1 Les bactéries marines hétérotrophes	2
1.1. Les bactéries marines : définitions et caractéristiques	2
1.2. La place des bactéries marines dans le cycle du carbone	3
1.3. Rôle des bactéries hétérotrophes au sein de la boucle microbienne	4
1.4. La matière organique utilisable par les bactéries hétérotrophes	5
1.4.1. La biodisponibilité de la matière organique	5
1.4.2. Les différentes sources de matière organique consommables par les bactéries hétérotrophes	6
1.5. Processus métaboliques bactériens et rendement de croissance	7
1.5.1. Production de biomasse et respiration bactérienne	7
1.5.2. Rendement de croissance bactérien (BGE)	9
1.5.3. Processus d'hydrolyse enzymatique de la matière organique	11
2 Les facteurs de contrôle des processus bactériens	14
2.1. Les ressources nutritives	14
2.1.1. La limitation par les composés organiques	15
2.1.2. La limitation par les nutriments	15
2.1.3. La stœchiométrie C/N/P	17
2.2. La température	18
2.2.1. Le concept d'énergie d'activation	18
2.2.2. Le concept du Q_{10}	19
2.2.3. Contexte du changement global	22
2.2.4. Effets directs et indirects de l'augmentation de la température	23
2.2.5. Un contrôle sur le BGE controversé	24
2.3. Autres facteurs de contrôle	26
2.4. L'hétérogénéité de la matière organique	26
3 Cadre et objectifs de la thèse	26
3.1. Objectifs de thèse	26
3.2. Déroulement et stratégie de la thèse	27

CHAPITRE 2 : Matériels & Méthodes	31
1 Expérimentation & cultures bactériennes	32
1.1. Effet de la température	32
1.2. Contrôle par les ressources	34
1.3. Effets des apports intermittents ou non en matière organique	35
2 Les paramètres mesurés	37
2.1. Météorologie	37
2.2. Données physico – chimiques	38
2.2.1. Température, salinité	38
2.2.2. Pigments	39
2.2.3. Carbone et Azote particulaires	39
2.2.4. Phosphore particulaire	40
2.2.5. Le carbone pyruvate	40
2.2.6. Carbone organique total	40
2.2.7. Sels nutritifs, azote et phosphore organique total et dissous	41
2.3. Dénombrement cellulaire	41
2.3.1. Pico et nano plancton	41
2.3.2. Microplancton	42
2.4. Processus bactériens hétérotrophes	42
2.4.1. Production bactérienne hétérotrophe	42
2.4.2. Respiration	44
2.4.3. Activités ectoenzymatiques	45
2.5. Structure des communautés bactériennes	45
2.5.1. Extraction d'ADN, d'ARN	45
2.5.2. Amplification par PCR	46
2.5.3. CE-SSCP et traitement des profils	47
3 Outils statistiques	48

CHAPITRE 3 : Suivi annuel des activités hétérotrophes des bactéries marines en baie de Marseille	49
Avant-Propos	50
1 INTRODUCTION	53
2 MATERIALS AND METHODS	55
2.1. Study area and sample collection	55
2.2. Chemical analysis	56
2.3. Prokaryote and phytoplankton counting	57
2.4. BP, CR, BR and BGE	58
2.5. Ectoenzymatic activity	59
2.6. Enrichment experiments	60
2.7. Statistical analysis	61
3 RESULTS	61
3.1. Environmental factors	61
3.2. Organic matter (C, N, P)	65
3.3. Cell abundance	67
3.4. Heterotrophic bacterial activity and growth efficiency	68
3.5. Bacterial response to nutrient enrichment	71
4 DISCUSSION	72
4.1. Heterotrophic bacterial activity and BGE	72
4.2. The effect of nutrients and labile carbon limitation	74
4.3. Temperature effect	75
5 CONCLUSION	76

CHAPITRE 4 : Contrôle des activités hétérotrophes des bactéries marines par la température et les ressources	79
Avant-propos	80
1 INTRODUCTION	81
2 MATERIALS AND METHODS	84
2.1. Study area and sample collection	84
2.2. Heterotrophic bacterial activity	84
2.3. Experimental temperature kinetics	85
2.4. Q_{10} computation	86
2.5. Relative changes of rates	87
2.6. Bacterial growth efficiency (BGE)	88
2.7. Nutrient enrichment experiments	89
2.8. Temperature and resource coupling	89
2.9. Statistical analysis	90
3 RESULTS	90
3.1. Temperature effect on bacterial activity	90
3.2. Relative changes of rates following temperature shifts	95
3.3. Bacterial growth efficiency	95
3.4. Bacterial response to nutrient enrichment	96
4 DISCUSSION	97
5 CONCLUSION	106

CHAPITRE 5 : Dynamique bactérienne contrôlée par le régime d'apport des ressources nutritives	107
1 Etat de l'art	108
2 Méthodologie	111
2.1. Zone d'étude	111
2.2. Principe et fréquence des cultures bactériennes	111
2.3. Mise en place des cultures bactériennes en minicosme	112
3 PARAMÈTRES MESURÉS	114
3.1. Le Carbone Organique Dissous	116
3.2. Le Carbone Organique Particulaire & l'Azote Organique Particulaire	117
3.3. Sels Nutritifs	118
3.4. L'Abondance cellulaire	118
3.5. Production bactérienne	119
3.6. Respiration bactérienne	120
3.7. Rendement de croissance	121
3.8. Structure des communautés	121
4 Principaux résultats obtenus	122
4.1. Les sels nutritifs	122
4.2. Abondances cellulaires	124
4.3. Stocks de matière organique dissoute et particulaire	125
4.4. Production, respiration, BGE et demande carbonée	131
4.5. Structure des communautés bactériennes	140
5 Bilan de l'étude	147
5.1. Les activités biologiques possibles	148
5.3. Le pas d'échantillonnage	148
5.3. Les facteurs de conversion leucine-carbone	150
5.4. Biais de la mesure de RB	152
5.5. Effets sur le rendement de croissance	152
5.6. Structure des communautés bactériennes	154

CHAPITRE 6 : Conclusions & Perspectives	157
1.1. Bilan du travail de thèse	158
1.2. Effets des variations saisonnières sur les processus hétérotrophes bactériens	159
1.3. Contrôle des processus hétérotrophes bactériens par la température	160
1.4. Les conséquences de la température sur le rapport C/N/P	160
1.5. Le couplage température – ressource : synergique ou antagoniste ?	161
1.6. Effets de la température sur le <i>BGE</i> et la dynamique bactérienne	162
1.7. Influence de l’hétérogénéité de la MO sur la dynamique bactérienne	164
Références bibliographiques	170

ANNEXES

Annexe 1	190
Cinétiques températures réalisées lors du suivi annuel à SOLEMIO (Janvier 2012 à Février 2013)	190
Annexe 2	194
Expériences d’enrichissements lors du suivi annuel au site SOLEMIO (Janvier 2012 à Février 2013)	194
Annexe 3	195
Données environnementales au site SOLEMIO	195
Annexe 4	199
Protocole de dosage du pyruvate	199
Annexe 5	205
Cytogrammes types établis lors du suivi annuel et des cultures en minicosme	205
Annexe 6	208
Principe de l’optode presens®	208
Annexe 7	210
Modèle de régression non linéaire appliqué sur les mesures acquises par les optodes presens® lors des études en minicosme sur les effets des apports fluctuants en MO	210
Annexe 8	211
Optodes presens® et validation des chambres d’incubation	211

LISTE DES ABREVIATIONS

En français...	In English ...		
AB	Abondance Bactérienne	ATP	Adenosine Tri-Phosphate
ATP	Adénosine Tri-Phosphate	BA	Bacterial Abundance
BB	Biomasse Bactérienne	BB	Bacterial Biomasse
BGE	Rendement de croissance	BGE	Bacterial Growth Efficiency
C	Carbone	BP	Bacterial Production
Chl <i>a</i>	Chlorophylle <i>a</i>	BR	Bacterial Respiration
CO	Carbone Organique	C	Carbon
CO ₂	Dioxyde de Carbone	CF	Conversion Factor
COD	Carbone Organique Dissous	Chl <i>a</i>	Chlorophyll <i>a</i>
COP	Carbone Organique Particulaire	CR	Community Respiration
COT	Carbone Organique Total	DOC	Dissolved Organic Carbon
DCB	Demande Carbonée Bactérienne	DOM	Dissolved Organic Matter
FC	Facteur de Conversion	DON	Dissolved Organic Nitrogen
FE	Facteur d'Enrichissement	DOP	Dissolved Organic Phosphorus
HMW	Haut Poids Moléculaire	EF	Enrichment Factor
L-COD	Carbone Organique Dissous Labile	HMW	High Molecular Weight
Leu ³ H	Leucine Tritiée	L-DOC	Labile Dissolved Organic Carbon
MO	Matière Organique	N	Nitrogen
MOD	Matière Organique Dissoute	OC	Organic Carbon
MOP	Matière Organique Particulaire	OM	Organic Matter
N	Azote	P	Phosphorus
N ₂	Diazote	<i>Phos</i>	Phosphatase activity
NO ₂	Nitrite	POC	Particular Organic Carbon
NO ₃	Nitrate	POM	Particular Organic Matter
NH ₄	Ammonium	PON	Particular Organic Nitrogen
NOD	Azote Organique Dissous	POP	Particular Organic Phosphorus
NOP	Azote Organique Particulaire	<i>Prot</i>	Protease Activity
NOT	Azote Organique Total	PP	Primary Production
O ₂	Dioxygène	R-DOC	Refractory Dissolved Organic Carbon
P	Phosphore	RQ	Respiratory Quotient
PB	Production Bactérienne	TGB	Temperature Gradient Block
<i>Phos</i>	Activité Phosphatase alcaline	TOC	Total Organic Carbon
PP	Production Primaire	TON	Total Organic Nitrogen
PO ₄	Phosphate	TOP	Total Organic Phosphorus
POD	Phosphore Organique Dissous		
POP	Phosphore Organique Particulaire		
POT	Phosphore Organique Total		
<i>Prot</i>	Activité Protéase		
RB	Respiration Bactérienne		
RC	Respiration Communautaire		
R-COD	Carbone Organique Réfractaire		
RQ	Quotient Respiratoire		
SiOH ₄	Acide Silicique		
SO	Service d'Observation		
SOMLIT	Service d'Observation en Milieu LITtoral		
TCA	Acide Trichloracétique		
TGB	Block de Gradient de Température		



CHAPITRE 1

Introduction générale et objectifs de thèse

1 Les bactéries marines hétérotrophes

1.1. Les bactéries marines : définitions et caractéristiques

Les microorganismes étaient autrefois nommés « animacules » par Antoine van Leeuwenhoek qui fut le premier à les observer avec un microscope de sa fabrication. Aujourd'hui, connu sous le terme de microbes, ils sont inclus parmi les 3 domaines du vivant : Bacteria, Archaea et Eukarya. L'Homme appartient au domaine des Eukarya (cellules pourvues d'un noyau) au même titre que les « algues » (excepté les « algues bleues » correctement nommées cyanobactéries), les flagellés, les protistes ciliés, les champignons, les plantes et les animaux. Les Bacteria et les Archaea sont des procaryotes, c'est-à-dire des organismes unicellulaires dépourvus de noyau. C'est donc sous le terme de procaryote que nous retrouvons l'ensemble des bactéries marines.

Chez les bactéries marines, il existe une grande diversité en termes d'énergie et de sources de carbone qu'elles sont capables d'assimiler. Cette diversité bactérienne peut aller des phototrophes qui utilisent la lumière et le CO₂, des chémolithotrophes qui utilisent des composés inorganiques pour l'énergie et le CO₂, aux hétérotrophes qui utilisent des composés organiques comme source de carbone et d'énergie. Du point de vue du cycle du carbone dans le milieu marin, le groupe des bactéries organotrophes est le groupe physiologique le plus important. Ces bactéries hétérotrophes vivent dans la colonne d'eau de l'océan et sont responsables d'une grande partie des transformations biologiques de la MO et de la production de CO₂ dans l'Océan (Sherr & Sherr 1996).

Dans les couches de surface des océans, la majorité des procaryotes identifiables par les techniques de cytométrie en flux ou de microscopie à épifluorescence appartiennent au domaine des Eubacteria (80%). Ces méthodes de dénombrement ne permettent pas de distinguer leur appartenance aux deux grands domaines : Archeae et Bacteria, accessibles seulement via les techniques d'hybridation *in situ*. Par contre, elles permettent de distinguer les bactéries hétérotrophes (non naturellement fluorescentes) des bactéries autotrophes telles que les cyanobactéries et les prochlorophytes (naturellement fluorescentes). Dans le milieu marin, les bactéries appartiennent au picoplancton, dont la taille est comprise entre 0.2 et 2 µm (Seiburth et al. 1978). Dans la suite du manuscrit, le terme de « bactéries hétérotrophes » désignera les procaryotes supposés hétérotrophes (car non fluorescents) dénombrés par ces techniques, alors que les bactéries photo-lithotrophes, naturellement fluorescentes, seront désignées sous le terme générique de cyanobactéries (Prochlorococcus et Synechococcus).

1.2. La place des bactéries marines dans le cycle du carbone

L'océan recouvre 71% de la surface de la planète et joue un rôle primordial dans le cycle du carbone et dans le fonctionnement du système global du climat. Le stock de carbone inorganique dans l'eau de mer s'élève à près de 40 Eg C (Fig. 1.1) soit environ 6 fois la quantité de dioxyde de carbone (CO₂) dans l'atmosphère ce qui à l'échelle de la planète, constitue l'un des plus importants réservoirs de carbone inorganique.

Le carbone organique (CO) est lui-même fractionné en deux groupes: le carbone organique dissous (COD) et le carbone organique particulaire (COP). Ces deux groupes appartiennent, respectivement, à la matière organique (MO) dissoute (MOD) et particulaire (MOP). En biogéochimie marine, la différence entre ces deux fractions se fait au niveau de la taille selon un critère méthodologique (un filtre en fibres de verre GF/F Whatman®, de porosité nominale 0,7 µm). En microbiologie sont considérés comme dissous, tous les éléments qui vont passer à travers un filtre de porosité 0,2 µm (soit une taille équivalente ou inférieure à 200 kDa) et comme particulaires tous les éléments retenus par ce filtre. Les bactéries sont à la limite de cette séparation du filtre GF/F et contribuent donc aussi bien aux stocks de COP que de COD. En réalité, la MO se répartit selon un continuum de classe de taille (Fig. 1.2).

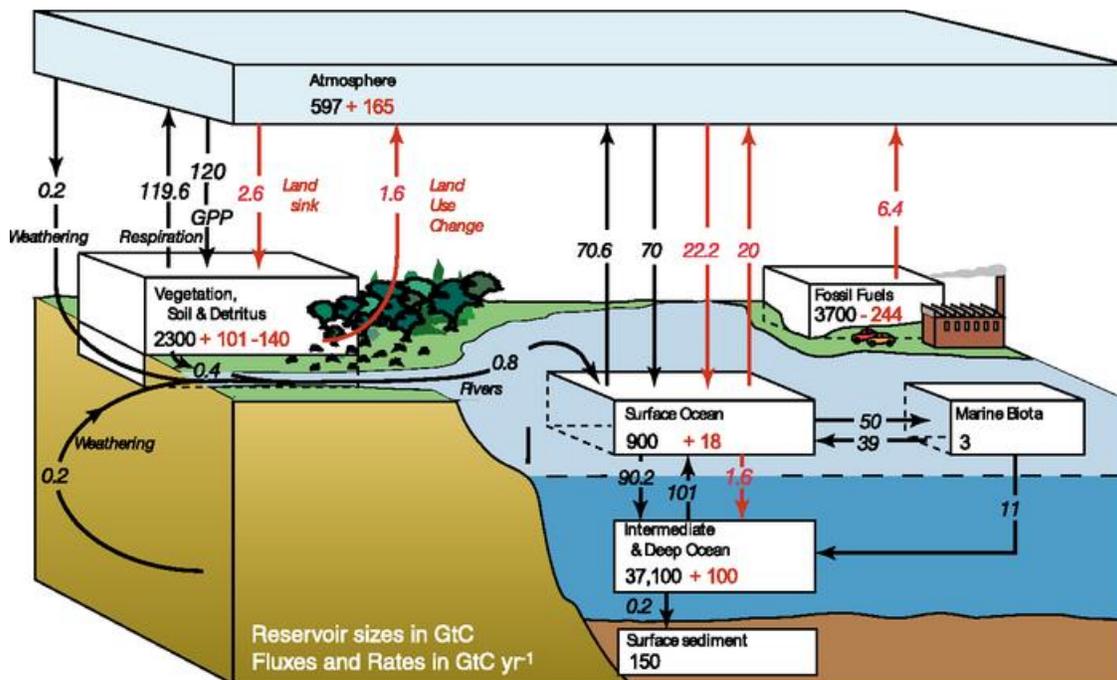


Figure 1.1. Cycle du carbone - Stocks et flux annuels (moyenne de 1990-2000) exprimés en gigatonnes de carbone (Gt C). En noir, les chiffres naturels, en rouge, les chiffres d'origine anthropique (IPCC Climate Change, 2007)

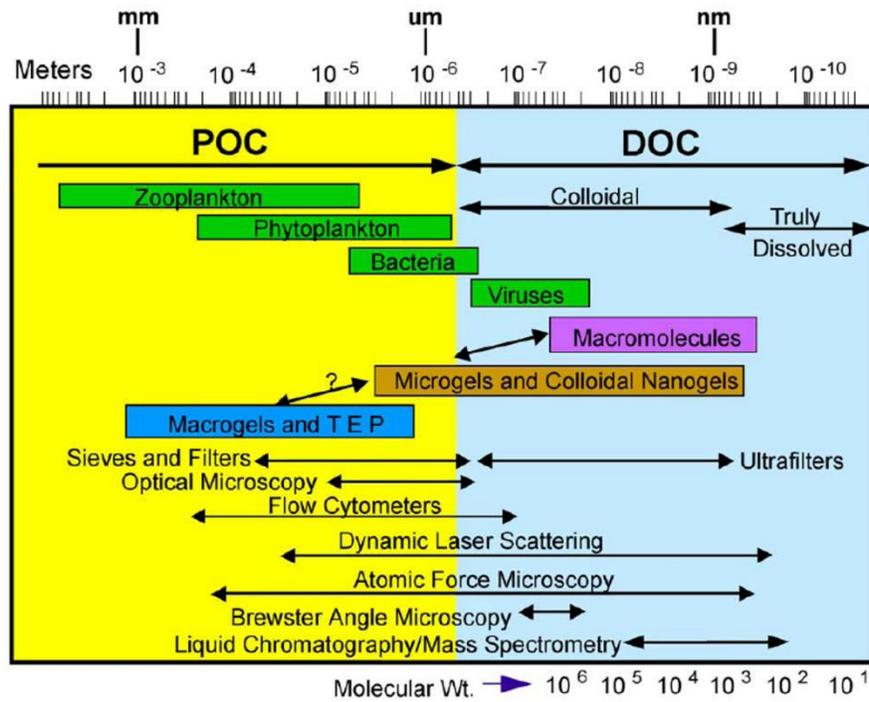


Figure 1.2. Taille du spectre continu du carbone organique avec la distinction entre la phase particulaire (POC > 0,2 µm) et la phase dissoute (DOC < 0,2 µm). (Verdugo et al. 2004)

1.3. Rôle des bactéries hétérotrophes au sein de la boucle microbienne

Le concept de boucle microbienne a été décrit pour la première fois par Azam et al. (1983). La boucle microbienne permet de relier les bactéries marines, consommatrices principales de la MOD à ses prédateurs (protistes bactériovores : flagellés hétérotrophes) (Sherr & Sherr 1994). Les bactéries hétérotrophes consomment la MOD produite par les organismes phytoplanctoniques (production primaire) et en la transformant soit en biomasse disponible pour les échelons trophiques supérieurs (protistes, zooplancton, macrozooplancton,...) soit en CO₂ (Fig. 1.3). 50 % de la production primaire « passe » par la boucle microbienne (Cole et al. 1988)

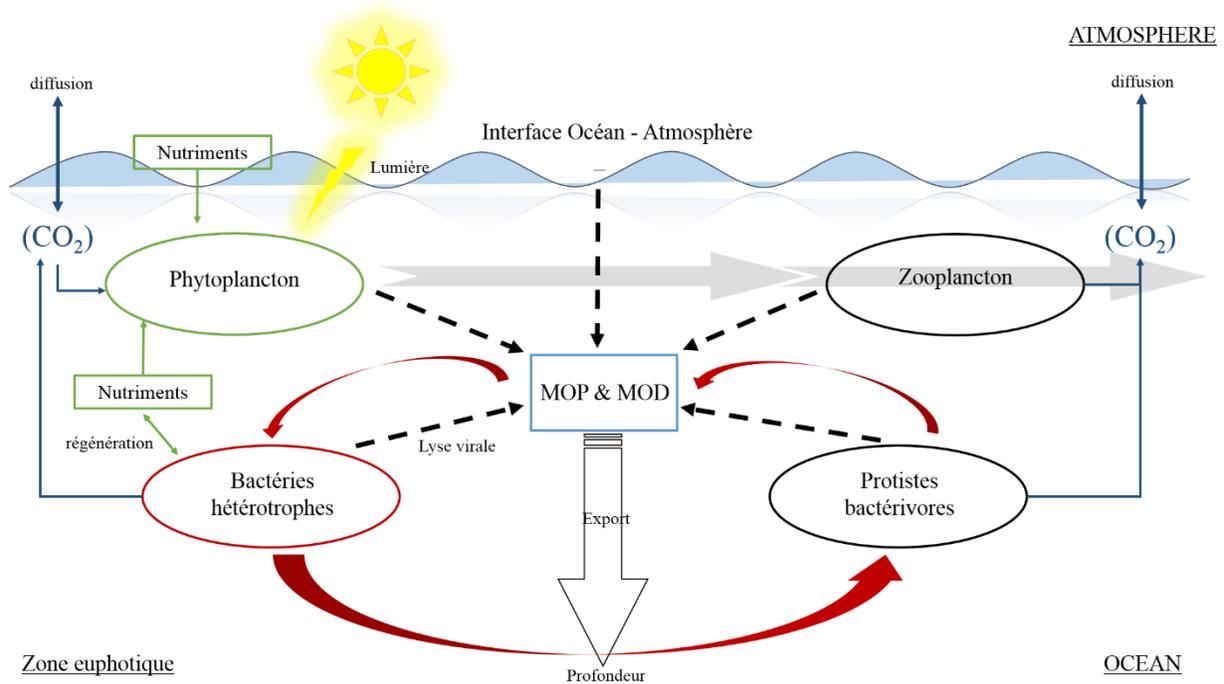


Figure 1.3. Représentation du cycle du carbone dans l'océan au niveau de la zone euphotique. Les flèches vertes correspondent aux transferts de nutriments inorganiques indispensables au commencement du cycle. Les flèches grises correspondent à la chaîne alimentaire traditionnelle allant des organismes phytoplanctoniques vers les échelons trophiques supérieurs. Les flèches noires en pointillées représentent les flux de MO. La flèche vide illustre l'export de MO en profondeur par les processus de sédimentation. Les flèches rouges correspondent à la boucle microbienne qui débute à partir de MO. Les flèches bleues servent à illustrer le CO_2 produit par chaque échelon trophique

1.4. La matière organique utilisable par les bactéries hétérotrophes

1.4.1. La biodisponibilité de la matière organique

Amon & Benner (1996) ont proposé un modèle de continuum entre la taille et la biodisponibilité de la MO (Fig. 1.4). D'après ce modèle, les composés de haut poids moléculaire (High Molecular Weight, HMW : 1kDa à 30 kDa) sont plus facilement consommables par les organismes que les composés de faible poids moléculaire (Low Molecular Weight, LMW : < 1kDa). Amon & Benner (1996) fondent leur hypothèse sur le fait que la MO fraîchement produite serait principalement constituée de particules HMW et que durant sa décomposition, ces particules deviendraient moins biodisponibles et de taille plus petite donnant ainsi des composés LMW faiblement réactifs.

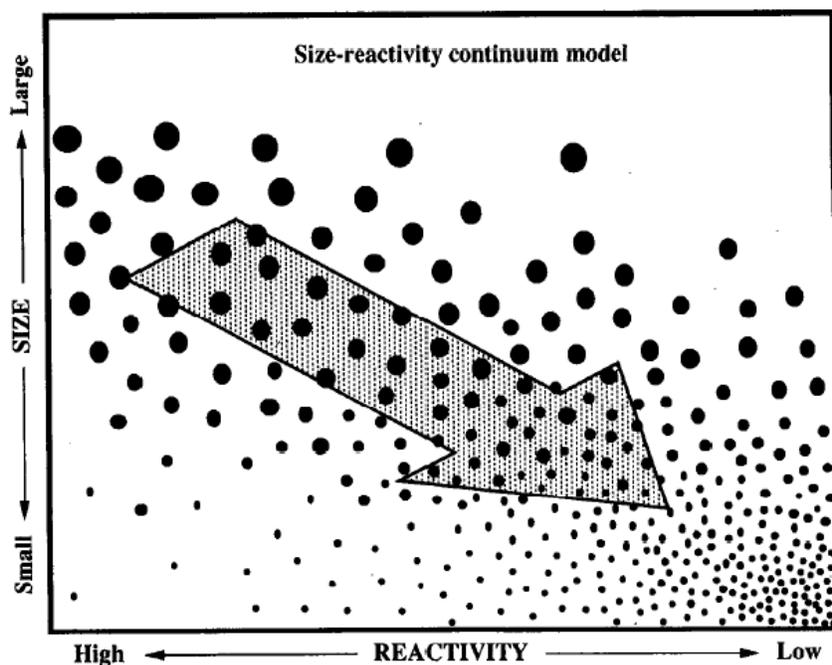


Figure 1.4. Modèle de continuum entre la taille et la biodisponibilité de la matière organique pour les environnements aquatiques. Les flèches montrent les voies majeures de dégradation à partir des particules organiques bioréactives et des macromolécules jusqu'aux composés de faible poids moléculaire (Low Molecular Weight, LMW) réfractaire. La taille des points représente la taille de la matière organique avec de grands points pour la MOP, les points de taille intermédiaire pour les molécules de haut poids moléculaire (High Molecular Weight, HMW) de la MOD et les petits points pour les molécules LMW de la MOD (d'après Amon & Benner 1996).

Ce concept de continuum de réactivité des particules est aujourd'hui communément admis et introduit la notion de labilité du COD (L-COD). Afin de déterminer la nature labile du COD, de nombreux auteurs réalisent des expériences de biodégradation avec des consortiums bactériens d'eau de mer : soit dilués dans l'eau de mer naturelle, soit dans l'eau de mer où sont ajoutées des molécules organiques modèles (glucose, fructose, pyruvate) ou des exsudats phytoplanctoniques. Les observations qui en découlent montrent que la croissance bactérienne semble limitée par le CO dans certaines régions océaniques (Carlson & Ducklow 1996, Carlson et al. 2002, Cherrier & Bauer 2004). La part de COD qui n'est pas utilisée sur l'échelle de temps de l'incubation (de 2 à 10 jours) est alors considérée réfractaire (R-COD).

1.4.2. Les différentes sources de matière organique consommables par les bactéries hétérotrophes

Une des principales sources de MO dans l'océan est d'origine phytoplanctonique (Nagata 2000). Ces organismes excrètent des exsudats qui représentent une source de MO consommable par les bactéries. Les exsudats sont principalement constitués de polysaccharides, d'acides aminés, de peptides, d'acides organiques et de lipides. Le pourcentage d'excrétion (par rapport à la production primaire totale : particulaire et dissoute) fluctue entre 2 % et 10 % dans des cultures

(Nagata 2000) et entre 0 % et 80 % dans le milieu naturel (Carlson 2002). Ces fluctuations peuvent dépendre des conditions nutritionnelles du milieu (Obernosterer & Herndl 1995) et de l'état de croissance des cellules phytoplanctoniques (Mykkestad 1995).

Une autre source de MO provient de l'action des brouteurs sur les cellules phytoplanctoniques. Ils peuvent être identifiés comme étant des protozoaires et des métazoaires capables, par l'action de broutage, de relâcher dans le milieu autant voire plus de MO que le phytoplancton (Nagata 2000). Ce relargage de MO se fait par 4 processus : l'excrétion, l'éjection du contenu des vacuoles digestives, le *sloppy feeding* (dommages collatéraux durant l'ingestion des proies) et la production de pelotes fécales, avec des taux très variables selon le processus (Nagata 2000).

Les virus peuvent lyser les cellules phytoplanctoniques et bactériennes et libérer dans le milieu toute la machinerie cellulaire (Suttle 1994). Les produits de lyse virale peuvent ainsi être consommés par les bactéries non infectées (Middelboe et al. 1996).

De par la prédation et la lyse virale, les bactéries participent également à la production de MOD. En effet, les composés des cellules bactériennes tels que le peptidoglycane des membranes ou les acides aminés peuvent se retrouver relâchés dans le milieu après la mort de l'organisme (Nagata & Kirchman 1999).

En plus des apports autochtones décrits ci-dessus, les sources de MO et de nutriments inorganiques peuvent également provenir des dépôts atmosphériques (précipitations, poussières sahariennes, ...), des apports latéraux liés aux mouvements de masses d'eaux (*upwelling*, *downwelling*, circulation générale) et des apports continentaux (rivières, lessivage des sols, rejets anthropiques, ...) ou du sédiment.

1.5. Processus métaboliques bactériens et rendement de croissance

1.5.1. Production de biomasse et respiration bactérienne

Les bactéries hétérotrophes sont considérées comme des consommatrices et des reminéralisatrices essentielles de la MOD dans l'océan (Pomeroy 1974). Azam et al. (1983) ont mis en évidence l'importance du rôle écologique des bactéries dans le milieu marin. Depuis, de nombreuses études essaient de comprendre comment les bactéries utilisent et transforment la MOD. Les conclusions de ces études montrent que les composés directement assimilables (~600 Da) de la MOD (Ghuysen & Hakenbeck 1994) ainsi que ceux issus de l'action hydrolytique d'enzymes vont pouvoir traverser la membrane des cellules bactériennes. Les bactéries pourront

utiliser cette matière labile pour croître et produire de la biomasse qui sera disponible pour les échelons trophiques supérieurs. En parallèle, la respiration bactérienne reminéralise la MO sous forme de CO₂. La production de biomasse et la reminéralisation vont alors caractériser deux processus essentiels du flux de matière à travers les bactéries hétérotrophes : la production bactérienne (PB) et la respiration bactérienne (RB) (Fig 1.5).

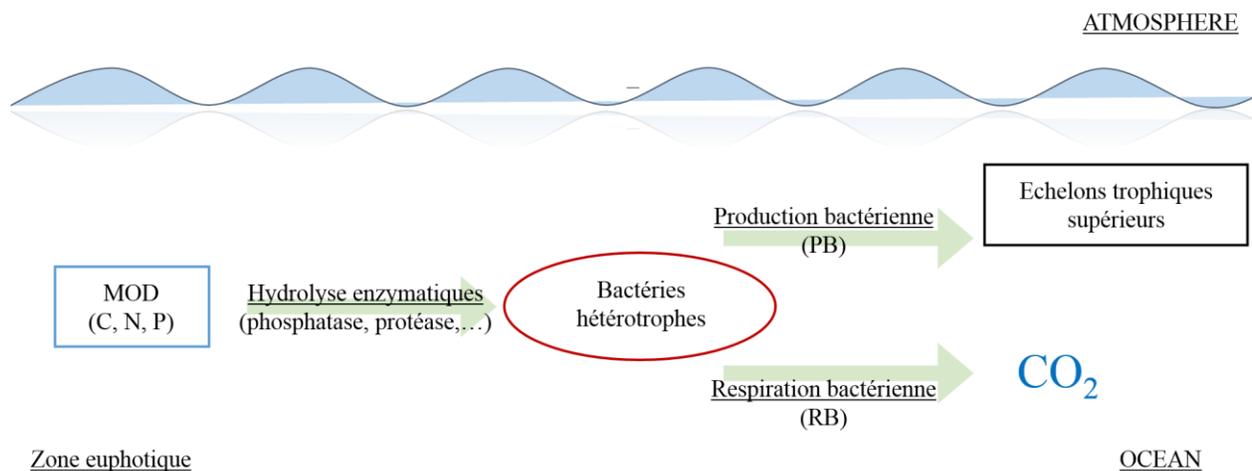


Figure 1.5. Schéma conceptuel simplifié du transfert de la matière organique dissoute (flux C, N et P) à travers les bactéries marines hétérotrophes.

1.5.1.1. La production bactérienne

La production bactérienne (PB) correspond à la production secondaire, *i.e.* la synthèse de nouvelle biomasse bactérienne à partir de la MOD et des nutriments inorganiques générés principalement lors de la production primaire (PP) (Ducklow 2000). PB peut s'exprimer comme la vitesse de synthèse de biomasse bactérienne (BB) :

$$PB = \mu \times BB$$

Avec μ le taux de croissance spécifique de la population bactérienne exprimé par unité de temps (t^{-1}) et BB en $\mu\text{g C dm}^{-3}$. Selon le milieu considéré et le facteur de conversion (FC) cellule-carbone utilisé ($FC_{\text{cell-C}}$ en fg C cell^{-1}), la BB peut varier entre $5 \mu\text{g C dm}^{-3}$ pour l'océan ouvert (avec un $FC_{\text{cell-C}}$ de $10 \text{ fg C cell}^{-1}$) (Caron et al. 1994, Christian & Karl 1994) et 50 à $150 \mu\text{g C dm}^{-3}$ pour un estuaire (avec des $FC_{\text{cell-C}}$ respectifs de 10 et $30 \text{ fg C cell}^{-1}$) (Fukuda et al. 1998).

1.5.1.2. La respiration bactérienne

La respiration bactérienne (RB) permet la reminéralisation de la MO en CO₂ dans le milieu marin. Ce second processus de transformation de la MO, donne accès avec la PB au rendement de

croissance (*Bacterial Growth efficiency* : BGE). Bien qu'indispensable pour l'estimation du BGE (del Giorgio & Cole 1998), les mesures de PB sont rarement accompagnées de mesures de RB (Jahnke & Craven 1995). La RB peut varier aussi bien entre 0,02 et 0,80 $\mu\text{mol O}_2 \text{ dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ en Atlantique Nord (Pomeroy et al. 1994) qu'entre 0,60 et 2,50 $\mu\text{mol O}_2 \text{ dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ dans une lagune de Nouvelle Calédonie (Briand et al. 2004). La RB peut même atteindre des valeurs élevées en rivière atteignant jusqu'à 15,6 $\mu\text{mol O}_2 \text{ dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (Warkentin et al. 2007). Toutefois, les méthodes classiques (pré-incubation, filtration pour séparer les bactéries du reste du phytoplancton et incubation de 24h) de mesures de RB sont difficiles à réaliser (Gasol et al. 2008) et elles ne permettent pas de discerner précisément la RB de la respiration communautaire (RC) entraînant souvent une surestimation des valeurs de RB. En effet, selon l'environnement, le pourcentage de contribution des bactéries à la RC peut varier entre 82 % et 90 % dans les milieux oligotrophes et de 9 % à 30 % dans les systèmes plus productifs (Biddanda et al. 2001). Les procédures de pré-filtration ont le désavantage de perturber les communautés planctoniques comme la disponibilité de la MO (Gasol & Moran 1999) ce qui entraînera forcément des estimations erronées de la RB dans les échantillons préfiltrés (Teira et al. 2010) et particulièrement dans les eaux oligotrophes où les stocks de MOD sont réduits.

1.5.2. Rendement de croissance bactérien (BGE)

1.5.2.1. *Les voies métaboliques : catabolisme versus anabolisme*

Chez les bactéries hétérotrophes, la distribution des flux de carbone entre les processus anaboliques et cataboliques conditionne le BGE. Un substrat organique est utilisé par la cellule pour, d'une part, réaliser des réactions cataboliques générant de l'ATP et, d'autre part, effectuer des réactions anaboliques pour synthétiser de la biomasse. La figure 1.6 détaille ces deux voies et met l'accent sur les nombreux processus qui déterminent le BGE.

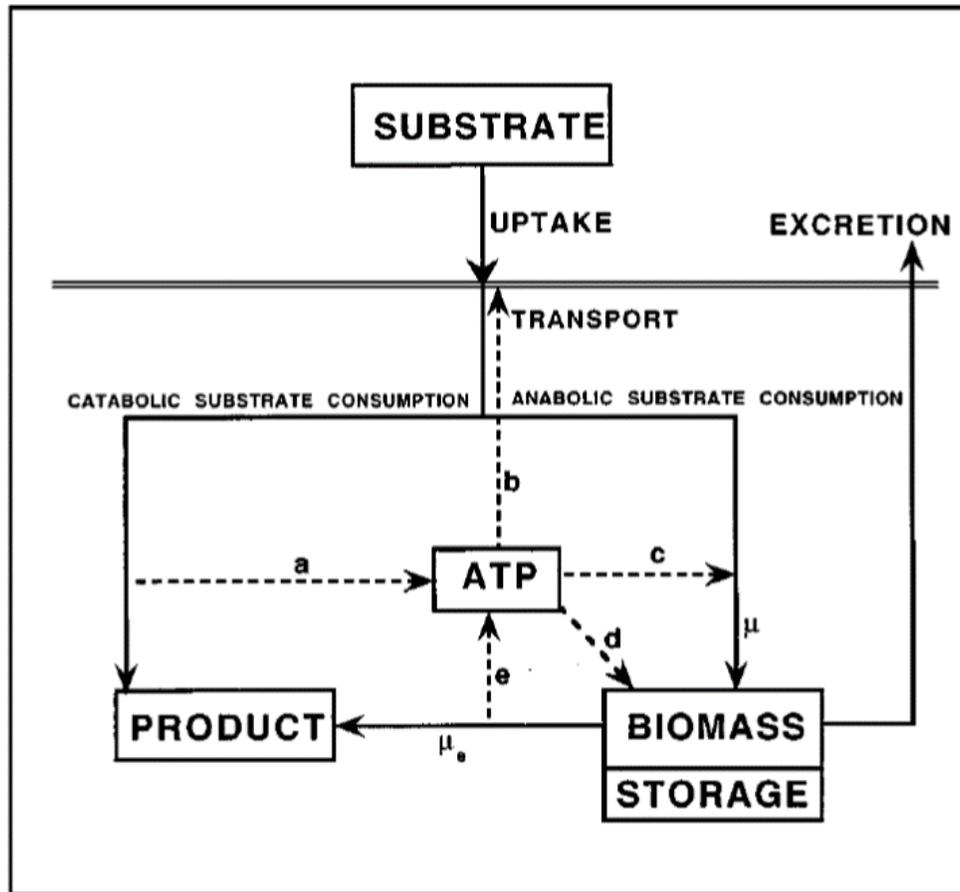


Figure 1.6. Représentation simplifiée des voies cataboliques et anaboliques qui influencent le BGE des bactéries hétérotrophes. L'oxydation des composés organiques contribue au pool d'énergie d'ATP avec un taux (a). En même temps, le transport actif du substrat à l'intérieur de la cellule nécessite de l'énergie à partir de l'ATP avec un taux (b). Les réactions anaboliques utilisent l'ATP avec un taux (c) et génèrent un taux de croissance (μ). La voie anabolique ne produit pas seulement une augmentation de biomasse mais également un stockage de produits et de composés organiques qui peuvent être excrétés dans le milieu. La maintenance consomme de l'ATP avec un taux (d). En l'absence de substrat exogène, une énergie de maintenance minimum doit être soutenue par la dégradation de biomasse à partir d'un métabolisme endogène (μ_e) qui assure une production d'ATP avec un taux (e). Le métabolisme endogène se définit ici comme l'état où aucune croissance n'est possible et donc par définition le BGE serait de 0 sous de telles conditions (d'après del Giorgio & Cole 1998).

Les résultats des études expérimentales suggèrent que lorsque la croissance n'est pas contrainte comme dans les cultures en batch, il y a souvent un fort couplage entre le catabolisme et l'anabolisme favorisant ainsi une augmentation du BGE. En revanche, lorsque la croissance est contrainte par la quantité de substrat organique ou inorganique comme dans la plupart des études en chémostat et certainement dans l'environnement naturel, il y a différents degrés de découplage entre ces deux voies métaboliques qui vont diminuer le BGE (Kirchman 2000). Ce découplage s'observe par des taux élevés de consommation d' O_2 et de MO, une surproduction de métabolites et d'excrétion ou un excès de production de chaleur (synthèse de Russell & Cook (1995). Ainsi, de faibles BGE sont généralement trouvés à des faibles taux de croissance, quand la croissance est limitée par certains composés de la MO ou d'autres sources d'énergies.

1.5.2.2. Les calculs de BGE

Le rendement de croissance bactérien ou *Bacterial Growth Efficiency* (BGE) se caractérise par la quantité de nouvelle biomasse bactérienne produite par unité de C organique consommé et permet de faire le lien entre la PB et la RB selon l'équation suivante :

$$BGE = \frac{PB}{DCB} \text{ où } DCB = PB + RB$$

Avec DCB, PB et RB exprimées en flux de carbone ($\mu\text{mol C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ou $\mu\text{g C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$). Toutes ces mesures réalisées dans de l'eau de mer naturelle sont généralement indirectes et basées sur la mesure d'un FC leucine-carbone ($\text{FC}_{\text{leu-C}}$) ou thymidine-carbone pour la PB et sur la conversion de l' O_2 consommé en CO_2 produit pour la RB. Cette conversion se fait par l'intermédiaire du quotient respiratoire (RQ) considéré comme constant et fixé en général à 0,8 (del Giorgio & Williams 2005). Bien que le BGE ait été largement étudié à travers des environnements différents, sa régulation semble confuse (del Giorgio & Cole 1998). En effet, le BGE apparaît varier en fonction de la PB et la richesse trophique de l'écosystème avec des valeurs proches de 0,01 dans des milieux oligotrophes jusqu'à des valeurs plateaux de 0,5 dans des milieux plus eutrophes. Les bactéries semblent maximiser l'utilisation de C plutôt que leur BGE ce qui se traduit par un coût d'énergie de maintenance plus élevé dans les systèmes oligotrophes (del Giorgio & Cole 1998). Enfin, en plus du poids moléculaire (Amon & Benner 1996), de la nature chimique du COD (Carlson & Ducklow 1996, Cherrier & Bauer 2004) et de son rapport C/N (Goldman et al. 1987), d'autres facteurs soupçonnés de contrôler le BGE ont également été étudiés tel que la température (Rivkin & Legendre 2001) ou la lumière (Kragh et al. 2008) par exemple. Tous ces facteurs variant dans le temps et l'espace, la variabilité du BGE dans l'environnement est importante (Reinthalder & Herndl 2005).

1.5.3. Processus d'hydrolyse enzymatique de la matière organique

Dans le milieu naturel, la MOD utilisable par les bactéries marines est dominée par des molécules HMW qui ne sont pas directement assimilables à travers la paroi cellulaire des bactéries. La membrane externe des bactéries Gram négatives (dominantes dans les couches de surface) permet le transport des molécules de moins de 600 Da (Nikaido & Vaara 1985), ce qui suppose que certains composés du réservoir de MOD peuvent directement être assimilés. Pour les autres, cela nécessitera une étape d'hydrolyse enzymatique (Middelboe & Søndergaard 1993, Cunha et al. 2010). Cette étape enzymatique va consister à dégrader des polymères comme les polysaccharides

pour en faire des monomères afin qu'ils puissent traverser la membrane bactérienne (Hoppe et al. 1988).

Les enzymes sollicitées pour les hydrolyses sont dites des ectoenzymes et peuvent être associées à la surface des cellules bactériennes (enzymes attachées) ou bien libérées dans le milieu (enzymes libres) suite à la lyse des cellules par l'activité des virus ou par l'activité de broutage (Reichardt et al. 1967, Chróst 1991). Toutefois, la production d'enzymes libres ne semble pas être bénéfique pour les bactéries car 1) une fois libérées, ces enzymes sont susceptibles d'être dégradées par des facteurs physiques (température, pH, UV-B..) et chimiques. Ou bien, elles peuvent être à leur tour hydrolysées par des protéases (Chróst 1991) ; et 2) ces enzymes peuvent être transportées loin de leur producteur qui ne pourrait alors plus bénéficier des produits de l'hydrolyse (Chróst 1991). Deux courants de pensées s'opposent quant à l'origine des enzymes libres. D'un côté, elles pourraient être le fruit d'un phénomène passif suite à la lyse des cellules par prédation (broutage), à une infection virale ou à une manipulation en laboratoire (Azam & Ammerman 1984, Chrost 1990, Bochdansky et al. 1995). De l'autre, les enzymes libres pourraient provenir d'un processus actif des bactéries attachées à la MOP qui opteraient pour une « hyperproduction » d'enzymes libres afin de solubiliser rapidement les particules en polymères et de favoriser leur absorption (Simon et al. 1990, Hoppe 1991, Karner & Herndl 1992, Smith et al. 1992). Toutefois, d'après ces auteurs, ces bactéries attachées à la MOP présenteraient un taux élevé d'hydrolyse avec un taux faible d'absorption de MOD. D'après une étude en minicosme réalisée par Unanue et al. (1998), il semblerait que ce ne soit pas une activité hydrolytique élevée qui soit à l'origine de ce découplage mais un plus faible taux d'absorption comparé aux bactéries libres. Enfin, il a été montré que cette stratégie d'enzymes a ses limites. En effet, la production d'enzymes libres représente un bénéfice pour les bactéries si la distance avec les substrats à hydrolyser est inférieure ou égale à 10 µm (Vetter et al. 1998).

Lorsque la synthèse des enzymes est induite, les activités enzymatiques peuvent rapidement être inhibées par une variété de composés présents dans les milieux aquatiques (Chróst 1991). Les bactéries possèdent différentes enzymes capables de dégrader la MO (Hoppe 1983, Christian & Karl 1995) à une vitesse définie selon l'équation de Michaelis-Menten :

$$V = \frac{(V_{max} \times S)}{(K_s + S)}$$

Avec, V la vitesse d'absorption exprimée en $\text{nmol dm}^{-3} \text{h}^{-1}$, S la concentration en nutriment, V_{max} la vitesse d'absorption maximum et K_s la constante de demi-saturation.

1.5.3.1. *La phosphatase alcaline*

La phosphatase alcaline est une enzyme ubiquiste qui a été largement étudiée. Identifiée comme dimère, de poids moléculaire d'environ 160 kDa, chacune de ses sous unités contient un atome de zinc indispensable à son intégralité structurale et un autre atome de zinc intervenant dans le processus catalytique (Chróst 1991). La phosphatase alcaline est hautement spécifique des liaisons phospho-monoesters (P-O-C) mais elle n'est pas spécifique de la partie organique (Hoppe 2003). Elle joue un rôle important dans l'utilisation du P par les microorganismes aquatiques (Jansson et al. 1988, Hoppe 2003). La production de phosphatase alcaline est réprimée par de fortes concentrations extra- ou intracellulaire en P (Cembella et al. 1984) et sa présence/absence est régulée par le pH du milieu. Son pH optimal est de 8,5-9,5, c'est-à-dire proche de celui de l'eau de mer (~8,2). Elle est impliquée dans le recyclage du P organique et elle permet aux organismes de lutter contre la limitation en P. Les études s'intéressant à l'activité phosphatase ont fait l'objet de travaux plus nombreux sur les environnements d'eau douce que sur les environnements marins. Cette différence peut s'expliquer par le fait que P est souvent le facteur limitant en eau douce alors que dans le milieu marin la limitation nutritionnelle est généralement attribuée au N (Tyrrell 1999). Toutefois, P peut devenir également limitant dans le milieu marin (cf. paragraphe 2.1.2.2). De plus, cette enzyme peut être synthétisée aussi bien par les bactéries que par le phytoplancton (Hoppe 2003). L'importance relative des bactéries hétérotrophes et du phytoplancton à la production de cette enzyme est aussi variable que les facteurs déclencheurs. Par exemple, dans des cultures axéniques de dinoflagellés, l'activité phosphatase est régulée par la concentration en phosphate inorganique dissous (Dyhrman & Palenik 1999). La demande en P des organismes, le rapport N/P intracellulaire ou encore les ultraviolets B pourraient également influencer cette activité (Paasche & Erga 1988, Huang & Hong 1999, Garde & Gustavson 1999, Hoppe 2003). D'autre part, chez les bactéries, la composition et la disponibilité du substrat (Thingstad & Rassoulzadegan 1995) et les besoins en C et N (Benitez-Nelson & Buesseler 1999, Hoppe 2003) semblent aussi avoir leur importance dans l'expression de l'activité phosphatase. De manière générale, la phosphatase alcaline serait induite par les bactéries hétérotrophes pour hydrolyser les liaisons phospho-monoesters des molécules afin d'accéder au C, N ou au P ou les trois à la fois (Thingstad & Rassoulzadegan 1995, Van Wambeke et al. 2002, Hoppe 2003). Cette activité semble donc posséder de multiples fonctions écologiques. Malgré tout, elle est principalement utilisée en tant qu'indicateur moléculaire de limitation en P dans les études *in situ* ou dans les études en laboratoire (Thingstad et al. 1998, Zohary & Robarts 1998, Van Wambeke et al. 2002, 2008, Hoppe 2003, Pinhassi et al. 2006).

1.5.3.2. L'ectoaminopeptidase (protéase)

La protéase (ou peptidase) est également une enzyme ubiquiste que l'on retrouve dans tous les milieux et chez tous les êtres vivants. C'est une aminopeptidase dont l'action hydrolytique cible les liaisons peptidiques (-CO-NH-) des protéines en coupant entre le premier acide aminé et le second acide aminé de la chaîne, libérant ainsi l'acide aminé N-terminal. Identifiée comme monomère, son poids moléculaire peut atteindre jusqu'à 50 kDa. La production de protéase permet l'assimilation des monomères qui résultent de l'hydrolyse. Sa synthèse est favorisée en dessous d'un seuil critique de concentration de composés directement utilisables tels que les composés monomériques (Chrost 1989, Mayer 1989). Autrement dit, l'activité protéase est limitée par la qualité du substrat fondée d'une part sur la concentration de composés monomériques, et d'autre part sur la présence de composés polymériques en C et N. Une étude, menée sur la zone Arctique, suggère que les bactéries issues de milieux à faibles apports nutritifs maximisent la synthèse des peptidases afin d'obtenir tous les composés azotés disponibles (Vetter Y & Deming 1994). Cette étude apporte un argument supplémentaire à l'hypothèse que l'expression de la protéase dépendrait d'un équilibre entre les composés directement utilisables et les polymères nécessitant une étape d'hydrolyse au sein de la MOD. Dans le milieu marin, parce qu'une petite fraction de l'activité peptidase (< 10%) a été trouvée sous forme libre (Kamer & Rassoulzadegan 1995), il est généralement admis que les activités ectoenzymatiques, telles que la protéase, sont liées aux cellules des microorganismes (enzyme attachée) et principalement induites par les bactéries hétérotrophes (Hoppe 1983, Rosso & Azam 1987, Chróst 1989, 1991).

2 Les facteurs de contrôle des processus bactériens

2.1. Les ressources nutritives

L'océan ouvert est un environnement extrêmement dilué. L'accès aux ressources représente un challenge pour les microorganismes marins. Les observations issues de travaux expérimentaux suggèrent que les bactéries ont des activités cataboliques très flexibles qui seraient la clé pour survivre et croître dans un environnement aussi oligotrophe et variable que peut l'être l'océan mondial (Kovárová-Kovar & Egli 1998). En effet, de par leur capacité à modifier leur physiologie afin d'utiliser une large variété de substrats différents, les bactéries libres sont capables de survivre dans des milieux extrêmes et dans des conditions de limitation en nutriments (Morita 1997).

2.1.1. La limitation par les composés organiques

A partir d'une étude portant sur l'analyse croisée de nombreux systèmes aquatiques d'eau douce et d'eau salée, Cole et al. (1988) montrent une corrélation significative entre PB et la production primaire (PP) ($r^2 = 0.59$, $n = 54$, $p < 0.0001$). Dans l'océan Pacifique équatorial, cette corrélation signifierait que la PP gouverne, directement ou indirectement, la quantité globale de MOD disponible pour les bactéries qui à son tour déterminerait la PB (Kirchman & Rich 1997). Les expériences d'enrichissement permettent de déterminer les facteurs limitant la PB. Dans les expériences d'enrichissement, des composés organiques sont ajoutés à des échantillons d'eau de mer et la PB est mesurée après plusieurs heures d'incubation. La limitation est observée quand la PB mesurée dans l'échantillon enrichi est significativement supérieure à la PB dans l'échantillon de contrôle non-enrichi. De nombreux auteurs utilisent ce type d'expériences pour caractériser le ou les composés limitants de la MO d'un environnement donné (Kirchman et al. 1995, Pomeroy et al. 1995, Kirchman & Rich 1997, Pinhassi et al. 2006, Van Wambeke et al. 2009).

Ce n'est pas toujours la source de carbone organique qui est limitante pour les bactéries hétérotrophes. En effet, de faibles PB peuvent être rencontrées alors que la concentration en CO labile dans le milieu est élevée. Ce paradoxe peut se rencontrer généralement en situation estivale après le bloom, en conditions de stratification intense, ce qui entraîne l'épuisement des nutriments inorganiques dans la couche de surface. Les sources en N ou P ne se trouvent plus à des concentrations suffisamment importantes dans la MO ce qui contraint les bactéries à utiliser les sels nutritifs et à se retrouver en compétition avec le phytoplancton pour l'assimilation de ces composés (Currie & Kalf 1984, Wheeler & Kirchman 1986, Price et al. 1991, Kirchman 1994).

2.1.2. La limitation par les nutriments

2.1.2.1. *Caractérisation des nutriments inorganiques*

Les nutriments inorganiques tels que l'azote (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^-), le phosphore (H_3PO_4^-) ou encore le fer (Fe_3^+), sont des composés utilisables par les bactéries. Au nord-ouest de la mer Méditerranée, la concentration des nutriments inorganiques est de l'ordre du nanomolaire pour le phosphate et le fer et du micromolaire pour les nitrates (Guieu et al. 1996, Diaz et al. 2001, Célia et al. 2014). En milieu oligotrophe, ces composés varient de manière saisonnière à cause de leur consommation par les microorganismes (Kirchman 1994) d'une part, et des processus de mélange de la colonne d'eau d'autre part (Cullen 1991). A certaines périodes, les concentrations naturelles

de ces composés peuvent varier du micro- au nano- approchant les limites de détection (Céa et al. 2014) et devenant alors des sources de limitation pour la croissance des bactéries marines.

2.1.2.2. *La limitation par l'azote (N), le phosphore (P) ou le carbone organique labile*

La limitation potentielle des bactéries hétérotrophes est généralement testée par des expériences d'enrichissement en phosphate (P), nitrate – ammonium (N) et glucose (C) ajoutés seuls et/ou en combinaisons. Selon la situation géographique, les éléments limitants ne sont pas les mêmes. Par exemple, les lagons de Polynésie française sont principalement limités en N et des phénomènes de co-limitation NC et NP peuvent apparaître et limiter la croissance bactérienne (Torréton et al. 2000). En mer des Sargasses et en fonction de la période de l'année, C peut être le premier facteur limitant (Carlson & Ducklow 1996). Les bactéries régulent le catabolisme de la MO de façon à atteindre une stœchiométrie intracellulaire stable (del Giorgio & Cole 1998). De ce fait, le rendement de croissance est négativement relié au rapport C/N et C/P de la MO (Goldman et al. 1987, Kroer 1993, Vallino et al. 1996).

Selon les résultats obtenus à partir d'expériences d'enrichissement réalisées principalement pendant la période estivale (Juin, juillet et Août), P apparaît être le principal élément limitant en mer des Sargasses et en mer Méditerranée (Thingstad & Rassoulzadegan 1995, Cotner et al. 1997, Thingstad et al. 1998, Torréton et al. 2000, Van Wambeke et al. 2002, 2008, Obernosterer et al. 2003). Toutefois, alors que les biogéochimistes marins sont en faveur d'une limitation par le P pour la production primaire (Smith 1984), les biologistes marins penchent plus pour une limitation par le N. Aussi, d'après la synthèse bibliographique de Smith (1984), ce seraient les taux relatifs aux échanges des masses d'eaux et les processus biochimiques internes des organismes qui agiraient de concert afin d'ajuster la disponibilité du rapport N/P dans les écosystèmes marins.

Néanmoins, la croissance bactérienne semble plus souvent limitée par le CO que par P ou N et ce probablement parce que le CO sert à la fois à la synthèse de biomasse et à la RB alors que P et N ne servent qu'à la synthèse de la biomasse (Kirchman 2012). Les petites cellules telles que les bactéries hétérotrophes ont un rapport surface/volume élevé qui leur confère un avantage compétitif pour le N, le P et d'autres composés dissous. Cet avantage compétitif va favoriser l'absorption des nutriments inorganiques par les bactéries hétérotrophes au détriment de la croissance des organismes autotrophes. Cela diminuera la production de composés organiques ce qui par conséquent limitera la croissance des bactéries hétérotrophes par le CO (Kirchman 2012). Enfin, la limitation par le P semble plus commune chez les bactéries que la limitation par le N. Cette observation s'explique par le fait que dans les cellules bactériennes, N se présente

principalement sous forme de protéines qui ne sont généralement pas dégradées mais synthétisées séparément de la croissance bactérienne (faible « *Turn Over* »). Alors que le P bactérien se retrouve principalement sous forme d'acides nucléiques, de lipides et de nucléotides (par exemple : ARNm et ATP, taux de renouvellement de la molécule) qui se renouvellent rapidement (fort « *Turn Over* ») (Kirchman 2012).

2.1.2.3. *La limitation par les autres macro-nutriments*

Les éléments traces tels que le fer (Fe) ou le zinc (Zn) semblent également jouer un rôle important dans le contrôle des bactéries marines (Cullen 1991, Bruland & Lohan 2003, Church 2008). En effet, le Fe est impliqué dans divers processus biologiques comme la photosynthèse et la fixation du N₂ (Rueler & Ades. 1987), la respiration ou encore la régulation de l'expression des génomes, la biosynthèse et la réparation de l'ADN (McHugh et al. 2003, Lukianova & David 2005, Thompson et al. 2011). Cela fait de cet élément une base essentielle pour la croissance cellulaire. Pratiquement un tiers des enzymes connues sont dépendantes d'ions métalliques comme le Fe.

2.1.3. La stœchiométrie C/N/P

Les recherches d'Alfred Redfield montrent que le rapport stœchiométrique C/N/P moyen trouvé dans le phytoplancton et dans la profondeur des océans est stable et égal à un rapport par atome de 106/16/1. Depuis cette découverte en 1934, ce rapport est devenu une référence pour les études des flux biogéochimiques de ces éléments dans le milieu marin en lien avec le phytoplancton mais aussi avec les bactéries hétérotrophes. Ainsi, souvent à partir d'expériences en culture, de nombreux auteurs se sont intéressés à relier la variabilité de divers processus bactériens hétérotrophes (PB, RB) et du BGE avec le rapport C/N/P des ressources nutritives. Par exemple, à partir de cultures bactériennes en mode batch enrichies avec une source unique de C et de N, il est montré que BGE diminue avec l'augmentation du rapport C/N du substrat fourni (Billen 1984, Goldman et al. 1987, Billen et al. 1990). Toutefois, si les bactéries ont accès à des sources multiples de C et de N, la relation entre le BGE et le rapport C/N devient plus faible (Goldman & Dennett 1991). Plus tard, Goldman & Dennett (2000) manipulent des cultures bactériennes (mode batch et culture continue) où le rapport C/N varie d'une limitation en C (5/1) à une limitation en N (30/1) grâce à des combinaisons variables d'ajouts en glucose, en glutamate et en NH₄⁺. Ils trouvent que le BGE n'est plus influencé par le rapport C/N et les différentes combinaisons de substrats. Toutefois, les auteurs mentionnent l'incertitude élevée liée à la détermination du BGE (50 % ± 20)

suggérant la difficulté d'estimer ce paramètre que ce soit dans les études en laboratoire ou sur le terrain. Par contre, une étude réalisée *in situ* durant la période estivale sur des lacs du Minnesota, montre que le BGE varie négativement avec le rapport C/N/P de la MO (Biddanda et al. 2001). Au vu des résultats de la littérature, il faut modérer l'hypothèse définie dans la synthèse de del Giorgio & Cole (1998) d'une augmentation du BGE le long d'un gradient de productivité dans les systèmes aquatiques. En réalité, cette hypothèse suggère intrinsèquement que c'est la combinaison entre la qualité de la matière organique, la disponibilité des nutriments et la demande énergétique des microorganismes propre à chaque système qui régularaient le BGE.

2.2. La température

2.2.1. Le concept d'énergie d'activation

Le concept d'énergie d'activation fut pour la première fois introduit dans le domaine de la chimie en 1889 par le scientifique Suédois Svante Arrhenius. L'énergie d'activation se définit comme l'énergie minimum requise pour amorcer une réaction chimique. Elle est usuellement notée E_a et s'exprime en Kj mol^{-1} . Les vitesses de toutes les réactions chimiques augmentent avec la température et l'équation d'Arrhenius permet de définir une base quantitative de la relation entre E_a et le taux d'une réaction selon l'égalité suivante :

$$k = A \times e^{\frac{-E_a}{RT}}$$

Où k est le taux de la réaction exprimé par unité de temps (t^{-1}), A est la constante pré-exponentielle caractéristique du composé qui réagit, R est la constante universelle des gaz parfaits équivalant à $8,29 \text{ kj mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ et T la température en Kelvin (K). E_a peut donc être déterminée à partir du taux de réaction (k) à des températures où l'équation d'Arrhenius est valide, *i.e* : seulement dans une partie de la gamme de température (Fig. 1.7).

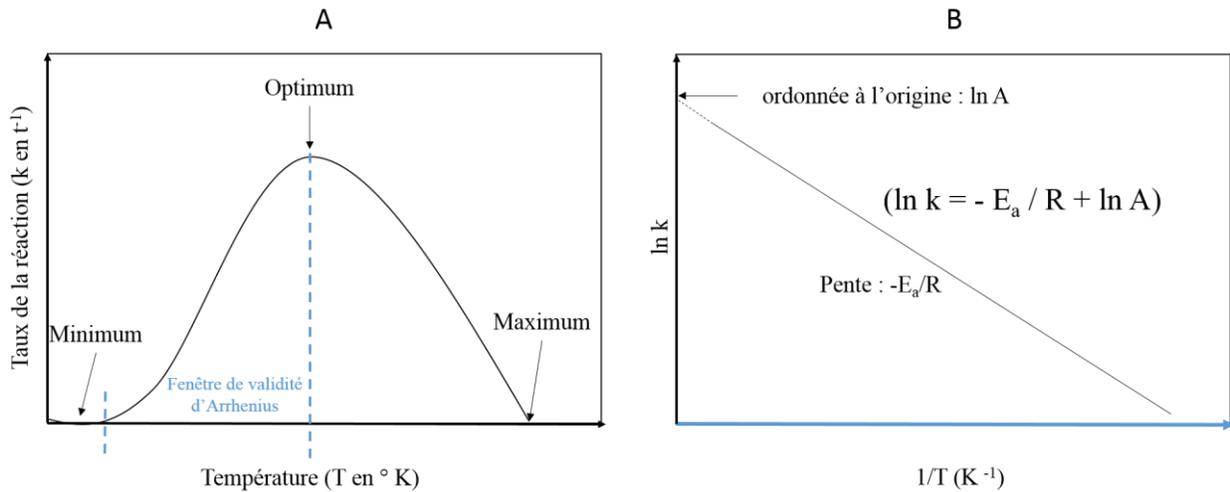


Figure 1.7. A : Allure générale du taux d'une réaction (k) en fonction de la température (T) en Kelvin (A). B : Graphique d'Arrhenius obtenu à partir d'une transformation log des valeurs (k et T) de la phase exponentielle où l'équation d'Arrhenius est valide

Ainsi, l'équation d'Arrhenius prédit que le taux de la réaction diminue exponentiellement avec l'inverse de la température. Or, de tous les paramètres environnementaux, la température est celui qui a le plus un impact sur les activités bactériennes parce que 1) elle influence directement les réactions enzymatiques générées par tous les microorganismes dont les bactéries et 2) elle est à l'origine de modifications de l'environnement aquatique telle que la stratification des masses d'eau (Kirchman 2012).

2.2.2. Le concept du Q_{10}

Un indice communément utilisé par les écologistes et biologistes pour exprimer la relation entre le taux d'une réaction et la température est le Q_{10} . Le Q_{10} est le facteur d'augmentation d'un taux d'une réaction quand la température augmente de 10 °C. Expérimentalement, le Q_{10} se mesure souvent à des intervalles de température autres que 10 °C et, dans ce cas, il peut être calculé de la manière suivante :

$$Q_{10} = \left(\frac{r_2}{r_1}\right)^{\left(\frac{10}{T_2-T_1}\right)}$$

Où r_1 et r_2 sont les taux mesurés aux températures T_1 et T_2 , dans la fenêtre de validité de l'équation d'Arrhenius. Toutefois, cette manière de calculer le Q_{10} comporte un biais car le Q_{10} varie légèrement dans la phase d'Arrhenius car il dépend du choix des températures cardinales (T_1 et T_2) choisies. De plus, il faut vérifier que nous nous trouvons bien dans la phase d'Arrhenius pour calculer le Q_{10} . Des auteurs ont réalisé des études sur l'effet de la température sur des activités

bactériennes et calculé des Q_{10} différents selon la gamme de température qu'ils avaient choisi pour les calculer (Pomeroy et al. 1991, Felip et al. 1996, Apple et al. 2006, Sand-Jensen et al. 2007). Aussi, dans cette thèse, les Q_{10} que nous calculons font appel au coefficient de pente estimé à partir du graphique d'Arrhenius (Fig. 1.7 B), établi à partir des expériences de cinétique température (Chapitre 4) et de la température *in situ* de l'eau de mer utilisée lors de la réalisation de chacune des cinétiques. La détermination du Q_{10} se fait alors selon la relation suivante :

$$Q_{10} = e^{\frac{(pente \times (-10))}{(273,15 + \text{température in situ})^2}}$$

Il est communément admis que les réactions biologiques présentent un Q_{10} moyen d'environ 2. Le Q_{10} permet donc d'appréhender l'effet quantitatif de la température sur un processus physiologique ciblé (telle qu'une réaction enzymatique en solution). Les écologistes utilisent fréquemment cette notion pour des communautés de microorganismes planctoniques et c'est pourquoi la littérature abonde de mesures de Q_{10} sur des processus tels que les activités enzymatiques, la PB ou la RB.

Par exemple, une étude s'est intéressée à mesurer l'optimum de température de la phosphatase alcaline produite par différents organismes issus de l'estuaire d'Harvey au sud-ouest de l'Australie (Huber & Kidby 1984b). Les auteurs de cette étude montrent 1) que l'optimum de température de la phosphatase alcaline dépend des caractéristiques biologiques des eaux échantillonnées (concentration en biomasse, composition des populations phytoplanctoniques et des communautés bactériennes, cycles jour/nuit, la saison, la profondeur, ...) et 2) que selon les organismes, le Q_{10} de la phosphatase alcaline peut varier de 1,45 à 2,0. Les écosystèmes d'eaux ou de sédiments des hautes latitudes ont également été à l'origine de nombreuses études sur les Q_{10} de la PB et de la RB (Tableau 1.1).

Tableau 1.1. Synthèse d'études saisonnières sur la production et la respiration de communautés bactériennes isolées à partir d'eaux de mer ou de sédiments et exposées à des conditions de réchauffement. Si possible, Q_{10} PB et Q_{10} RB sont moyennés ($\pm se$) (cf. Chapitre 4).

Etudes saisonnières	Isolées à partir de	Coordonnées GPS	Température <i>in situ</i> (°C)	Gamme de température (°C)	Q_{10} PB	Q_{10} RB
Kirchman & al (2005)	Océan Arctique de l'ouest	67°30'N, -1°75'E 72°30'N, -1°60'E	-1.7 à -1.5	-1 à 5	(leu ^a) 3.1 (± 1.1)* (TdR ^b) 1.9 (± 0.2)*	nd
Sand-Jensen & al (2007)	3 fleuves danois	<i>Selbæk</i> <i>Havelse Å</i> <i>Pøleå</i>	3 - 13 0 - 21 0 - 25	0 - 15 15 - 25 25 - 35	2.10 (± 0.35)* 1.53 (± 0.16)* 1.26 (± 0.23)*	3.31 (± 0.36)* 2.27 (± 0.26)* 1.43 (± 0.21)*
Vázquez-Domínguez & al (2007)	Baie de Blanes	41°39'N, 2°48'E	12.5 - 25	Temp. <i>in situ</i> , + 2.5	2.5**	1.9**
Berggren & al (2010)	1 Fleuve Boréale	64°14'N, 19°46'E	8.6 0.0 8.1	0 - 25	1.48 2.12 1.21	1.52 2.37 2.12
Kritzberg & al (2010a)	Ile de Majorque	39°20'N, 3°03'E	14.4 – 28.2	Temp. <i>in situ</i> , +2, +4, +6	4.9**	7.3**
(Kritzberg & al. 2010b)	Océan Arctique	78°21'N, -11°17'E	5.8	Temp. <i>in situ</i> , +3, +6	1.4	7.0
		79°03'N, -04°14'E	2.0		1.5	1.6
		78°41'N, -00°13'E	-0.6		2.8	5.4
		78°00'N, -00°01'E	5.0		1.9	98
Vázquez-Domínguez & al (2012)	Baie de Blanes	41°39'N, 2°48'E	12.5 - 25	Temp. <i>in situ</i> , + 2.7	2.8 (± 0.1)*	nd
Notre étude	Baie de Marseille	43°14'N, 05°17'E	12-26	12-31	1.76-4.08	1.91-7.68

^amoyenne du taux d'incorporation de leucine^bmoyenne du taux d'incorporation de thymidine

** médian

nd: non déterminé

Par exemple, lors d'une étude de manipulation de température (à -1°C et 5°C) dans l'ouest de l'océan Arctique (température *in situ* = 1,65 °C en moyenne) les Q_{10} PB moyens sont de $1,9 \pm 0,6$ et de $3,1 \pm 2,6$ selon que les auteurs utilisent de la thymidine ou de la leucine pour les mesures de PB (Kirchman et al. 2005). Kritzberg et al (2010b) ont testé l'effet de la température (*in situ*, *in situ* + 3 °C et *in situ* + 6 °C) sur de l'eau de mer en Arctique filtrée sur 0,8 µm. Ils montrent que les Q_{10} PB et Q_{10} RB varient de 1,4 à 2,8 et de 1,6 à 98, respectivement. Enfin, lors d'une étude menée cette fois ci sur une eau tempérée (l'île de Majorque, dans la partie nord-ouest de la mer Méditerranée), Kritzberg et al (2010a) ont réalisé des augmentations de température (+2, +4 et + 6 °C par rapport à la température *in situ*) en été (température *in situ* = 28°C) et en hiver (température *in situ* = 15°C) et ont trouvé des Q_{10} PB = 4,9 et des Q_{10} RB = 7,3. Tous ces résultats témoignent

de valeurs de Q_{10} qui peuvent être nettement supérieures à la valeur canonique de 2 généralement utilisé en biologie ou dans les modèles écologiques.

Toutes ces études n'utilisent pas nécessairement de vraies mesures de cinétiques et les Q_{10} peuvent être établis simplement à partir d'incubation à 2 températures différentes. Ainsi, à la lumière de ces résultats bibliographiques, il semble primordial 1) de réaliser de véritables cinétiques pour établir correctement la fenêtre de validité d'Arrhenius, 2) de ne pas dissocier la valeur d'un Q_{10} des différentes caractéristiques physico-biologiques du milieu où il est calculé et 3) de chercher d'éventuels liens expliquant cette variabilité (type de flux mesurés, température *in situ* et gamme de variabilité annuelle, abondance et diversité des consortiums microbiens, disponibilité des ressources nutritives, ...).

D'un point de vue plus physiologique, la température agit également sur les propriétés de diffusion pour les nutriments vers les bactéries. En effet, Jumars et al. (1993), rappellent que la température affecte le taux de diffusion des molécules par l'intermédiaire de son effet sur D (coefficient de diffusion) ce qui génère un Q_{10} d'environ 1,2 à 1,4 pour les taux de croissance qui seraient limités seulement par la diffusion.

2.2.3. Contexte du changement global

Les modèles climatiques prédisent que la température de l'eau de surface augmentera de quelques degrés (2 °C à 6 °C) à l'horizon 2100 (Timmermann et al. 1999, Meehl et al. 2007). Ces prédictions ont été confirmées par des observations à long terme dans plusieurs mers européennes (mer Méditerranée, mer du Nord et mer Baltique) où il a été montré que la température des couches de surface a augmenté de 0,01 °C an⁻¹ depuis les années 1860 (Wiltshire & Manly 2004, Vargas-Yáñez 2005, Mackenzie et al. 2007). Les bactéries hétérotrophes sont en couplage étroit avec les producteurs de matière organique nécessaires à leur croissance (excrétion du phytoplancton, produits de lyse, broutage,...), en particulier dans les écosystèmes oligotrophes. Donc une perturbation même moindre sur le compartiment phytoplanctonique peut être amplifiée à travers les bactéries hétérotrophes et les échelons trophiques supérieurs (Sarmiento et al. 2010). Différentes approches ont été utilisées pour observer l'effet de la température sur les activités hétérotrophes bactériennes (expérimentation en laboratoire, observation à long terme, modèle prédictif,...). La majorité de ces études montre que le taux de croissance bactérien, la PB et la RB augmentent avec l'augmentation de la température (White et al. 1991, López-Urrutia & Morán 2007, Vázquez-Domínguez et al. 2007).

2.2.4. Effets directs et indirects de l'augmentation de la température

Bien que les auteurs s'accordent à dire que l'augmentation de la température aura un impact sur les processus bactériens à la hausse, il est important de faire la différence entre les effets directs et indirects du réchauffement des couches superficielles de l'océan sur le compartiment bactérien. Nous avons vu précédemment (paragraphe 2.2.1 & 2.2.3) que la hausse des températures (inférieure aux valeurs de température optimale) influence positivement et directement les activités bactériennes telles que la PB ou la RB (White et al. 1991, López-Urrutia & Morán 2007, Vázquez-Domínguez et al. 2007). Néanmoins, cette hausse a également 2 effets indirects sur les bactéries marines : 1) les effets liés à la cascade trophique, la température influençant aussi bien les organismes producteurs de MO que les prédateurs et 2) la hausse de la température diminue la profondeur de la couche de mélange en hiver et provoque une stratification plus importante en été. Une stratification accrue a pour conséquence un accès aux ressources nutritives plus difficile et une augmentation de la disponibilité en lumière pour les organismes photosynthétiques vivant dans les couches de mélange supérieures (Wohlers et al. 2009). La hausse de la température des couches de surface de l'océan a donc un double effet sur les bactéries marines hétérotrophes : l'augmentation des activités métaboliques (effet direct) et la diminution de la disponibilité en ressources (effet indirect) qui induit une compétition accrue entre les bactéries hétérotrophes et le phytoplancton (Azam et al. 1983, Morán et al. 2010, Wojewodzic et al. 2010), (Fig. 1.8).

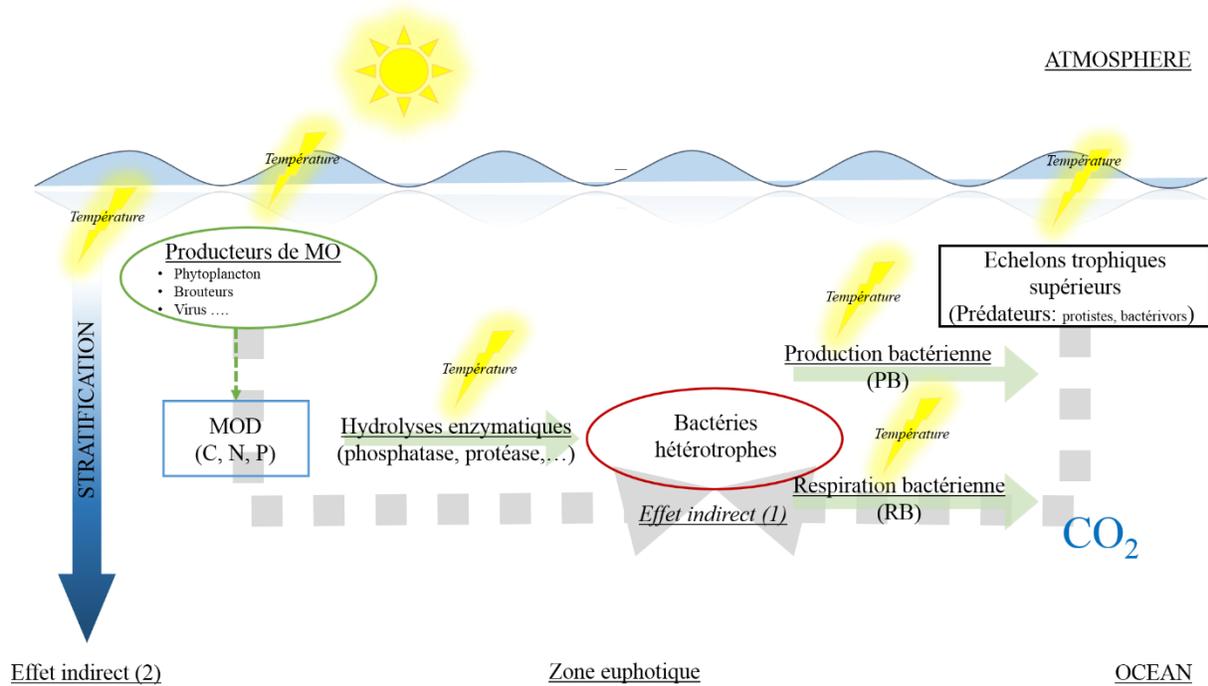


Figure 1.8. Schéma de l'influence de la température sur les bactéries marines hétérotrophes. Les effets directs de la température sont symbolisés par les flèches jaunes et les effets indirects 1 (cascade trophique) et 2 (diminution de la couche de mélange en hiver et stratification en été) de la température par la flèche bleue et les flèches grises

Dans leur synthèse sur l'effet de la température sur les processus bactériens, Sarmiento et al. (2010) concluent que le réchauffement augmente 1) la RB, 2) la prédation sur les bactéries et 3) la PB s'il y a suffisamment de ressources nutritives disponibles dans le milieu. Ainsi, avec le réchauffement des couches de surface de l'océan, l'abondance des bactéries hétérotrophes augmenterait ce qui renforcerait leur rôle dominant dans le cycle du carbone.

Enfin, au sein d'une même communauté bactérienne, il peut y avoir des populations ayant des optima de température différents ce qui pourrait avoir un effet direct de sélection au sein de cette communauté en faveur de populations bactériennes adaptées (Adams et al. 2010).

2.2.5. Un contrôle sur le BGE controversé

La littérature montre que la PB et la RB sont positivement corrélées à la température. Par contre, les avis sur le contrôle du BGE par la température ne sont pas unanimes. En effet Rivkin & Legendre (2001) et Apple et al. (2006) ont réalisé l'analyse de données *in situ* provenant d'environnements très différents (*cross-system analysis*). Ils ont montré une tendance du BGE à diminuer avec l'augmentation de la température. Sur une étude menée en environnement côtier, la

RB répond plus à la hausse de la température que la PB, ce qui laisse suggérer aussi une diminution du BGE avec la température (Kritzberg et al. 2010a).

Néanmoins, aussi bien dans la synthèse bibliographique de Del Giorgio & Cole (1998) que dans une compilation de données de PB et de RB issues de différents systèmes aquatiques réalisée par López-Urrutia & Morán (2007) ou encore lors d'une étude de simulation de réchauffement de 2,7 °C au-dessus de la température *in situ* de l'eau de surface d'un site côtier oligotrophe de la mer Méditerranée (Vázquez-Domínguez et al. 2007), les études montrent toutes que la variation du BGE n'est pas directement contrôlée par la température mais sa variation dépend également de la disponibilité en ressources nutritives. Ce résultat s'est vérifié dans un travail ultérieur de Berggren et al. (2010) qui combinait expérimentalement une augmentation de la température avec un enrichissement en nutriments inorganiques (P et N). Les auteurs ont trouvé un BGE qui diminue avec la hausse des températures dans un système enrichi, alors que dans un système limité en nutriments inorganiques, aucune relation entre le BGE et la température n'est observée. Ce type de couplage température-ressource avait déjà été étudié auparavant sur des cultures en batch. Barillier & Garnier (1993) ont soumis un consortium bactérien d'eau douce à une hausse de température et à différentes conditions de concentration de COD. Ces auteurs n'observent aucune tendance d'évolution du BGE avec la température (sur une gamme de 8°C à 25°C). Ils observent en revanche une augmentation du BGE avec l'augmentation de la concentration en COD (sur une gamme de 0,16 à 1 mmol C dm⁻³). Au vu des résultats de la littérature, il semble que le contrôle du BGE par la température dépende de plusieurs paramètres incluant :

- ✓ la quantité et la qualité de la MO,
- ✓ la disponibilité des nutriments inorganiques,
- ✓ l'état biologique du milieu,
- ✓ la nature des populations bactériennes peuplant le système considéré.

Ces paramètres sont généralement intégrés dans les « *cross-system analysis* » ce qui ne permet pas de séparer leurs effets respectifs. Bien que les « *cross-system analysis* » soient importants pour explorer l'organisation des différents patterns au sein de l'océan, l'approche expérimentale permet quant à elle de déconvoluer chacun de ces paramètres pour en observer leur effet sur les processus bactériens ou le BGE.

2.3. Autres facteurs de contrôle

Même s'ils ne sont pas le sujet de ce manuscrit, d'autres paramètres physiques tels que la pression hydrostatique, les ultraviolets (Abboudi et al. 2008), le pH (Orr et al. 2005, Riebesell et al. 2007, Siu et al. 2014) ou la salinité (Fuhrman et al. 2006, Ghiglione et al. 2008) peuvent avoir un impact direct et indirect et significatif sur le compartiment bactérien.

2.4. L'hétérogénéité de la matière organique

Les apports de MO disponible pour les bactéries marines hétérotrophes n'arrivent pas de manière continue dans le milieu marin. Il existe une intermittence liée aux sources de ces apports qui peuvent être :

- ✓ allochtones (rivières, dépôts atmosphériques, ...),
- ✓ des processus physiques (tourbillons, méandre, *upwelling*, *downwelling*, ...),
- ✓ chimiques (photo-oxydation, agrégats, dissolution, ...),
- ✓ biologiques (photosynthèse, prédation, lyse, excrétion, ...),
- ✓ dépendantes de la rythmicité de la biologie du système considéré (cycle diurne, cycle saisonnier),
- ✓ l'état physique de la MO (dissoute, colloïdale, particulaire) présente dans l'eau entraînant des divergences comportementales au sein des communautés bactériennes.

Ainsi, toutes ces caractéristiques qui définissent la nature hétérogène de la MO dans le milieu marin peuvent avoir un impact sur la dynamique des bactéries hétérotrophes.

3 Cadre et objectifs de la thèse

3.1. Objectifs de thèse

Au cours de ces dernières années, le contrôle des processus hétérotrophes bactériens et notamment du BGE par les ressources nutritives (paragraphe 2.1) et la température (paragraphe 2.2) ont fait l'objet de nombreuses études (Kirchman et al. 1995, del Giorgio & Cole 1998, Rivkin & Legendre 2001, Kirchman 2012). Avec le changement global, ces deux paramètres environnementaux sont en train de subir des modifications qui ont un impact direct ou indirect sur le compartiment bactérien hétérotrophe et donc sur les flux de transferts de MO au sein du réseau

trophique microbien. Bien qu'abondantes, les connaissances sur ces modifications manquent de clarté et nécessitent des approches méthodologiques rigoureuses.

Dans ce contexte scientifique, l'objectif principal de cette thèse est de déterminer la manière dont certains processus hétérotrophes bactériens se régulent avec la température, les ressources (y compris son mode d'apport) mais également l'effet couplé de ces deux paramètres. Cette démarche permet de contribuer à l'enrichissement des connaissances quant à la façon dont le compartiment bactérien peut répondre au changement global du climat et des conséquences que cette réponse (via le BGE), peut avoir sur le réseau trophique. Cet objectif nécessite donc de répondre à plusieurs questions :

- ✓ Comment la température contrôle certains processus hétérotrophes ?
- ✓ Le couplage température-ressources agit-il de manière synergique ou antagoniste ?
- ✓ Le mode d'apport de la MO a-t-il un effet sur la dynamique des bactéries hétérotrophes ?
- ✓ Quels effets les variations saisonnières et le mode d'apport de la MO peuvent avoir sur le BGE ?

3.2. Déroulement et stratégie de la thèse

Pour étudier les sources de variabilité de l'effet de la température, nous avons choisi de mesurer plusieurs processus hétérotrophes bactériens au moyen d'approches expérimentales (cinétiques températures) répétées plusieurs fois lors d'un suivi temporel. Le site SOLEMIO (43°14'30" N et 05°17'30" E, 60 m de profondeur) est une station d'observation du réseau SOMLIT (Service d'Observation en Milieu LITtoral) gérée par le MIO dans la rade de Marseille qui est géré par le réseau SOMLIT (<http://somalit.epoc.u-bordeaux1.fr/fr/>). Ce site a été choisi pour ce suivi temporel.

Marseille est une agglomération de plus de 800 000 habitants et qui s'étend le long d'un golfe, subdivisé en deux bassins représentant un volume d'eau de mer de 4,4 km³ (Castelbon 1972). Ce golfe est le siège de nombreuses activités anthropiques telles que la pêche, la navigation de commerce ou de plaisance, les activités balnéaires et aquacoles, les émissions des déchets urbains officiels (émissaire de CORTIOU) et sauvages qui se traduisent par des rejets en mer de substances susceptibles de perturber les écosystèmes marins (hydrocarbures, sels nutritifs en excès, métaux lourds, etc.). Depuis janvier 2000, le site d'observation SOLEMIO est échantillonné par les services du réseau SOMLIT ce qui permet d'avoir accès à une importante base de données d'une vaste gamme de paramètres physiques (température, salinité, pH, fluorescence, O₂), chimiques

(sels nutritifs, autres composés inorganiques, MOD et MOP) et biologiques (abondances zooplanctoniques et phytoplanctoniques). En parallèle de la station météorologique officielle de l'aéroport de Marignane, une autre station placée sur l'île du Frioul permet également de disposer d'informations sur les vents dominants, les précipitations, les retombées atmosphériques et l'irradiance à proximité du site SOLEMIO. Enfin, la rade de Marseille et ses abords sont étudiés au moyen d'outils de modélisations physiques et biogéochimiques, notamment pour étudier les effets dynamiques des courants et tourbillons dans la région (Fraysse et al., 2013, Estournel et al. 2001, Reffray et al. 2004, Gatti et al. 2006). Ainsi, cette thèse a pu bénéficier d'une source importante d'informations pour comprendre l'évolution saisonnière du compartiment bactérien au sein de la colonne d'eau d'un site côtier.

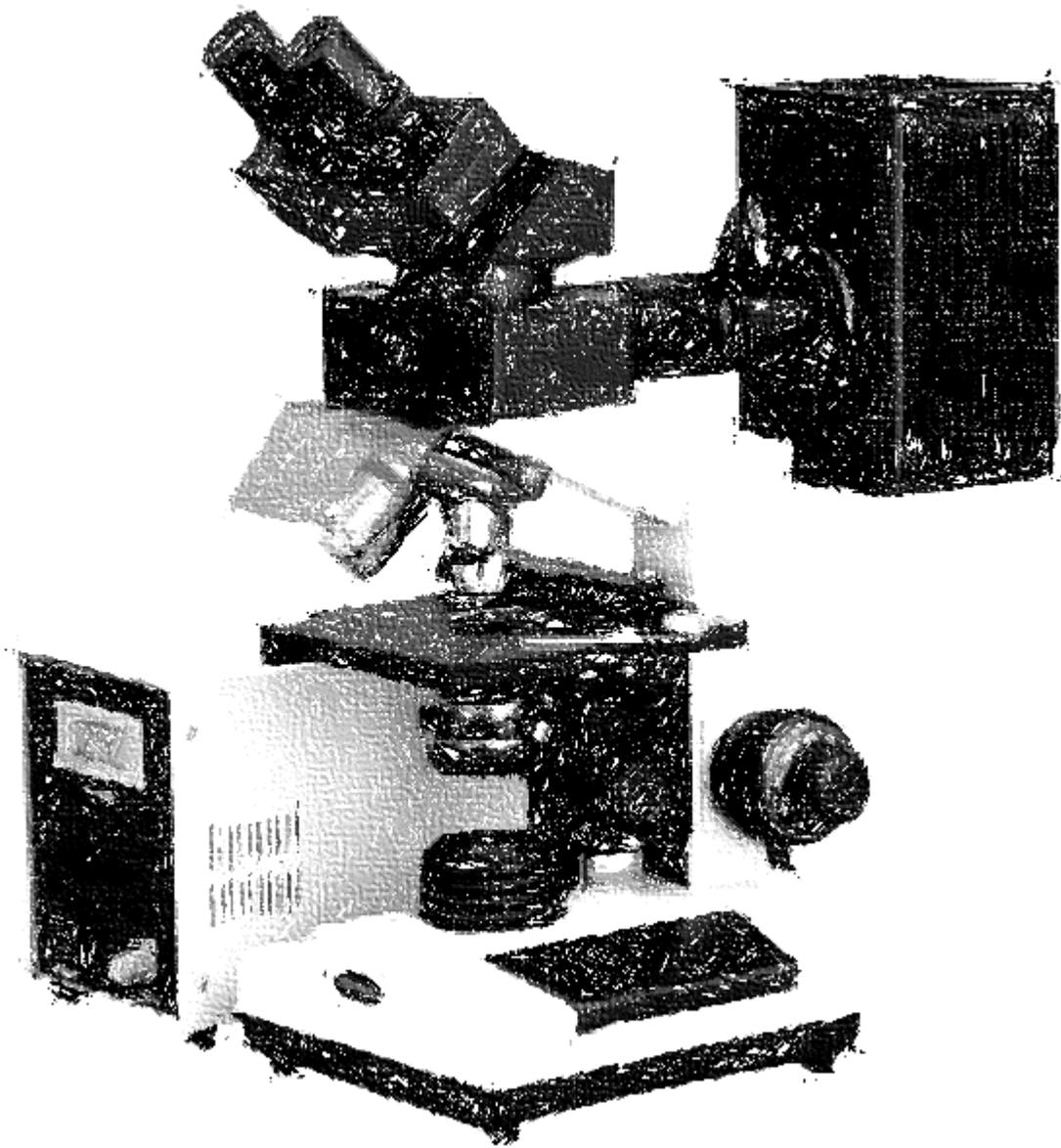
Les combinaisons d'approches *in situ* - expérimentales permettent d'avoir une vision plus précise de l'influence d'un paramètre dans un écosystème donné et de son évolution temporelle-*in situ*. Nous avons donc réalisé des cinétiques températures, des expériences d'enrichissements et suivi la nature synergique ou antagoniste du couplage température-ressources lors de cette étude saisonnière. En parallèle, l'influence du mode d'apport de COD (de manière pulsée ou continue) est également investiguée.

Pour ce faire, le régime des apports de MO est manipulé dans une série de cultures en batch répétée en Novembre 2011, Mars 2012, Juillet 2012 et Septembre 2012. Le principe est d'inoculer ces cultures avec de l'eau de mer de surface du site SOLEMIO, filtrée sur 0,6 μm , afin de constituer un inoculum bactérien naturel « débarrassé » de ses prédateurs et de soumettre cet inoculum à des apports pulsés et continus de COD en utilisant le pyruvate comme source connue. L'intérêt de cette démarche est de voir comment, avec des réplicats d'expériences dont les conditions initiales peuvent différer selon la situation saisonnière, le compartiment bactérien répond à un ajout pulsé de pyruvate par rapport à un ajout continu.

Ce manuscrit commence par un descriptif détaillé du matériel et des méthodes qui ont été utilisées pour mener à bien ce travail (Chapitre 2). Il se compose ensuite de 3 chapitres de résultats. Le chapitre 3 aborde dans un premier temps, la variabilité saisonnière de la PB, de RB, de la *phos* et de la *prot* du compartiment bactérien de la couche de surface en lien avec l'évolution de l'environnement étudié. Le chapitre 4 présente l'estimation de l'indice Q_{10} , sa variabilité saisonnière et « inter-processus », et permet d'observer l'effet que peut avoir la température sur les 4 processus hétérotrophes (PB, RB, *phos* et *prot*) et sur le BGE. Puis, l'effet de la température est couplé à l'effet des ressources nutritives dans le but d'estimer si ce couplage contrôle la PB de manière synergique ou antagoniste. Ces 2 chapitres sont sous forme de publications. Le chapitre 5

se focalise sur les cultures en minicosme et aborde l'effet du mode des apports de MO. Cette approche permet tout d'abord, de dissocier l'effet des apports de la MO des autres paramètres environnementaux et de voir ainsi quels impacts peuvent avoir ces apports sur la PB, la RB et le BGE. Cette méthodologie est à l'origine de l'élaboration d'un outil de mesure pour la RB utilisant la fibre optique presens®. Le chapitre 6 présente les conclusions et les perspectives de mon travail de recherche.

Ces travaux ont été supportés par l'INSU – programme EC2CO (*Ecosphère Continentale et Cotière*) dans le cadre du projet DEMO2 (Dégradation de la Matière Organique) et par la Fondation Total pour la Biodiversité et la Mer (projet REMECCA). Cette thèse a reçu un financement de la région Provence Alpes Côtes d'Azur et a bénéficié d'un partenariat avec la société High Tech Environnement.



CHAPITRE **2**

Matériels & Méthodes

L'objectif du chapitre « Matériels & Méthodes » est de dresser un portrait détaillé de toutes les méthodes d'analyses qui sont utilisées dans ce travail de thèse. Ainsi les paramètres biogéochimiques et biologiques mesurés lors du suivi *in situ* mais aussi lors des expériences en minicosme vont être présentés ici. Dans un souci de clarté du manuscrit, un certain nombre de méthodes d'analyses (dosage du pyruvate, mesure de respiration par les optodes presens®, ...) non détaillées dans les articles figurent seulement dans les annexes.

Le chapitre « Matériels & Méthodes » commence par un descriptif détaillé des approches expérimentales mises en place (cinétiques températures, expériences d'enrichissement et cultures bactériennes). Il présente ensuite tous les paramètres biologiques et biogéochimiques mesurés et se termine par une présentation des outils d'analyses statistiques utilisés pour traiter les données.

1 Expérimentation & cultures bactériennes

1.1. Effet de la température

Dans le cadre du suivi *in situ*, la saisonnalité des Q_{10} de 4 activités hétérotrophes : la production bactérienne (PB), la respiration communautaire (RC), la phosphatase alcaline (*phos*) et une ectoaminopeptidase, la protéase (*prot*), sont mesurées grâce à un système d'incubation soumis à un gradient thermique : *temperature gradient bloc* (TGB). Deux TGB, (1) et (2), (Fig. 2.1) sont créés afin de pouvoir incuber au noir et à 8 températures expérimentales différentes (de 12 à 32 °C), des quadruplicats d'échantillons d'eau de mer. Les TGB ont la capacité de couvrir un spectre de température couvrant les variabilités annuelles (10°C - 30 °C).

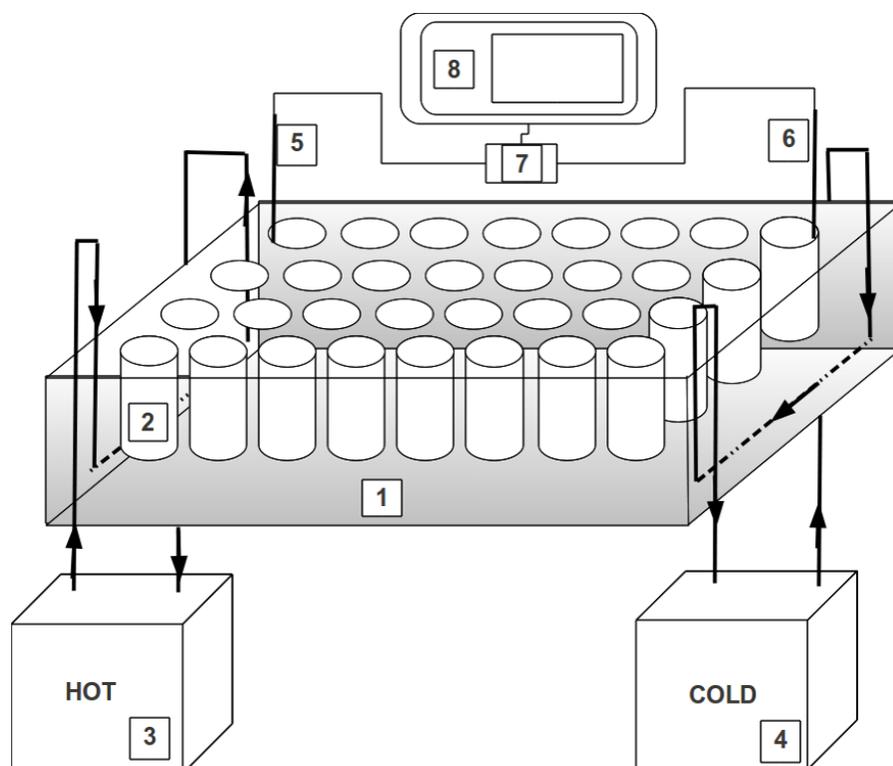


Figure 2.1 "temperature gradient block" (TGB). Un TGB (1) est destiné à l'incubation des échantillons pour les mesures de RC (dimensions : 34 x 72 x 12 cm) et un second (2) est réservé aux échantillons pour les mesures de PB, *phos* et *prot* (dimensions : 12 x 42 x 8 cm). Le premier contient 32 puits (400 cm³) capables de recevoir des flacons Winkler (125 cm³) dans une matrice de 8 x 4. Le second TGB, plus petit, est également composé de 32 puits (10 cm³) pouvant contenir des micros tubes à centrifuger Eppendorf (2 cm³) ou des cuves en PMMA (3 cm³) dans une matrice de 8 x 4. Les 2 TGB sont isolés avec 2,5 cm de polystyrene. Le plus grand est de plus enfermé dans une caisse de bois. Ces TGB sont composés d'un block en aluminium (#1), percé de 32 puits (#2) remplis d'eau. Chacun des 2 TGB est traversé, de part et d'autre, par un courant d'eau chaude et froide délivrée par 2 cryostats (Huber ministat 240-cc, #3 et #4). Ce système de courant d'eau permet de créer un gradient thermique sur la longueur du TGB dont les 2 températures extrêmes (12 °C et 32 °C) sont contrôlées par des sondes à température de type pt100 (#5 et #6). Enfin, l'enregistrement en continu des données de température de contrôle des puits est rendu possible grâce à un système d'acquisition par ordinateur (#7 et #8).

Les RC sont calculées à partir d'incubations de 24 heures dans le TGB 1 en utilisant la méthode Winkler (Chapitre 2, paragraphe 2.4.2) : 8 températures en quadruplicat. Les PB sont mesurées à partir d'échantillons incubés 1,5 heures dans le TGB 2 selon la méthode de la Leu-³H (Chapitre 2, paragraphe 2.4.1) : 8 températures en quadruplicat, sauf pour 3 températures, car 3 des 32 puits ont été utilisées pour les témoins. Après avoir incubé les échantillons de PB, le TGB 2 est utilisé pour les incubations simultanées de la *phos* et de la *prot* : 8 températures en duplicat pour chaque activité ectoenzymatique. Les échantillons sont directement incubés dans les cuves en PMMA avec leur substrat fluorogénique respectif (Chapitre 2, paragraphe 2.4.3). Les temps d'incubation et les fréquences de mesure au spectrofluorimètre sont ajustés en fonction du degré

de l'activité (5 heures maximum). Ces expériences de cinétique température sont réalisées une fois par mois.

1.2. Contrôle par les ressources

Dans le cadre du suivi *in situ*, le contrôle des bactéries hétérotrophes par la biodisponibilité en ressources est déterminé en mesurant expérimentalement les changements de PB après 48 heures d'incubation au noir, à température *in situ*, dans des flacons incubés en présence de phosphate (PO_4^{3-} : $0.25 \mu\text{mol P dm}^{-3}$), de nitrate + ammonium ($\text{NO}_3^{2-} + \text{NH}_4^+$: $1 \mu\text{mol N dm}^{-3}$ chacun) et de glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$: $10 \mu\text{mol C dm}^{-3}$). Différentes combinaisons d'enrichissement sont réalisées (P, N, C, PN, PC, NC et PNC) en incluant un contrôle témoin non enrichi (T). Chaque condition d'enrichissement est réalisée dans des flacons en polycarbonate (60 cm^3) en triplicats. Après le temps d'incubation, chaque flacon est sous échantillonné dans le but de mesurer la PB selon le protocole de la Leu- ^3H (Chapitre 2, paragraphe 2.4.1). Les sous échantillons pour la détermination de la PB sont incubés au noir, durant 2 heures, dans les mêmes conditions de température que les enrichissements.

Afin d'observer le couplage entre l'effet de la température et des ressources sur la PB, le même type d'expériences d'enrichissement est réalisé en combinant ou non ces facteurs. Les incubations sont identiques, mais réalisées à une température supérieure de $+ 3^\circ\text{C}$ par rapport à la température *in situ* et seulement en présence de phosphate (PO_4^{3-} : $0,25 \mu\text{mol P dm}^{-3}$) ou de glucose ($10 \mu\text{mol C dm}^{-3}$). Deux combinaisons d'enrichissement sous réchauffement sont donc réalisées (P+ et C+), incluant un contrôle témoin non enrichi (T+). Chaque condition est faite en triplicats (Fig. 2.2).

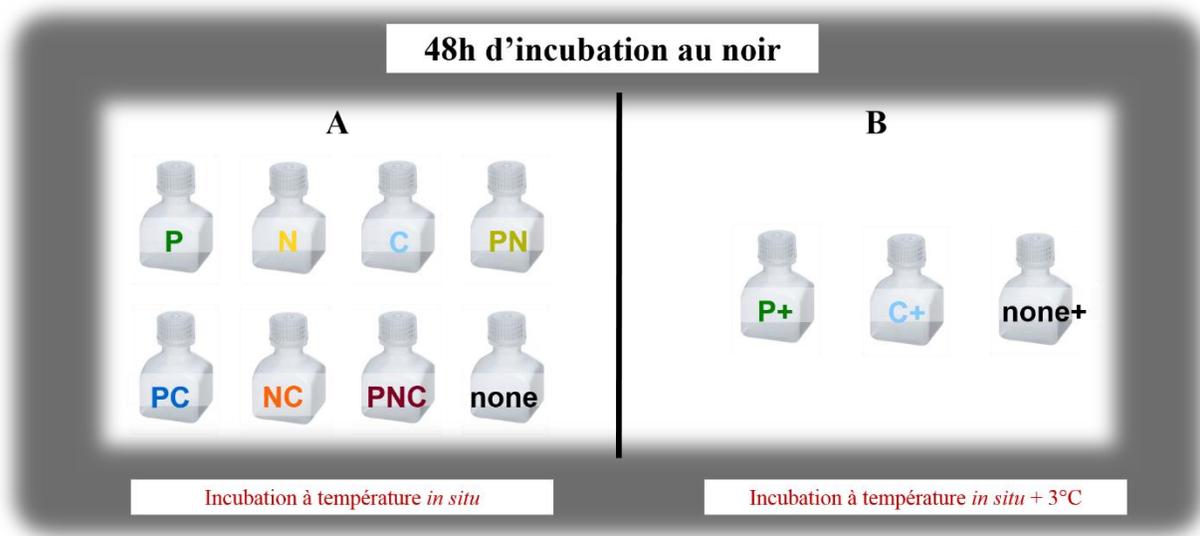


Figure 2.2. Expériences d'enrichissements réalisées au noir pendant 48h à température *in situ* (A) et température *in situ* + 3°C (B). Les différentes combinaisons de P (phosphate), N (nitrate + ammonium), C (glucose) et témoin (none) sont faites en triplicats

A partir des mesures de PB, des facteurs d'enrichissement (FE) sont alors calculés en divisant la PB trouvée dans chaque combinaison P, N, C, PN, PC, NC, PNC, P+, C+ et T+ par la PB trouvée dans le contrôle témoin T, et ce pour chaque expérience d'enrichissement réalisée durant le suivi saisonnier. Le calcul des FE permet de comparer les combinaisons entre elles à chaque période, en relativisant l'information sur l'effet de la PB, et de constater les éventuelles apparitions de limitation ou de co-limitation, qui seront ensuite validées par les tests statistiques. Ces expériences d'enrichissement sont réalisées une fois par mois.

1.3. Effets des apports intermittents ou non en matière organique

Des expériences de cultures en minicosme sont réitérées 4 fois : Septembre – Décembre 2011, Mars – Avril 2012, Juin – Juillet 2012 et Septembre – Octobre 2012. Ces cultures en mode « batch » sont réalisées pendant 10 jours. Les nutriments (PO₄ et NH₄) sont ajoutés en excès (10 μmol dm⁻³ et 41 μmol dm⁻³, respectivement). Les consortiums naturels de bactéries de départ sont identiques et obtenus en filtrant de l'eau de mer de surface (5m) prélevée à SOLEMIO sur des filtres polycarbonates 0.6 μm. Le pyruvate représente l'élément destiné à être limitant dans les cultures. Dans le batch « pulsé » (P), il est introduit 5 fois et seulement à des instants précis : au

début de l'expérience (à t_0) puis tous les 48 heures après chaque phase exponentielle. Dans le batch « continu » (C), un flux d'entrée constant de pyruvate est maintenu durant tout le temps que dure l'expérience, de façon à ce que l'apport total en pyruvate cumulé sur l'ensemble de l'expérience soit identique dans les 2 types de culture P et C. Ainsi, chaque expérience de culture se compose d'une combinaison de régime « pulsé » (P), de régime « continu » (C) et d'un témoin contrôle (T). Ce type d'expérience sur l'effet des modes d'apports de MO a nécessité un montage très spécifique qui est détaillé dans le chapitre 5.

2 Les paramètres mesurés

Un grand nombre de paramètres ont été analysés durant mon travail de thèse et le tableau 2.1 en fait un inventaire résumé.

Tableau 2.1. Paramètres mesurés durant mon travail de thèse avec les instruments de mesure utilisés, la personne en charge des analyses et le chapitre où figurent les résultats obtenus. J'ai moi-même réalisé les prélèvements et le conditionnement de la plupart de ces analyses.

Paramètres	Instruments de mesure	Analystes	Chap.
Météo (Température, Vents, pluie, ensoleillement, pression atmosphérique)	Station météo de Marignane et du Frioul (Anémomètre, Girouette, Thermomètre, Baromètre, Hygromètre, Pyranomètre, pluviomètre)	Christophe Yohia Dominique Lefèvre Benjamin Céa	3
Température, salinité	CTD SBE 19	Michel Lafont	3
Chl <i>a</i>	Spectrofluorimètre	Patrick Raimbault	
COP, NOP	Spectromètre de masse	Patrick Raimbault	3
POP	<i>Chemical wet-oxidation</i>	Patrick Raimbault	3
COD	Shimadzu TOC-5000 Analyzer®	Benjamin Céa Bruno Charrière	3
Sels nutritifs (NO ₃ , NO ₂ , NH ₄ , PO ₄ , SiOH ₄)	Technicon AutoAnalyzer®	Nicole Garcia	3 & 5
Pyruvate	Spectrofluorimètre HITACHI F-7000®	Benjamin Céa	5
Abondances cellulaires (bactéries hétérotrophes, phytoplanctons, flagellés, diatomées, ...)	Cytométrie en Flux FACSCalibur	Benjamin Céa	3, 4 & 5
	Microscope a épifluorescence (BX 61 Olympus)	Benjamin Céa	
		Claire Chauveau	
	Microscope inversé	Marie Eichinger	
Béatrice Beker			
Production Bactérienne	Liquide Scintillation Analyzer Packard-2100TR®	France Van Wambeke Benjamin Céa	3, 4 & 5
Respiration Bactérienne	Winkler	Dominique Lefèvre Benjamin Céa	3, 4 & 5
	Optode Presens®		
Activités enzymatiques (phosphatase, protéase)	spectrofluorimètre Kontron®	Laure Chirurgien Benjamin Céa	3 & 4
Structure des communautés bactériennes	CE-SSCP	Benjamin Céa	5

2.1. Météorologie

L'accès aux données météorologiques, telles que les informations relatives aux vents (direction, vitesse, intensité, rafales, temps des rafales), la température de l'air, l'hygrométrie, la pluviométrie, la radiométrie ainsi que les dépôts atmosphériques, est possible grâce à deux stations climatologiques. Une première station est localisée à proximité de l'aéroport de Marignane et les données sont disponibles sur le site Météo France (<http://www.meteofrance.com/accueil>). Il existe une autre station située sur l'île du Frioul (île de Pomègues ; 43°15'59.85" N, 5°17'38.06" E), gérée

par le Service d'Observation (SO) de l'OSU-Institut Pythéas (<http://mio.pytheas.univ-amu.fr>) qui permet d'avoir un point de vue climatologique plus réaliste de la zone d'étude dont fait partie le site d'échantillonnage SOLEMIO. Cette station dispose des équipements suivants :

- ✓ Anémomètre (vitesse du vent en m s^{-1})
- ✓ Girouette (direction du vent)
- ✓ Baromètre (Pression atmosphérique)
- ✓ Thermomètre (Température de l'air en $^{\circ}\text{C}$)
- ✓ Hygromètre (humidité ambiante)
- ✓ Pyranomètre (ensoleillement)
- ✓ Pluviomètre (précipitation en mm)

Toutes ces données météorologiques fournissent des informations indispensables pour comprendre l'origine des changements dans notre système d'étude (chute de la salinité, de la température de surface ou encore apports de nutriments). Pour rendre l'information la plus lisible possible, ces données sont transformées en diagrammes temporels, en profils de densité ou en rose des vents (Annexe 3 et Chapitre 3, Fig. 3.2).

2.2. Données physico – chimiques

2.2.1. Température, salinité

La sonde CTD SBE 19 du SO mesure la profondeur, la température ($^{\circ}\text{C}$), la salinité (psu) et la turbidité de l'eau. Cette CTD est également équipée d'un capteur de fluorescence qui est généralement utilisé comme un proxy de la Chl *a* dans la colonne d'eau.

Les dérives des capteurs pour la température et la pression sont très faibles et corrigées lors des envois en calibration périodiques des sondes. Un protocole strict de maintenance et de nettoyage de la sonde est effectué afin d'éviter une salissure progressive de la cellule de conductivité qui conduirait à une sous-estimation de sa valeur. La précision minimale demandée pour la température est de $0,01^{\circ}\text{C}$. Un suivi régulier de la mesure de la salinité est effectué par prélèvements discrets afin d'éviter des dérives difficiles à corriger à posteriori. La calibration a lieu

au moyen d'instruments de plus grande précision (Salinomètre Austosal). La précision minimale demandée pour la salinité est de 0,01 psu.

Pour la réalisation d'un profil, la sonde est descendue à 2 m sous la surface pendant environ une minute (stabilisation des capteurs) puis remontée en surface avant la réalisation du profil à une vitesse de descente uniformisée à 0,5 m s⁻¹. Les données sont post-traitées selon les recommandations de Seabird®. Les fichiers de données font apparaître une donnée tous les 25 cm.

2.2.2. Pigments

La concentration en chlorophylle *a* (Chl *a*) de la colonne d'eau est déterminée par spectrofluorimétrie (limite de détection de 0,05 µg dm⁻³ avec une reproductibilité de 5 %) selon la méthode de Raimbault et al. (2004). Contrairement à la méthode traditionnelle qui utilise l'acétone pour extraire les pigments, cette méthode se base sur une extraction en seulement 15 à 20 minutes avec du méthanol. En plus de sa rapidité, ni broyage, ni centrifugation ou filtration de l'extrait ne sont nécessaires. Toutefois, en raison de l'instabilité des pigments dans le méthanol, le dosage des échantillons doit être réalisé dans les 2 heures suivant l'extraction. Cette méthode se trouve être parfaitement adaptée aux mesures intensives de la concentration en Chl *a* au laboratoire ou durant des campagnes en mer lors d'investigations à haute fréquence spatio-temporelles.

2.2.3. Carbone et Azote particuliers

Les concentrations du COP et NOP sont mesurées par un spectromètre de masse (limite de détection de 1 µg dm⁻³, reproductibilité de 10 %) selon la méthode de (Aminot & Kérouel 2004). Le COP et NOP sont déterminés par combustion à 900 °C du matériel particulaire récupéré par filtration (à partir d'un volume d'eau de mer entre 50 et 100 cm³) sur des filtres Whatman® GF/F. Des blancs filtres sont réalisés avec de l'eau milliQ et déduit des mesures de COP et NOP.

2.2.4. Phosphore particulaire

La concentration en POP est déterminée par *Chemical wet-oxidation* (CWO : limite de détection de $0,005 \mu\text{mol dm}^{-3}$ avec une reproductibilité de 10 %) selon la méthode de Raimbault et al. (1999). Sa précision de l'analyse est comparable au CHN Analyzer®. La précision de la collecte sur les filtres Whatman® GF/F est quant à elle comparable à celle du NOP (Raimbault & Slawyk 1991). Le principe du CWO est d'oxyder à l'aide du potassium peroxydopersulfate tout le POP qui a pu être récolté par filtration (à partir d'un volume d'eau de mer $\geq 250 \text{ cm}^3$) sur filtres GF/F pour en obtenir sa forme inorganique PO_4 . Ce composé inorganique est alors dissous dans un « mélange de digestion » et sa concentration est mesurée automatiquement par colorimétrie au Technicon AutoAnalyzer®.

2.2.5. Le carbone pyruvate

Afin de quantifier la part réellement consommée du COD par les bactéries hétérotrophes cultivées lors des expériences en minicosme et de pouvoir ainsi identifier une potentielle production de COD réfractaire, une estimation de la concentration en pyruvate ($\text{CH}_3\text{COCOO}^-$) est testée sur un spectrofluorimètre HITACHI F-7000®. Le protocole utilisé est inspiré de la méthode de Mezzour et al. (2007). Ce protocole est adapté pour les échantillons d'eau de mer. Cette méthodologie s'est révélée inefficace (i.e. en dessous des seuils de détection) pour des concentrations en pyruvate $< 100 \mu\text{mol C dm}^{-3}$. Elle n'a pu être mise en œuvre dans les expériences du chapitre 5 et elle n'est donc présentée qu'en annexe 4.

2.2.6. Carbone organique total

La concentration du carbone organique total (COT) est mesurée par combustion à haute température sur un Shimadzu TOC-5000 Analyzer® (limite de détection de $0,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ avec une reproductibilité de 2 %) selon la méthode de Cauwet (1994). Les échantillons sont non filtrés et collectés dans des ampoules en verre (préalablement brûlées à $450 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 4 à 5 heures) qui sont immédiatement acidifiées avec une goutte de $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ d'acide ortho-phosphorique. Les ampoules sont ensuite scellées au chalumeau et conservées en chambre froide ($-4 \text{ }^\circ\text{C}$) jusqu'à l'analyse.

2.2.7. Sels nutritifs, azote et phosphore organique total et dissous

Les concentrations des composés inorganiques tels que le NO_3^- , NO_2 , NH_4^+ , PO_4^{3-} et SiOH_4 ainsi que de l'azote organique total NOT et du phosphore organique total POT sont mesurées par des méthodes colorimétriques classiques automatisées sur des chaînes Technicon AutoAnalyzer® (limite de détection de $0,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$, $0,020 \mu\text{mol dm}^{-3}$, $0,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$, $0,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ et $0,03 \mu\text{mol dm}^{-3}$, respectivement avec une reproductibilité de 5 %) selon les protocoles définis par Tréguer et Le Corre (1975). Les très faibles concentrations de NO_3^- et NO_2 rencontrées dans la couche superficielle (< 100 m) sont déterminées à l'aide d'une méthode sensible (Raimbault et al. 1990). La concentration de NOD est déterminée à partir de la concentration NOT moins celles de $\text{NOP} + \text{NO}_3^- + \text{NO}_2 + \text{NH}_4^+$ et la concentration de POD à partir de la concentration de POT moins celles de $\text{POP} + \text{PO}_4^{3-}$.

2.3. Dénombrement cellulaire

2.3.1. Pico et nano plancton

L'abondance bactérienne (AB) est dénombrée par le cytomètre en flux FACSCalibur (BD Sciences®, San Jose, CA) de la plateforme PRECYM (<http://precym.com.univ-mrs.fr>) du MIO. Des échantillons de $1,8 \text{ cm}^3$ d'eau de mer sont fixés au formaldéhyde (concentration finale 2 %, 15 minutes d'incubation au frigidaire), puis conservés à l'azote liquide jusqu'à l'analyse. Après une rapide décongélation, 450 mm^3 d'échantillon sont incubés (15 minutes à $20 \text{ }^\circ\text{C}$ et au noir) avec 5 mm^3 de SYBR Green II (SIGMA®, concentration finale 0,05 % [v/v] de la solution commerciale) dans le but de colorer les acides nucléiques, puis analysés selon le protocole de Marie et al. (1997). Les dénombrements sont réalisés en excluant les *Prochlorococcus* et les *Synechococcus* grâce à leur fluorescence rouge induite par leurs pigments photosynthétiques.

Une partie du phytoplancton, l'ultraphytoplancton (*Synechococcus*, *Prochlorococcus*, picophytoeucaryotes et nanophytoeucaryotes) est également analysé sur le même cytomètre en flux. Des aliquotes de $4,5 \text{ cm}^3$ d'eau de mer fixés et conservés de la même manière que ceux des bactéries hétérotrophes (fixation au formaldéhyde 2 %, congélation et stockage à l'azote liquide) sont analysés sans passer par l'étape de l'ajout de l'intercalant nucléique. L'ultraphytoplancton, constitué de pigments photosynthétiques, fluoresce naturellement, entre autres, dans le rouge (>

650 nm, Chl *a*). Les cellules phytoplanctoniques peuvent également être caractérisées par 3 autres signaux optiques : la taille de la cellule (*Forward scatter, FSC*), la structure cellulaire (*Side scatter, SSC*) et la fluorescence orange (540-606 nm, PE_{SSC}) induite par la phycoérythrine. Les protocoles de routine mis en place sur le cytomètre sont tels que définis lors d'un précédent suivi dans la baie de Marseille (Grégori et al. 2001).

Toutes les données de dénombrement sont, dans un premier temps, collectées sur le logiciel CellQuest (BD Bioscience®) puis, dans un second temps, analysées sur le logiciel SUMMIT v4.3 (cytogrammes types en annexe 5). Cinquante mm³ de billes (*TruCount*, BD Bioscience®), préalablement diluées au 10^{ème} dans de l'eau de mer synthétique, sont ajoutés à chaque échantillon afin de déterminer le volume exact analysé par le cytomètre. Des billes en polystyrène (2 µm de diamètre) sont utilisées comme standard interne pour discriminer le picoplancton (< 2 µm) du nanoplancton (> 2 µm).

Des échantillons d'eau de mer provenant du suivi *in situ* et des cultures bactériennes en minicosme sont également analysés par microscopie à épifluorescence (BX 61 Olympus). L'intérêt est de visualiser la taille et l'aspect agrégatif ou non des bactéries dans les expériences en minicosmes. Cette méthode d'observation est également un moyen de contrôle de présence ou non de nano-flagellés hétérotrophes dans les cultures.

2.3.2. Microplancton

L'identification et la quantification des diatomées, du nanoplancton et du microplancton lors du suivi *in situ* ont été réalisées par Béatrice Beker par des observations directes d'échantillons fixés au formol selon la méthode de microscopie inversée d'Uthermöhl (1931).

2.4. Processus bactériens hétérotrophes

2.4.1. Production bactérienne hétérotrophe

L'estimation de la production bactérienne hétérotrophe (PB) est faite à partir de la mesure d'incorporation de la leucine tritiée (Leu ³H) (Kirchman et al. 1985) adaptée à la méthode de centrifugation (Smith & Azam 1992).

Dans le cas du suivi *in situ*, un triplicat (1,5 cm³ dans des micro tubes à centrifuger Eppendorf) et un témoin préalablement fixé à l'acide trichloracétique (*TCA*, 5% final) sont incubés (au noir, à température *in situ* pendant 2 heures) avec 50 mm³ d'un mélange de leucine radioactive (Leu ³H, Perkin Elmer d'activité spécifique entre 107 et 144 Ci mmol⁻¹) et de leucine froide (concentration finale en leucine : 7 et 13 nmol dm⁻³, respectivement). Des tests préliminaires ont confirmé que l'incorporation de la leucine était linéaire durant le temps de l'incubation. Pour mettre un terme à l'incubation, du *TCA* est ajouté dans chaque aliquote (concentration finale 5 %). Après 3 étapes de centrifugation (16000g, 10 minutes) - aspiration du surnageant (une fois avec de l'échantillon d'eau de mer fixée, puis avec du *TCA* à 5 %, puis avec de l'éthanol à 80 %), le précipité est re-suspendu dans du liquide à Scintillation Packard Ultimagold MW®. La radioactivité est mesurée au compteur à scintillation liquide Packard-2100TR® où le comptage de la Leu ³H est corrigé du *quenching*. Des cinétiques concentrations réalisées occasionnellement ont montré que la dilution isotopique est négligeable quand une concentration finale de 20 nmol dm⁻³ de leucine est utilisée. La PB (ng C dm⁻³ h⁻¹) est ainsi calculée à partir du taux d'incorporation de leucine (pmol Leu ³H dm⁻³ h⁻¹) en considérant un facteur de conversion de 1,5 kg C mol⁻¹.

Dans le cas des expériences en minicosme, les paramètres d'échantillonnage sont différents afin de pouvoir s'adapter à la forte variabilité de la PB liée aux conditions de culture et aux plus fortes activités qu'en milieu naturel. La PB est calculée de la manière suivante :

$$PB(\text{pmol} \cdot \text{Leu} \cdot \text{dm}^{-3} \text{h}^{-1}) = \frac{(dpm_{\text{moyen}} - dpm_{\text{T}})}{2200000 \times As_{\text{Leucine}} \times 1,5 \times 1000 \times \Delta t_{\text{incubation}}} \times \frac{(\text{Leu}_{\text{froide}} + \text{Leu}_{\text{chaude}})}{\text{Leu}_{\text{chaude}}}$$

La PB est ensuite transformée d'après la relation suivante :

$$PB(\mu\text{mol} \cdot \text{C} \cdot \text{dm}^{-3} \text{h}^{-1}) = \frac{PB(\text{pmole} \cdot \text{Leu} \cdot \text{dm}^{-3} \text{h}^{-1}) \times 131,2 \times 0,86 \times d_{\text{isotopique}}}{0,073 \times 12 \times 1000000}$$

Avec, dpm_{moyen} (la moyenne de 3 mesures réalisées en triplicat) et dpm_{T} (dpm témoin préalablement fixé avant l'incubation) le nombre de désintégration par minute. As_{Leucine} , l'activité spécifique de la leucine en $\mu\text{Ci nmole}^{-1}$. $\Delta t_{\text{incubation}}$, le temps d'incubation en heure. Leu_{total} , la concentration totale de leucine. Leu_{froide} et Leu_{chaude} , les concentrations en leucine froide et radioactive ajoutée à l'échantillon. $d_{\text{isotopique}}$, le facteur de dilution isotopique. La dilution isotopique est calculée à partir des cinétiques concentrations de leucine.

2.4.2. Respiration

Dans le cas du suivi *in situ*, la respiration communautaire (RC) est mesurée selon la méthode Winkler à partir d'eau de mer non filtrée. Les échantillons sont incubés dans des flacons en verre borosilicatés et se composent à chaque fois de 4 réplicats. Les réplicats sont incubés pendant 24 heures au noir et à température *in situ* après quoi 1 cm³ de chacun des 2 réactifs Winkler sont ensuite ajoutés. Avant chaque début d'incubation, 4 flacons sont préalablement fixés avec les réactifs Winkler afin de pouvoir déterminer la concentration initiale. Les échantillons sont conservés à la température du laboratoire et immergés dans des bacs d'eau. Les mesures de l'O₂ dissous sont réalisées avec un détecteur colorimétrique automatisé (Williams & Jenkinson 1982). La RB ($\mu\text{mol O}_2 \text{ dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) est calculée à partir de la différence de la concentration d'O₂ (concentration initiale - concentration finale en $\mu\text{mol O}_2 \text{ dm}^{-3}$) divisée par le temps d'incubation (h), en supposant une consommation linéaire de l'O₂ au cours du temps. Afin de mesurer la contribution (en %) de la respiration bactérienne (RB) à la RC, de l'eau de mer est également filtrée à travers un filtre polycarbonate de 0,6 μm préalablement à l'incubation. Nous trouvons un rapport moyen RB/RC de 90 % (n = 4). C'est une valeur moyenne plus élevée que celle qui a déjà été observée lors d'une précédente étude dans le Nord-ouest de la mer Méditerranée (67 ± 9 % dans Lemée et al. 2002). Par contre, cette technique présente certains biais. En effet, cette technique de mesure de l'O₂ dissous, nécessite une étape de filtration ce qui provoque une coupe artificielle des interrelations trophiques (prédation, compétition, régénération) au sein du réseau trophique microbien, et donc peut surestimer la valeur de la contribution de la RB à la RC. Aussi, d'autres méthodes d'analyses peuvent être utilisées pour mesurer l'O₂ dissous, comme par exemple, la méthode ETS (Aranguren-Gassis et al. 2012). Un autre biais concerne la fraction de communauté susceptible de passer à travers un filtre 0,6 μm et qui peut varier au gré des changements des communautés bactériennes se produisant lors des périodes d'incubation (Massana et al. 2001). Dans ce manuscrit, nous avons choisi de garder la contribution moyenne de 90 % de la RB à la RC et nous avons supposé une communauté bactérienne constante durant les 24 heures d'incubation nécessaires à la méthode Winkler.

Concernant le cas des cultures bactériennes en minicosme, les mesures de la RB sont réalisées directement à l'aide d'une méthode optique utilisant la technologie des optodes oxygène presens® qui a nécessité la création de 2 chambres d'incubation. Cette technique est préférée à celle de Winkler car les minicosmes sont réalisés en mode batch limitant ainsi le volume de culture.

Le principe, les tests de validation et les détails de cette méthode sont expliqués dans les annexes 6, 7 et 8.

2.4.3 Activités ectoenzymatiques

La spectrofluorimétrie est également utilisée pour mesurer l'activité phosphatase (*phos*) et aminopeptidase (*prot*) exprimée en $\text{nmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$. *Phos* est détectée en utilisant du methylumbelliférophosphate (MUF-P) et *prot* en utilisant du L-leucine-4-méthyl-7-coumarinylamide (MCA-Leu, SIGMA®) (Hoppe 1983). Ces 2 substrats fluorogènes sont directement ajoutés dans une cuve en PMMA (3 cm^3 d'échantillon 1 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ de MUF-P en concentration finale ou 100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ de MCA-Leu en concentration finale). L'augmentation linéaire de la fluorescence dans l'eau de mer après un ajout de MUF-P ou de MCA-Leu est suivi au spectrofluorimètre Kontron® SFM-23 (excitation 365 nm, émission 460 nm pour *phos* et 380 et 440 nm pour *prot*, respectivement) pendant un temps d'incubation (au noir et à température *in situ*) qui varie en fonction du degré d'activité (5 points de mesures étalés entre 2 et 6 heures). Des cinétiques concentrations sont réalisées à chaque nouvelle expérience en utilisant une gamme de concentration de 25 à 1000 nmol dm^{-3} de MUF-P et 0,5 à 400 nmol dm^{-3} de MCA-Leu. La fluorescence est calibrée au moyen d'une gamme d'étalonnage réalisée sur les produits de l'hydrolyse, MUF et MCA. Des blancs réalisés à partir de MUF-P ou de MCA-Leu ajouté à de l'eau de mer bouillie ne varient pas significativement. L'équation de Michaelis-Menten est utilisée pour déterminer le taux d'hydrolyse V . Les vitesses maximales (V_m en $\text{nmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) et les constantes de demi-saturation (K_m en nmol dm^{-3}) sont déterminées à partir de régressions non linéaires à l'aide du logiciel PRISM®. Le rapport V_m/K_m est également calculé afin d'estimer le *Turnover time* (h) des réactions enzymatiques.

2.5. Structure des communautés bactériennes

2.5.1. Extraction d'ADN, d'ARN

Un volume de 100 cm^3 de milieu de culture sont préfiltrés sur un filtre de porosité 3 μm (47mm, polycarbonate, Nuclepore®, Whatman, Kent, UK) puis filtrés à travers un filtre de porosité 0,22 μm (47 mm, Polycarbonate, Nuclepore®). Les filtres sont conservés à -80°C jusqu'aux

analyses. L'ADN total est extrait dans du tampon lyse (50 mmol dm⁻³ de Trizma base, 40 mmol dm⁻³ d'EDTA et 0,75 mol dm⁻³ de sucrose) en ajoutant d'abord une solution de lysozyme fraîchement préparée (concentration finale 1 mg cm⁻³) et en incubant à 37 °C pendant 45 min. Du sulfate dodécyl sodium (concentration finale 1%) et une solution de protéinase K (concentration finale 0.2 mg cm⁻³) sont ensuite ajoutés et les échantillons sont incubés à 50 °C pendant 1 h. Un volume de 60 mm³ de lysat cellulaire obtenu est traité avec 10 mm³ d'une solution de 100 mg cm⁻³ de ARNase solution A (Qiagen®, Hilden, Allemagne). L'extraction de l'ADN est ensuite réalisée avec le kit *DNeasy Tissue* (Qiagen®), comme décrit dans les instructions du fabricant.

Les échantillons destinés à l'analyse de l'ARN sont traités en parallèle de l'extraction d'ADN. Les 40 mm³ restants du lysat sont traités avec de la ADNase I pour l'extraction de l'ARN en utilisant un kit d'isolation d'ARN total SV (Promega®, Madison, WI). L'efficacité de la digestion de l'ADN est vérifiée à l'aide d'une amplification par PCR directe. L'ARN est transformée par une *reverse transcriptase* (RT) en ADNc simple brin en utilisant le virus de la leucémie murine de Moloney (MMLV) de la transcriptase inverse (Promega®), selon les instructions du fabricant. L'amplification par PCR de l'ADNc est réalisée comme pour l'ADN.

2.5.2. Amplification par PCR

La région variable V3 du gène de l'ARNr 16S (positions des gènes d'ARNr 16S d'*Escherichia coli* 329-533, Brosius et al. 1981) est amplifiée à la fois pour les extraits d'ADN et d'ADNc. Les amorces universelles bactériennes initiales et inverses utilisées sont la W49 (50 ACG CGV CAG ACT CCT ACG GG-30; Delbès et al. 2001) et la W34 (50 TTA GCC CGG CTG CTG GCA C-30; Lee et al. 1996), respectivement. L'amorce inverse W34 est marquée par fluorescence avec phosphoramidite (TET, Applied Biosystems®, Applied Biosystems Corp., Norwalk, CT) à la position finale 50. L'amplification par PCR est réalisée sur des réactions de 50 mm³ de matrice, d'amorces (concentration finale 0,25 mmol dm⁻³), dNTPs (Eurogentec®, Seraing, Belgique, concentration finale 0,6 mmol dm⁻³) et d'ADN polymérase *Pfu* (1U, Promega®). La zone tampon de la réaction *Pfu* est traitée dans un *Robocycler thermocycleur* (Stratagene®, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Les étapes de PCR sont les suivantes: dénaturation initiale à 94°C pendant 1 min, suivie par 25 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1 min, puis incubation à 61°C pendant 15 s et remonté de la température à 72°C pendant 30 s, avec une phase finale de 10 minutes à 72°C. La taille (longueur des paires de bases de 200) et la concentration des produits de PCR sont déterminées par

électrophorèse sur gel d'agarose (2%) avec un écart de taille d'ADN (échelle d'ADN de masse faible, GIBCO, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

Les dilutions dans l'eau stérile sans nucléases sont faites pour obtenir 10 ng cm^{-3} de produit de PCR. Un mm^3 de la solution diluée est mélangé avec $18,9 \text{ mm}^3$ de formamide (Applera Corp.) et $0,1 \text{ mm}^3$ de standard interne de taille Gene-Scan-400 Rox (Applied Biosystems®, Applera Corp.), dénaturé à 94°C pendant 5 min et immédiatement refroidi sur de la glace pendant 5 min et ensuite injecté de manière électrocinétique (5s, 12 kV) dans un tube capillaire (47 cm x 50 mm) rempli avec 5,6% d'un polymère de Genescan dans un analyseur génétique ABI PRISM 310 (Applied Biosystems®). L'électrophorèse est réalisée à 15 kV pendant 30 minutes à 30°C par échantillon et les données sont recueillies avec le logiciel de collecte de l'ABI PRISM 310 (Applied Biosystems®).

2.5.3. CE-SSCP et traitement des profils

L'analyse CE-SSCP (*Capillary electrophoresis-single strand conformation polymorphism*) est basée sur la migration différentielle des séquences d'ADN monocaténares dans un gel non dénaturant lors d'une électrophorèse capillaire (Orita et al. 1989). La migration est en relation avec la conformation tridimensionnelle de l'ADN monocaténaire, elle-même liée à sa séquence en nucléotide et à sa taille. Pour chaque échantillon, nous obtenons un chromatogramme des communautés bactériennes d'une résolution de 1200 points (nous utiliserons dans ce manuscrit le terme de profil). La grande richesse d'espèces bactériennes présente dans les matrices de prélèvement provoque des co-migrations de ribotypes appartenant à des espèces différentes. De ce fait, chaque pic correspond à un assemblage de ribotypes ayant des mobilités électrophorétiques proches (Loisel et al. 2006). Un marqueur de taille utilisant un fluorochrome différent (5-Rox) est ajouté à chaque échantillon et permet ainsi la comparaison des profils entre eux. Les produits PCR (1 mm^3) sont ajoutés à $7,8 \text{ mm}^3$ de formamide désionisée (Genescan, Applied Biosystem) et $0,2 \text{ mm}^3$ de marqueur de taille (Genescan-HD400). Les fragments amplifiés présentes dans le mix sont dénaturés pendant 5 min à 94°C et placés directement dans la glace pendant 5 min. L'électrophorèse capillaire et la détection laser des produits de migration sont réalisées dans un capillaire de 36 cm avec un séquenceur ABI 3100. La correction de l'alignement et la normalisation des profils sont réalisées avec le script Safum dans Matlab® (Zemb et al. 2007). La normalisation est réalisée telle que l'aire totale sous la courbe du profil CE-SSCP soit égale à 1. Afin de regrouper

les différents échantillons selon leur proximité génétique, des dendrogrammes sont également réalisés à partir du test de similarité de Bray Curtis.

3 Outils statistiques

Les traitements des données des travaux de thèse (suivi *in situ* et minicosmes) nécessitent l'utilisation de divers outils statistiques. Afin de garantir la normalité de toutes nos séries de données, nous leur faisons au préalable subir des transformations logarithmiques de base 10 (log). En plus des traditionnels calculs de moyennes, d'écart types (sd) ou d'erreurs types ($se = sd / \sqrt{n}$), nous établissons des corrélations partielles entre certaines variables et nous réalisons également des tests paramétriques sur notre jeu de données. Toutes ces analyses sont faites sous Microsoft Excel®.

Certaines données du suivi *in situ* (Chapitre 3) demandent d'établir des corrélations partielles entre différentes variables afin de dégager d'éventuelles relations parmi un système environnemental, siège potentiel de nombreuses interactions. Le principe des corrélations partielles est de dégager, dans un premier temps, la relation entre n variables (corrélation multiple) et, dans un second temps, de regarder la relation entre seulement 2 variables de cette corrélation multiple indépendamment des autres variables. Dans notre cas, cette méthode permet de mettre en évidence l'influence réelle d'une variable indépendante (la température, par exemple) sur une variable dépendante (la PB, par exemple) en retirant l'effet de n autres variables (Chl *a*, RB, *phos*,..., par exemple). La significativité des corrélations partielles est donnée selon le degré de liberté ($ddl = n - k - 2$) et la table de référence (Sokal & Rohlf. 1981, Biometry).

Afin de différencier 2 séries de données entre elles, nous utilisons 2 tests paramétriques 1) l'ANOVA (*ANalyse Of VAriance*), dont le principe est de tester significativement la différence de variance entre 2 observations et 2) le test de *Student* ou test *t*, dont le but est de tester statistiquement l'hypothèse d'égalité de l'espérance de deux variables aléatoires suivant une loi normale et de variance inconnue.



CHAPITRE 3

**Suivi annuel des activités hétérotrophes des bactéries marines en baie de
Marseille**

Avant-Propos

La quantité et la qualité des ressources nutritives fluctuent temporellement et spatialement ce qui peut faire varier les facteurs de contrôle des processus bactériens hétérotrophes. Dans les systèmes tempérés, la floraison phytoplanctonique printanière conditionne toute une succession planctonique qui influence les échelons secondaires et l'activité des bactéries hétérotrophes. Nous avons étudié la variabilité saisonnière de 2 facteurs de contrôle des activités hétérotrophes : la température et les ressources nutritives. Dans cette optique, une première partie de cette thèse consiste à réaliser un suivi *in situ* à la station SOLEMIO dans la baie de Marseille.

Durant plus d'une année (Janvier 2012 à Février 2013), un échantillonnage bimensuel est effectué sur trois profondeurs différentes de la colonne d'eau (surface, pic de fluorescence et à proximité du fond) et de nombreux paramètres environnementaux sont mesurés tels que la température, la salinité, la Chl *a* ou les nitrates (Fig. 3.1). En parallèle et en lien avec les caractéristiques biogéochimiques de la zone d'étude, quatre processus hétérotrophes bactériens sont, pour la première fois, simultanément quantifiés durant toute une année : la production bactérienne (PB) avec la méthode de la leucine tritiée, la respiration bactérienne (RB) avec la méthode de Winkler et deux activités ectoenzymatiques, la phosphatase (*phos*) et la protéase (*prot*), avec l'utilisation de substrats fluorogènes (MUF-P et MCA-Leu). Les objectifs étant de 1) décrire simultanément des processus de dégradation, de production et de minéralisation de la MO, 2) étudier la dynamique de ces processus au cours d'un suivi saisonnier, 3) mettre en évidence le ou les paramètres contrôlant ces processus et 4) mieux comprendre l'impact sur le transfert de MO au sein du compartiment bactérien.

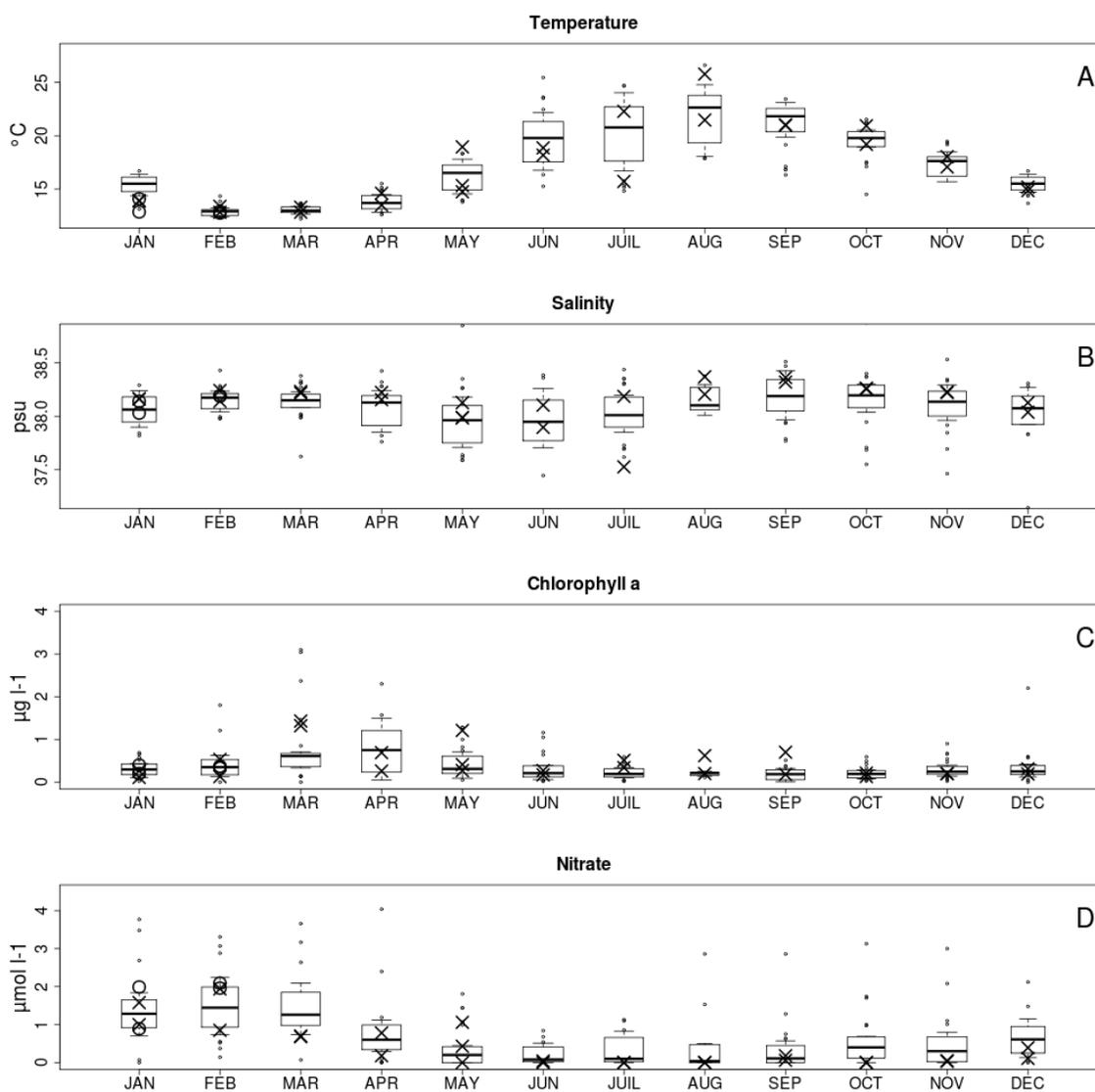


Figure 3.1. Comparaison entre notre suivi annuel (croix de janvier 2012 à Décembre 2012 et cercle de Janvier 2013 à Février 2013) et les moyennes mensuelles (Box plot) calculées sur 11 années de données SOMLIT pour la température (A), la salinité (B), la Chl *a* (C) et les nitrates (D) à la station SOLEMIO en baie de Marseille.

Afin de révéler d'éventuelles périodes de limitation (ou co-limitation) par les ressources, des expériences d'enrichissement sont réalisées tous les mois avec différentes combinaisons d'ajouts de phosphate, nitrate, ammonium et glucose. Ces informations représentent un moyen de comprendre l'origine des changements dans notre écosystème et de pouvoir ainsi expliquer la variabilité des activités hétérotrophes étudiées (PB, RB, *phos* et *prot*) en lien direct avec leur environnement. Tout ce travail a permis la rédaction d'un article scientifique paru dans un volume spécial du programme EC2CO dans la revue *Environmental science and Pollution Research*.

**An annual survey of bacterial production, respiration and ectoenzyme activity in coastal
NW Mediterranean waters: temperature and resource controls**

B. Cea¹, D. Lefèvre¹, L. Chirurgien¹, P. Raimbault¹, N. Garcia¹, B. Charrière^{1,2}, G. Grégori¹, J.F. Ghiglione^{3,4}, A. Barani¹, M. Lafont¹, F. Van Wambeke¹

¹ Aix-Marseille Université, Université de Toulon, IRD, CNRS, Mediterranean Institute of Oceanography (MIO) UMR 7294, Marseille, France

² University Perpignan Via Domitia, Centre de Formation et de Recherche sur les Environnements Méditerranéens, UMR5110, Perpignan, France

³ Laboratoire d'Océanographie Biologique de Banyuls, CNRS, UMR 7621, Banyuls-sur-Mer, France

⁴ Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France

Published on line 14th September 2014 in special issue in *Environmental science and Pollution Research*

Abstract. We simultaneously measured bacterial production (BP), bacterial respiration (BR), alkaline phosphatase activity (*phos*) and ectoaminopeptidase activity (*prot*) in relation to biogeochemical parameters, nutritive resources and *in situ* temperature over a one year survey at the long term observatory SOLEMIO station (Marseille bay, NW Mediterranean sea). Despite its proximity to the coast, oligotrophic conditions prevailed at this station (yearly mean of Chl *a* = 0.43 $\mu\text{g dm}^{-3}$, $\text{NO}_3 = 0.55 \mu\text{mol dm}^{-3}$ and $\text{PO}_4 = 0.04 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Episodic meteorological events (dominant winds, inputs from the Rhone River) induced rapid oscillations (within 15 days) in temperature and sometimes salinity that resulted in rapid changes in phytoplankton succession and a high variability in C:P ratios within the particulate and dissolved organic matter. Throughout the year, BP ranged from 0.01 to 0.82 $\mu\text{g C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and bacterial growth efficiency (BGE) varied from 1 to 39%, with higher values in summer. Enrichment experiments showed that BP was limited most of the year by phosphorus availability (except in winter). A significant positive correlation was found between *in situ* temperature, BP, BR and *phos*. Finally, we found that temperature and phosphate availability were the main factors driving heterotrophic bacterial activity, and thus play a fundamental role in carbon fluxes within the marine ecosystem.

Key words: Bacterial production, Bacterial respiration, Bacterial growth efficiency, Ectoenzymes, phosphorus limitation, SOLEMIO, NW Mediterranean Sea.

1 INTRODUCTION

The dissolved organic carbon (DOC) pool is recycled into new biomass via heterotrophic bacterial production, BP which represents an entry for particulate organic carbon (POC) into the aquatic food web and CO₂ metabolic production through remineralisation, *i.e.* bacterial respiration (BR). The magnitude of DOC flow through the heterotrophic bacterioplankton remains largely unknown because measurements of BP are seldom accompanied by BR measurements (Jahnke and Craven 1995). The bacterial growth efficiency (BGE) relates to the efficiency of the conversion, from dissolved to particulate organic carbon, according to the equation: $BGE = BP / (BP+BR)$. While BGE characterises the dynamics of heterotrophic bacteria, its estimation has a large degree of uncertainty (Jahnke and Craven 1995). Cole and Pace (1995) proposed that the high BGE variability may not be random but related to environmental constraints such as nutrient availability or organic substrate quality. Moreover, a consistent increase in BGE was found along gradients of productivity in aquatic systems, suggesting that BGE may be controlled by resources (Del Giorgio and Cole 1998). Other authors discussed the potential effects of temperature on BGE (Rivkin & Legendre 2001, Apple et al. 2006, López-Urrutia & Morán 2007, Kritzberg et al. 2010b, Berggren et al. 2010), but the relative importance of temperature and resources have not been explored.

Overall, bacterial processes are influenced by the quantity and quality of the organic substrate, as well as the availability of inorganic nutrients. For example, some substrates require enzymatic hydrolysis before uptake (Middelboe and Søndergaard 1993) and different organic molecules exhibit different energy to C ratios, which limits their utilisation by bacteria and therefore influence the bacterial growth efficiency (Vallino et al. 1996). According to the ecological Redfield stoichiometric theory, it has been shown that BGE decreases with increasing C:N and C:P ratios of the natural organic substrates (Kroer 1993, Vallino et al. 1996). Under such conditions, addition of inorganic nutrients stimulated the organic matter uptake by bacteria and the BGE (Kroer 1993, Kragh et al. 2008). As a consequence, heterotrophic bacteria living in oligotrophic oceans could compete with phytoplankton for mineral nutrients, such as N in the South Pacific (Torréon et al. 2000, Van Wambeke et al. 2008) and P in the Sargasso Sea (Cotner et al.

1997, Sebastian & Ammerman 2009). In the Mediterranean Sea, which is one of the most oligotrophic areas of the world's ocean, inorganic phosphorus has been shown to limit both phytoplankton and heterotrophic bacteria growth in certain areas (Krom et al. 1991, Zweifel et al. 1993, Thingstad et al. 1998, Christakill et al. 1999, Pinhassi et al. 2006) and over large longitudinal gradients (Van Wambeke et al. 2002).

In the NW Mediterranean sea, a network of long term observatory stations have been developed incorporating different habitats where the seasonal changes of BP in relation to physical and biogeochemical parameters have been investigated from one to several years (Pinhassi et al. 2006; Alonso-Sáez and Gasol 2007; Alonso-Saez et al. 2008; Lami et al. 2009). Seasonal changes in BGE and ectoenzymatic activities have been less frequently investigated (Negro et al. 2008; Alonso-Saez et al. 2008). Here we investigated the seasonal variation of several components of the carbon flux mediated by heterotrophic bacteria in relation to biogeochemical changes at the long term observatory SOLEMIO station (Marseille bay, NW Mediterranean Sea) by sampling surface seawater every 15 days over a year. Information on the substrate quantity and quality was provided by the biochemical composition of the organic pools (particulate and dissolved C, N, P stocks). We simultaneously measured BP, BR, alkaline phosphatase activity (*phos*) and ectoaminopeptidase activity (*prot*). We evaluated the influence of phosphorus (P), nitrate (N) and carbon (C) on BP in bioassay incubations.

The hydrodynamics of the Marseille Bay is complex and controlled by:

- i) Two dominant winds: north-northwesterly (The Mistral), which favours upwelling from the “Cote Bleue” to the “Calanques”, and south-easterly winds, which favour downwelling. Minas (1968) showed that primary production tripled at a coastal station influenced by upwelling compared with a reference offshore station.
- ii) The oligotrophic North Mediterranean Current (NMC), which flows along the continental slope towards the west (Millot 1990) can occasionally intrude on the shelf (Millot & Wald 1980, Gatti 2008).

The Rhône River mouth is situated 40 km westward from the Marseille Bay. According to observations (Broche et al. 1998) and modelling studies (Estournel et al. 2001, Reffray et al. 2004, Fraysse et al 2013), the Rhône river plume exhibits most of the time a predominant westwards direction and under those conditions does not impact the Marseille Bay. However, a less common orientation toward the east has also been observed (Gatti et al. 2006, Fraysse et al. under review).

The eastward extent is explained by different factors not necessarily related solely to the eastern winds, and including: Rhône river discharge volume, wind shifts and forcings, presence of a mesoscale eddy in the area, and variation in the thermocline depth (Frayse et al. under review). An inventory of Rhône River intrusion events into the Bay of Marseille during the years 2007 to 2011 show an average of only 7.6 intrusions per year with a variable duration from 3 to 10 days (Frayse et al. 2014).

2 MATERIALS AND METHODS

2.1. Study area and sample collection

A time series study was established from January 2012 to February 2013, sampling sea water from the SOLEMIO station located in the Marseille bay (N 43°14'30" and E 05°17'30", 60m depth) (Fig. 3.2), NW Mediterranean Sea. This station belongs to the SOMLIT network (<http://somlit.epoc.u-bordeaux1.fr/fr/>) which records a time series of several environmental parameters throughout the seasons from March 1994. Sampling was performed bi-monthly aboard the R.V. Antedon II using a 20 dm³ Niskin bottle coupled to a Seabird CTD system (SBE 19) for pressure, temperature, conductivity (salinity), fluorescence (chlorophyll *a*) and dissolved oxygen measurements. Our data set is limited to sampling at the surface (1m < S < 5m). Sea water was collected into 2 dm³ polycarbonate bottles, stored in the dark in a portable incubator and set at *in situ* surface temperature. In the laboratory, samples were processed no more than 2 hours after sampling.

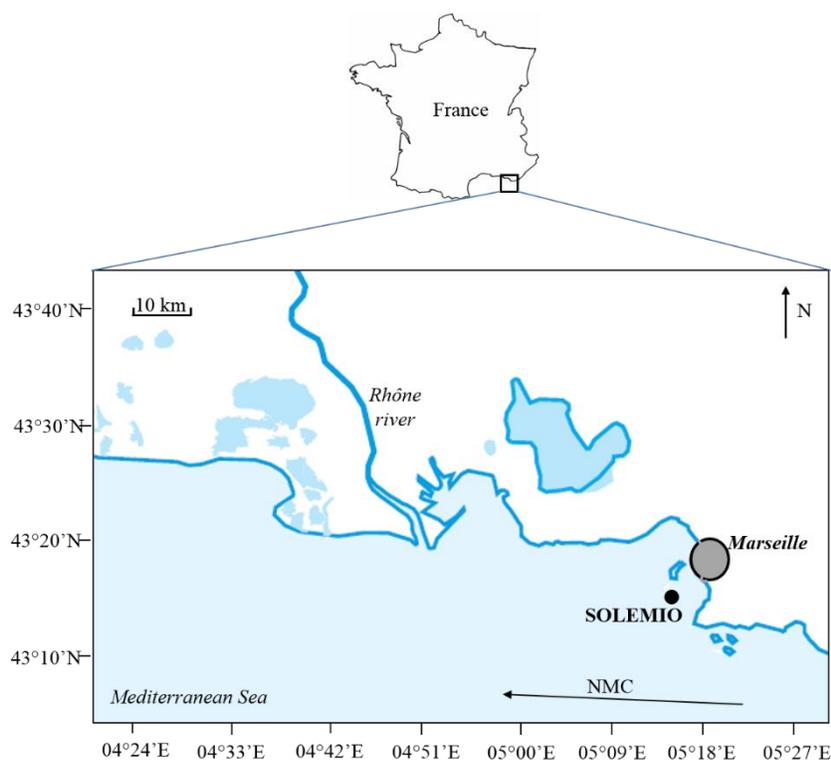


Figure 3.2. Study site (SOLEMIO) location in the Marseille Bay, France, NW Mediterranean Sea. NMC: North Mediterranean Current

2.2. Chemical analysis

A major advantage of sampling at the SOLEMIO station, from the SOMLIT network, is that biogeochemical variables have been measured and recorded since January 2000. Thus we had access to historical data temperature, salinity, chlorophyll *a* concentration (Chl *a*), nitrate, phosphorus, orthosilicic acid (NO_3 , PO_4 , SiOH_4 , respectively), particulate organic carbon and nitrogen (POC and PON). During our study other environmental variables (total nitrogen, total phosphorus, particulate phosphorus) were performed. Chl *a* concentrations were determined by spectrofluorimetry (limit of detection of $0.05 \mu\text{g dm}^{-3}$ and, reproducibility of 5 %) following the method of Raimbault et al (2004). NO_3 , PO_4 , SiOH_4 , TON and TOP concentrations were measured by a Technicon AutoAnalyzer® (limit of detection of $0.5 \mu\text{mol dm}^{-3}$, $0.020 \mu\text{mol dm}^{-3}$, $0.1 \mu\text{mol dm}^{-3}$, $0.1 \mu\text{mol dm}^{-3}$, $0.03 \mu\text{mol dm}^{-3}$, respectively with a reproductibility of 5 %) following the method of Tréguer & Le Corre (1975) and Raimbault et al. (1990). POC and PON concentrations were determined by combustion of particulate matter recovered after filtration (GF/F Whatman® filter 25 mm). The combustion of organic matter product CO_2 , CO (if combustion is incomplete) and NO_x which are converted in CO_2 and N_2 then separate by gas chromatography and quantified

by TCD (Thermal Conductivity Detector) detector type (limit of detection of $10 \mu\text{g dm}^{-3}$ and $5 \mu\text{g dm}^{-3}$, respectively and, reproducibility of 10 %) following the method of Aminot & K erouel (2004). DON and DOP concentrations were derived from TON minus (PON+ $\text{NO}_3+\text{NO}_2+\text{NH}_4$) concentrations, and from TOP minus (POP + PO_4) concentrations, respectively. Samples for POP analysis were determined by Chemical wet-oxydation (limit of detection of $0.005 \mu\text{mol dm}^{-3}$ with a reproducibility of 10 %) following the method of Raimbault et al. (1999). For this method 250 cm^3 of sea water was filtered from each depth through glass microfiber filters. TOC samples were collected in pre-combusted ($450 \text{ }^\circ\text{C}$ for 4 to 5 hours) glass ampoules, immediately acidified with a drop of $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ orthophosphoric acid, flame-busted and stored at $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ until analysis. TOC analysis were performed using high temperature combustion on a Shimadzu® TOC-5000 total organic carbon Analyzer (limit of detection of $0.1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ and reproducibility of 2 %) following the method of Cauwet (1994). All DOC concentrations reported were derived from the difference between TOC and POC concentrations from each sample.

2.3. Prokaryote and phytoplankton counting

Flow cytometry analyses were carried out at the PRECYM flow cytometry platform (<https://precym.mio.univ-amu.fr/>). Samples were analysed using a FACSCalibur (BD Biosciences® San Jose, CA). For heterotrophic bacterial abundance (BA), 1.8 cm^3 of sea water was fixed with formaldehyde (2% final concentration, 15 min incubation at RT) frozen and stored in liquid nitrogen until analysis in the laboratory. After rapid thawing, samples were incubated with SYBR Green II (SIGMA, final conc. 0.05% [v/v] of the commercial solution, for 15 min, at 20°C in the dark) in order to stain the nucleic acid and analysed according to Marie et al. (1997). Prochlorococcus were excluded from the counts, thanks to their red fluorescence which is induced by photosynthetic pigments.

Some of the phytoplankton, the ultraphytoplankton (Synechococcus, Prochlorococcus, picophytoeukaryotes and nanophytoeukaryotes) were analysed using flow cytometry to determine abundance. 4.5 cm^3 of seawater was collected and samples were processed as for bacterial samples (fixation with formaldehyde, freezing and storage in liquid nitrogen). In the present study, the red fluorescence of the cells ($> 650 \text{ nm}$, ChloroA) related to the chlorophyll *a* content of phytoplankton cells. These cells were also characterised by 3 other optical signals: forward scatter (FSC) related

to cell size, side scatter (SSC) related to cell structure, and orange fluorescence (564 - 606 nm - PE) related to phycoerythrin using the techniques found in Grégori et al. (2001).

All data were collected using the CellQuest software (BD Biosciences®) and the analysis of the bacteria and the ultraphytoplankton groups were performed using SUMMIT v4.3 software (Beckman Coulter®). TruCount beads (BD Biosciences®) were added to the samples to accurately determine the volume analysed. Polystyrene beads (2 µm in diameter) were used as an internal standard and to discriminate between picoplankton (<2µm) and nanoplankton (>2µm) populations (Fluoresbrite YG, Polyscience). Diatom quantification was carried out by microscopy using the Lugol-fixed samples. Identification and counting of nano and microplankton was carried out by direct observation using an inverted microscope according to Utermöhl method.

2.4. BP, CR, BR and BGE

Bacterial production (BP) was estimated using the ³H-leucine (Leu) incorporation technique (Kirchman et al. 1985), adapted to the centrifugation method (Smith & Azam 1992). For each sample, triplicate aliquots (1.5 cm³) and one trichloroacetic acid (TCA) killed control were incubated with a mix of 6 nmol dm⁻³ hot leucine (L-[³H] leucine, Perkin Elmer® specific activity ranging 107-144 Ci mmol⁻¹) and 14 nmol dm⁻³ cold leucine in the dark, at *in situ* temperature, for 2 h. Preliminary experiments confirmed that leucine incorporation was linear during this period. The live incubations were terminated with 5 % TCA (final concentration). After three runs of centrifugation/aspiration of the supernatant (once with the fixed sea water sample, once with a 5% TCA rinse, once with an 80% ethanol rinse), the pellet was resuspended in Packard Ultima Gold MW Scintillation liquid®. Radioactivity was counted using a Liquid Scintillation Analyzer Packard® 2100 TR and the 3H counting efficiency was corrected for quenching. Concentration kinetic experiments showed that isotopic dilution was negligible when using 20 nmol dm⁻³ leucine and thus BP rates were calculated from leucine incorporation rates using the conversion factor of 1.5 kg C mol⁻¹ leucine and given in µg C dm⁻³ h⁻¹. Daily rates were calculated assuming they are 24 times the hourly rate.

Community respiration (CR) was determined from non-filtered sea water using the Winkler method and given in µg C dm⁻³ h⁻¹. Four replicate 125 cm³ borosilicate glass bottles were carefully filled and four other replicates were immediately fixed with Winkler reagents to determine the

initial oxygen concentration. The replicate bottles were incubated in the dark, at *in situ* temperature, and fixed with Winkler reagents after 24 h. Dissolved oxygen measurements were made using an automatic colorimetric endpoint detector (Williams & Jenkinson 1982). The respiration rate was determined by dividing the oxygen concentration difference (initial – final) by the incubation time, assuming a linear consumption of oxygen with time. In order to determine the bacterial respiration rate (BR), incubations were performed on filtrate that had passed through a 0.6 μm polycarbonate filter. BR was on average 90% of CR ($n = 4$), which is a mean value of $67 \pm 9\%$ greater than previously observed in the open NW Mediterranean Sea (Lemée et al. 2002). The fraction of CR attributed to BR could be overestimated with the classical method of filtration. Aranguren-Gassis et al. (2012) found the following relationship: $\text{BR} = 0.3 \times \text{CR}$ from *in vivo* ETS experiments in 2 contrasting environments: the highly productive Ría de Vigo (NW Spain) and the North Atlantic oligotrophic gyre. This fraction can also vary during incubation with some changes in the bacterial community composition (Massana et al. 2001).

Applying a constant BR fraction from 30 % to 100 %, the absolute BGE values would vary but the seasonal trend of BGE would not change. Having no systematic seasonal estimates of BR, we kept 0.9 to calculate the BR fraction for the whole period of this study. We assumed a respiratory quotient of 0.8 (del Giorgio & Williams 2005). Thereby, owing to the difficulty of estimating the BR fraction within CR, BGE was calculated as $\text{BGE} = \text{BP} / (\text{BP} + 0.9 \times \text{CR})$ with BP and BR expressed in $\mu\text{g C dm}^{-3} \text{h}^{-1}$ and where CR was calculated from the incubations described above and BP was determined using the incorporation of leucine in non-filtered sea water at each depth at the sampling time. Due to technical problems, accurate measurements of respiration rates started only in March 2012.

2.5. Ectoenzymatic activity

Alkaline Phosphatase activity (*phos*) was measured fluorometrically using methylumbelliferone phosphate (MUF-P) following the method of Hoppe 1983. 30 mm^3 of a 0.1 mmol dm^{-3} MUF-P solution was added to 3 cm^3 of seawater sample and then allequoted into a 1 cm PMMA cuvette for measurement. Stock solutions of 5 mmol dm^{-3} MUF-P in methylcellosolve were stored at -20°C and diluted with boiled filtered sea water prior to use. The linear increase in fluorescence in the sea water samples with added MUF-P was measured over the incubation time

(from 2 to 5 hours), in the dark at *in situ* temperature (excitation at 365 nm and emission at 460 nm), using a Kontron® SFM 23B spectrofluorometer. Calibration curves were made using MUF standards diluted in boiled seawater. The kinetic coefficients were determined on surface sea water samples using a range of concentrations of MUF-P from 25 to 1000 nmol dm⁻³. The Michaelis-Menten equation was used to determine kinetic coefficients: $V = (V_m \times S) / (K_m + S)$, where S is the MUF-P concentration and V the hydrolysis rate. V_m (nmol dm⁻³ h⁻¹) and K_m (nmol dm⁻³) have been specified from a non-linear regression calculated with the PRISM software. Then, the $K_m:V_m$ ratio enabled the estimation of the Turnover time (h) of the enzymatic reaction. Blanks were run by adding the MUF-P to filtered boiled sea water and were shown to be insignificant.

Protease activity (*prot*), was determined by measuring the hydrolysis rate of L-leucine-4-methyl-7-coumarinylamide (leu-MCA, Sigma), which is used as an analogue substrate for natural peptides (Hoppe 1983). Stock solutions of 10 mmol dm⁻³ leu-MCA were prepared in methylcellosolve and kept at -20°C. As for *phos*, concentration kinetics were undertaken for sea surface layers, but using a range of concentrations of leu-MCA from 0.5 to 400 µmol dm⁻³ and setting the excitation to 380 nm and the emission to 440 nm. Samples for *prot* were incubated, in the dark, at *in situ* temperature during the analysis time. *Phos* and *prot* were determined from non-filtered sea water and only V_m was conserved in the time series with their corresponding K_m .

2.6. Enrichment experiments

The availability of phosphorus (P), nitrate (N) and carbon (C) in the sea water column was investigated by measuring changes in bacterial production following additions of PO₄ (0.25 µmol dm⁻³ P), NO₃ and NH₄ (1 µmol dm⁻³ each) or glucose (10 µmol dm⁻³ C) (final concentrations). Several bioassays were realised: P, N, C, PN, PC, NC and PNC including the non-enriched control (T). Each bioassay condition was made in triplicate in 60 cm³ polycarbonate bottles incubated at *in situ* temperature, in the dark over 48h. Following incubation, each bottle was sub-sampled in order to measure BP. BP subsamples were determined with the leucine technique described above using the same temperature conditions as for the bioassays (in the dark, for 2h).

2.7. Statistical analysis

Our observations were *log* transformed to stabilise the heterogeneity of variance before computing statistics. We used a t-test for listing significant differences ($p < 0.05$) between different combinations of enrichment experiments. From matrices of linear correlation, we examined partial correlation coefficients (r) between the heterotrophic bacterial rates (BP, BR, *phos* and *prot*), *in situ* temperature and Chl *a*. As the number of observations differ for each variable, we carried out the analysis on a set of 3 or 4 variables at a time, based on the common number of observations. The significance of r was considered for $p = 0.05$, $p = 0.01$ and $p = 0.001$ according to the degree of freedom ($df = n - k - 2$ with $k =$ number of variables and $n =$ number of observation).

3 RESULTS

3.1. Environmental factors

The SOLEMIO station (depth 60 m) is situated in the Gulf of Lion (North Western Mediterranean Sea) to the south of the Marseille Bay 6 km off the coast, next to the Frioul Islands. The hydrodynamics are mostly governed by the winds, general circulation of the North Mediterranean Current, (NMC), bathymetry and the Rhône river influence. The wind direction compass (Fig. 3.3) showed two major winds: north westerly: The Mistral and south easterly winds. The water temperature at the sea-surface varied between 12.8 °C in January and 25.8 °C in August (Table 3.1 and Fig. 3.4A) with a cooling event in July (15.7 °C) caused by the Mistral. Salinity was homogeneous over the water column (38.15 ± 0.02) except during the summer stratified condition where one lower salinity event (offset with the cooling event) was recorded in July (37.5 in upper layers, Fig. 3.4B) which appeared to be induced by a freshwater Rhône intrusion towards the Marseille Bay (<http://www.previmer.org>). Indeed, salinity < 37.8 is considered as a threshold for an intrusion of Rhône River waters into the bay of Marseille (Gatti et al. 2006, Pairaud et al. 2011).

Table 3.1. Summary of the variables measured in sea-surface waters at the SOLEMIO station from January 2012 to February 2013 showing observation period, maximum value, minimum value, average and SE. * Values cited excluding 3 outliers, see discussion.

Sea-surface variable	Period	Min	Max	Average (\pm SE)
Environmental factors				
Temperature ($^{\circ}$ C)	Jan 12 – Feb 13	12.8	25.8	16.7 (\pm 0.7)
Salinity (psu)	Jan 12 – Feb 13	37.53	38.37	38.15 (\pm 0.03)
Chl <i>a</i> (μ g dm ⁻³)	Jan 12 – Feb 13	0.13	1.43	0.43 (\pm 0.07)
Nitrate (μ mol dm ⁻³)	Jan 12 – Feb 13	0.00	2.09	0.55 (\pm 0.13)
Phosphorus (μ mol dm ⁻³)	Jan 12 – Feb 13	0.00	0.10	0.04 (\pm 0.01)
Silicate (μ mol dm ⁻³)	Jan 12 – Feb 13	0.18	3.57	1.84 (\pm 0.14)
Organic matter (μmol dm⁻³)				
DOC	Jan 12 – Feb 13	46	180	90 (\pm 10)
DON	Jan 12 – Feb 13	4	11	7 (\pm 1)
DOP	Jan 12 – Feb 13	0.08	0.56	0.31 (\pm 0.04)
POC	Jan 12 – Feb 13	0.87	14.15	5.53 (\pm 0.64)
PON	Jan 12 – Feb 13	0.21	3.10	0.88 (\pm 0.12)
POP	Jan 12 – Feb 13	0.018	0.070	0.040 (\pm 0.005)
Cellular abundance				
Heterotrophic bacteria ($\times 10^5$ cell cm ⁻³)	Jan 12 – Feb 13	2.467	14.020	5.716 (\pm 0.499)
Synechococcus ($\times 10^5$ cell cm ⁻³)	Jan 12 – Feb 13	0.046	1.357	0.416 (\pm 0.091)
Prochlorococcus ($\times 10^5$ cell cm ⁻³)	Jan 12 – Feb 13	0.018	0.567	0.180 (\pm 0.037)
Picophytoplankton ($\times 10^5$ cell cm ⁻³)	Mar 12 – Dec 12	0.003	0.163	0.051 (\pm 0.010)
Nanophytoeukaryotes ($\times 10^5$ cell cm ⁻³)	Jan 12 – Feb 13	0.010	0.044	0.022 (\pm 0.002)
Diatoms ($\times 10^5$ cell dm ⁻³)	Mar 12 – Dec 12	0.00	1.41	0.11 (\pm 0.07)
Heterotrophic bacterial activities				
Bacterial production (μ g C dm ⁻³ h ⁻¹)	Jan 12 – Feb 13	0.01	0.82	0.10 (\pm 0.03)
Community respiration (μ g C dm ⁻³ h ⁻¹)	Mar 12 – Feb 13	0.11	2.32	0.59 (\pm 0.13)
<i>Phos</i> (Vm: nmol dm ⁻³ h ⁻¹)	Jan 12 – Feb 13	0.1	116.5	15.7 (\pm 6.0)
<i>Prot</i> (Vm: nmol dm ⁻³ h ⁻¹)	Mar 12 – Feb 13	5.1	85.1	28.0 (\pm 8.8)
BGE (%) = BP / (BP + 0.9 x CR) x 100	Mar 12 – Feb 13	1	39	17 (\pm 2)

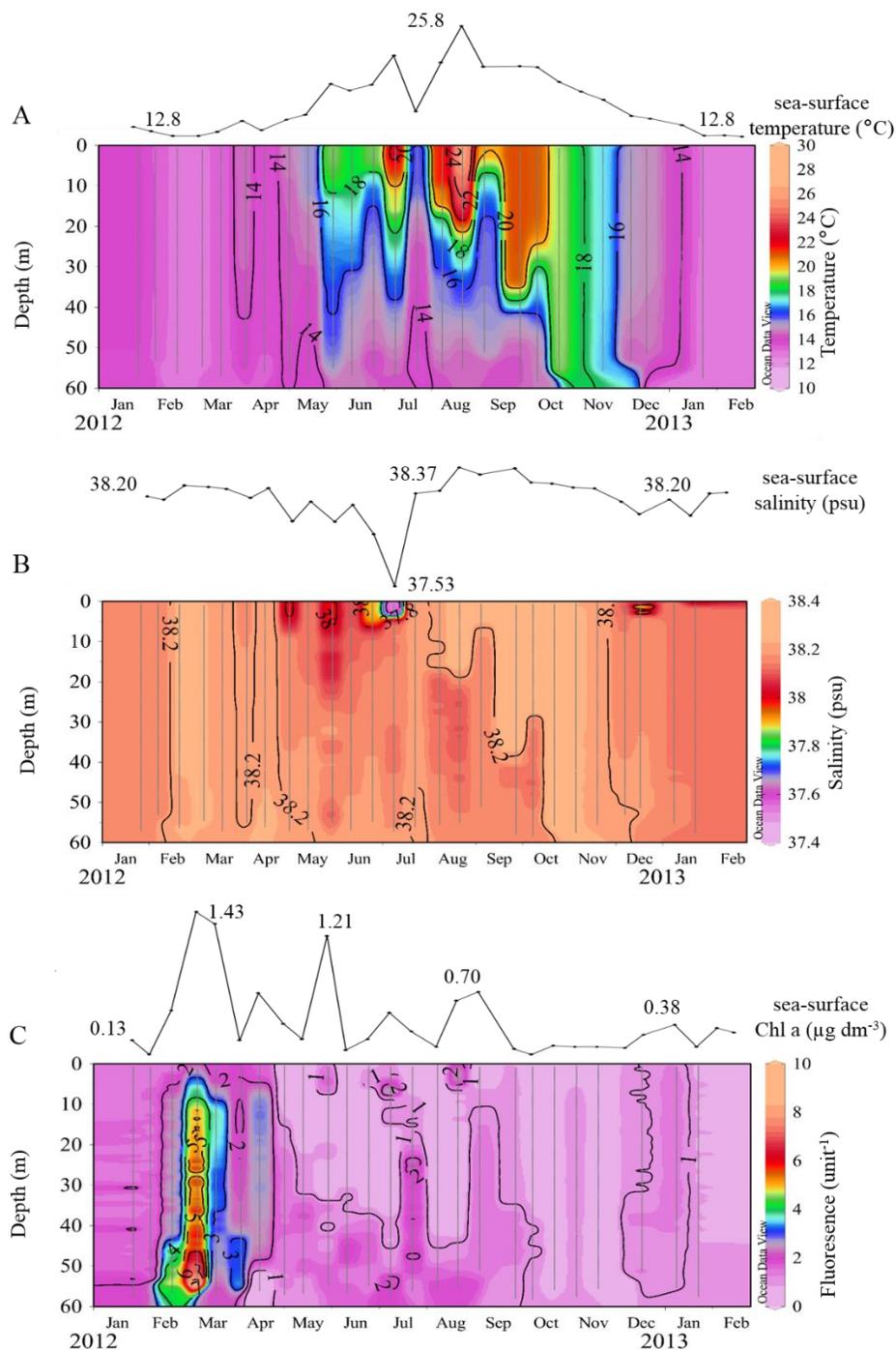


Figure 3.4. (A) Temperature, (B) salinity and (C) fluorescence vertical profiles at SOLEMIO station during the survey (January 2012 to February 2013). Dots indicate sampling depths. Above contour plots show sea surface discrete temperature, salinity and Chl *a* time series. (Courtesy of SOMLIT data base)

Chl *a* was generally low and varied between 0.2 to 0.5 $\mu\text{g dm}^{-3}$ at the sea-surface, except in late February and March when values reached 1.43 $\mu\text{g dm}^{-3}$ (Fig. 3.4C). Highest SiOH_4 , NO_3 and PO_4 concentrations (between 1.5 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ and 2.09 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, 0.08 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ and 0.10 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ and 2 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ and 3.57 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, respectively) were observed (Fig. 3.5A, 3.5B and 3.5C) during the winter (January and February 2012, 2013) characterised by a homogeneous water column (data not shown), rich in nutrients (NO_3 , PO_4 and SiOH_4) and under the effect of the Mistral and a few strong southeasterly wind events. Inversely, when summer arrived, stratification of the water column occurred, with lower nutrient concentrations (NO_3 , PO_4 and SiOH_4), with a period showing shifts between a calm and a few events period of low Mistral and southeasterly winds. Summer is characterized by the lowest NO_3 and PO_4 concentrations (below 0.5 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ and below detection limits of 0.03 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, respectively). Despite a period of depletion, SiOH_4 was always higher than 1 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ in the deeper layers (data not show) and increased progressively and earlier (in October) than NO_3 and PO_4 , this being visible particularly at the sea-surface.

3.2. Organic matter (C, N, P)

Three peaks of DOC ($> 130 \mu\text{mol dm}^{-3}$) were observed in January, March, August and November (Fig. 3.5D) whereas the lowest concentrations ($< 50 \mu\text{mol dm}^{-3}$) were measured in March and April. DON increased from 4 to 11 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ (Fig. 3.5E) during the survey with lowest values observed in January and February 2012 and highest values during the summer stratified conditions. DOP concentrations stayed low throughout the survey ($< 0.6 \mu\text{mol dm}^{-3}$) and ranged from 0.08 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ at the beginning of the cruise to 0.56 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ at the end (Fig. 3.5F). POC concentrations increased from the spring bloom period to reach its highest values in May, June and August and decreased from September down to 2 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ in winter (Fig. 3.5G). From September to February 2013, the POC average concentration was $3.08 \mu\text{mol dm}^{-3} \pm 0.17$.

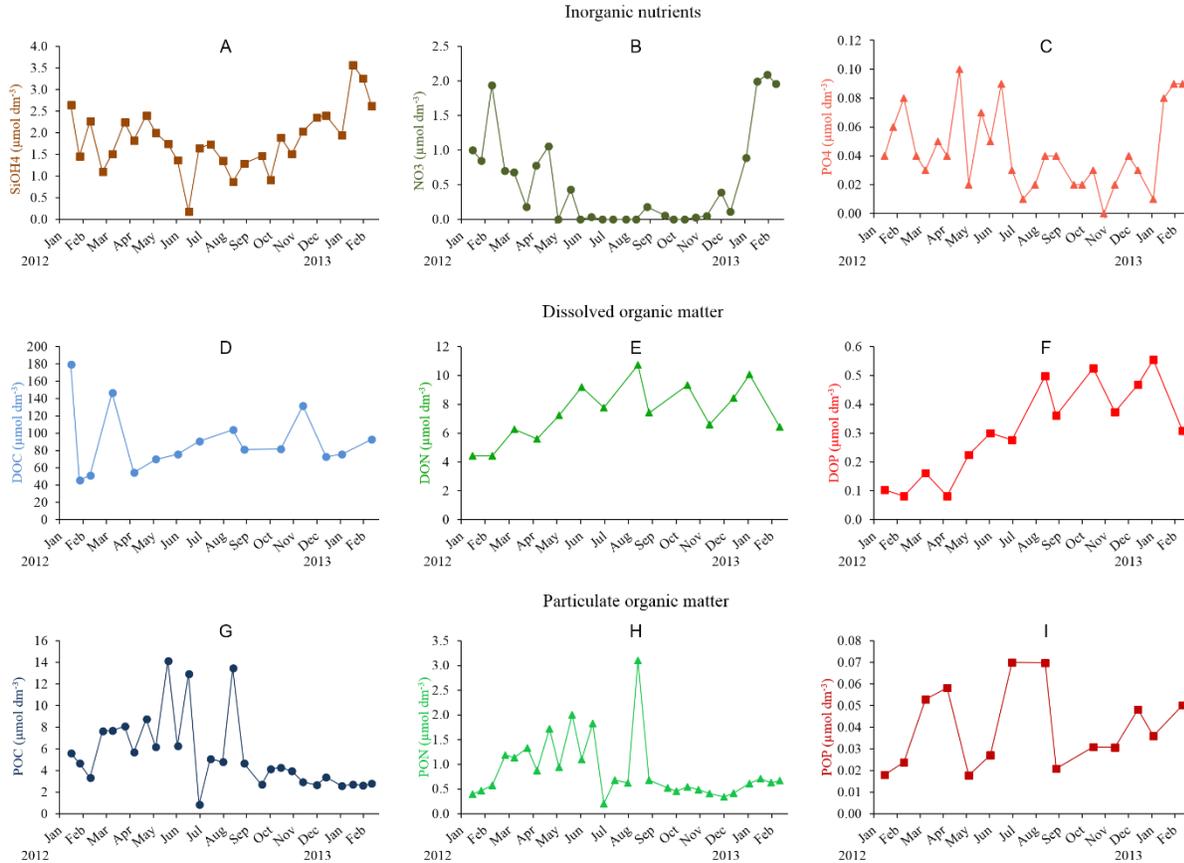


Figure 3.5. Concentrations of i) inorganic nutrients: orthosilicic acid (A), nitrate (B) and phosphate (C), ii) dissolved organic matter: DOC (D), DON (E) and DOP (F) and iii) particulate organic matter: POC (G), PON (H) and POP (I) at the SOLEMIO station during the survey

Similarly, PON concentrations began to increase from the spring bloom period, and reached a maximum during the stratified period in August and decreased from September to homogenise around $0.51 \mu\text{mol dm}^{-3} \pm 0.03$ during the winter mixed period (Fig. 3.5H). POC and PON showed their lowest values in July ($0.87 \mu\text{mol dm}^{-3}$ and $0.21 \mu\text{mol dm}^{-3}$, respectively). There were 3 periods of high POP concentrations ($> 0.05 \mu\text{mol dm}^{-3}$): the spring bloom period (in March), the stratified period in summer (June, July and August) and the mixed period in winter (December, January and February 2013) (Fig. 3.5I). POC:PON ratios were stable, around 6.7 ± 0.4 with a decrease at the end of the survey (about 4). POC:POP ratios ranged from 13 to 348 and PON:POP ratios from 3 to 53 during the survey. For dissolved organic matter, the annual average DOC:DON ratio was 10 ± 1 , that of DOC:DOP ratio 306 ± 55 and DON:DOP 31 ± 4 . Annual variability of C:N, C:P and N:P ratios for particulate organic matter were higher than those of dissolved organic matter (32% versus 20%, 64% versus 60% and 61% versus 51%, respectively).

3.3. Cell abundance

Cell abundance is characterized by a succession of phytoplanktonic and bacterioplanktonic populations. Indeed, the maximal abundance of diatoms occurred in March (Fig. 3.6A) with the beginning of the spring phytoplankton bloom (from February to May). Then, their abundance dropped rapidly and remained low for the rest of the survey ($< 1,000 \text{ cell dm}^{-3}$) except for two peaks in July and August. The abundance of picophytoplankton (cells $< 2 \mu\text{m}$ in size) increased during mixing (from December to February 2013) and during the spring phytoplankton bloom. The abundance of nanophytoeukaryotes was relatively stable, except for some small increases in April and August and from December to February 2013. The abundance of *Synechococcus* reached its maximum in April and May after the spring phytoplankton bloom, then in August during the stratification period (Fig. 3.6B). The abundance of *Prochlorococcus* was low during the spring phytoplankton bloom but increased from August to December. Heterotrophic bacteria (BA) were at a maximum (peaked) at the end of the spring phytoplankton bloom (late March and April) with some peaks in May and June, remaining stable during other periods (Fig. 3.6C). The first phase of this bloom was dominated by diatoms and picophytoplankton whose growth stopped following the depletion of SiOH_4 in the water column. This is followed by a change in phytoplankton dominance with the arrival of non-siliceous organisms the cyanobacteria (*Synechococcus* and *Prochlorococcus*) and then an increase in heterotrophic bacteria. Thus, the transition period between mixed and stratified conditions is marked by a spring phytoplankton bloom characterized by maximum Chl *a*, NO_3 and PO_4 concentrations together with high particulate organic matter concentrations (C, N, P).

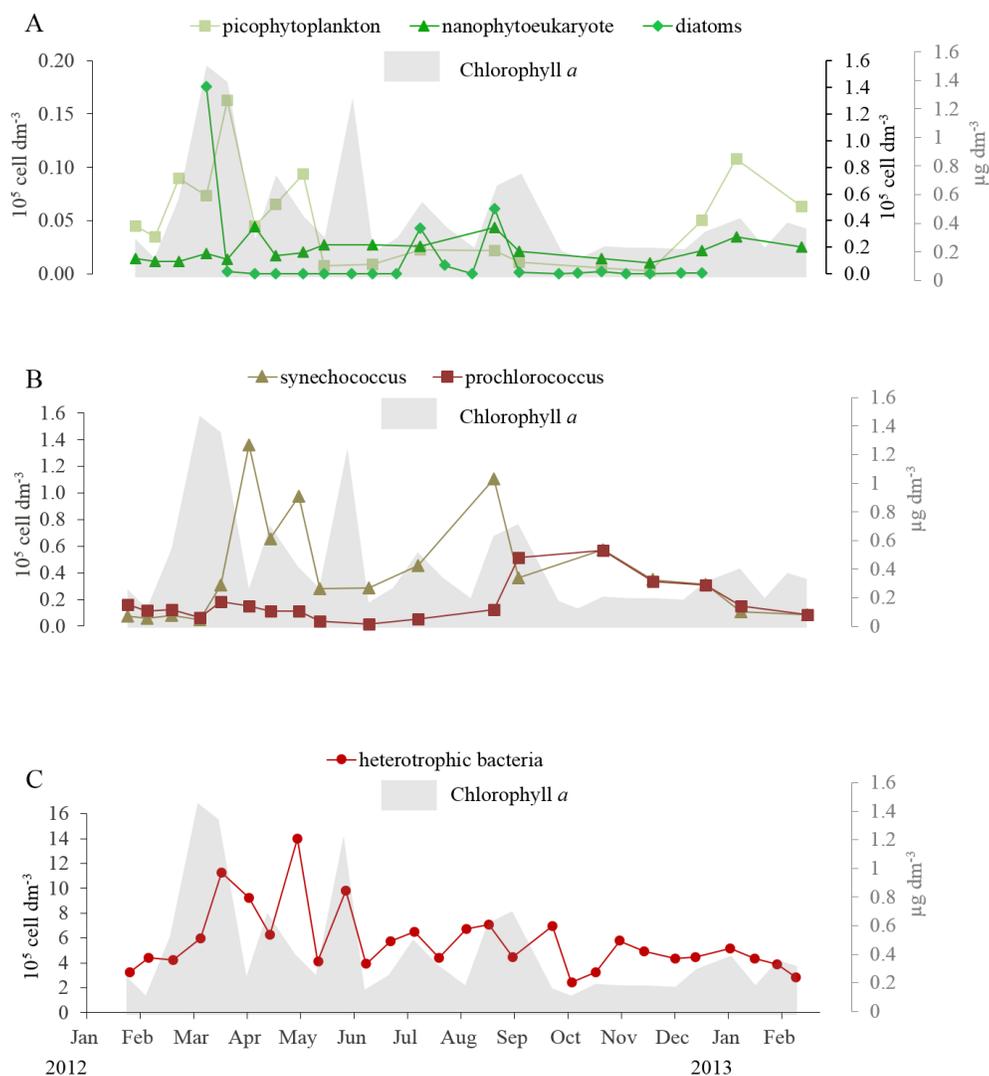


Figure 3.6. Time series of abundance of (A) picophytoplankton, nanophytoeukaryote and diatoms, (B) cyanobacteria and (C) heterotrophic bacteria with Chl *a* at the SOLEMIO station during the survey

3.4. Heterotrophic bacterial activity and growth efficiency

The highest BP values ($> 0.2 \mu\text{g C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) were observed during the summer (late May, June, July and August) with a smaller BP increase (0.05 to $0.2 \mu\text{g C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) during the spring bloom period (in March and April) in the upper layers (Fig. 3.7A). Maximum CR values ($> 1 \mu\text{g C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) were observed during the summer period (from May to August) (Fig. 3.7B). During the remainder of the survey, CR varied from 0.2 to $0.8 \mu\text{g C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

The lowest BGE (1 % to 10 %) were generally obtained in winter (from October 2012 to February 2013), whilst the highest BGE (20 % to 39 %) was found, during summer (Fig. 3.7B). However, a low BGE (5 %) was found in August, during the temperature peak (25.8°C) coinciding with a period of delayed increase in BP with regard to BR. During the spring bloom (March, April), BGE was around 15 %.

Maximum rates of *phos* occurred in the summer (Fig. 3.7A) especially within surface layers (late in May, June, July and early in August), during stratification where the water column was P limited (Table 2). However, *phos* had already started to increase during the spring bloom period with values $> 4 \text{ nmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Like *phos*, *prot* reached its highest values in summer (July and August) (Table 3.2). Lower *prot* ($< 20 \text{ nmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) values were observed during the winter. Cell-specific MCA-Leu hydrolysis rates at the SOLEMIO station ranged between 15 to $131 \times 10^{-18} \text{ mol MCA-Leu cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$, cell specific MUF-P hydrolysis ranged from 0.3 to $163 \times 10^{-18} \text{ mol MUF-P cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Table 3.2. Maximum hydrolysis rates (V_m) and half saturation constant (K_m) of *prot* and *phos* measured during the survey (January 2012 to February 2013).

Time	<i>Prot</i>		<i>Phos</i>	
	V_m ($\text{nmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)	K_m ($\mu\text{mol dm}^{-3}$)	V_m ($\text{nmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)	K_m ($\mu\text{mol dm}^{-3}$)
March 12	45.6 (± 5.2)	102.1 (± 31.1)	4.3 (± 0.3)	114.0 (± 24.6)
April 12	12.4 (± 0.6)	40.1 (± 6.3)	4.0 (± 0.1)	111.8 (± 12.0)
May 12	21.8 (± 4.1)	122.5 (± 56.4)	11.3 (± 0.4)	117.9 (± 14.0)
July 12	85.1 (± 4.2)	83.1 (± 11.4)	67.5 (± 2.6)	145.7 (± 17.4)
August 12	81.3 (± 5.9)	63.6 (± 14.0)	115.7 (± 2.7)	346.1 (± 19.5)
September 12	12.2 (± 0.7)	67.2 (± 11.0)	3.0 (± 0.2)	163.0 (± 37.1)
October 12	14.5 (± 0.8)	62.1 (± 10.0)	4.8 (± 0.3)	131.0 (± 23.0)
November 12	7.4 (± 0.9)	41.8 (± 17.5)	2.9 (± 0.4)	47.1 (± 83.2)
December 12	7.3 (± 0.5)	42.2 (± 10.0)	2.6 (± 0.8)	471.2 (± 318.1)
January 13	16.9 (± 2.9)	151.2 (± 59.3)	0.7 (± 0.1)	65.0 (± 33.6)
February 13	5.1 (± 0.3)	35.5 (± 8.5)	0.1 (± 0.0)	273.8 (± 86.3)

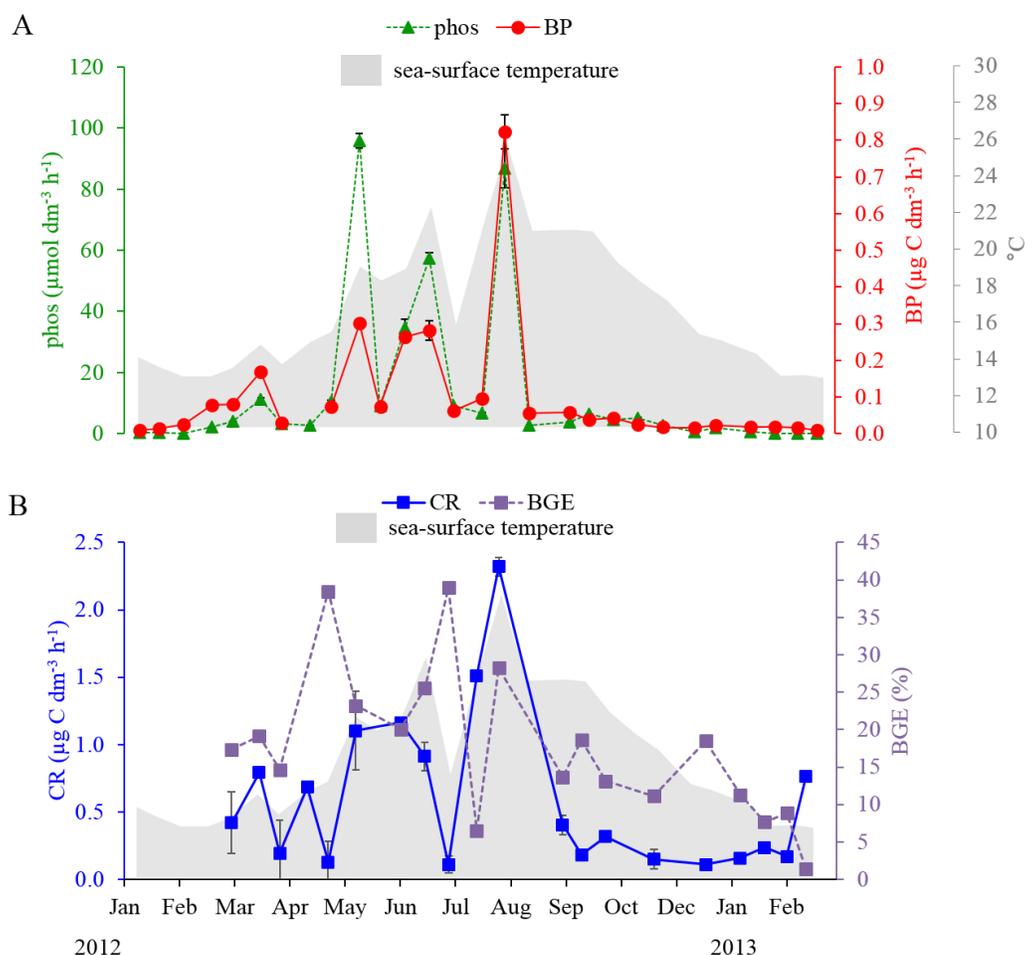


Figure 3.7. Time series of (A) bacterial production and phosphatase activity and (B) community respiration and bacterial growth efficiency ($\text{BGE} = \text{BP} / (\text{BP} + 0.9 \times \text{CR})$) with sea-surface temperature at the SOLEMIO station during the survey

The coefficients of partial correlation (Table 3.3) calculated from respective correlation matrices (data not shown) revealed that i) only *phos* and BP showed a significant relationship independently to *prot* and BR ($r(\text{BP-phos}) = 0.91$, $\text{df} = 4$, $p < 0.01$), ii) BP, BR and *phos* were correlated with *in situ* temperature independently to Chl *a* ($r(\text{BP-in situ temperature}) = 0.76$, $\text{df} = 23$, $p < 0.001$; $r(\text{BR-in situ temperature}) = 0.62$, $\text{df} = 14$, $p < 0.05$; $r(\text{phos-in situ temperature}) = 0.79$, $\text{df} = 23$, $p < 0.001$); and iii) only BP was correlated to Chl *a* independently to *in situ* temperature ($r(\text{BP-Chl } a) = 0.62$, $\text{df} = 23$, $p < 0.01$).

Table 3.3. Partial correlation coefficients between *in situ* temperature, Chl *a*, *phos*, *prot*, BP and BR calculated from *log* transformed data with probability values of $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***). Values in bracket are the degree of freedom for each partial correlation.

	<i>Phos</i>	<i>Prot</i>	BP	BR
<i>Phos</i>	nd			
<i>Prot</i>	-0.45(4)	nd		
BP	0.91**(4)	0.74(4)	nd	
BR	-0.76(4)	-0.43(4)	0.79(4)	nd
	<i>Phos</i>	<i>Prot</i>	BP	BR
<i>in situ</i> temperature	0.79***(23)	0.66(6)	0.76***(23)	0.62(14)
Chl <i>a</i>	0.46(23)	0.62(6)	0.62**(23)	0.32*(14)

3.5. Bacterial response to nutrient enrichment

The highest increase in BP relative to the control was recorded in the PNC amended bottles, and ranged from x 0.7 to x 40.6 (Table 3.4). Overall, there was a significant stimulation in BP following P addition (in 7 out of the 14 surveys) while only one stimulation was observed from N addition (February 2013) and two cases from C addition, (January 2012 and October). BP was significantly stimulated when two different nutrients were added: PC in March and April and PN, NC in December. It was never necessary to add the three elements PNC together to trigger a stimulation of BP.

Table 3.4. Enrichment factors relative to the corresponding unamended control after 48 h of incubation. xP: PO₄ alone, xN: NO₃+NH₄, xC: glucose alone, xPN: PO₄+NO₃+NH₄, xPC: PO₄ + glucose, xNC: NO₃+ NH₄+glucose and xPNC: PO₄+ NO₃+ NH₄+glucose: (*) rate of BP after 48h of amendment significantly different from that in the unamended control (t - test, p < 0.05 and df = 4).

Time	xP	xN	xC	xPN	xPC	xNC	xPNC
January 12	0.7	1.0	4.2*	1.0	4.5*	4.1*	9.1*
February 12	1.0	1.3	1.1	0.9	1.1	2.1	1.4*
March 12	2.3	1.0	1.2	2.0	6.3*	1.3	8.3*
April 12	1.2	1.1	1.0	1.3	10.3*	0.9	7.1*
May 12	10.0*	0.8	0.7	13.6*	11.4*	0.8	18.0*
Jun 12	4.9*	0.8	0.8	12.7*	4.7*	1.0	0.9
July 12	3.7*	1.0	1.0	10.0*	7.6*	1.3*	11.1*
August 12	6.0*	1.5	1.4	6.4*	5.2*	1.0	8.0*
September 12	2.5*	1.2	1.1	3.6*	2.6*	0.9	4.1*
October 12	15.4*	1.1	1.2*	23.8*	13.8*	0.9	25.7*
November 12	7.3*	0.8	1.1	38.3*	16.5*	0.5	40.6*
December 12	1.2	1.1	0.9	4.0*	1.1	1.7*	17.6*
January 13	0.8	1.3	0.9	1.7	1.3	0.9	3.7*
February 13	0.8	1.8*	1.0	nd	1.8	1.2	nd

4 DISCUSSION

4.1. Heterotrophic bacterial activity and BGE

Overall, the range of BP and CR recorded at the long term coastal observatory SOLEMIO station (from 0.01 to 0.82 $\mu\text{g C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and from 0.11 to 2.32 $\mu\text{g C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectively) were close to BP and BR encountered at the coastal observatory of Blanes bay (NW Mediterranean Bay) (from 0.01 to 0.85 $\mu\text{g C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and from 0.17 to 2.00 $\mu\text{g C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectively) (Alonso-Saez et al. 2008). However, *prot* hydrolysis rates at SOLEMIO (5.1 to 85.1 $\text{nmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) were lower when compared to the Blanes station (from 133 to 1150 $\text{nmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$). The difference could be that we measured Vm kinetics with concentrations of up to 400 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ of MCA-leu added, whereas they used 100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ as a single concentration. Even relative to bacteria abundance, activities were low, as reflected by cell-specific MCA-Leu hydrolysis rates at the SOLEMIO station. This may reflect the difference in trophic status between the two stations. The Blanes bay

has been shown to be mesotrophic whereas the Marseille Bay is more oligotrophic (Chl *a* 0.95 ± 0.22 vs $0.43 \pm 0.07 \mu\text{g dm}^{-3}$, PO_4 0.07 ± 0.01 vs $0.04 \pm 0.01 \mu\text{mol dm}^{-3}$, NO_3 1.81 ± 0.63 vs $0.55 \pm 0.13 \mu\text{mol dm}^{-3}$, respectively) (Alonso-Sáez et al. 2008, Simó et al. 2009). The range of BP and CR at the SOLEMIO station were similar to those found at the oligotrophic JGOFS-DYFAMED observatory, situated 28 miles offshore (from undetectable to $0.20 \mu\text{g C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and from 0.00 to $2.59 \mu\text{g C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectively), where *prot* activity remained low throughout the year (mean of $4.6 \pm 1.5 \text{ nmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) (Lemée and al. 2002, Van Wambeke et al. 2009). The annual mean value ($17 \pm 2\%$) for BGE found at the SOLEMIO station was close to other studies in NW Mediterranean (Vázquez-Domínguez et al. 2007, Lemée et al. 2002, Alonso-Sáez & Gasol 2007), while Kritzberg et al (2010a) observed much higher values (32%, Table 3.5).

Table 3.5. Summary of Bacterial Growth efficiency (BGE) found by several authors in NW Mediterranean Sea. FC, leucine-carbon conversion factor ($\text{kg C mol leucine}^{-1}$) and RQ, respiratory quotient.

Authors	Study Area	FC	RQ	BGE (%)		
				Min	Max	Average \pm SE
This study	Marseille's Bay	1.5 to 2.6	0.8	1	37	17 \pm 2
Kritzberg & al., 2010a	Island of Majorca	1.5	1	12	51	32 \pm 3
Alonso-Saez & al., 2008	Blanes Bay	0.9 to 3.6	0.88	3	42	17 \pm 4
Vazquez-Dominguez & al., 2007	Blanes Bay	3.1	1	nd	nd	18 \pm 6
Lemée & al., 2002	DYFAMED	1.5	1	0.1	43	11 \pm 2

Such comparisons may take into consideration i) FC and RQ are different according to the studies, ii) both leucine conversion factors and BR/CR ratios have been shown to vary throughout the seasons (Alonso-Sáez and Gasol 2007; Alonso-Saez et al. 2008; Aranguren-Gassis et al. 2012) and iii) the comparisons of *prot* is dependent on the choice of the final concentration of Leu-MCA (50 to 400 μM according above authors).

4.2. The effect of nutrients and labile carbon limitation

The range of *phos* found at SOLEMIO was similar to that found in the open Mediterranean Sea along two longitudinal transects during June and July 1999 (from 0.62 to 12.60 nmol dm⁻³ h⁻¹) (Van Wambeke et al. 2002). The very low PO₄ concentrations and the higher *phos* activity from May to August suggested P limitation during summer. The cell specific *phos* hydrolysis rate increased from May to August as did the other activities, suggesting that *phos* activity did not depend on bacterial abundance only. Indeed both *phoA* and *phoX* genes can be induced by heterotrophic and photosynthetic prokaryotes during P limitation (Sebastian & Ammerman 2009), suggesting that all categories of organisms possessing these genes could be responsible for the phosphatase activity, as both are good markers of P stress conditions. Furthermore, enrichment experiments showed that phosphate limitation occurred over a longer time period, from March to November 2012. Labile carbon was added (glucose) during the enrichment experiments, alone or in combinations with N and P. BP in SOLEMIO was stimulated by labile carbon (i.e. glucose) alone, only in January 2012, but not during winter 2013. This suggests that even under winter mixing conditions, labile carbon is not always the first limiting factor. P is the main limiting element; N is the second limiting element except in March and April where labile C is the second limiting element. Thus, our ecosystem is mainly P limited. So, far, we have no more arguments to say that the lability of DOC in terms of quality of C-organic molecules would influence BP more than the accessibility to N and P pools. The 48 hours of confinement in the dark may be sufficient to create P stress as *in situ* organisms probably used P at a steady rate of delivery in these intermediary periods in March, May and August-November.

Prior discussing the stoichiometry of the organic matter we have to consider the high DOC values relevance for our ecosystem study. Three high DOC concentrations found during the cruise (179 μmol dm⁻³ in January 2012, 147 μmol dm⁻³ in March 2012 and 132 μmol dm⁻³ in November 2012 in Fig. 3.5D) were not related to any salinity event and thus cannot be explained by intrusion of Rhône River into the Bay of Marseille during these periods. The SOLEMIO site being situated near to the coast, some anthropogenic influence could give punctual high DOC values. However, none of our biological or biogeochemical variable was related to these 3 high DOC values. Hence, we could not reject potential problem in contamination of some samples. Therefore, these 3 high values of DOC are removed, and the new mean annual value of DOC is of 75 ± 5 μmol dm⁻³ at 5m, close to that of 67 ± 7 μmol dm⁻³ at 2 m found by Para et al. (2010) during the year 2007-2008.

Carbon, nitrogen and phosphate stoichiometry of the dissolved organic matter was also higher than the Redfield ratio (DOC:DOP ratio range from 136 to 664, and with an average of 306, also DON:DOP ratio range from 18 to 68, and with an average of 31). Seasonal evolution of the particulate matter P stoichiometry was very variable (CV C:P 64 %, CV N:P 61 %,) but ratios were always greater than the Redfield ratio, while the evolution of C:N was more steady over the year (32 %). All these results converged to a P limitation at the coastal oligotrophic SOLEMIO station for most of the year. In a marine ecosystem with P limitation, the P availability can limit both growth (Van Wambeke et al. 2002) and respiration (Obernosterer et al. 2003). In our study, we found a positive correlation between BP and *phos* but also between BP and Chl *a*, whereas BR was not correlated to Chl *a*. These results suggested that BP was more resource dependent, relative to BR, as previously suggested (López-Urrutia and Morán, 2007). Phosphate is necessary for protein synthesis, cell production and energy transport by bacteria (Kritzberg et al. 2010a). In deep sea environments, it has been suggested that phosphatase activity facilitates the hydrolysis of refractory molecules, giving them access to N or C for degradation by other enzymes (Hoppe 2003). The presence of both *prot* and *phos* may favour access to organic matter (Hoppe et al. 1988). The *phos:prot* ratio has been proposed as a relevant physiological indicator of the nutritional status of a biological system (Sala et al. 2001). In this study, the *phos:prot* ratio increased with the P-deficient nutrient addition but decreased in the N+P balanced additions. This ratio increased from March to August when P limitation occurred and decreased over the rest of the year. These results suggest that *phos* and *prot* could give an ecological advantage to microorganisms capable of consuming organic matter when it is poor or refractory.

4.3. Temperature effect

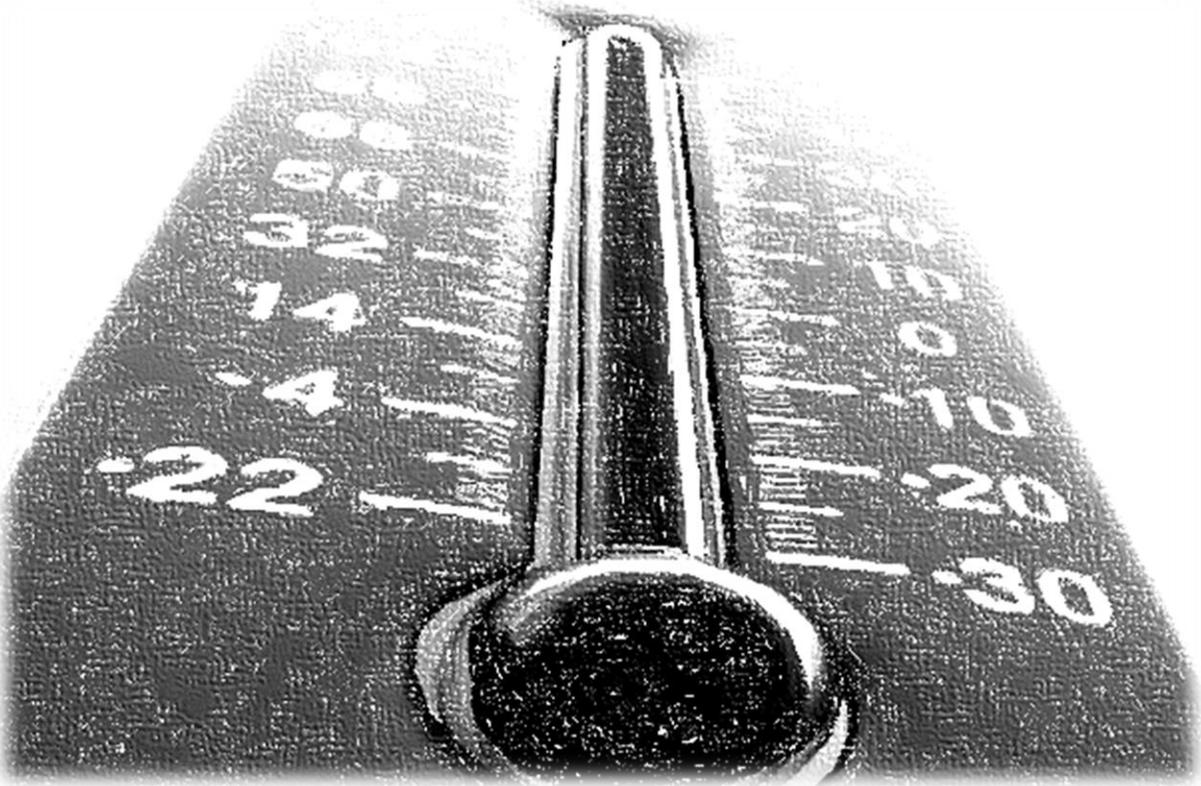
Besides organic matter stoichiometry and lability, temperature impacted bacterial activity, as depicted by the significant positive correlation between *in situ* temperature and *phos*, BP and BR. The influence of temperature may not have the same impact on BP and BR, but generally resulted in a decrease in BGE (Daneri et al. 1994, Rivkin & Legendre 2001, Apple et al. 2006, Berggren et al. 2010). For example, a seasonal study (March 2000 to January 2002) of 13 stations within a temperate estuary (ranging from 3 to 30 °C, Chesapeake Bay, USA) carried out by Apple et al (2006), revealed that BR was mainly controlled by temperature, whereas both temperature and

organic matter quality influenced BP and BGE resulting in a negative temperature response of BGE. While, another seasonal study by Kritzberg et al. (2010a) carried out between 2005 and 2008 in Majorca (Spain) where the temperature of the surface water varied between 14.4 and 28.2 °C, showed a significant relationship with *in situ* temperature for BR and BP. The authors concluded that BP and BR are both affected by temperature, but BR more than BP. In our study, we could not find any relationship between BGE and temperature. However, the increase of BGE from May to late July coincided with the increase of BP and mostly with the strong increase of *prot* thus resulting in a bacterial uptake of polymeric organic matter. Compiling several BGE data, Del Giorgio and Cole (1998) concluded that an unexplained source of BGE variability was due to the regional and seasonal differences of quality and quantity of the organic matter. From winter to summer, bacterial activity varied more than 2-fold suggesting that temperature alone would not be sufficient to explain the variation of BP, BR, *prot* and *phos*. In the natural ecosystem, several parameters can act on these activities such as the availability of resources, predation, viruses or bacteria community composition (del Giorgio & Cole 1998, Cottrell & Kirchman 2000, Fischer & Velimirov 2002, Apple et al. 2006). Temperature could affect various processes within the microbial food web differently, like BP, BR, grazing or lytic activities (Sarmiento et al. 2010, Bouvy et al. 2011). So, the controlling factors of one process within an ecosystem, such as temperature, can only start to be understood by monitoring the multiple indirect interactions. The coupling can be assessed through sensitivity estimates of temperature control together with resource control on the heterotrophic activities during the season. Because in natural environments temperature and resource controls are interacting together, it is necessary to get proper experimental data on the simultaneous effects of temperature (Q_{10}) on both production and respiration. This is further developed in a companion study (Céa et al. under review).

5 CONCLUSION

The simultaneous measurements of 4 different heterotrophic bacterial activities and BGEs with biogeochemical parameters helped to highlight their strong variation throughout the season in relation to resources and temperature control. These data clearly showed the wide range of BGE that can be experienced at a particular site on an annual timescale in the surface mixed layer. Our results confirmed that the availability of phosphate and temperature were the main factors

controlling heterotrophic activity in the coastal, oligotrophic Marseille Bay. Further insight on the ecosystem dynamics should be improved using regional modelling (Fraysse et al. 2013) and by using high frequency long term observation systems including biological observation and proxies in relation to environmental variables (Thyssen et al. 2008).



CHAPITRE **4**

**Contrôle des activités hétérotrophes des bactéries marines par la température
et les ressources**

Avant-propos

Bien que la température soit considérée comme un paramètre clef dans la régulation des processus hétérotrophes bactériens, la séparation entre les effets directs et indirects demeure encore difficile à établir. La difficulté provient du fait que la température influence l'ensemble du réseau trophique avec un impact inégal sur les différents niveaux (du producteur primaire en passant par les consommateurs jusqu'aux virus). Par exemple, en se basant uniquement sur des études comparatives des différents écosystèmes à partir de mesures *in situ*, un effet direct de la température sur les bactéries hétérotrophes sera difficile à différencier d'un effet indirect tel que le changement de disponibilité en ressources ou la composition des communautés. Déconvoluer les paramètres influençant le compartiment microbien est un enjeu primordial pour comprendre comment la température seule est capable de réguler une activité hétérotrophe comme la production bactérienne ou la respiration bactérienne.

Un système de gradient de température (*Temperature Gradient Block : TGB*) est élaboré dans le but de mesurer mensuellement pendant un an, l'effet de la température sur la production bactérienne (PB), la respiration bactérienne (RB) et les activités ectoenzymatiques : phosphatase alcaline (*phos*) et protéase (*prot*). Ayant déterminé les effets de la température à la fois sur RB et sur PB, nous avons étudié son effet sur le BGE. Par ailleurs, afin d'observer l'effet simultané de la température et des ressources sur les activités bactériennes, des expériences d'enrichissements sont menées à température *in situ* et sous conditions de réchauffement (+3°C). L'intérêt est d'analyser les effets potentiellement synergétiques ou antagonistes de ces facteurs entre eux sur la PB.

Ce travail est réalisé à partir d'échantillons d'eau de surface issus de la station SOLEMIO prélevés durant le suivi *in situ* en baie de Marseille (Janvier 2012 à Février 2013). Les résultats sur l'évolution saisonnière des activités hétérotrophes bactériennes ainsi que les variations physiques et biogéochimiques (Chapitre 3) ont pu être utilisés pour cette seconde étude afin de faire le lien avec les changements environnementaux survenus pendant la campagne. Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'une seconde publication acceptée dans la revue *Aquatic Microbial Ecology*.

Regulation of bacterial production, bacterial respiration and ectoenzymatic activities by temperature and resource over an annual cycle in the Bay of Marseille

B. Célia^{1,*}, F. Van Wambeke¹, D. Lefèvre¹, L. Chirurgien¹

¹Aix-Marseille Université, CNRS, Université de Toulon, IRD, Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), UMR 110, 13288 Marseille, France

Under Review in *Aquatic Microbial Ecology*

Abstract. The temperature kinetics (12-32°C) of 4 bacterial activities: alkaline phosphatase (*phos*), ectoaminopeptidase (*prot*), bacterial production (BP) and community respiration (CR) were repeatedly estimated on surface sea water samples over a seasonal study in the Marseille Bay, NW Mediterranean Sea. Optimal temperature and Q_{10} varied (optimal temperature: BP: 22-26°C, *phos*: 23-31°C, *prot*: 23-28°C and CR: not reached; Q_{10} : BP: 1.76-4.08, CR: 1.84-7.68, *phos*: 1.22-2.42 and *prot*: 1.43-1.88). BGE did not necessarily decrease with increasing temperature. The bacterial assemblage exhibited a bacterial growth efficiency close to its temperature optima whatever the *in situ* conditions (season, temperature). We also carried out experiments with and without PO₄ and glucose amendments, some of them incubated 3°C higher than *in situ* temperature. The nature of interaction between temperature and resource was mostly synergistic. According to our results, BP would be more favored than ectoenzymatic activity after warming and at the opposite, ectoenzymatic activity would be more favored than BP after cooling. Our results illustrate the major role of temperature in impacting different heterotrophic activities.

Key words: Bacterioplankton, Ectoenzyme, Bacterial production, Bacterial respiration, Bacterial growth efficiency, Q_{10} , Temperature, P limitation, NW Mediterranean, SOLEMIO

1 INTRODUCTION

Temperature plays an important role in bacterial growth and related processes. In aquatic systems, heterotrophic prokaryotes are responsible for most of the biodegradation and remineralisation processes and therefore participate to the transfer through the higher trophic levels. Natural microbial communities have previously been subjected to experimental warming

(using a range of 3 to 6°C) over days or weeks in mesocosms. The response in the food web was due to differential temperature effects on the specific trophic levels: such as primary producers, consumers, or viruses. Thus, the direct effect of temperature on heterotrophic prokaryotes is difficult to separate from indirect effects, such as changes in resource availability (Bouvy et al. 2011, Vidussi et al. 2011) or community composition (Adams et al. 2010). In particular, experimental warming affects the interactions between phytoplankton and heterotrophic prokaryotes (Hoppe et al. 2008, Wohlers et al. 2009). It has been predicted that the metabolic balance of the oceans would shift toward heterotrophy under global warming (López-Urrutia et al. 2006).

The temperature impact on heterotrophic prokaryotic production (BP), respiration (BR) and its influence on the regulation of bacterial growth efficiency (BGE) has been widely studied. As an example of work in pure cultures Tison & Pope (1980) manipulated three strains (psychrophile, mesophile and thermophile) and showed that the percentage of substrate mineralized increased with an increase in temperature from 5°C to 45°C, suggesting that BGE decreased due to physiological stress. Hall et al. (2010) studied physiology and membrane composition of a warm and a cold isolate of *Flavobacterium*, and showed higher growth rates, higher carrying capacity, and lower respiration rates in the warm isolate relative to the cold isolate when cultivated at higher temperatures.

A negative relationship between BGE and temperature increase was found through across system analyses (Apple et al. 2006, Rivkin & Legendre 2001), while other studies of natural environments showed BGE may not respond negatively to increased temperature (del Giorgio & Cole 1998, López-Urrutia & Morán 2007). Finally, a study on boreal humic stream water by Berggren et al. (2010) found that temperature did not impact BGE when inorganic nutrients were scarce and suggested that the inorganic nutrient limitation of BGE can override the temperature regulation. Thus studies evaluating the response of microorganisms from a broad range of natural habitats and in mesocosm experiments suffer from a bias. This is introduced by the many possible sources and environmental factors, other than temperature, that control heterotrophic prokaryotes and can have an effect on bacterial growth.

In spite of abundant literature on this topic, little is known about how the metabolism of bacteria responds to changing temperature. Metabolic processes such as production and/or respiration seem to follow pure enzyme kinetics with a first phase of exponentially increasing

activity, followed by an optimum and an inhibition phase. The temperature dependence of an organism uses the concept of activation energy, introduced by Svante August Arrhenius, *i.e.* the energy required to initiate a process or a chemical reaction. In the review of Sarmiento et al. (2010), they used this concept to calculate the warming effect on BP, BR, bacterial-grazer trophic interaction and BGE. They showed that warming increased BR, bacterial loss by grazing and BP (if enough resource was available). This temperature dependence is, by simplification, often characterized through the Q_{10} factor which is the relative process rate increase following a temperature raise of 10°C. The typical Q_{10} of growth rates determined in pure cultures of aquatic bacteria ranges from 2 to 3 (Pomeroy & Wiebe 2001). Kirchman et al. (1995) found a Q_{10} of around 2 for growth rates of bacterial assemblages in low-latitude oceans. This Q_{10} value of 2 is often used in ecological models. However, the Q_{10} of BP and BR have rarely been determined simultaneously. Arctic marine bacterial communities exhibited Q_{10} values for BP and BR ranging from 1.5 to 3.1 and from 1.6 to 98, respectively, based on experimental temperature increases of 3 and 6 °C, where BR increased faster than BP (Kritzberg et al. 2010b). In temperate lakes, water samples were experimentally submitted to 6 different temperatures ranging from 0 to 25°C and Q_{10} values determined from time-integrated rates were higher for BR compared to BP (Berggren et al. 2010). Few studies use experimental increases in temperature, generally deriving Q_{10} from *in situ* data (Apple et al. 2006). Due to the lack of experimental data for Q_{10} on different heterotrophic activities, we set up an experiment to understand how temperature regulates, BP, BR, phosphatase (*phos*) and protease (*prot*) activity during seasonal variations in the temperate Mediterranean Sea waters. The objective was to determine whether a change in temperature affected different types of metabolism and whether it changed between seasons due to varying resource controlling factors. Our first study (Céa et al. 2014) investigated the seasonal variations of these metabolic activities in the Marseille Bay. It showed a persistent P limitation of bacterial production throughout most of the year. Therefore it was important to investigate the synergistic or antagonistic role of temperature and resource by using enrichment experiments and changing temperatures in order to obtain a better understanding of natural bacterial communities when subjected to environmental stress.

From January 2013 to February 2013, sampling was carried out monthly at the SOLEMIO station (*Site d'Observation de l'Environnement du MIO*), in the Marseille Bay, France; a site from the SOMLIT network (SOLEMIO station, <http://somlit.epoc.u-bordeaux1.fr/fr/>) which records a

time series of several environmental parameters every 15 days (since January 2000). The study by C ea et al. (2014), described the seasonal variability of biochemical variables and heterotrophic activity: BP, BR, *phos* and *prot*, at the SOLEMIO station during 2012, and can be used to put the results of this present study into an environmental context.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1. Study area and sample collection

A time series study was undertaken from January 2012 to February 2013, sampling sea water from the SOLEMIO station located in the Marseille bay (N 43°14'30" and E 05°17'30", 60 m depth) NW Mediterranean Sea. Sampling was performed bi-monthly aboard the R.V. Antedon II using 20 dm³ Niskin bottles. Sea-surface water was stored in 2 dm³ polycarbonate bottles, in the dark in a portable incubator set at *in situ* surface temperature. In the laboratory, the samples were processed within 2 hours of sampling.

2.2. Heterotrophic bacterial activity

Bacterial production (BP), community respiration (CR), alkaline phosphatase activity (*phos*) and ectoaminopeptidase activity (*prot*) were determined as detailed in C ea et al. (2014). Briefly, heterotrophic bacterial production (BP) was estimated using the ³H-leucine incorporation technique (Kirchman et al. 1985), adapted to the centrifuge method (Smith & Azam 1992). Radioactivity was counted using a Liquid Scintillation Analyzer Packard 2100 TR and the 3H counting efficiency was corrected for quenching. BP rates were calculated from leucine incorporation rates and isotopic dilution factors that were calculated from concentration kinetics made at each survey. Isotopic dilution factors ranged from 1.0 - 1.65, with a mean of 1.2, and thus the conversion factors applied ranged from 1.5 kg to 2.6 kg C mol⁻¹ leucine. BP is expressed in $\mu\text{g C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

Community respiration (CR) was determined from non-filtered sea water using the Winkler method. Dissolved oxygen measurements were made using an automatic colorimetric endpoint detector (Williams & Jenkinson 1982). The respiration rate was determined by dividing the oxygen

concentration difference (initial – final) by the incubation time (24 h), assuming a linear oxygen consumption with time. CR is expressed in $\mu\text{g C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

Ecto enzymatic activity was measured fluorometrically using methylumbelliferone phosphate (MUF-P, $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ final concentration) for *phos* and L-leucine-4-methyl-7-coumarinylamide (leu-MCA, $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$ final concentration) for *prot* (Hoppe 1983). These concentrations were saturating for the activities measured (Céa et al. 2014). The linear increase in fluorescence of sea water with added MUF-P or leu-MCA was measured over the incubation time, in the dark with a Kontron SFM 23B spectrofluorometer (excitation at 365 nm and emission at 460 nm for *phos*; excitation at 380 nm and emission at 440 nm for *prot*). Calibration curves were made with MUF and MCA standards.

2.3. Experimental temperature kinetics

All water samples for determining heterotrophic bacterial activity (BP, CR, *phos* and *prot*) were incubated in a “temperature gradient block” (Fig4.1).

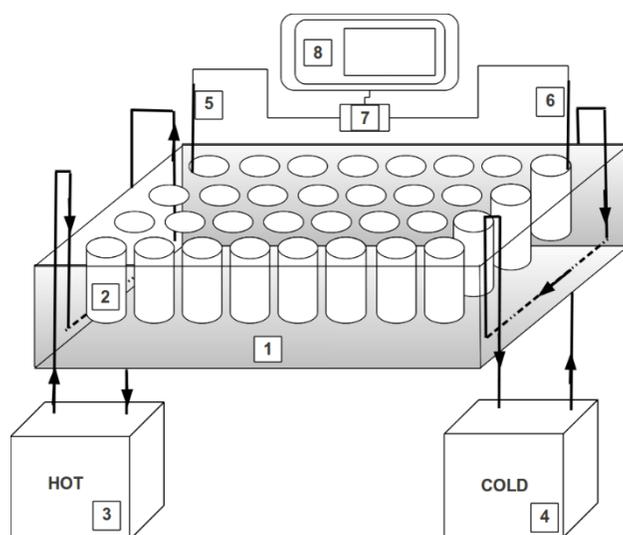


Figure 4.1. Components of the temperature gradient system. Aluminium blocks (#1) were thermally isolated with polystyrene, protected from light, with 32 holes each (#2) and filled with water. These blocks were traversed by two currents of hot and cold water controlled by two cryostats (#3, #4) which ensured a constant temperature gradient over the length of the block (#5, #6). This was checked by continuously monitoring temperature using pt100 probes. (#7, #8). Temperature regulation was managed by 2 cooler circulators (Huber ministat 240-cc) used as a heat source and as a heat sink which were connected to each end of the blocks.

The temperature kinetic experiments were carried out on surface sea water samples monthly during our survey. The water samples were incubated in the dark, at 8 different experimental temperatures in quadruplicate ranging from 12 to 32°C. Two different marine grade aluminium blocks were used (for CR: 34 x 72 x 12 cm and for BP, *phos* and *prot*: 12 x 42 x 8 cm). The first block (block A) was designed with 32 holes (400 cm³) to take Winkler bottles (125 cm³) in an 8 x 4 matrix. The second block (block B) was also designed with 32 holes (10 cm³) to take Eppendorf tubes (2 cm³) or PMMA cuvettes (3 cm³) in an 8 x 4 matrix, both blocks were insulated using 2.5 cm thick expanded polystyrene. Block A was enclosed in a wooden box. To determine CR, quadruplicate Winkler bottles were immediately fixed for time zero (initial oxygen concentration), the samples (4 samples at each of 8 temperatures) were then incubated in block A for 24 h and then analysed using the Winkler methodology. In block B, BP was measured after 1.5 h incubation. Five temperature conditions were made in quadruplicate. For the remaining 3 temperature conditions, one hole was used for TCA-killed blanks, and for these 3 temperatures, only triplicate samples were incubated. Block B was then used to determine *prot* and *phos* ectoenzymatic activities simultaneously. Duplicate samples for *prot* and another set of duplicates for *phos* were incubated, in 3 cm³ PMMA cuvettes containing the fluorogenic substrates, at 8 different temperatures. The incubation time chosen for *phos* and *prot* was variable and depended on the intensity of the activities (max 5 hours) with at least 5 readings of fluorescence in the spectrofluorometer during the incubation time.

2.4. Q_{10} computation

Q_{10} was determined by analysing bivariate correlations between experimental temperature T (in K) expressed as 1/T and the logarithms of metabolic activities that we examined (BP, CR, *phos* and *prot*) over a temperature range which is defined in the Arrhenius law domain (Fig 4.2):

$$\text{Ln (BP, CR, } \textit{phos} \text{ or } \textit{prot}) = A \times (1/T) + B \quad (\text{eq 1})$$

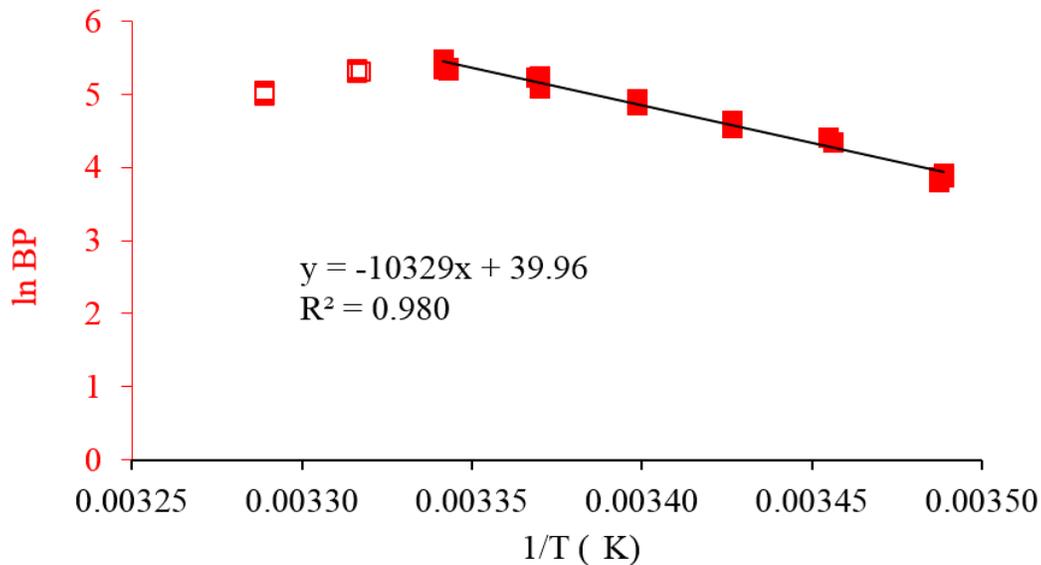


Figure 4.2. An example (9, July 2012) of the relationship between temperature (1/T in K) and BP (ln BP). The regression (eq. 1) was established from the linear part only (dark points) within the Arrhenius law domain.

To slope (A) in eq. 1 and using the *in situ* temperature values (K), Q_{10} was calculated according the relationship:

$$Q_{10} = e^{(\text{slope} \times (-10)) / ((\text{in situ temperature})^2)} \quad (\text{eq 2})$$

Practically, we measured Q_{10} for BP, CR, *phos* and *prot* activities (Q_{10BP} , Q_{10CR} , Q_{10phos} and Q_{10prot} , respectively). The 95% confidence interval (CI) for the mean Q_{10} was calculated as follows:

$$\text{CI of } Q_{10} = e^{((\text{slope} \pm 1.96 \times \text{se slope}) \times (-10)) / ((\text{in situ temperature})^2)} \quad (\text{eq 3})$$

2.5. Relative changes of rates

We simulated a raise of 3 °C in spring as surface water masses tend to warm rapidly over a few days under calm sunny conditions. Some climatic models predict a sea-surface increase of 3°C in the NW Mediterranean Sea region by the end of the century (“Climate Change 2007, The

Physical Science Basis” 2007). Shifts of 3°C have already been tested experimentally in batch experiments (Vázquez-Domínguez et al. 2008, Vázquez-Domínguez et al. 2007) and mesocosms (Hoppe et al. 2008, Vidussi et al. 2011, Wohlers et al. 2009). We then simulated an increase of 5°C to mimic a potential heat wave occurring in summer, as previously recorded in 2003 (Feudale & Shukla 2007). Finally, we simulated a decrease of 5°C that might occur during summer or autumn periods at the sea-surface after a strong Mistral wind event. According to the model described in eq. 1, we calculated the predicted values of BP, *phos* and *prot* in order to simulate what would be the disequilibrium between these rates with temperature shifts (Table 4.2). We applied the Q_{10} correction only when the temperature variation coincided with the Arrhenius law domain. When an activity was at an optimal rate within the temperature change tested, rates were not corrected. We examined relative changes of *prot* and *phos* per unit BP as follows:

$$\text{Relative change of } prot : BP = (prot_f : BP_f - prot_i : BP_i) / prot_i : BP_i \times 100$$

$$\text{Relative change of } phos : BP = (phos_f : BP_f - phos_i : BP_i) / phos_i : BP_i \times 100$$

$$\text{Relative change of } prot : phos = (prot_f : phos_f - prot_i : phos_i) / prot_i : phos_i \times 100$$

With BP_f , $prot_f$ and $phos_f$ being the final rate after temperature changes (*in situ* + 3°C, *in situ* + 5°C and *in situ* – 5°C) and BP_i , $prot_i$ and $phos_i$ being the initial rate at *in situ* temperature.

2.6. Bacterial growth efficiency (BGE)

BGE was estimated according the relationship:

$$BGE = BP / (BP + (0.9 \times CR)) \quad (\text{eq 4})$$

We assumed that heterotrophic bacterial respiration (BR) represented 90 % of the microbial community respiration (CR) based on the average obtained during 4 occasions where we determined simultaneously BR and CR (Céa et al. 2014). We used a respiratory quotient to convert O₂ units to CO₂ units of 0.8 (Del Giorgio & Williams 2005). Standard error (se) of BGE was determined using standard errors of BP and CR, computed using the equation as in Toolan (1996):

$$seBGE = (BP+BR)^{-2} * \text{sqrt}(BR^2 \times (seBP)^2 + BP^2 \times (seBR)^2) \quad (\text{eq 5})$$

2.7. Nutrient enrichment experiments

The availability of phosphorus (P) and carbon (C) in the sea water was investigated by measuring changes in BP after 48 h of incubation in the dark, in the presence of PO_4 ($0.25 \mu\text{mol P dm}^{-3}$) or glucose ($10 \mu\text{mol C dm}^{-3}$) (final concentrations). *In situ* conditions of temperature were maintained in a first set of bioassays, and *in situ* temperature plus 3°C in a second set of bioassays, resulting in 6 different combinations: P, C, T (unenriched control) for incubations at the sea-surface temperature and P+, C+ and T+ for incubations 3°C higher. Each bioassay combination was made in triplicate in polycarbonate bottles (60 cm^3), and the series of bottles were incubated in two temperature controlled incubators, one set at the *in situ* temperature, and the other one 3°C above the *in situ* temperature. Following 48h, each bottle was sub-sampled in order to measure BP using the leucine technique as described above. The sub samples were incubated for 1h under the same conditions of temperature as for the 48h incubations. The effects of enrichments, alone or combined with temperature effect, were expressed as enrichment factors (P/T, C/T, P+/T and C+/T) corresponding to BP in amended-bottles (P, C, P+ and C+) divided by BP in the unenriched control (T). Likewise, the effect of temperature alone (T+/T) was identified from BP in the unenriched control incubated 3°C higher (T+) divided by BP in unenriched control incubated at the sea-surface temperature (T).

2.8. Temperature and resource coupling

The synergistic or antagonistic effect between temperature and resource coupling was tested by comparing the enrichment factors defined above. Thus, to identify the nature of this coupling according to season, the effect of temperature alone or resource alone (here we take the example for P) was compared to the combined effect of temperature and resource, *i.e.*:

if, $\text{P/T} \times \text{T+/T} > \text{P+/T}$ then there would be antagonistic effects of temperature and P resources, and
 if, $\text{P/T} \times \text{T+/T} < \text{P+/T}$ then there would be synergistic effects between temperature and P resource.

2.9. Statistical analysis

All data were log-transformed to normalise variances before statistical analysis. We used a t-test for listing significant differences ($p < 0.05$) between different combinations of enrichment experiments or between the four Q_{10} values. We examined partial correlation coefficients (r) between Q_{10} , their corresponding rates and *in situ* temperature. The significance of r was considered for $p = 0.05$, $p = 0.01$ and $p = 0.001$ according to the degree of freedom ($df = n - k - 2$ with $k =$ number of variables and $n =$ number of observations). A two-way factorial analysis of variance (ANOVA) was used to explore the significance of the interactions between temperature and resource (P and C amendments) on the BP variability. The interaction term tests the null hypothesis that temperature and resource were independent (*i.e.*, temperature x resource interaction, $P > 0.05$) (Sokal & Rohlf 1995).

3 RESULTS

The SOLEMIO station has been identified as a coastal, oligotrophic site where *in situ* surface temperature varies between 12.8 and 25.8°C. Chl *a* ranged from 0.13 to 1.43 $\mu\text{g dm}^{-3}$ and heterotrophic bacterial activities, BP and BR, varied between 0.01 to 0.82 $\mu\text{g C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and 0.01 to 2.10 $\mu\text{g C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectively (Céa et al. 2014).

3.1. Temperature effect on bacterial activity

The temperature effect on BP, CR, *phos* and *prot* was determined over a range of experimental temperatures from 12 to 32°C. Over this range, and depending on the activity, a plateau or an inhibition phase could sometimes be observed (Table 4.1). For example, in September, BP decreased above 26°C and *prot* reached a plateau around 22°C. In contrast, CR and *phos* continued to increase even at the highest temperature tested (30 and 32°C, Fig 4.3). Over all the temperature kinetic experiments, BP reached, in most cases, an inhibition phase except in March and January (continuous increase of BP), and February and August (only the optimum was reached). CR increased continuously for the whole range of temperatures tested and for all experiments. *Phos* reached a temperature optimum in only 6 out of 15 temperature kinetic experiments (February, March, May, July, November and January 2013), but an inhibition phase

was only observed on one occasion (February 2012). Regarding the *prot* activity, most of the experiments exhibited a plateau phase (9 cases out of 12 experiments) but never an inhibition phase.

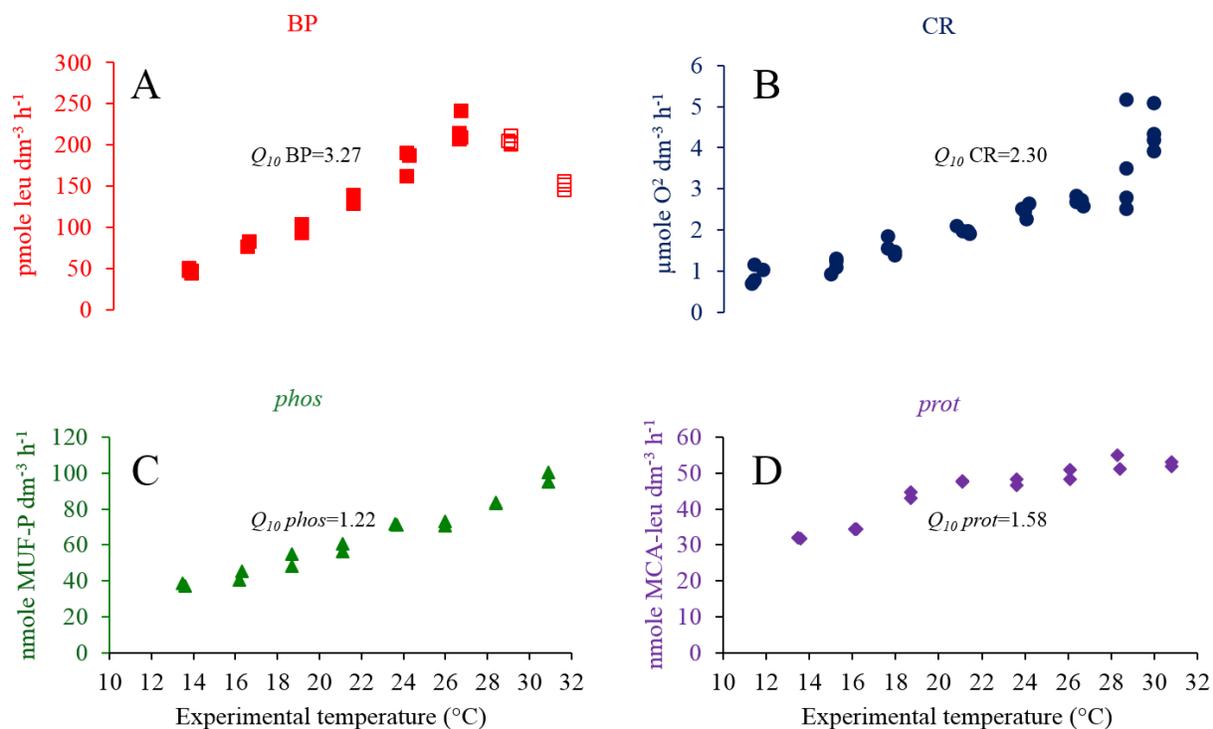


Figure 4.3. An example (07/09/2012) of temperature kinetics for bacterial production (A), community respiration (B), phosphatase (C) and protease (D) and their associated Q_{10} , which was calculated using eq. 1 and eq. 2 keeping only black dots.

Table 4.1. Q_{10} of bacterial production ($Q_{10}BP$), Q_{10} community respiration ($Q_{10}CR$), Q_{10} alkaline phosphatase activity ($Q_{10}phos$), Q_{10} ectoaminopeptidase activity ($Q_{10}prot$) and Arrhenius law domain of experimental temperature from which they were calculated. The higher temperature tested ranged from 25.9°C to 31.8°C according to the experiments.

Time	<i>in situ</i> temperature (°C)	Q_{10}				Arrhenius law domain			
		BP	CR	<i>phos</i>	<i>prot</i>	BP (°C)	CR (°C)	<i>phos</i> (°C)	<i>prot</i> (°C)
January 12	13.9	2.54	nd	2.36	nd	12 - 22**	nd	16 - 26*	nd
February 12	12.8	1.76	nd	2.16	nd	13 - 23**	nd	13 - 23**	nd
March 12	12.8	nd	nd	1.57	nd	nd	nd	15 - 23	nd
March 12	13.3	2.38	3.52	2.17	1.52	13 - 26	11 - 28	14 - 24*	14 - 26
April 12	13.5	2.50	3.02	2.15	1.43	13 - 23**	11 - 32	14 - 31	14 - 23*
May 12	15.3	2.73	3.80	2.06	1.52	13 - 25**	11 - 31	14 - 28*	14 - 28*
Jun 12	18.2	2.87	na	1.77	1.50	13 - 25**	na	14 - 30	14 - 23*
July 12	22.3	3.27	2.30	1.22	1.58	13 - 26**	12 - 29	16 - 29*	14 - 24*
August 12	25.8	4.08	2.60	1.76	1.79	14 - 26**	11 - 32	14 - 31	14 - 26*
September 12	21.0	2.97	na	1.98	1.86	14 - 26**	na	14 - 31	14 - 26*
October 12	19.2	2.55	1.91	1.99	1.45	14 - 26**	12 - 30	14 - 31	19 - 28*
November 12	17.1	2.67	3.12	2.01	1.49	14 - 26**	12 - 31	14 - 29*	14 - 26*
December 12	14.9	2.16	7.68	2.36	1.71	17 - 24**	12 - 31	14 - 31	17 - 31
January 13	14.4	2.47	4.45	2.42	1.88	16 - 24**	12 - 31	15 - 28*	17 - 27*
February 13	12.8	2.00	1.84	1.23	1.63	14 - 27**	13 - 32	17 - 29	14 - 32
Average ±se		2.6 ±0.15	3.4 ±0.54	2.0 ±0.10	1.6 ±0.05				

(*) cases where an optimum was reached within the range of temperatures tested

(**) cases where an inhibition temperature was reached within the range of temperatures tested.

nd: not determined,

na: not available (In June and Sept 2013 the coolers of the aluminium block failed during the incubation of Winkler bottles).

The Arrhenius law domain was systematically obtained using a minimum of 4 intervals of temperature settings, allowing Q_{10} calculations for all experiments and all activities. Each of the four series of Q_{10} showed a strong variability throughout the survey (Fig 4.4). $Q_{10}BP$ ranged from 1.76 to 4.08. $Q_{10}CR$ ranged from 1.84 to 7.68. $Q_{10}phos$ showed a lower variability, ranging from 1.23 to 2.42. $Q_{10}prot$ exhibited the lowest variability, ranging from 1.43 to 1.88 (Table 4.1). Annual means for the four Q_{10} values obtained were significantly different to each other (t-test, $p < 0.05$, $df = 27$ for $Q_{10}BP-Q_{10}phos$, $df = 19$ for $Q_{10}BP-Q_{10}prot$, $df = 12$ for $Q_{10}CR-Q_{10}phos$, $df = 10$ for

$Q_{10}CR-Q_{10}prot$ and $df = 20$ for $Q_{10}phos-Q_{10}prot$) except for $Q_{10}BP$ and $Q_{10}CR$ (t-test, $p=0.21$, $df=12$). According to partial correlation analysis between Q_{10} of one activity versus Q_{10} of another activity, no correlation was found between two different Q_{10} , having removed any effect of interaction of the two other Q_{10} . In addition, according to partial correlation analysis between Q_{10} values versus *in situ* temperature, only $Q_{10}BP$ was positively correlated to *in situ* temperature, having removed any effect of the interaction from the corresponding rate ($r= 0.67$, $df = 9$, $p < 0.05$). Finally, according to partial correlation analysis between Q_{10} values versus its corresponding rate having removed any effect of the interaction from the *in situ* temperature, no correlation was found.

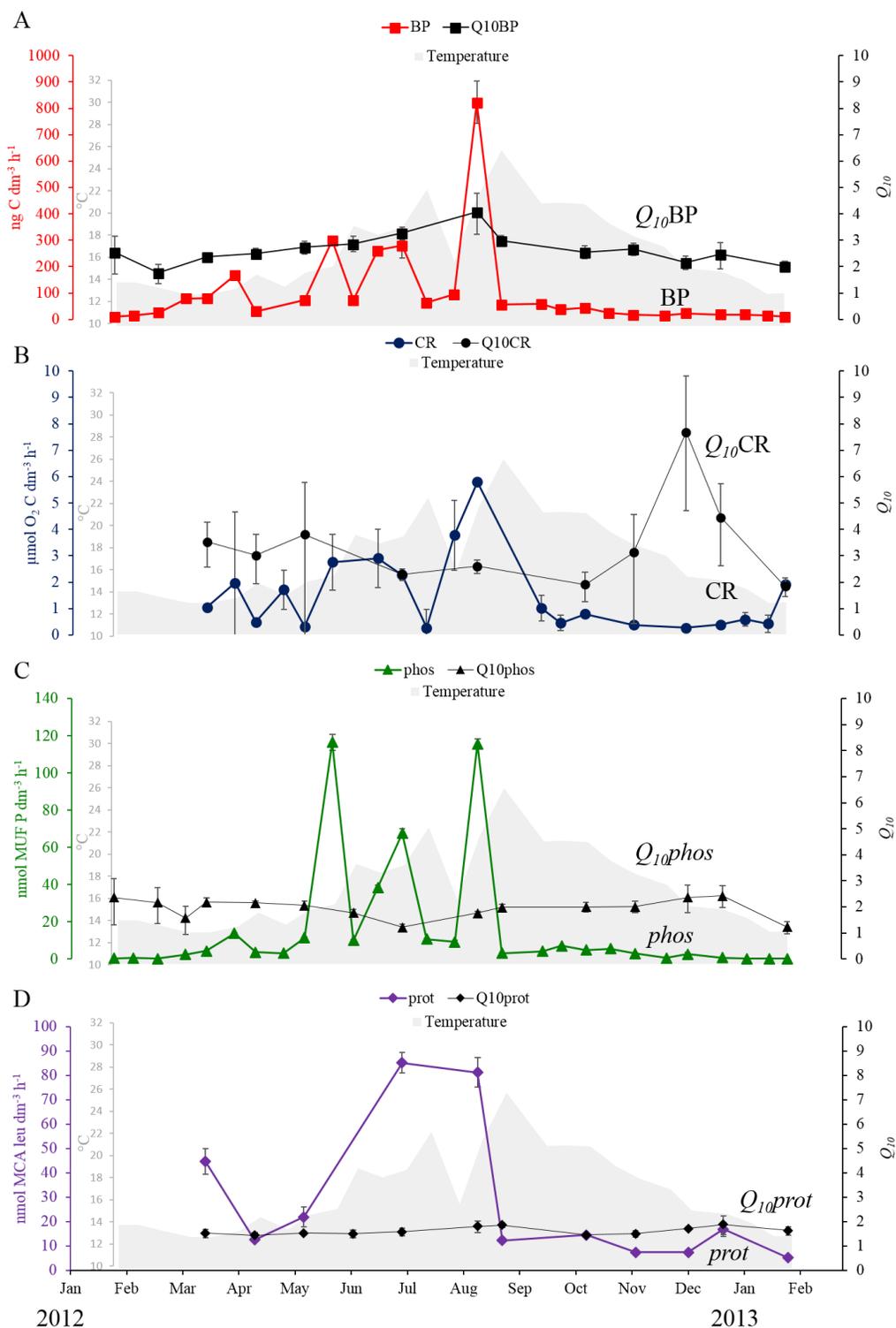


Figure 4.4. Seasonal evolution of Q_{10} (right scales) with the corresponding *in situ* rates (left scales) for the 4 rates tested. A: bacterial production (BP) B: community respiration (CR), C: phosphatase (*phos*) and D protease (*prot*). *In situ* temperature in background (left scale grey). Error bars corresponds to 95% confidence intervals (eq. 3).

3.2. Relative changes of rates following temperature shifts

According to our scenario, a 3°C warming in spring would result in a disproportional decrease in the rate of ectoenzyme activity relative to BP (Table 4.2). Likewise, after a 5°C warming in summer, BP increase faster than both ectoenzymatic activities except in August 2012 because the optimal temperature of *phos* (31°C) is higher than the optimal temperature of BP (24°C). Finally following a 5°C cooling in summer, *phos* and *prot* would be less inhibited than BP suggesting bacterial cells have a surplus of enzymatic activity per unit BP during a cooling period. The *prot:phos* ratio decreased after warming and increased after cooling except in July 2012 and August 2012 because Q_{10prot} is higher than Q_{10phos} ($1.58 > 1.22$ and $1.79 > 1.76$, respectively).

Table 4.2. Relative changes in BP, CR, *phos* and *prot* following an *in situ* temperature increase of 3°C, 5°C or a decrease of 5°C.

Time	Seasons	<i>in situ</i> T (°C)	Change T (°C)	Relative change of		
				<i>prot</i> per unit BP after temperature changes (%)	<i>phos</i> per unit BP after temperature changes (%)	<i>prot</i> per unit <i>phos</i> after temperature changes (%)
March 12	spring	13.3	+ 3	-12.5	-2.7	-10.0
April 12		13.5		-15.4	-4.4	-11.5
May 12		15.3	-15.9	-8.0	-8.6	
May 12		15.3	-5	34.7	15.4	16.7
June 12	Summer	18.2	+ 5	-27.2	-21.0	-7.9
July 12		22.3		-29.6	-22.4	-9.3
August 12		25.8		nd	32.2	-24.3
September 12		21.0		-20.7	-18.1	-3.1
June 12		-5	18.2	38.9	27.7	8.8
July 12			22.3	44.6	65.0	-12.4
August 12			25.8	51.8	53.1	-0.9
September 12			21.0	27.1	22.9	3.4
October 12	Autumn	19.2	-5	33.4	13.3	17.8
November 12		17.1		34.5	15.8	16.2

*Out of Arrhenius Law Domain

3.3. Bacterial growth efficiency

BGE has been estimated from experimental points of BP and BR from the temperature kinetic measured monthly during the survey, using eq. 4. BGE decreased with experimental temperature in March (23 to 11%), April (17 to 3%), May (44 to 11%), November (40 to 5%), December (13 to 1%), January 2013 (11 to 1%, Fig. 4.5). A continual decrease in BGE

corresponded to cases where BP and BR optimum had not been reached (for the whole temperature range tested) and where $Q_{10}BP$ were less than $Q_{10}BR$ (example, March 2012). A break in the slope (April 2012) was due to an inhibition phase reached for BP but not for BR, accelerating the decrease in BGE with temperature. Inversely, an increase, followed by a decrease in BGE with experimental temperature was found in July (increase from 15% to 20%, BGE optimal at 26°C), August (increase from 15% to 22%, BGE optimal at 24°C), October 2012 (increase from 4% to 8%, BGE optimal at 21°C) and February 2013 (increase from 1 to 2%, BGE optimal at 27°C). In these cases, the increase was due to $Q_{10}BR$ higher than those of BR, and a decrease to a plateau or inhibition phase occurring for BP but not for BR. On average, there was only a 12% relative difference between BGE measured under *in situ* temperature conditions and maximal BGE obtained from temperature kinetics, suggesting that in most cases, BGE were close to their temperature optimum under *in situ* temperature conditions.

3.4. Bacterial response to nutrient enrichment

P alone significantly limited BP throughout most of the summer-autumn seasons (May to November 2012, Table 4.3), as observed in the stimulation factors P/T, varying from x 3.7 to x 15.4 during that period. By comparison, samples incubated at +3°C of *in situ* showed a more significant P limitation before and after that period (March 2012, December 2012 - February 2013, P+/T ratios). In general, C alone is not the primary limiting factor, except in January 2012 and October (C/T ratios, Table 3). However, when incubating samples +3°C above the *in situ* temperature, significant stimulation by C alone was shown in winter season (December and February 2013, C+/T), but also during the warmer months when P was the first, limiting factor (July, C+/T ratios). The stimulation factor P/T is higher than its corresponding P+/T, only during the warmer months, from August to October (*in situ* temperature 19 - 25°C). During this period (3 series of experiments), and based on comparisons of the P/T x T+/T to P+/T ratios, an antagonistic effect of temperature and P resource was obtained, despite being synergetic for the rest of the year. However, due to the variability between triplicates a significant interaction between resource and temperature could only be statistically confirmed in a few cases (Table 4.3).

Table 4.3. Enrichment factors relative to the corresponding unenriched control incubated at *in situ* temperature (P/T, C/T) and incubated 3°C higher above the sea-surface temperature (C+/T, P+/T). Effect of temperature alone (T+/T) as determined from unenriched bottles. The nature of effect (synergistic or antagonistic) between temperature and resource as determined in M&M section.

Time	<i>In situ</i> temperature (°C)	unenriched control T+/T	sea-surface temperature		sea-surface temperature + 3°C		Nature of effect	
			P/T	C/T	P+/T	C+/T	P	C
January 12	13.9	nd	0.7	4.2*	nd	nd	nd	nd
February 12	12.8	nd	1.0	1.1	nd	nd	nd	nd
March 12	13.3	1.1	2.3	1.2	7.3*	1.5	Synergistic**	Synergistic
April 12	13.5	1.3	1.2	1.0	1.8	1.2	Synergistic	Synergistic
May 12	15.3	0.5	10.0*	0.7	21.2*	2.6	Synergistic**	Synergistic**
June 12	18.2	1.0	4.9*	0.8	6.3*	1.3	Synergistic	Synergistic**
July 12	22.3	1.8*	3.7*	1.0	3.7*	1.3*	Synergistic	Synergistic**
August 12	25.8	0.9	6.0*	1.4	4.5*	3.8	Antagonistic	Synergistic
September 12	21.0	1.0	2.5*	1.1	1.9*	1.2	Antagonistic	Synergistic
October 12	19.2	1.7*	15.4*	1.2*	9.3*	1.2*	Antagonistic	Synergistic
November 12	17.1	0.9	7.3*	1.1	13.6*	1.0	Synergistic	Antagonistic
December 12	14.9	1.6	1.2	0.9	2.5*	1.1*	Synergistic**	Synergistic**
January 13	14.4	1.6	0.8	0.9	2.9*	1.0	Synergistic**	Synergistic
February 13	12.8	7.9*	0.8	1.0	1.3*	2.1*	Synergistic	Synergistic**

(*) showed the values significantly different from corresponding control (T) according to t-test realised on log-transformed data ($p < 0.05$ and $df = 4$).

(**) showed significant interaction between temperature and resource (two factors ANOVA on log-transformed data, interaction effect, $p < 0.05$)

nd: not determined

4 DISCUSSION

Temperature kinetic experiments were employed to measure the phenotypic response of temperature on heterotrophic activity. Over the natural range of temperatures encountered in the Mediterranean Sea surface waters, the temperature dependence of some metabolic processes cannot be defined solely according to the Arrhenius law. Indeed, BP departed from the exponential course and levelled off at a temperature optimum, ranging between 22°C in winter and 26°C in summer. In nature, a maximum temperature at which BP no longer increases has been reported, although this optimum should be considered with caution (estimated from *in situ* seasonal observations). In a temperate salt marsh estuary (Monie Bay, Chesapeake area, USA), the apparent optimal temperature was 22°C for *in situ* temperatures ranging from 0 to 30°C (Apple et al. 2006). Kritzberg

et al. (2010a) incubated Mediterranean Sea water at 2, 4, and 6°C above the *in situ* temperature over 24h. They found an optimal temperature for BP in the winter experiment (17°C, i.e. 2°C above the *in situ* temperature) whereas increasing temperatures in summer (*in situ* temperature 28°C) resulted in inhibition of BP. As specific temperature optima differs for different bacterial phyla (Crump & Hobbie 2005, Lymer et al. 2008, Adams et al. 2010), it is not surprising to observe changes in optimal temperatures for BP as heterotrophic bacterial communities shift during the seasonal variations in coastal Mediterranean Sea waters (Schäfer et al. 2000, Carlson et al. 2002, Obernosterer et al. 2010).

Unlike BP, our experiments showed a continual increase in BR which never reached optimal temperature. However, the range of temperature tested stopped at 32°C and in the same study cited above, Sand-Jensen et al. (2007) occasionally found BR with optimal temperatures between 30 and 40°C in summer. We have shown that the trend generally described for ambient water samples, where BR, but not BP, continually increases above a temperature threshold (Fig 7 in Apple et al. 2006), is not solely due to the differential control of BP and BR by resources in warmer waters, but also by an inhibition phase reached at lower temperature for BP compared to BR.

In the case of ectoenzyme activities, optimum temperatures were reached more often for *prot* (9 cases over 12) than for *phos* (7 cases over 15). When reached, optimal temperatures ranged from 23 to 31°C for *phos* and from 23 to 28°C for *prot*. Studies dealing with the relationship between temperature and enzymatic activity are scarce, mostly undertaken in the sediments and/or within cold sea-water and not with simultaneous investigation of *prot* and *phos*. Indeed, a previous study realised on a culture of oceanic dinoflagellate found an optimum temperature of 50°C for *phos* (Rivkin & Swift 1980). However, the optimum temperature of *phos* seems to depend on the biological composition of the waters sampled and can vary between 25°C and 55°C according to the species responsible for its production (Huber & Kidby 1984a). Another study realised from sea-ice samples found optimal temperatures of 35°C and 25°C for *prot* (Huston et al. 2000 ; Arnosti & Jørgensen 2003). Otherwise, using temperature kinetics on several enzymes (chitinase, sulfatase, leucine aminopeptidase or alkaline phosphatase), Reichardt (1987), Christian & Karl (1995), Arnosti et al. (1998), Huston et al. (2000) and Arnosti & Jørgensen (2003) showed that optimum temperatures were reached well above the natural *in situ* range, which seems characteristic in cold water studies, but too few experiments have been performed to confirm this

pattern in temperate waters. Finally, whatever the season, the Arrhenius phase was found between 12 and 25°C which encompasses the natural conditions of temperature generally found in these temperate surface waters over the year.

Focusing on the Arrhenius phase, most studies show that the Q_{10} values tend to be 2 to 3, except near the temperature limits for growth (Pomeroy & Wiebe, 2001). We showed that, firstly, Q_{10} values varied throughout the seasons and secondly, that according to the heterotrophic bacterial activity considered, the Q_{10} could differ. Our seasonal variations of $Q_{10}BP$ and $Q_{10}BR$ seem to be within a coherent range for temperate waters (Table 4.4), close to those found in other Mediterranean Sea areas by Vázquez-Domínguez et al. (2012) and Vázquez-Domínguez et al. (2007) in Blanes Bay and by Kritzberg et al. (2010a), around the Island of Majorca, although these authors incubated samples at only a few selected temperatures. Statistical analysis of partial coefficients determined from the relationships between Q_{10} of a given activity with *in situ* temperature, having removed any effect of the interaction from the corresponding rate, showed that only $Q_{10}BP$ was positively correlated with the *in situ* temperature which is the opposite trend to that observed by Adams et al. (2010) in lakes, where the *in situ* temperatures ranged from 8°C to 13°C. This means that, during the colder months, in the Mediterranean Sea temperate waters, BP increase following water warming is relatively slower than BP decrease after water cooling during warmer months, in other words, winter populations are less temperature – sensitive than summer-autumn populations.

Table 4.4. Synthesis of seasonal studies on the production and respiration of natural bacterial assemblages isolated from sea-water or sediment and exposed to warming conditions. When possible, Q_{10} of bacterial production (BP) and bacterial respiration (BR) are averaged (\pm se).

Seasonal studies	Isolate from	Localization	<i>in situ</i> temperature (°C)	Temperature range (°C)	Q_{10} BP	Q_{10} BR
Kirchman & al (2005)	Western Arctic Ocean	67°30'N, 1°75'E 72°30'N, 1°60'E	-1.7 to -1.5	-1 to 5	(leu ^a) 3.1 (\pm 1.1)* (TdR ^b) 1.9 (\pm 0.2)*	nd
Sand-Jensen & al (2007)	3 Danish lowland streams	<i>Selbæk</i>	3 - 13	0 - 15	2.10 (\pm 0.35)*	3.31 (\pm 0.36)*
		<i>Havelse Å</i>	0 - 21	15 - 25	1.53 (\pm 0.16)*	2.27 (\pm 0.26)*
		<i>Pøleå</i>	0 - 25	25 - 35	1.26 (\pm 0.23)*	1.43 (\pm 0.21)*
Vázquez-Domínguez & al (2007)	Blanes Bay	41°39'N, 2°48'E	12.5 - 25	<i>in situ</i> Temp. + 2.5	2.5**	1.9**
Berggren & al (2010)	Boreal humic stream	64°14'N, 19°46'E	8.6	0 - 25	1.48	1.52
			0.0		2.12	2.37
			8.1		1.21	2.12
Kritzberg & al (2010a)	Island of Majorca	39°20'N, 3°03'E	14.4 – 28.2	<i>in situ</i> Temp. +2, +4, +6	4.9**	7.3**
Vázquez-Domínguez & al (2012)	Blanes Bay	41°39'N, 2°48'E	12.5 - 25	<i>in situ</i> Temp. + 2.7	2.8(\pm 0.1)*	nd
This study	Marseille Bay	43°14'N, 05°17'E	12-26	12-31	1.76-4.08	1.91-7.68

^aaverage incorporation rate of leucine

^baverage incorporation rate of thymidine.

*average \pm se

** median

nd: not determined

From the few studies measuring the Q_{10} of ectoenzymes, using cultures of phytoplankton or marine bacteria Q_{10} phos varies between 1.4 and 2.0 (Rivkin & Swift 1980, Huber & Kidby 1984b). The nitrate reductase activity of triplicate cultures of the marine diatom *Thalassioria pseudonana* grown at 8, 17 and 25°C, showed some Q_{10} values ranging from 0.95 to 2.71 with a higher Q_{10} between 8 and 17°C than between 17 and 25°C (Berges et al. 2002). These values from

cultures are close to our values of Q_{10phos} and Q_{10prot} (2.0 ± 0.10 and 1.6 ± 0.05 , respectively). However, phosphatase enzymes are also produced by some photosynthetic species (Hoppe 2003) whose composition greatly changed during our seasonal survey (Céa et al. in press). Aminopeptidase are also produced by some cyanobacteria (Martinez & Azam 1993), but their importance was small compared to heterotrophs (Céa et al. in press). Thus our measurements are integrative, reflecting the activities of structurally distinct enzymes, produced by different organisms having different temperature optima (Adams et al 2010).

A theoretical threshold for Q_{10} of around 1.4 is expected when diffusion rates limit growth rates (Jumars et al. 1993), this suggests that temperature mainly affects the diffusion rates for the two ectoenzymes tested and not the reaction rates. We assumed that the short incubation times prevented inducible mechanisms. It is also necessary to point out that temperature could play a role on both the optimum amount of enzyme produced by the cell and the optimum enzyme activity, which can occur at different temperatures as shown on pure cultures (Vázquez-Dominguez et al. 2008) and these processes cannot be distinguished in our protocols. Another possible technical bias is that the measurements were carried out under saturation conditions, this prevented us from observing the temperature effects on the affinity constant K_m , which could also change activities under *in situ* conditions of exopolymer concentration. Nevertheless, Christian & Karl (1995) observed apparent temperature independence at low substrate concentration and suggested that it might result because the rate limiting step in the low concentration range is reversible and that the temperature affects both forward and backward enzymatic reactions identically. Finally, Q_{10phos} tended to decrease (from 2.3 to 1.2) when the environment was P-limited. This decoupling between *phos* and BP with respect to temperature sensitivity suggests that during warmer months, the *phos* could be induced by the less temperature sensitive communities than those responsible for BP. Another hypothesis, besides the possible shifts of communities, including the phytoplankton species discussed above, is that in summer a greater proportion of *phos* could be fully dissolved, having leaked out of the cells and digestive vacuoles of flagellates (Hoppe 2003). Presumably, in a dissolved state they are less sensible to temperature changes, but with the lack of size-fractionated measurements in our study we cannot confirm this hypothesis. Alternatively as *phos* and *prot* are at the beginning of the degradation process of organic matter, they require fewer enzymatic steps than the activities reflecting overall metabolism such as BP and BR. A larger number of enzymatic steps may operate at different rates under different temperature controls (Arnosti & Jørgensen

2003) and could explain a relatively higher seasonal variability for $Q_{10}BP$ and $Q_{10}CR$ (24% and 30%, respectively), than for $Q_{10}phos$ and $Q_{10}prot$ (18% and 10%, respectively). Finally, Berges et al. (2002) using experimental cultures of phytoplankton, suggested that the stability of enzymes associated with carbon fixation generally exceeds that of whole - plant photosynthesis, i.e. enzymes are less temperature - sensitive than the integrated process in which they participate. Transferring this concept to heterotrophic organisms, ectoenzymes should be less temperature sensitive than whole - bacterial metabolism, reflected by BP or BR.

As both Q_{10} and temperature optima were different according to the heterotrophic process studied, the imbalance in the sensitivity to temperature amongst these heterotrophic processes could have a significant effect on the use of polymer hydrolysis relative to production needs. Our results provide support to the hypothesis that an increase in temperature will promote BP compared to ectoenzymatic activities, while cooler conditions will promote the *prot* and *phos* to the detriment of BP. However, if the temperature increase occurs when the sea surface temperature is close to the BP temperature optimum (e.g. August) the response is not different from the cooling simulation: ectoenzymatic activities are enhanced relative to BP rates. Exploring relative temperature sensitivity of C and N mineralisation and potential ectoenzymatic activity in Alpine soils, Koch et al. (2007) found an increase in polypeptide decay under low temperatures and a higher temperature - sensitivity in the turnover of easily degradable C substrates than that of higher molecular compounds. This suggests that temperature is an important factor in regulating the use of different quality substrates from monomers to polymers. In addition, assuming *phos* as an important provider of P and *prot* for N that might influence ultimately the C:N:P ratio of rates through heterotrophic prokaryotes. Experimental studies on the effect of temperature on phytoplankton stoichiometry (Woods et al. 2003) generally showed an increase in C:N ratio with increasing temperature. However using a modelling experiment, Omta et al (2006) showed that from low to high light intensities the response could differ. More experimental investigation is required in this field of research: as global changes impact N and P inputs into the Mediterranean (rivers, aerosols), circulation, level of the mixed-layer depth and the intensification of the stratification periods, which will consequently impact the stoichiometry within plankton cells and the exported detritus (Krom et al. 1991, Franois et al. 1997, Bethoux et al. 1998, Omta et al. 2006).

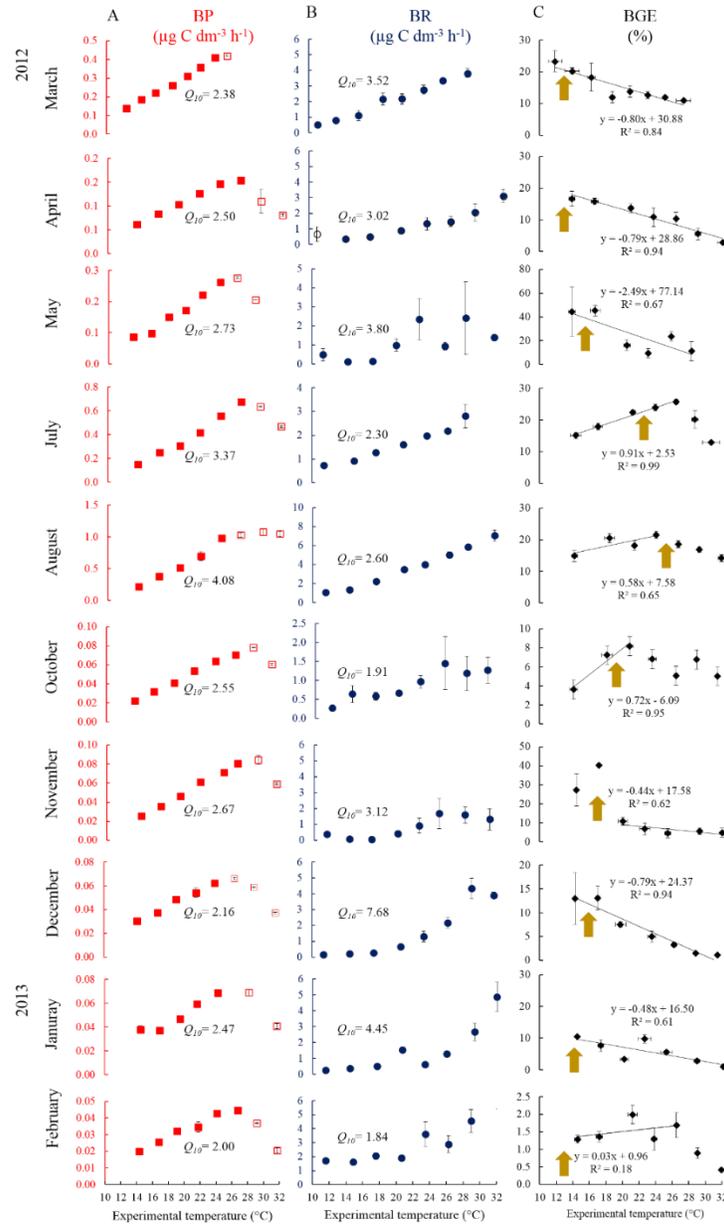


Figure 4.5. Temperature kinetics for BP (A) and BR (B). Q_{10} have been determined in the Arrhenius law domain of temperature (dark points) whereas open points corresponded to optimum or inhibition phases. BGEs (C) have been computed from means of BR and CR at selected temperatures using eq. 4. Vertical bar in C corresponds to the BGE error (se), computed from se errors in CR and BP (eq. 5). The horizontal bar in C (error of temperature) is due to the fact that two aluminium blocks were used, generating small differences between two experimental temperatures (one for BP and one for CR), which were taken as close as possible but always within a range of 1°C. The arrows show the *in situ* temperature

A highly variable pattern of temperature dependence on BGE (Fig. 4.5) revealed that the assumption of a linear temperature response may not accurately describe changes in BGE in aquatic systems. Discrepancies in the literature are due to the interactions between temperature and

resources when interpreting the effect of temperature based on *in situ* data, and the range of temperature and degree of trophic of the systems studied (Apple et al. 2006, Kritzberg et al. 2010b, Rivkin & Legendre 2001). By using repetitive temperature kinetics, and depending on season, a negative or positive relationship between BGE and temperature can be found (Fig. 4.5). Differences in the pattern of temperature dependence of BP and BR were reflected by different Q_{10} values over the Arrhenius phase and the presence or absence of a plateau and/or inhibition phase, explaining fully the effect of experimental temperature on BGE. The pattern is sometimes biphasic, showing a threshold when the optimal temperature of BP is reached. In the temperature domain where both BP and BR follow the Arrhenius law, if $Q_{10}BR$ is higher than $Q_{10}BP$ then BGE decreases with warming (March, April, May, December). This BGE decrease is explained by BP and BR which are both positively impacted by temperature but with some emphasis for BR compared to BP (Berggren et al. 2010, Kritzberg et al. 2010b). However, we also found the inverse during warmer months (July, August and October). In short, during spring (13 - 15°C) warming would drive more activation energy to catabolism, whereas in warmer periods (19 - 25°C) bacteria would give more activation energy to the anabolism relative to catabolism. It is rather surprising as during the warmer months the degree of P limitation is maximal (Céa et al. 2014). In cold, N+P depleted lake waters, a decrease in BGE with increased experimental temperature is obtained only when nutrients are added (Berggren et al. 2010), suggesting that it is difficult to observe a clear temperature effect when the system is nutrient limited. The temperature/nutrient manipulation of these authors showed clear interactions between the temperature and resources, as availability of nutrients also regulates the BGE (del Giorgio & Cole 1998). It is not very clear, however if resources interact synergistically or antagonistically with temperature.

The approach that we used, combining nutrients and a 3°C temperature increase in seasonally distinct experiments, showed both types of interactions, although significant interactions were only observed in synergistic cases (Table 3). However, combining enrichment experiments with temperature experiments are rather complex to interpret, as confined bottles are incubated for many days (Berggren et al. 2010), sometimes in modified water (diluted waters, exclusion of high-sized organisms). After 48 hours of confinement, depending on communities or temperature can occur only lag phase in some cases and a short lag phase and exponential phase in other cases. The community initially present in such experiments encompass some bacterial populations with different optimal temperatures suggesting that temperature changes can induce

modifications in population and communities can change in favor of other temperature - adapted populations (Adams et al. 2010). Confinement effects are a likely explanation as the $Q_{10}BP$ values derived from our T+ and T observations (Table 3, sea water left in the dark for 2 days) are significantly different from the BP values derived from temperature kinetics (t-test, $p < 0.05$ in July, October, December and February 2013 with $df = 4$). This difference may be explained partly by the artefacts induced by a 2 - day confinement in the dark and/or by experiments carried out in summer with temperatures close to the optimal temperature for BP. This difference has also been shown in experiments made in Arctic waters (Kirchman et al. 2005).

We examined the effects of combinations of temperature and resource only on BP, but Berggren et al. (2010) also investigated the combined effects of nutrients and temperature on BR and BGE in different boreal streams over different seasons. Using data from Fig.1 of Berggren et al. (2010), the $Q_{10}BP$ is lower following N+P amendments than in the controls; implying that an antagonistic effect is seen. In one case, $Q_{10}BR$ is higher after N+P amendments than in the control implying a synergistic effect. The consequence of this work is that BGE seems independent of temperature in the controls and the BGE decreases following N+P amendments. Wiebe et al. (1992) used experimental cultures of 4 facultative psychrophilic bacteria isolated from cold sea-water (Conception Bay, Newfoundland, and the Arctic Ocean) grown under variable conditions of temperature (-1.5 to 35°C) and labile organic substrate concentrations (proteose-peptone yeast and proline). They found higher growth rates and larger cells at the lowest temperatures (-1.5 to 5°C) and highest substrate concentration, suggesting an antagonistic effect on these cold-adapted populations. Likewise, Pomeroy et al. (1991) in the same place, measured BR in enrichment experiments where resources (between 0 and 1500 mg dm⁻³ of glucose and proteose-peptone) and temperature (between -1°C and 15°C) were experimentally combined. They found significant interactions between temperature and resource in 3 out of 4 experiments. From their Table 5, we calculated that for a given experiment, there could be a switch between antagonistic affects or synergetic effects according the amount of substrate added. However, Kirchman et al (2005) tested the effect of glucose enrichment combined with warming on a natural bacterial assemblage from Arctic waters thinking that if the Wiebe-Pomeroy hypothesis was correct (Pomeroy & Wiebe 1991), bacterial growth in cold waters would be stimulated more by DOM additions than during growth in warm waters. However, they found the opposite indicating a possible synergism between DOM and temperature. Identifying the complex nature of the coupling between temperature and

resource is essential in understanding the response of bacterial communities in the context of global warming.

5 CONCLUSION

Our experimental approach has shown the great variability of temperature optima and Q_{10} over different seasons and different heterotrophic activities. Ectoenzymatic activities are less temperature dependent than respiration or production. We showed that different heterotrophic processes are affected differently by increasing temperatures, highlighting the limitations of the Q_{10} concept, as explained by Jumars et al. (1993) and Berges et al. (2002). We examined that such differential temperature sensitivity response could impact the relative importance of polymeric material hydrolysis compared to BP. Interaction between temperature and resource are always present and is mostly of a synergistic nature with antagonistic effects sometimes noticed in summer periods. As revealed by temperature kinetics, BGE did not follow any of the general trends extrapolated from a large set of *in situ* data (Rivkin & Legendre 2001, Apple et al. 2006). BGE showed different kinetic responses to temperature depending on season, and were in all situations close to their temperature optima.



CHAPITRE 5

**Dynamique bactérienne contrôlée par le régime d'apports des ressources
nutritives**

1 Etat de l'art

Les apports de matière organique (MO) et de nutriments dans le système marin sont variables. Être en mesure d'identifier les sources de ces apports et l'impact de la variabilité de ces flux sur l'activité des bactéries hétérotrophes est un enjeu majeur pour mieux comprendre les flux biogéochimiques en milieu marin.

A grande échelle d'observation, les sources allochtones de MO et de nutriments vers le système pélagique se produisent via les apports côtiers (lessivage des sols, fleuves), la re-suspension du sédiment, les aérosols secs et humides. D'après la littérature, les rivières représentent la principale source allochtone d'apport de MO et de nutriments (P et N principalement) dans l'océan (Meybeck 1982). Les estimations des taux de carbone organique dissous (COD) ou de carbone organique particulaire (COP) apportés par les rivières sont estimées sur l'année à environ 17×10^{12} moles C an⁻¹ (Smith & Hollibaugh 1993). Par exemple, un fleuve comme le Rhône présente des concentrations en COD pouvant dépasser $300 \mu\text{mol C dm}^{-3}$ (Sempéré et al. 2000) selon la période de l'année. Or, nous avons vu précédemment que sous certaines conditions bien définies (Chapitre 3), les intrusions du Rhône peuvent prendre une direction vers l'Est, passer au large de Marseille et couvrir une zone de plus de 40 km depuis l'embouchure, provoquant ainsi des modifications biogéochimiques et biologiques sur leur passage (Gatti et al. 2006, Para et al. 2010, Fraysse et al. 2013). D'après ces auteurs, un site d'étude comme SOLEMIO peut présenter, épisodiquement et en surface, une valeur de salinité plus faible (< 37.5) et des concentrations en C, N et P plus élevées, signes d'intrusion d'eau du Rhône. Il a également été montré que, via le courant nord Méditerranéen (CNM), la présence d'eau d'origine rhodanienne, sous forme de lentilles propagées, peut également être enregistrée à la station d'observation SOLA (Laghdass et al. 2010).

Les impacts des crues de rivières peuvent être aussi un facteur d'apport de MO d'origine continentale comme le laisse suggérer l'indice *BIT* (*Branched and Isoprenoid Tetraether*) qui permet d'estimer la quantité relative de MO terrigène et de MO marine présentes dans les sédiments marins (Hopmans et al. 2004). L'utilisation de l'indice *BIT* combiné avec des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ COP (Carbone Organique Particulaire composé de l'isotope stable ¹³C) et de rapport C/N confirme que des événements de crues de rivières, comme ceux du Têt, contribuent à de forts apports terrigènes (Kim et al. 2006).

L'atmosphère représente également une source allochtone de nutriments (N et P) et de métaux traces comme le fer (Fe) pour l'océan ouvert (Duce & Tindale 1991, Jickells et al. 2005,

Duce et al. 2008, Krishnamurthy et al. 2010, Okin et al. 2011). Dans l'océan ouvert, les apports atmosphériques sont source de composés nutritionnels et de métaux biodisponibles pour le système marin. Par exemple, un système comme celui de la mer Méditerranée est caractérisée par des eaux à tendance oligotrophes. Par ailleurs, nous avons vu qu'elle est principalement limitée en P et que les apports de N mais surtout de P, minéral ou organique, par l'atmosphère, peuvent représenter une source intermittente de nutriments non négligeable. Or, selon la localisation géographique, les flux de dépôt atmosphérique de phosphore inorganique dissous (PID) et d'azote inorganique dissous (NID) peuvent représenter des apports de 243 à 608 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{an}^{-1}$ et de 18,1 à 47,7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{an}^{-1}$, respectivement (Markaki et al. 2010). Les résultats de cette étude suggèrent également que 1) la quantité de NID déposée durant la période humide (Octobre à Avril) est 2 à 8 fois plus élevée que celle déposée pendant la période sèche (Mai à Septembre), 2) 65% de PID est déposé pendant la période humide et 3) les poussières atmosphériques contribuent significativement aux dépôts de PID. L'importance de tels apports atmosphériques est également observée lors d'expériences d'enrichissement en minicosme. En effet, des enrichissements réalisés avec des poussières minérales ou d'origine saharienne montrent que des pulses de poussières peuvent être à l'origine de nouvelles sources de N et P. Par ailleurs, ces poussières peuvent stimuler également, et de manière significative, la RB et l'AB et provoquer des changements dans la structure des communautés (Pulido-Villena et al. 2008, 2014, Lekunberri et al. 2010).

Les variations de MO disponible pour les bactéries hétérotrophes dans le système marin ne sont pas seulement dépendantes de l'intermittence de tels apports allochtones (rivières, dépôts atmosphériques). Sous l'influence de processus physiques (upwelling, downwelling, courants, sédimentation, re-suspension), chimiques (photo-oxydation, agrégation, dissolution) et biologiques (photosynthèse, prédation, lyses, excrétion) (Carlson & Ducklow 1995, Carlson et al. 2004), il se produit un découplage entre les termes de production et de consommation (Carlson et al. 2002). Ce déphasage entraîne des fluctuations spatiales et temporelles du COD (Aminot & Kérouel 2004). Dans le golfe du Lion, la variabilité spatiale se situe à plusieurs échelles. D'un point de vue physique, l'échelle la plus étudiée est la meso-échelle avec les phénomènes de tourbillons, de méandres du courant nord Méditerranéen ou d'évènements d'upwelling (Mcmanus & Peterson 1988, Millot 1990, Sciandra et al. 2003, Hu et al. 2011, Kersalé et al. 2013).

L'hétérogénéité spatiale de la MO se retrouve également dans son état physique au sein de la colonne d'eau. La traditionnelle dichotomie entre COP et COD est remplacée depuis longtemps

par le concept d'un continuum de classe de taille de la MO avec, entre les groupes dissous et particuliers de colloïdes, des particules exopolymériques transparents (TEP), des gels polymériques (Verdugo et al. 2004) et, à une échelle même visible à l'œil nu, des macro agrégats (neige marine) (Mari 1999, Mari et al. 2004, Stemann et al. 2008). Des études sur la nature complexe de la MO (Long & Azam 1996, Chin et al. 1998) et sur les stratégies comportementales des bactéries tel que le chémotactisme (Stocker et al. 2008) montrent que 1) les bactéries ne dégradent pas seulement la MOD mais tout le continuum MOD - MOP (Azam et al. 1994, Mitchell et al. 1995), 2) cela génère des échanges de MO entre les différents groupes de classe et de taille, et 3) les activités de dégradation des différents réservoirs créent des micro-consortiums taxonomiques bactériens plus ou moins adaptés qui peuvent échanger leurs populations (Kiorboe et al. 2002, Fenchel 2002, Ortega-Retuerta et al. 2013).

La variabilité temporelle peut elle aussi influencer les apports en ressources et les plus connues sont 1) celles liées au cycle journalier accompagné de la rythmicité diurne du phytoplancton, influant sur celle d'autres éléments du réseau trophique microbien comme les virus ou les prédateurs flagellés (Jones et al. 1990, Coffin et al. 1993, Mercado et al. 2006), et 2) celles liées à l'influence des cycles saisonniers en milieu tempéré caractérisés par la période du bloom printanier et sa production plus élevée de COD (Lemée et al. 2002a, Montserrat Sala et al. 2002, Sohrin & Sempéré 2005, Pinhassi et al. 2006, Alonso-Sáez et al. 2008, Laghdass et al. 2012). En conclusion, la nature (i.e. la labilité) fluctuante de la MO doit être abordée comme un facteur régulant la dynamique des bactéries marines hétérotrophes.

La culture en minicosme semble être un outil adapté pour observer la réponse d'une communauté bactérienne face à des pulses de MO. De précédentes études réalisées avec des cultures bactériennes soumises à différentes concentrations de carbone (Barillier & Garnier 1993, Eiler et al. 2003) ont déjà été menées. Alors que Barillier & Garnier (1993) montrent une tendance à l'augmentation ($r = 0.65$, $p < 0.05$) de la croissance bactérienne avec l'augmentation de la concentration en COD (de 200 à 1000 $\mu\text{mol C dm}^{-3}$), Eiler et al. (2003) montrent qu'à partir de communautés bactériennes issues de l'eau de surface d'un lac, le BGE, les taux de croissance et la composition des communautés ne sont pas contraints par la concentration en substrat (40 à 2530 $\mu\text{mol C dm}^{-3}$, dans la plupart des eaux naturelles avec une possible exception pour les eaux oligotrophes). Toutefois, la valeur du BGE peut doubler lorsque le substrat carboné est apporté de manière pulsée par rapport à un apport initial unique (Eichinger et al. 2010) (tel qu'il est

généralement apporté dans les expériences de dégradation bactérienne qui servent à estimer le BGE). Il nous a semblé intéressant d'étudier l'influence d'un substrat carboné unique : le pyruvate (de faible poids moléculaire et d'une forte labilité), apporté de manière « pulsée » et « continue », sur la dynamique des communautés bactériennes (AB, PB, RB et BGE).

2 Méthodologie

2.1. Zone d'étude

Les inoculum bactériens pour les cultures en minicosme (définis dans ce manuscrit comme une culture bactérienne réalisée dans un réservoir de 10 dm³) proviennent d'eau de mer de surface (< 5 m de profondeur) de la station SOLEMIO (N 43°14'30" et E 05°17'30", 60 m de profondeur) dans la baie de Marseille. Les caractéristiques de la zone d'étude sont détaillées lors du suivi saisonnier (Chapitre 3). Trois des 4 expériences en minicosme sont réalisées en même temps que le suivi *in situ*. La première expérience en culture a lieu avant le début du suivi (avant Janvier 2012) et bénéficie donc de moins d'informations sur l'état initial de l'écosystème échantillonné.

2.2. Principe et fréquence des cultures bactériennes

Quatre séries de cultures bactériennes sont réalisées en minicosme. Ces cultures sont toutes réalisées selon le principe du mode « batch ». Un premier réservoir (P) reçoit 5 pulses de pyruvate toutes les 48 heures (avec à chaque fois 100 µmol dm⁻³ de C pyruvate rajoutée dans le réservoir). Un second réservoir (C) est alimenté en continu par une pompe péristaltique capable de délivrer des volumes précis de C pyruvate issu d'une solution mère (4000 µmol dm⁻³ C). La quantité cumulée dans le système « continu » en fin d'expérience est équivalente à celle du régime « pulsé ». Un troisième réservoir (T) fonctionne également en mode « batch » et sert de témoin (il ne reçoit pas de pyruvate). Au final, chaque série de culture bactérienne se compose d'une combinaison de régime « pulsé » (P), de régime « continu » (C) et d'un témoin contrôle (T). L'objectif est d'étudier comment le régime d'apports de MO (pulsé vs continu) peut avoir un effet sur la dynamique des bactéries marines hétérotrophes (PB, RB, AB, BGE). Les cultures en minicosme sont réalisées 4 fois à l'identique :

- ✓ En situation hivernale (du 28/11/11 au 08/12/11) : expérience I
- ✓ Au printemps (du 26/03/12 au 06/04/12) : expérience II
- ✓ En été (du 25/06/12 au 06/07/12) : expérience III
- ✓ En automne (27/09/12 au 08/10/12) : expérience IV

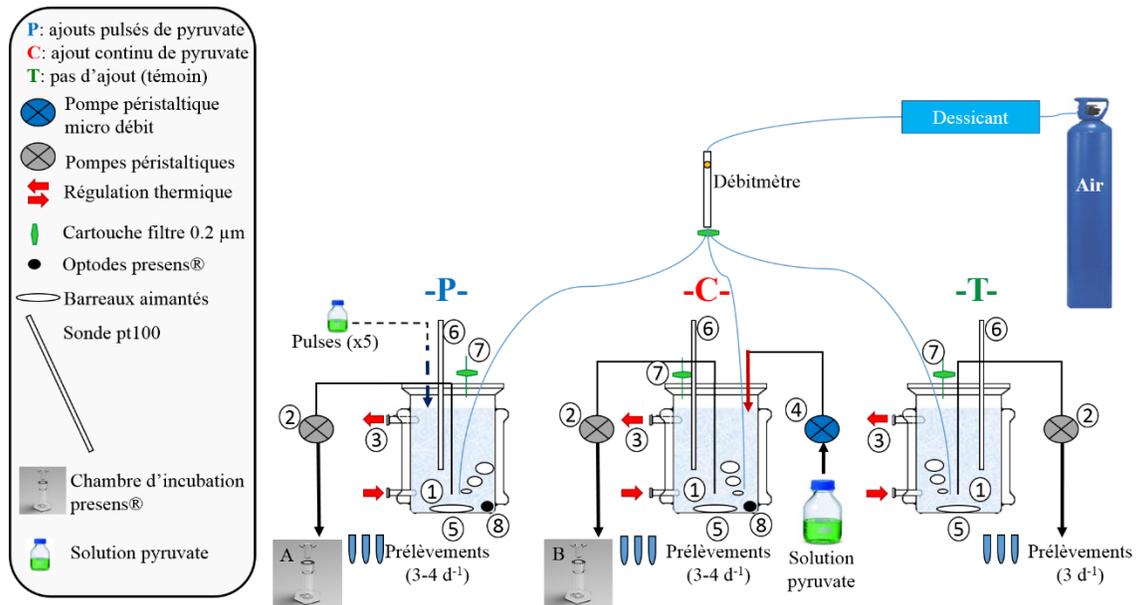
L'intérêt de reproduire 4 cultures à l'identique est d'avoir des réplicats d'expériences faute d'avoir des réplicats de cultures. Ne disposant que de seulement 3 réservoirs de culture, il nous est impossible d'avoir des triplicats pour chacune des 3 conditions testées. Le fait de travailler en situations saisonnières contrastées, avec des conditions différentes en termes de qualité de MO et de consortium bactérien, permet de vérifier si les résultats obtenus sont répétitifs quand les conditions initiales changent.

2.3. Mise en place des cultures bactériennes en minicosme

Le jour même du prélèvement *in situ*, 30 dm³ d'eau de mer de surface sont filtrés sur des filtres polycarbonate 0,6 µm et divisés par paliers successifs dans 3 réservoirs en verre de 10 dm³ chacun. Le système d'expérience en minicosme bénéficie en plus des appareils décrit figure 5.1 :

- ✓ D'une chambre thermo-régulée de 30 cm³ (Chapitre 5, paragraphe 3.2) annexée à chacun des réservoirs P et C et équipée de la technologie presens® afin de pouvoir mesurer instantanément la RB lors de chaque échantillonnage journalier,
- ✓ D'une électrode pH (Schott® instrument pl80 – 425 pH) pour contrôler tous les 72 heures le pH des cultures,
- ✓ D'un réfractomètre pour contrôler la salinité en début et en fin d'expérience.

A



B

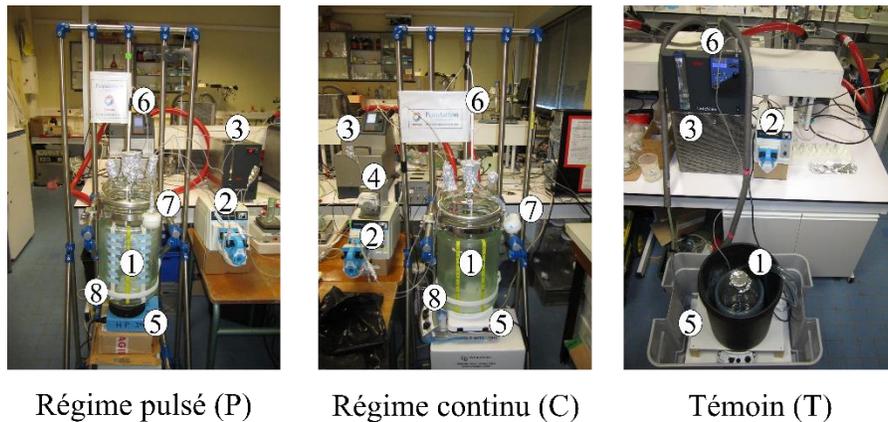


Figure 5.1. A : schéma du système de culture bactérienne en minicosme en régime pulsé (P), continu (C) et témoin (T). B : photo du système de culture bactérienne en minicosme. 3 réservoirs de 10 dm³ (#1) remplis d'eau de mer filtrée sur 0,6 µm, alimentés par des pompes péristaltiques servant pour les apports de MO et/ou pour les prélèvements (#2), sont thermo-régulés par des cryostats de type Huber® Ministat 240-cc (#3). Une pompe péristaltique micro-débit délivre un volume précis de C pyruvate dans le réservoir C (#4) et un agitateur magnétique (400 rpm) est placé sous chaque réservoir (#5). Une sonde pt100 (#6) enregistre dans chaque culture la température interne. Un évent (#7, cartouche stérile en polycarbonate) est placé sur le chapeau hermétique de chaque réservoir afin d'éviter une surpression due au bullage à l'air (bouteille *Alphagaz Auto IV L50*) qui est là pour garder une saturation d'O₂ dissous constante et supérieure à 80% dans les cultures. Le système presens® est branché sur les réservoirs (P) et (C) (#8). Toutes les mesures en continu de la température interne et de l'O₂ dissous sont acquises par ordinateur. Le réservoir (T) ne possédant pas de double paroi, il a nécessité l'utilisation 1) d'un tuyau courant sur toute la hauteur de ce réservoir afin d'y faire circuler de l'eau thermo-régulée et 2) d'un bac d'eau pour diminuer les pertes calorifiques entre la température interne de la culture et la température extérieure de la pièce. Le laboratoire était équipé de climatiseurs améliorant ainsi les conditions thermiques durant la durée des expériences en minicosmes. La RB est mesurée dans les réservoirs (P) et (C) à l'aide de 2 chambres d'incubation presens®.

Avant de remplir les réservoirs avec l'eau de mer filtrée, ils sont au préalable nettoyés (détergent RBS, HCL 10% et eau MilliQ) et autoclavés. Les cryostats sont allumés 24 heures avant le début de l'expérience et la consigne de température est fixée dès que la température *in situ* du prélèvement est connue (environ 5 heures avant le remplissage). Le remplissage des minicosmes prend entre 5 et 7 heures selon la vitesse de filtration. L'agitation est mise en route pendant cette étape. Une fois remplis, les réservoirs sont hermétiquement fermés. Le bullage, l'acquisition en continu de la température interne et de la saturation d'O₂ dissous sont activés. Avant d'injecter le 1^{er} pulse et de lancer la pompe péristaltique en continu pour le réservoir C, des prélèvements « t0 » sont effectués afin connaître les conditions initiales dans chaque minicosme : P, C et T. Afin que le carbone-pyruvate soit le seul facteur limitant, les sels nutritifs (NH₄ et PO₄) sont ajoutés en excès (41 μmol dm⁻³ de NH₄ et 10 μmol dm⁻³ de PO₄) en début d'expérience (à t1) dans les réservoirs P et C. Le 1^{er} pulse de 100 μmol dm⁻³ de C pyruvate est alors ajouté à la culture P, tandis que la pompe péristaltique assurant un ajout en continu de cet élément est lancé pour la culture C.

3 PARAMÈTRES MESURÉS

Les 3 réservoirs P et C ont une fréquence d'échantillonnage de 3 prélèvements par jour (matin, début d'après-midi et fin d'après-midi). Le jour du pulse, un prélèvement supplémentaire est réalisé dans les réservoirs P et C 30 minutes après l'apport pulsé (Tableau 5.1). Le réservoir T n'est échantillonné qu'une seule fois par jour (début d'après-midi).

Le protocole d'échantillonnage consiste dans un premier temps à couper la climatisation afin d'éviter 1) une potentielle contamination et 2) de dévier la flamme du bec bunsen placé à la sortie des tubes de prélèvement en PFA (0,8 mm de diamètre) plongés dans les cultures. Trois pompes péristaltiques sont utilisées pour garantir les prélèvements en conditions stériles. Avant de débiter une série de prélèvements, un volume de 100 cm³ est sacrifié afin de rincer le volume resté dans les tubulures.

Tableau 5.1. Nombre d'échantillons des différents paramètres mesurés selon le réservoir de culture considéré P, C et T.

Paramètres mesurés	Réservoir pulsé (P)	Réservoir en continu (C)	Réservoir témoin (T)
	fréquence / jour	fréquence / jour	fréquence / jour
COD	3 à 4	3 à 4	1
COP & NOP	3 à 4	3 à 4	1
Sels nutritifs (NH ₄ & PO ₄)	1	1	1
RB	3 à 4	3 à 4	nd
PB	3 à 4	3 à 4	1
Cytométrie en flux	3 à 4	3 à 4	1
Microscopie	1	1	1
SSCP	1	1	1

nd: non déterminé

Les 2 chambres de mesures de respiration presens® sont remplies après avoir été rincées deux fois et l'acquisition est lancée avant de commencer chaque prélèvement dans P et C. Les échantillonnages du COD et du COP (et NOP) sont toujours réalisés en premier car il s'agit des paramètres les plus sensibles à la contamination. Pour ce faire, 100 cm³ de culture sont prélevés dans une éprouvette graduée calcinée et transvasés dans un système de filtration en verre calciné selon le protocole expliqué chapitre 5 (paragraphe 3.1 et 3.2). Les sels nutritifs (NH₄ et PO₄) ne sont échantillonnés qu'une seule fois par jour, le matin pour P et C et en début d'après-midi pour T (Chapitre 5, paragraphe 3.3). Les prélèvements pour la PB (Chapitre 5, paragraphe 3.5) et pour les comptages bactériens, virus et phytoplancton en cytométrie en flux (Chapitre 5, paragraphe 3.4) ne sont réalisés qu'après ceux de la MO et des sels nutritifs. Un échantillonnage journalier pour les comptages en microscopie à épifluorescence est également réalisé pour contrôler une potentielle contamination par les flagellés (Chapitre 5, paragraphe 3.5). Avant chaque pulse, 100 cm³ de culture des réservoirs P, C et T sont prélevés et filtrés dans des colonnes de filtration à travers une série de 2 filtres en polycarbonate blanc : 3 µm puis 0,2 µm. Seuls les filtres 0,2 µm sont analysés en CE-SSCP (Chapitre 5, paragraphe 3.8).

3.1. Le Carbone Organique Dissous

Afin de suivre l'évolution du COD dans les minicosmes, 100 cm³ de culture sont filtrés à travers des filtres Whatman® GF/F 25 mm sous une dépression faible. Le système utilisé est en pyrex et il est calciné avant chaque utilisation. Cette étape permet de séparer le COP du COD. Les échantillons de COD sont stockés dans des ampoules en verre au moyen de pipettes Pasteur calcinées. Une goutte de H₃PO₄ 80 % est ajoutée avant de sceller les ampoules qui sont ensuite stockées en chambre froide (4°C) jusqu'à l'analyse selon la méthode décrite Chapitre 2 (paragraphe 2.2.6). Durant la filtration, des cellules bactériennes de petite taille passent à travers les filtres GF/F (porosité nominale de 0,7 µm). Aussi, des échantillons supplémentaires sont prélevés dans les filtrats pour une analyse ultérieure par cytométrie en flux (Chapitre 2, paragraphe 2.3.1). Il est ainsi possible, à posteriori, de corriger les mesures de COD selon la relation suivante :

$$COD_{\text{corrigé}} = COD_{\text{mesuré}} - (AB_{\text{filtrat}} \times 1000) \times COP_{\text{spécifique}} \times 10^{-9}$$

Où,

$$COP_{\text{spécifique}} = \frac{COP_{\text{mesuré}}}{(AB_{\text{totale}} - AB_{\text{filtrat}}) \times 1000} \times 10^9$$

Avec, COD_{corrigé}, COD_{mesuré} et COP_{mesuré} en µmol C dm⁻³, Abondance Bactérienne totale (AB_{totale}) et Abondance Bactérienne dans le filtrat (AB_{filtrat}) exprimées en nombre de bactéries cm⁻³ et COP_{spécifique} en fmol C bactérie⁻¹. L'évolution du COP_{spécifique} lors des phases de broutage par les flagellés hétérotrophes (HF), se produisant dans les réservoirs P et C des expériences I et III et dans le réservoir P de l'expérience II, est calculé en considérant une AB_{totale} équivalente à la valeur du dernier échantillon mesuré. En parallèle, la quantité de COD_{cumulé} dans le réservoir C est également calculée à partir des relations suivantes :

$$COD_{\text{cumulé}} = \sum_{i=0}^{i=n} COD_{\text{ajouté}}$$

Où chaque jour de culture, le COD_{ajouté} est calculé selon la relation suivante :

$$COD_{\text{ajouté}} = \frac{COD_{SM} \times V_{\text{ajouté}}}{V_{\text{réservoir}}}$$

Où,

$$V_{\text{ajouté}} = \frac{\text{débit}_{\text{pompe}} \times 1000}{24} \times \Delta$$

Avec, COD_{cumulé}, COD_{ajouté} et COD_{SM} en $\mu\text{mol C dm}^{-3}$. Les concentrations en C des solutions mères (COD_{SM}) sont de 3813, 3632, 3975 et 3853 $\mu\text{mol C dm}^{-3}$ pour les cultures I, II, III et IV, respectivement. V_{ajouté} et V_{réservoir} sont des volumes exprimés en dm^3 . *débit*_{pompe} correspond au débit de la pompe péristaltique en $\text{cm}^3 \text{ d}^{-1}$ préalablement étalonnée par une gamme de calibration, Δ représente le nombre d'heures où un même *débit*_{pompe} est appliqué.

3.2. Le Carbone Organique Particulaire & l'Azote Organique Particulaire

Un volume d'échantillon de 100 cm^3 de culture est filtré sur le même système en verre calciné que celui utilisé pour le COD. Le matériel particulaire est récupéré sur des filtres Whatman® GF/F 25mm, puis les filtres sont placés dans des boîtes de pétri et stockés à -20°C jusqu'à l'analyse du COP et du NOP selon la méthode décrite Chapitre 2 (paragraphe 2.2.3). Comme pour le COD, une correction est apportée, à posteriori, aux mesures de COP et de NOP selon les relations suivantes :

$$COP_{\text{corrigé}} = COP_{\text{mesuré}} + (AB_{\text{filtrat}} \times 1000) \times COP_{\text{spécifique}} \times 10^{-9}$$

$$NOP_{\text{corrigé}} = NOP_{\text{mesuré}} + (AB_{\text{filtrat}} \times 1000) \times NOP_{\text{spécifique}} \times 10^{-9}$$

Où,

$$COP_{\text{spécifique}} = \frac{COP_{\text{mesuré}}}{(AB_{\text{totale}} - AB_{\text{filtrat}}) \times 1000} \times 10^9$$

Et,

$$NOP_{\text{spécifique}} = \frac{NOP_{\text{mesuré}}}{(AB_{\text{totale}} - AB_{\text{filtrat}}) \times 1000} \times 10^9$$

Avec, COP_{corrigé}, NOP_{corrigé}, COP_{mesuré} et NOP_{mesuré} en $\mu\text{mol C dm}^{-3}$, AB_{totale} et AB_{filtrat} en nombre de bactéries cm^{-3} et COP_{spécifique} et NOP_{spécifique} en $\text{fmol C bactérie}^{-1}$.

3.3. Sels Nutritifs

L'échantillonnage s'effectue dans des flacons en verre de contenance 60 cm³. À chaque prélèvement, le flacon est rincé 3 fois de suite avec la culture avant de recevoir 20 cm³ d'échantillon, puis les flacons sont conservés congelés jusqu'à l'analyse. Les dosages des sels nutritifs (NH₄ et PO₄) se font au Technicon AutoAnalyzer ® selon la méthode décrite chapitre 2 (paragraphe 2.2.6).

3.4. L'Abondance cellulaire

L'échantillonnage pour les mesures d'abondance bactérienne (AB) se fait dans des cryotubes de 2 cm³. La fixation et la conservation des échantillons sont réalisées selon la méthode décrite Chapitre 2 (paragraphe 2.3.1). Le dénombrement cellulaire est réalisé par cytométrie en flux et l'AB est déterminée à partir des 3 équations suivantes :

$$AB = \frac{B_{\text{analysées}}}{V_{\text{analysé}}} \times d$$

Où,

$$V_{\text{analysé}} = \frac{Tc_{\text{analysé}}}{Tc_{\text{échantillon}}}$$

Et,

$$Tc_{\text{échantillon}} = \frac{Tc_{\text{total}}}{V_{\text{edm}}} \times \frac{V_{\text{ajouté}}}{V_{\text{échantillon}}}$$

Avec, AB : l'abondance bactérienne exprimée en nombre de bactéries cm⁻³. B_{analysées} : le nombre de cellules bactériennes comptées en 1 minute. V_{analysé} : le volume en cm³ d'échantillon analysé pendant 1 minute. d : le facteur de dilution de l'échantillon si il est trop concentré en cellules bactériennes (10 ou 100). Tc_{analysé} : le nombre de billes comptées en 1 minute. Tc_{échantillon} : le nombre de billes par mm³ d'échantillon. Tc_{total} : le nombre de billes total du lot de *TruCount* utilisé. V_{edm} : le volume d'eau de mer ajouté pour la dilution des billes (500 mm³). V_{ajouté} : le

volume de billes diluées ajouté à l'échantillon (50 mm³). $V_{\text{échantillon}}$: le volume total de l'échantillon (500 mm³ + 5 mm³ SYBR Green II).

En parallèle, un dénombrement cellulaire des bactéries hétérotrophes et des nano-flagellés est effectué par microscopie à épifluorescence (Chapitre 2, paragraphe 2.3.1). Une coloration au DAPI est réalisée sur les échantillons avant l'observation au microscope. Les échantillons pour l'abondance des bactéries et des flagellés (HF) sont prélevés dans tubes Falcon® (15cm³ et 25 cm³, respectivement). L'abondance est alors calculée de la façon suivante :

$$\text{cellules.cm}^{-3} = \frac{Nb_{\text{cellules}}}{Nb_{\text{champs}}} \times \frac{\pi D^2}{4S} \times \frac{1}{V_{\text{filtré}}} \times d$$

Avec, Nb_{cellules} , le nombre de cellules comptées et Nb_{champs} , le nombre de champs observés. D , le diamètre de la surface de filtration (μm^2). S , la surface de la zone de comptage (μm^2). $V_{\text{filtré}}$, le volume filtré d'échantillon (cm³) et d , le facteur de dilution apporté par le formol et une dilution éventuelle de l'échantillon.

3.5. Production bactérienne

Un volume de 10 cm³ est échantillonné dans un tube Falcon® de 15 cm³. Cela permet de garantir un volume suffisant pour une mesure simple à une seule concentration (Chapitre 2, paragraphe 2.4.1), des cinétiques concentrations de leucine (entre 10 et 200 nmol Leucine dm⁻³) et/ou des cinétiques de temps d'incubation (entre 0h et 1h30) qui sont régulièrement effectuées. Les conditions de culture sont telles la PB est très dynamique. Les tests cinétiques permettent d'adapter la bonne concentration saturante en leucine et le temps d'incubation nécessaire des échantillons afin d'avoir des mesures de PB les plus robustes possibles. Le temps d'incubation, la concentration en leucine totale, le ratio entre leucine radioactive, la leucine froide rajoutée et le volume incubé sont ajustés afin d'obtenir le meilleur compromis entre la quantité de leucine radioactive utilisée et la fiabilité de la mesure. Dans la première expérience, la dilution isotopique augmente très rapidement dans les minicosmes C et P jusqu'à un facteur 4,5 en même temps que l'activité, avec les ajouts initiaux de 20 nmol dm⁻³ de leucine. La concentration en leucine totale est augmentée à 60-100 nmol dm⁻³ de leucine et permet de ramener la dilution isotopique à 1,0-1,6. La durée d'incubation varie de 2 heures (les t₀ et le réservoir témoin) à 0,25-0,5 heure dans les bacs C et P. Lors des fortes activités, nous avons utilisé 100% de leucine radioactive et réduit les

volumes incubés de 1,5 à 0,375 cm³. Dans les autres expériences, nous avons anticipé les évolutions de l'activité et ajusté les concentrations totales en leucine rajoutées de façon à ce que la dilution isotopique ne dépasse pas 1,6.

3.6. Respiration bactérienne

La respiration bactérienne (RB) est mesurée avec la technologie des optodes presens® (Annexe 6). Deux chambres d'incubation placées au noir sont munies d'une optode presens® et annexées aux réservoirs P et C afin de mesurer en temps réel la saturation en O₂ dissous (Annexe 8, Fig. A8.1). Le temps d'incubation (entre 1h et 2h selon l'heure du prélèvement dans la journée) est suffisant pour voir une décroissance de la saturation d'O₂ dans les chambres. Les données brutes de saturation d'O₂ dissous acquises sont corrigées des conditions expérimentales de température, de salinité et de pression atmosphérique. Nous mesurons la salinité en début d'expérience à l'aide d'un réfractomètre et la température est acquise en continu grâce à une sonde pt100. L'étalonnage des optodes à 0% et à 100% de saturation d'O₂ dissous est réalisé post-expérience.

La RB ($\mu\text{mol O}_2 \text{ dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) est calculée à partir d'un modèle dynamique de régression non linéaire détaillé à l'annexe 7. Toutes les valeurs de RB ont nécessités une correction. En effet, malgré un étalonnage homogène entre les 2 chambres, un décalage de la concentration d'O₂ dissous (10 à 30 $\mu\text{mol O}_2 \text{ dm}^{-3}$) persiste au t0. Un facteur correctif (FC) est donc appliqué post-expérience à chaque mesure de RB.

Tableau 5.2. Valeurs minimales, maximales et moyennes de la concentration d'O₂ dissous théorique, selon les valeurs de salinité et de température (Min., Max. et Moy.), calculées selon la table de Benson & Krause de 1984. L'annotation « nd » est mentionnée lorsque l'acquisition de la température ne s'est pas réalisée correctement (défaut de capteur).

Réservoir P	Salinité	Température (°C)			Concentration d'O ₂ dissous théorique ($\mu\text{mol O}_2 \text{ dm}^{-3}$)		
		Min.	Max.	Moy.	Min.	Max.	Moy.
Exp. I	38,0	18,23	18,44	18,30	234,60	233,69	234,17
Exp. II	37,5	nd	nd	13,60	nd	nd	257,67
Exp. III	37,9	19,15	19,27	19,21	230,77	230,27	230,52
Exp. IV	38,4	20,77	20,84	20,81	223,42	223,14	223,26
Réservoir C	Salinité	Température (°C)			Concentration d'O ₂ dissous théorique ($\mu\text{mol O}_2 \text{ dm}^{-3}$)		
		Min.	Max.	Moy.	Min.	Max.	Moy.
Exp. I	38,0	18,31	18,53	18,40	234,25	233,30	233,95
Exp. II	37,5	13,09	13,20	13,10	260,14	259,56	259,88
Exp. III	37,9	nd	nd	19,15	nd	nd	230,77
Exp. IV	38,4	19,93	20,20	20,07	226,83	225,73	226,26

Nous obtenons ainsi des valeurs de concentration d'O₂ dissous moyennes théoriques déterminées selon les conditions de température et de salinité à partir de la table de Benson & Krause de 1984 (Tableau 5.2). Une fois cette concentration théorique d'O₂ dissous moyenne calculée, nous la divisons par la concentration d'O₂ mesurée expérimentalement (concentration d'O₂ dissous à t₀) afin d'obtenir un FC. Les calculs de ce FC ainsi que le développement méthodologique des optodes presens® dans le cadre de nos conditions expérimentales représentent un travail conséquent qui est repris en détail à l'annexe 8. Un quotient respiratoire (RQ) de 1,2 basé sur l'oxydation complète du pyruvate est utilisé pour convertir les données en flux de CO₂.

3.7. Rendement de croissance

Le rendement de croissance (BGE, en %) est calculé selon la relation suivante :

$$BGE = \frac{PB}{(PB + RB)} \times 100$$

Les erreurs standards (se) associées aux mesures de BGE sont calculées selon l'équation suivante (Toolan 1996):

$$seBGE = \frac{\sqrt{RB^2 \times sePB^2 + PB^2 \times seRB^2}}{(PB + RB)^2}$$

3.8. Structure des communautés

L'évolution de la structure des communautés au cours des expériences est suivie par la technique de CE-SSCP telle que décrite dans le Chapitre 2 (paragraphe 2.5.1). Pour chaque réservoir (P, C et T) et pour chaque expérience (I, II, III et IV), 100 cm³ de milieu de culture sont prélevés après filtration de l'eau de mer sur filtre polycarbonate blanc de porosité 0,6 µm et juste avant chaque pulse de carbone pyruvate. Ces résultats sont encore en cours d'analyses. Seuls sont décrit, dans ce manuscrit, les profils CE-SSCP et les dendrogrammes qui en découlent.

4 Principaux résultats obtenus

Les résultats des cultures en minicosme sont présentés sous forme de figures, montrant les évolutions temporelles des différents paramètres mesurés dans les réservoirs P, C et T, et sous forme de tableaux de données. La présence d'un mucus (non identifié) dans l'eau de mer a entraîné d'importantes difficultés de filtration durant la mise en route retardant ainsi de plusieurs heures (4 à 5h) le lancement des cultures de l'expérience III.

Tableau 5.3. Conditions initiales des expériences I, II, III et IV avant et après ajouts de pyruvate et des sels nutritifs (NH₄ et PO₄)

	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Exp. IV
Dates	28 Nov – 8 Déc 2011	26 Mar – 3 Avr 2012	25 Juin – 6 Juil 2012	27 Sept – 8 Oct 2012
Colonne d'eau stratifiée	Non	Non	Oui	Oui
Bloom	Non	Oui	Non	Non
Avant inoculation (dans eau de mer)				
Heures du T0	18h45	18h30	22h15	15h45
Température (°C)	18	13	19	21
Salinité (psu)	38,0	37,5	37,9	38,4
Chl a (µg dm ⁻³)	0,14	1,32	0,27	0,18
NO ₃ (µmol dm ⁻³)	0,28	0,68	0,04	0,06
NH ₄ (µmol dm ⁻³)	0,09	0,31	0,039	0,051
PO ₄ (µmol dm ⁻³)	0,00	0,03	0,09	0,02
COP (µmol dm ⁻³)	4	8	13	3
AB (10 ⁵ cell cm ⁻³)	9,33	8,06	9,41	6,07
PB (µmol C dm ⁻³ h ⁻¹)	0,001	0,002	0,015	0,004
RB (µmol C dm ⁻³ h ⁻¹)	nd	nd	0,120	0,030
BGE (%)	nd	nd	11	12
Après inoculation (dans P et C, respectivement)				
Heures du T1	19h30	20h40	23h00	18h14
COD (µmol dm ⁻³)	178 et 73	218 et 88	178 et 105	175 et 86
NH ₄ (µmol dm ⁻³)	53 et 51	41 et 44	43 et 41	44 et 47
PO ₄ (µmol dm ⁻³)	16 et 13	9 et 9	10 et 9	9 et 10

4.1. Les sels nutritifs

Les sels nutritifs sont ajoutés en excès dans les réservoirs P et C. L'évolution des concentrations de NH₄ et PO₄ au cours du temps montre une consommation (Fig. 5.2). La consommation des sels nutritifs semble s'effectuer de manière différente entre les réservoirs P et C. En effet, quelle que soit l'expérience considérée, le réservoir P montre une diminution par palier du NH₄ alors que le réservoir C montre une diminution continue. Ce résultat suggère un couplage

de l'assimilation du N et du C. Ce couplage est moins visible avec le PO₄. Bien que les réservoirs P et C des expériences I, II, III et IV montrent toutes une diminution du NH₄ (20 à 25 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) et du PO₄ (1 à 3 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), les concentrations résiduelles en fin d'expérience restent supérieures à celles du réservoir T (Fig. 5.2). Ces résultats confirment que, dans les 4 expériences, le carbone labile est le seul élément limitant la croissance des bactéries marines hétérotrophes. Pour une expérience donnée, les quantités totales de NH₄ et de PO₄ consommées sont identiques dans les bacs P et C.

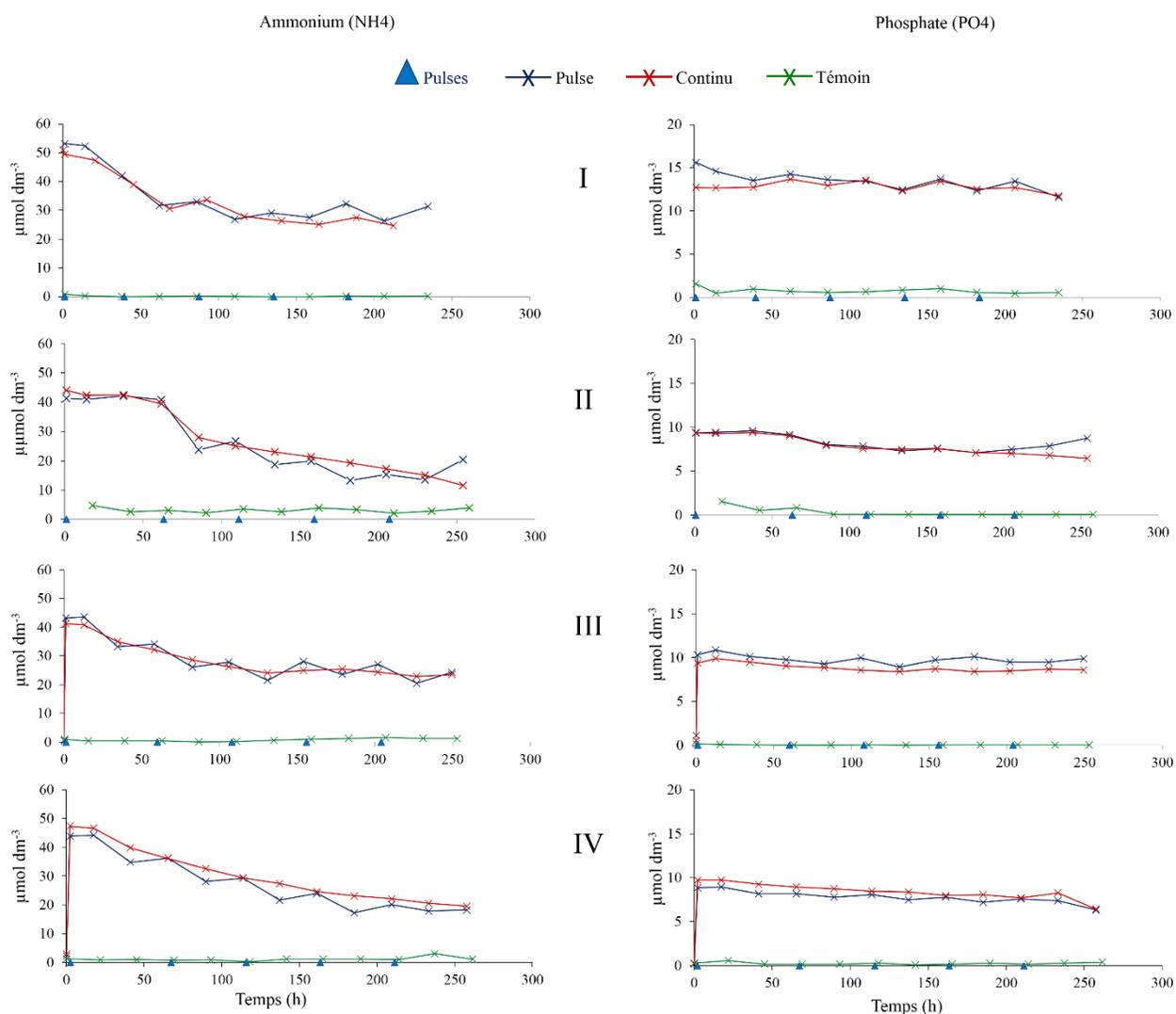


Figure 5.2. Evolution des concentrations du NH₄ et du PO₄ mesurés dans les réservoirs P (pulse), C (continu) et T (témoin) des 4 expériences réalisées : Nov-Déc.11 (I), Mar-Avr.12 (II), Juin-Juil.12 (III) et Sept-Oct.12 (IV)

4.2. Abondances cellulaires

L'abondance bactérienne (AB) des réservoirs P et C augmente de façon identique en début d'expérience (Fig. 5.3). Cette observation est confirmée avec les taux de croissance apparents (μ), calculés à partir des variations des abondances pendant les premiers jours de culture : ils sont relativement similaires entre les réservoirs P et C d'une même expérience (Tableau 5.4). Ceci suggère que l'apport de pyruvate dans les réservoirs C fournit des conditions saturantes pour la croissance (V_{max}), du moins dans les conditions initiales des expériences (comme le montre l'accumulation de COD dans les réservoirs C à ces périodes). Le taux de croissance est du même ordre de grandeur dans les expériences III et IV. Le développement apparent est juste un peu plus lent dans l'expérience II (cultivée à 13°C), et environ 2 fois plus rapide dans l'expérience I.

Tableau 5.4. Valeurs minimales (Min.), maximales (Max.) et moyennées (Moy. \pm se) de l'abondance bactérienne (AB) et les taux de croissance (μ) associés et calculés pour les Exp. I (entre 14h et 46h), Exp. II (entre 14h et 84h), Exp. III (entre 13h et 66h) et Exp. IV (entre 17h et 73h).

AB (10^5 cell. cm^{-3})	Température expérimentale (°C)	Réservoir Pulsé (P)		Réservoir Continu (C)		Réservoir Témoin (T)
		Min. Max. Moy. (\pm SE)	μ (\pm SE) (h^{-1})	Min. Max. Moy. (\pm SE)	μ (\pm SE) (h^{-1})	Min. Max. Moy. (\pm SE)
Exp. I (28/11/11-08/12/11)	18	4 190 81 (\pm 12)	0,074 (\pm 0,008)	9 209 108 (\pm 12)	0,085 (\pm 0,006)	5 38 19 (\pm 5)
Exp. II (26/03/12-06/04/12)	13	0,3 382 124 (\pm 18)	0,037 (\pm 0,006)	7 313 141 (\pm 15)	0,036 (\pm 0,004)	8 26 18 (\pm 8)
Exp. III (25/06/12-06/07/12)	19	2 302 84 (\pm 15)	0,044 (\pm 0,005)	3 335 82 (\pm 14)	0,040 (\pm 0,003)	4 53 19 (\pm 4)
Exp. IV (27/09/12-08/10/12)	21	6 352 144 (\pm 14)	0,046 (\pm 0,008)	6 272 137 (\pm 12)	0,047 (\pm 0,007)	3 12 7 (\pm 1)

Les abondances dans les expériences I, II et III des réservoirs P et C chutent brutalement en fin d'expérience du fait du développement de flagellés hétérotrophes (HF, Fig. 5.3). Cette chute est simultanée dans les réservoirs P et C lors des expériences III, mais décalée dans les expériences I et II, se produisant d'abord dans le réservoir P. La contamination par des flagellés s'est produite lors des phases de filtration de l'eau de mer avec des filtres polycarbonate 0,6 μm . Leur impact est particulièrement visible lors de leur efflorescence qui occasionne des chutes d'AB de plus de 150×10^5 bactéries cm^{-3} en quelques heures.

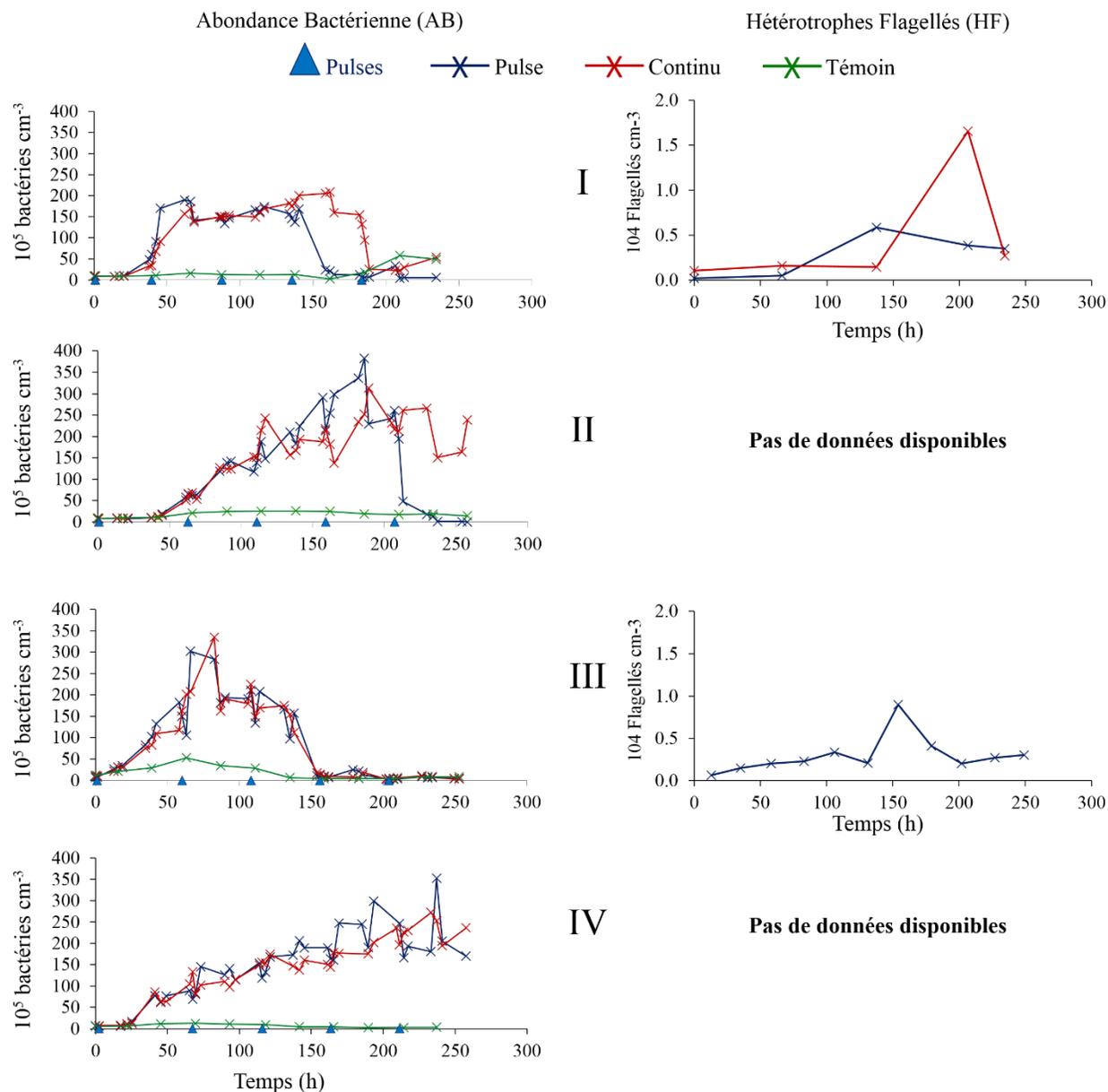


Figure 5.3. Evolution de l'AB et de l'abondance des flagellés hétérotrophes (HF) mesurée selon le régime d'apports en pyruvate dans les réservoirs P (pulsé), C (continu) et T (témoin) des 4 expériences réalisées : Nov-Déc.11 (I), Mar-Avr.12 (II), Juin-Juil.12 (III) et Sept-Oct.12 (IV). Des échantillons sont disponibles mais non traités pour le réservoir P de l'Exp. II et le réservoir C de l'Exp. III

4.3. Stocks de matière organique dissoute et particulaire

Les concentrations de COD et de COP mesurées au cours de chaque expérience sont corrigées selon le pourcentage décroissant de bactéries passant à travers le filtre GF/F 25 mm (exemple Fig. 5.4). En fonction de l'expérience, 15% à 60% de bactéries passent à travers le filtre

pendant les 2 premiers jours de culture. Ce pourcentage diminue brusquement à partir du 3^{ème} jour de 1% à 6%.

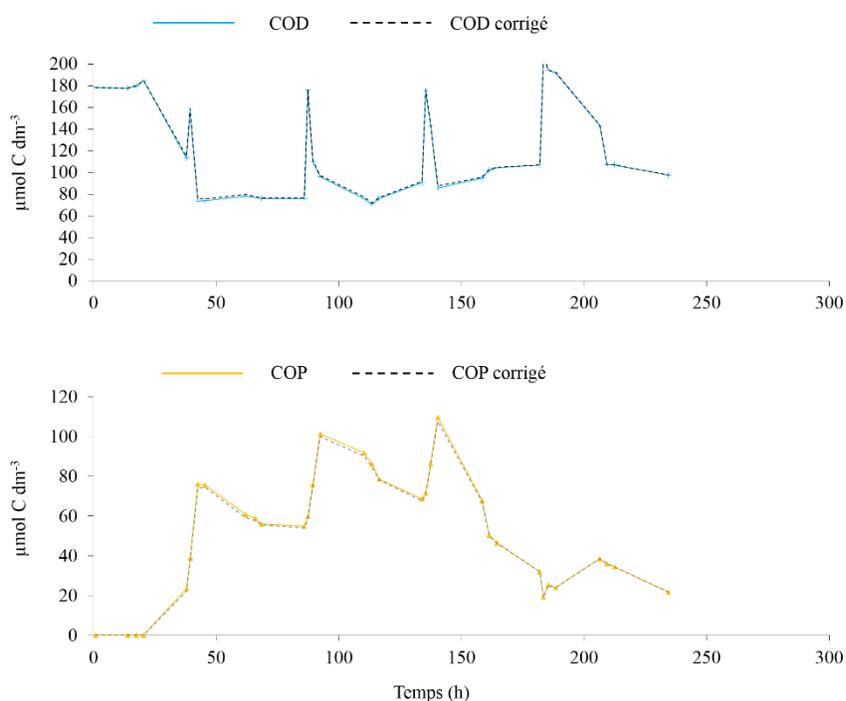


Figure 5.4. Evolution des concentrations de COD et de COP sans correction (trait bleu pour le COD et trait jaune pour le COP) et avec correction (traits pointillés noirs) du pourcentage de bactéries passant à travers le filtre GF/F 25 mm lors de l'expérience I dans le réservoir P (pulsé)

L'évolution temporelle du COD montre une série de pics bien visibles pour chaque expérience dans les réservoirs P (Fig. 5.5). Il manque une partie des données entre les temps 91h et 157h dans l'expérience III, due à une perte d'échantillons. Les communautés bactériennes consomment très rapidement ($< 5\text{h}$) le COD à chaque pulse dans les réservoirs P à l'exception des expériences I et II, où le COD n'est que partiellement consommé au moment du deuxième pulse. Les valeurs de COD du réservoir P redescendent au niveau de la ligne de base du COD du réservoir T après le 2nd pulse. Ensuite, il est observé une accumulation de COD dans les derniers pulses, puisque l'écart entre les valeurs minimales atteintes dans le réservoir P et les concentrations en COD dans le réservoir T augmente. En supposant que tout le C pyruvate labile est consommé à chaque pulse, une possible production de COD réfractaire à l'échelle du temps de l'expérience par les bactéries marines hétérotrophes peut être suspectée. Cependant, les difficultés rencontrées avec

le protocole de dosage du pyruvate aux faibles concentrations (Annexe 4) ne permettent pas de vérifier cette hypothèse. Dans les réservoirs C, le COD a tendance à s'accumuler en début d'expérience (excepté pour l'expérience III) pour ensuite diminuer vers des valeurs légèrement supérieures à celles des réservoirs T. Les valeurs de COD cumulé dans les réservoirs P et C en fin d'expérience sont proches des 500 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ théoriquement attendues, excepté pour les réservoirs C des expériences III et IV où elles dépassent largement les prévisions (Tableau 5.5). La valeur de COD cumulé dans le réservoir P de l'expérience IV est également supérieure à la valeur théorique de 500 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ (Tableau 5.6). Dans un cas, ces différences peuvent s'expliquer par un réglage de la vitesse de la pompe du réservoir C trop importante et dans un autre par des pulses de pyruvate dans le réservoir P supérieurs à 100 $\mu\text{mol C dm}^{-3}$. La source de ces erreurs est liée au réglage de la vitesse de la pompe du réservoir C et à la réalisation d'un pulse de pyruvate dans le réservoir P qui dépend du volume de culture résiduel à l'instant t. Ce volume est estimé de manière visuelle à partir d'une échelle de graduation (précision 0,1 dm^3) disposée sur chacun des réservoirs de culture. Cette méthode d'estimation peut expliquer les différences obtenues entre le COD cumulé mesuré et celui calculé sur le temps des expériences.

Tableau 5.5. Valeurs minimales (Min.), maximales (Max.) et moyennées (Moy \pm se) des stocks de MO, de sels nutritifs et d'AB dans les réservoirs C des expériences I, II, III et IV.

	Exp. I 28 Nov – 8 Déc 2011			Exp. II 26 Mar – 3 Avr 2012			Exp. III 25 Juin – 6 Juil 2012			Exp. IV 27 Sept – 8 Oct 2012		
$\mu\text{mol dm}^{-3}$	Min.	Max.	Moy.(\pm se)	Min.	Max.	Moy(\pm se)	Min.	Max.	Moy(\pm se)	Min.	Max.	Moy(\pm se)
COD	65	133	87(\pm 3)	63	124	85 (\pm 4)	66	125	92(\pm 3)	74	118	87(\pm 2)
COD _{cumulé}	565			582			619			772		
NH4	25	51	35(\pm 3)	12	44	27(\pm 3)	1	41	27(\pm 3)	3	47	29(\pm 3)
PO4	12	14	13(\pm 0,2)	6	9	8(\pm 0,3)	1	10	8 (\pm 1)	0,2	10	8(\pm 1)
COP	ld	74	43(\pm 4)	ld	106	53 (\pm 6)	9	76	47(\pm 3)	1	92	54(\pm 4)
NOP	ld	17	10(\pm 1)	ld	23	13(\pm 1)	1	15	9 (\pm 1)	ld	19	10(\pm 1)
AB 10 ⁵ cell cm ⁻³	9	209	108(\pm 12)	7	313	141(\pm 15)	3	335	82 (\pm 14)	6	272	137(\pm 12)

ld : limite de détection (1 $\mu\text{g dm}^{-3}$ soit 0,08 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ et 0,07 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ pour le COP et le NOP respectivement)

Tableau 5.6. Dynamique du COD dans les réservoirs P des expériences I, II, III et IV au moment des pulses de pyruvate.

	Exp. I 28 Nov – 8 Déc 2011					Exp. II 26 Mar – 3 Avr 2012					Exp. III 25 Juin – 6 Juil 2012					Exp. IV 27 Sept – 8 Oct 2012				
# Pulses	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Moment des pulses (h)	1	40	88	136	184	1	63	111	159	207	1	60	108	156	204	2	67	116	163	211
$\mu\text{mol dm}^{-3}$																				
COD _{cumulé}	506					547					578					689				
COD au pic	178	157	176	175	207	218	188	183	179	177	178	162	nd	nd	271	175	177	199	275	258
COD au minima	72	113	75	91	107	62	125	85	81	107	93	100	nd	nd	131	107	78	84	107	127
Delta COD	106	44	100	85	100	156	63	98	98	70	85	61	nd	nd	140	68	99	115	168	132

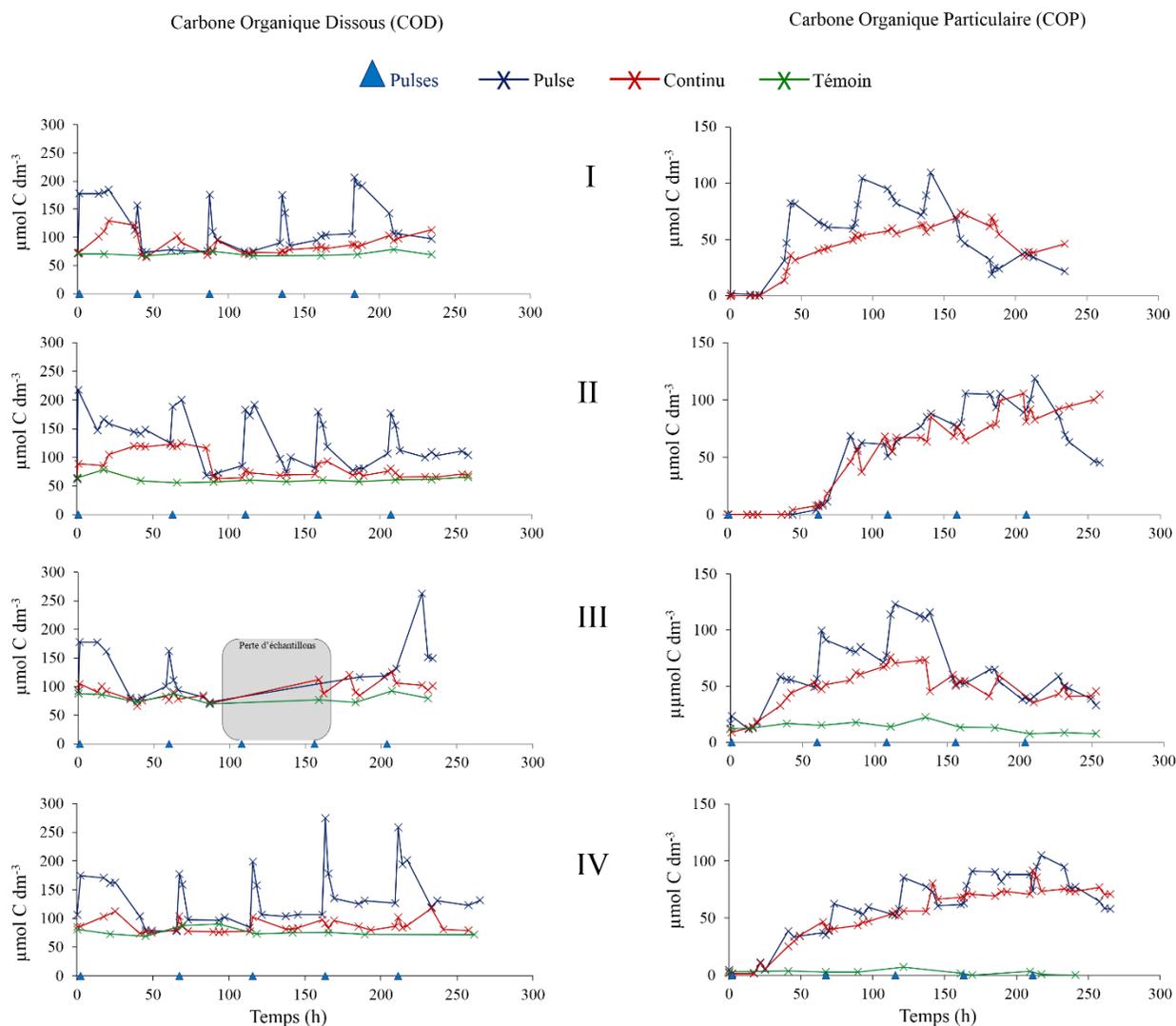


Figure 5.5. Evolution des concentrations du carbone organique dissous (COD) et du carbone organique particulaire (COP) (après correction par le nombre de bactéries passant à travers le filtre GF/F 0.7 μm) dans les réservoirs P (pulsé), C (continu) et T (témoin) des 4 expériences réalisées : Nov-Déc.11 (I), Mar-Avr.12 (II), Juin-Juil.12 (III) et Sept-Oct.12 (IV)

Les réservoirs P et C montrent tous les deux une accumulation de COP (Fig. 5.5). Dans l'expérience I, les stocks s'effondrent après 184 heures dans le réservoir C et 151 heures dans le réservoir P malgré le 5^{ème} pulse de pyruvate. L'accumulation de COP s'arrête également dans les réservoirs P et C de l'expérience III après 162 heures et 159 heures, respectivement. Le COP diminue également dans le réservoir P de l'expérience IV après 217 heures, mais seulement après le dernier pulse. Une augmentation par palier de COP dans les réservoirs P semble se dérouler à la même fréquence que les pulses tandis qu'une augmentation plus régulière se produit dans les

réservoirs C (Fig. 5.5). Si les pics de COP dans les réservoirs P produisent des valeurs plus élevées que celles rencontrées dans le réservoir C, globalement les 2 évolutions temporelles de COP sont parallèles, i.e. tendance à l'augmentation identique dans les réservoirs C et P pour chaque expérience. Le NOP (Fig.5.6) varie de façon concomitante à celui du COP dans tous les réservoirs C et P.

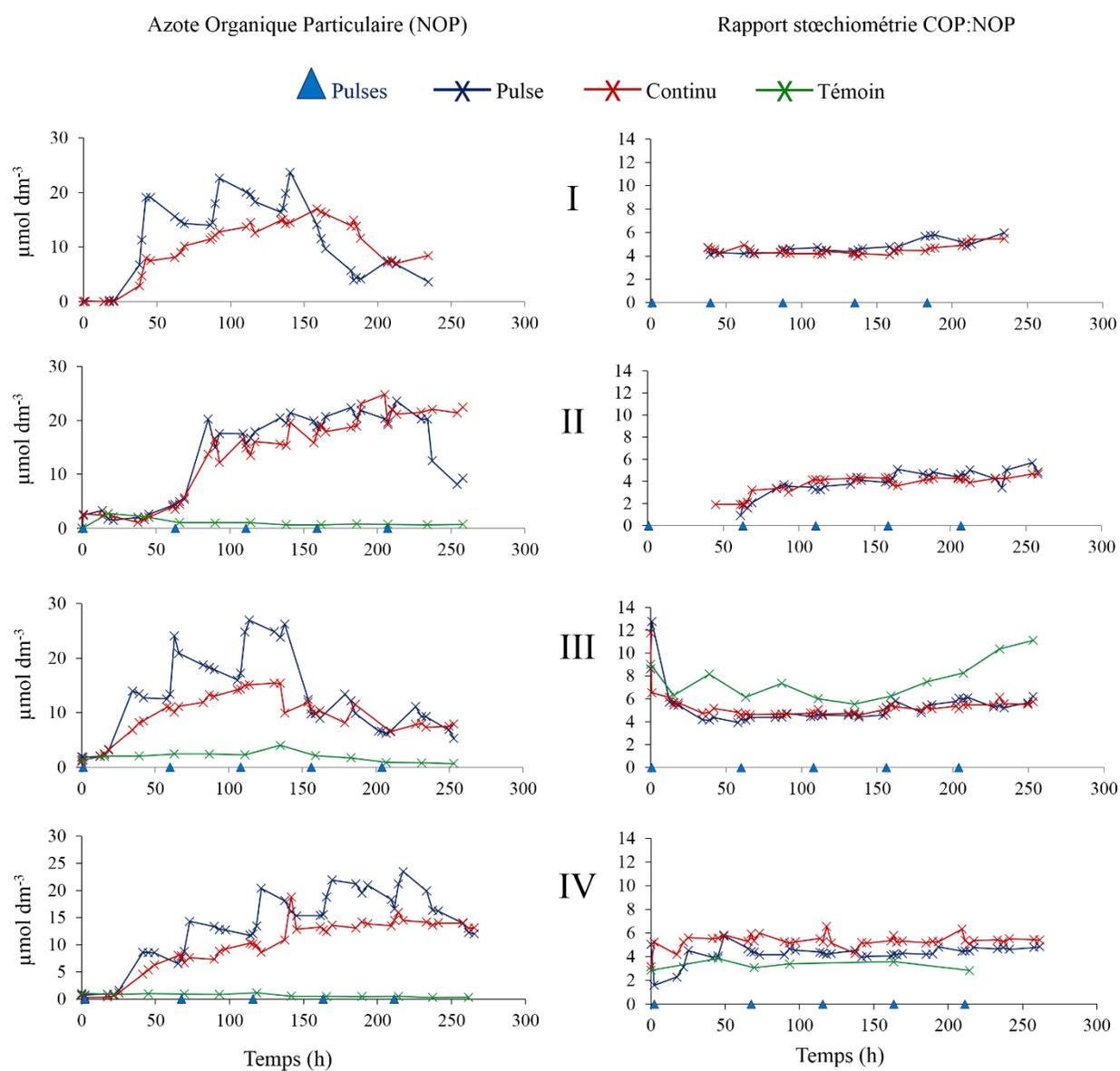


Figure 5.6. Evolution de la concentration de l'azote organique particulaire (NOP) et du rapport COP/NOP mesurés dans les réservoirs P (pulsé), C (continu) et T (témoin) des 4 expériences réalisées : Nov-Déc.11 (I), Mar-Avr.12 (II), Juin-Juil.12 (III) et Sept-Oct.12 (IV)

Quel que soit le régime d'apport (P ou C) et la saison, et hormis les premières valeurs dans les expériences, le rapport COP/NOP (Fig 5.6) fluctue en moyenne de façon stable entre 4 et 5 ($\pm 0,1$) (Tableau 5.7). Ce résultat suggère que les bactéries présentes dans les réservoirs P sont capables de s'adapter aux fluctuations de C dans le milieu afin de garder un rapport C/N bactérien constant, le NH_4 étant fourni en excès. Dans les expériences I et IV, la moyenne du rapport COP/NOP diffère de manière significative entre P et C ($n = 29$, ddl = 53, $t = 2,06$, $p < 0,05$ et $n = 38$, ddl = 57, $t = -5,72$, $p < 0,001$, respectivement). Par contre, le rapport moyen C/N du matériel particulaire du réservoir T est significativement différent de P et C dans l'expérience III ($n = 10$, ddl = 18, $t = -3,36$, $p < 0,01$ et $n = 10$, ddl = 18, $t = -2,37$, $p < 0,05$, entre P et T et C et T, respectivement) et dans l'expérience IV ($n = 6$, ddl = 8, $t = 4,84$, $p < 0,001$ et $n = 6$, ddl = 8, $t = 4,11$, $p < 0,01$, entre P et T et C et T, respectivement). Notons que les valeurs du rapport C/N dans le réservoir T sont plus sujettes à caution car les concentrations en COP et en NOP sont plus faibles et parfois proches de la limite de détection ($1 \mu\text{g dm}^{-3}$).

Tableau 5.7. Valeurs minimales, maximales et moyennées (\pm se) des valeurs du rapports C/N calculées à partir du matériel particulaire (COP et NOP) lors des 4 expériences.

	Réservoir Pulsé (P)			Réservoir Continu (C)			Réservoir Témoin (T)		
	Min.	Max.	Moy. (\pm se)	Min.	Max.	Moy. (\pm se)	Min.	Max.	Moy. (\pm se)
Exp. I (28/11/11-08/12/11)	4,1	6,4	4,9 ($\pm 0,1$)	4,0	5,5	4,5 ($\pm 0,1$)	nd	nd	nd
Exp. II (26/03/12-06/04/12)	0,9	5,7	3,9 ($\pm 0,2$)	1,9	4,7	3,8 ($\pm 0,1$)	nd	nd	nd
Exp. III (25/06/12-06/07/12)	3,9	12,8	5,2 ($\pm 0,3$)	4,6	11,8	5,3 ($\pm 0,2$)	5,5	9,0	7,1 ($\pm 0,3$)
Exp. IV (27/09/12-08/10/12)	1,6	13,3	4,3 ($\pm 0,1$)	3,2	18,1	5,3 ($\pm 0,1$)	2,8	3,9	3,3 ($\pm 0,1$)

4.4. Production, respiration, BGE et demande carbonée

Les réservoirs T présentent au début des cultures, et ce dans toutes les expériences, une augmentation de la PB qui diminue ensuite (Fig. 5.7). Les effets de parois classiques, ou la résultante de la pré-filtration à travers $0,6 \mu\text{m}$ supprimant la plupart des prédateurs, peuvent être à l'origine de ce développement. Il est environ 10 fois moins élevé que dans les réservoirs C et P enrichis en carbone. Cette augmentation de la PB, transitoire, n'est pas suffisante pour que l'on observe une diminution significative du COD dans ces réservoirs, d'autant qu'ils ne sont pas enrichis en sels nutritifs.

Les réservoirs P montrent tous une succession de pics correspondants à une augmentation très rapide (< 1h) et à une décroissance un peu plus lente (quelques heures) de la PB après chaque pulse de pyruvate (Fig. 5.7 et Tableau 5.8). C'est seulement lors des pulses 2, 3 et 4 de l'expérience II que la PB se maintient lors de deux échantillonnages successifs après le pulse. Partout ailleurs, elle chute d'abord rapidement, puis plus lentement, avant d'atteindre des valeurs basses (avant pulse). En revanche, l'intensité maximale atteinte aux pics d'activité propre à chaque expérience n'est pas identique partout. En dehors des pulses réalisés pendant des phases de broutage par des flagellés hétérotrophes (pulse 4 et 5 Exp. III, pulse 5 Exp. I), les pics de PB atteints ne dépassent pas $2,6 \mu\text{mol C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ lors de l'expérience I. Ils augmentent jusqu'à $5,2 \mu\text{mol C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ lors de l'expérience II, atteignent $17,7 \mu\text{mol C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ dans l'expérience III et $16,5 \mu\text{mol C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ dans la dernière expérience (Tableaux 5.8 et 5.11). Quel que soit le régime d'apport (pulsé ou continu) et l'expérience considérée (I, II, III ou IV), la PB mesurée dans les réservoirs P et C est toujours significativement différente de celle mesurée dans le réservoir T (Tableau 5.10).

Tableau 5.8. Dynamique de la PB dans les réservoirs P des expériences I, II, III et IV au moment des pulses de pyruvate.

	Exp. I 28 Nov – 8 Déc 2011					Exp. II 26 Mar – 3 Avr 2012					Exp. III 25 Juin – 6 Jul 2012					Exp. IV 27 Sept – 8 Oct 2012				
# Pulses	1	2	3	4	5*	1	2	3	4	5	1	2	3	4*	5*	1	2	3	4	5
Moment des pulses (h)	1	40	88	136	184	1	63	111	159	207	1	60	108	156	204	2	67	116	163	211
Moment des pics (h)	38	43	90	138	207	45	85	134	182	230	39	63	111	179	231	49	73	118	165	214
$\mu\text{mol C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$																				
PB au pic	0,9	2,6	2,2	1,4	0,2	0,3	2,3	2,0	4,1	5,2	2,3	12,2	17,8	1,1	2,0	1,8	7,9	15,6	16,5	13,6
PB au minima	0,0	0,9	0,4	0,2	0,03	0,0	0,3	0,3	0,6	1,2	1,6	4,6	6,5	0,4	0,8	0,7	2,3	1,0	1,3	1,7
Delta PB	0,9	1,7	1,8	1,2	0,2	0,3	2,0	1,7	3,5	4,0	0,8	7,6	11,2	0,7	1,2	1,2	5,6	14,6	15,2	11,9

*pic réalisé lors de l'épisode de broutage

Tableau 5.9. Dynamique de la RB dans les réservoirs P des expériences I, II, III et IV au moment des pulses de pyruvate.

	Exp. I 28 Nov – 8 Déc 2011					Exp. II 26 Mar – 3 Avr 2012					Exp. III 25 Juin – 6 Juil 2012					Exp. IV 27 Sept – 8 Oct 2012				
# Pulses	1	2	3	4	5*	1	2	3	4	5	1	2	3	4*	5*	1	2	3	4	5
Moment des pulses (h)	1	40	88	136	184	1	63	111	159	207	1	60	108	156	204	2	67	116	163	211
Moment des pics (h)	nd	40	90	136	207	1	90	134	182	230	39	63	108	179	210	25	69	116	165	214
$\mu\text{mol C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$																				
RB au pic	nd	18,4	11,2	10,2	1,5	1,2	2,5	4,9	8,6	7,9	2,6	18,1	14,8	3,2	2,5	1,9	11,8	9,2	21,1	19,4
RB au minima	nd	0,3	0,8	1,2	0,8	nd	1,5	1,2	0,8	1,3	1,1	2,0	2,3	2,4	1,5	0,8	2,1	0,6	2,1	1,6
Delta RB	nd	18,1	10,4	9,0	0,7	nd	1,0	3,7	7,8	6,6	1,5	15,8	12,5	0,8	1,0	1,1	9,7	8,6	19,0	17,8

*pic réalisé lors de l'épisode de broutage

Tableau 5.10. Résultats des test-t d'égalité des espérances avec deux observations de variances différentes réalisées sur les mesures de PB entre les réservoirs P vs T et C vs T ($p < 0,001$: *** ; $p < 0,01$: ** ; $p < 0,05$: *).

Sur les mesures de PB	Réservoir Pulsé (P) & Réservoir Témoin (T)				Réservoir Continu (C) & Réservoir Témoin (T)			
	n	ddl	t	p	n	ddl	t	p
Exp. I (28/11/11-08/12/11)	11	14	3,85	**	11	15	4,35	***
Exp. II (26/03/12-06/04/12)	12	16	3,90	**	12	15	4,52	***
Exp. III (25/06/12-06/07/12)	9	12	4,80	***	9	15	5,41	***
Exp. IV (27/09/12-08/10/12)	11	17	6,73	***	11	19	6,93	***

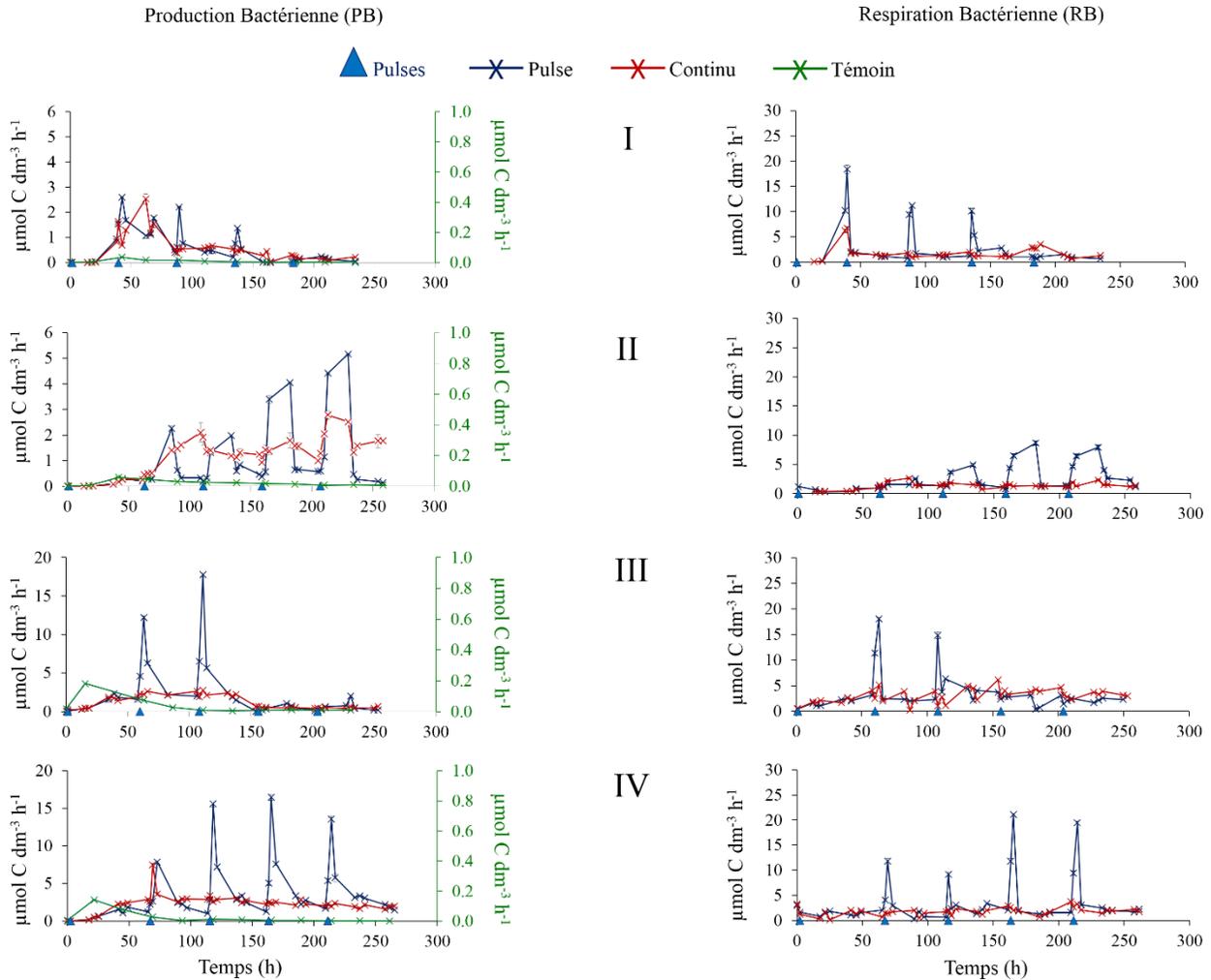


Figure 5.7. Evolution de la PB et de la RB mesurées selon le régime d'apports en pyruvate (P, C et T) 4 expériences réalisées : Nov-Déc.11 (I), Mar-Avr.12 (II), Juin-Juil.12 (III) et Sept-Oct.12 (IV)

Comme la PB, la RB montre une succession de pics dans les réservoirs P (Fig. 5.7) qui sont atténués lors de la croissance des flagellés (Tableaux 5.8 et 5.9). En dehors des phases de broutage, les maximums atteignent $18,4 \mu\text{mol C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ dans l'expérience I, $8,6 \mu\text{mol C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ dans l'expérience II, $18,1 \mu\text{mol C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ dans l'expérience III et $21,1 \mu\text{mol C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ dans l'expérience IV (Tableau 5.11). Les maximums atteints ne sont néanmoins pas exactement simultanés avec ceux de la PB. Dans l'expérience I, qui s'est déroulée à 18°C , les maximums de RB sont atteints immédiatement après les pulses et en même temps ou juste avant les maximums de PB. Dans l'expérience II, qui s'est déroulée à 13°C , le 2nd pic de RB est atteint après le 2nd pic de PB tandis que tous les autres arrivent de manière simultanée. Ces séries de pics ont lieu bien après les pulses (de 3h à 24h après environ). Dans l'expérience III, qui s'est déroulée à 19°C , c'est la même chose

que dans l'expérience I : les maximums de RB sont atteints en même temps ou avant les maximums de PB et après les pulses. Dans l'expérience IV, les 3 premiers pics de RB surviennent avant ceux de la PB puis de manière simultanée pour les 2 derniers pics. Dans cette dernière expérience, les pics de PB et de RB arrivent après les pulses. Il existe également une rythmicité de la PB et de la RB dans les réservoirs C, bien que celui-ci soit enrichi de manière continue en C-pyruvate. Le déclenchement de la croissance bactérienne se réalise en mode batch, la concentration de COD n'est pas constante depuis le début de l'expérience, et dans le réservoir C, il y a également des développements de HF.

La dynamique des activités PB et RB est décalée dans le temps et ce déphasage se reflète sur la dynamique du BGE (Fig. 5.8, Tableau 5.11). Le rendement de croissance bactérien moyen semble être plus faible dans le réservoir P que dans le réservoir C pour les expériences I, II et IV (22% et 26%, 23% et 42% et 51% et 56%, respectivement) alors que pour l'expérience III l'inverse est observé (31% et 21%, respectivement). Cependant, le BGE peut atteindre de fortes valeurs (>80% dans les expériences III et IV).

Les moyennes de PB, RB et BGE ne sont pas significativement différentes entre les réservoirs P et C, excepté dans l'expérience II où une différence significative entre les 2 réservoirs est obtenue pour RB et BGE, et dans l'expérience IV où la moyenne de RB dans le réservoir P est significativement différente de celle mesurée dans le réservoir C (Tableau 5.13).

Tableau 5.11. Valeurs minimales (Min.), maximales (Max.) et moyennées (Moy. \pm se) de la PB, de la RB et du BGE dans les réservoirs P et C des expériences I, II, III et IV.

	Réservoir P			Réservoir C		
	PB ($\mu\text{mol C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)					
	Min.	Max.	Moy. (\pm se)	Min.	Max.	Moy. (\pm se)
Exp. I (28/11/11-08/12/11)	0,0	2,6	0,6 (\pm 0,1)	0,0	2,5	0,5 (\pm 0,1)
Exp. II (26/03/12-06/04/12)	0,0	5,2	0,9 (\pm 0,2)	0,0	2,8	1,1 (\pm 0,1)
Exp. III (25/06/12-06/07/12)	0,0	17,8	2,2 (\pm 0,6)	0,0	2,8	1,2 (\pm 0,1)
Exp. IV (27/09/12-08/10/12)	0,0	16,5	3,7 (\pm 0,6)	0,0	7,5	2,4 (\pm 0,2)
	RB ($\mu\text{mol C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)					
Exp. I (28/11/11-08/12/11)	0,3	18,4	3,2 (\pm 0,8)	0,2	6,7	1,8 (\pm 0,3)
Exp. II (26/03/12-06/04/12)	0,3	8,6	2,3 (\pm 0,4)	0,3	2,6	1,3 (\pm 0,1)
Exp. III (25/06/12-06/07/12)	0,4	18,1	3,5 (\pm 0,6)	0,2	6,2	3,0 (\pm 0,2)
Exp. IV (27/09/12-08/10/12)	0,3	21,1	3,8 (\pm 0,8)	0,2	3,7	1,8 (\pm 0,1)
	BGE (%)					
Exp. I (28/11/11-08/12/11)	0,2	66	22 (\pm 3)	3	68	26 (\pm 3)
Exp. II (26/03/12-06/04/12)	0,3	59	23 (\pm 2)	0,7	69	42 (\pm 3)
Exp. III (25/06/12-06/07/12)	1	83	31 (\pm 3)	8	65	21 (\pm 3)
Exp. IV (27/09/12-08/10/12)	0,4	88	51 (\pm 3)	0,4	84	56 (\pm 3)

Tableau 5.12. Valeurs cumulées des mesures de PB, de RB, de DCB, de BGE et des ajouts de COD dans les réservoirs P (pulsé) et C (continu) des expériences I, II, III et IV. Les cumuls sont calculés selon un modèle d'intégration linéaire. Le BGE cumulé est estimé d'après la relation : $[\text{PB}_{\text{cumulée}} / (\text{PB}_{\text{cumulée}} + \text{RB}_{\text{cumulée}})] \times 100$.

		Exp. I (28/11/11- 08/12/11)	Exp. II (26/03/12- 06/04/12)	Exp. III (25/06/12- 06/07/12)	Exp. IV (27/09/12- 08/10/12)
Réservoir P (pulsé)	Température expérimentale (°C)	18	13	19	21
	Ajouts de COD _{cumulé} ($\mu\text{mol C dm}^{-3}$)	506	547	578	689
	PB _{cumulée} ($\mu\text{mol C dm}^{-3}$)	119	294	469	844
	RB _{cumulée} ($\mu\text{mol C dm}^{-3}$)	469	667	740	660
	DCB _{cumulée} ($\mu\text{mol C dm}^{-3}$)	587	962	1209	1498
	BGE _{cumulé} (%)	20	31	39	56
Réservoir C (continu)	Ajouts de COD _{cumulé} ($\mu\text{mol C dm}^{-3}$)	565	582	619	714
	PB _{cumulée} ($\mu\text{mol C dm}^{-3}$)	127	306	323	598
	RB _{cumulée} ($\mu\text{mol C dm}^{-3}$)	379	318	777	451
	DCB _{cumulée} ($\mu\text{mol C dm}^{-3}$)	506	624	1100	1041
	BGE _{cumulé} (%)	25	49	29	57

En plus de présenter de fortes valeurs de BGE, les expériences II, III et IV ont des demandes carbonées bactériennes cumulées (DCB_{cumulées}) qui sont très supérieures aux ajouts de COD_{cumulés} mesurés dans les réservoirs P et C (Tableau 5.12). Parfois, la RB_{cumulée} dépasse à elle seule les ajouts de COD_{cumulés} (réservoir P des expériences II et III et réservoir C de l'expérience III). D'autre fois, c'est la PB_{cumulée} qui dépasse à elle seule les ajouts de COD_{cumulés} (réservoir P de l'expérience IV). Même avec les erreurs types de PB et de RB incluses, nous ne pouvons pas expliquer ce décalage persistant. Il survient après 50 heures d'expérience pour les réservoirs P et C des cultures III et IV et 160 heures d'expérience pour le réservoir P de la culture II (Fig. 5.9).

Tableau 5.13. Résultats des test-t d'égalité des espérances avec deux observations de variances différentes réalisées sur les mesures de PB, RB et BGE entre les réservoirs P vs C ($p < 0,001$: *** ; $p < 0,01$: ** ; $p < 0,05$: *).

Réservoir P vs Réservoir C	PB				RB				BGE			
	n	ddl	t	p	n	ddl	t	p	n	ddl	t	p
Exp. I (28/11/11-08/12/11)	34	65	-0,57	ns	30	60	0,79	ns	30	43	-1,83	ns
Exp. II (26/03/12-06/04/12)	38	74	-1,15	ns	35	57	2,12	*	35	68	-2,24	*
Exp. III (25/06/12-06/07/12)	36	59	-0,23	ns	36	68	-0,23	ns	34	58	-0,02	ns
Exp. IV (27/09/12-08/10/12)	38	73	0,56	ns	37	62	2,25	*	37	71	-0,67	ns

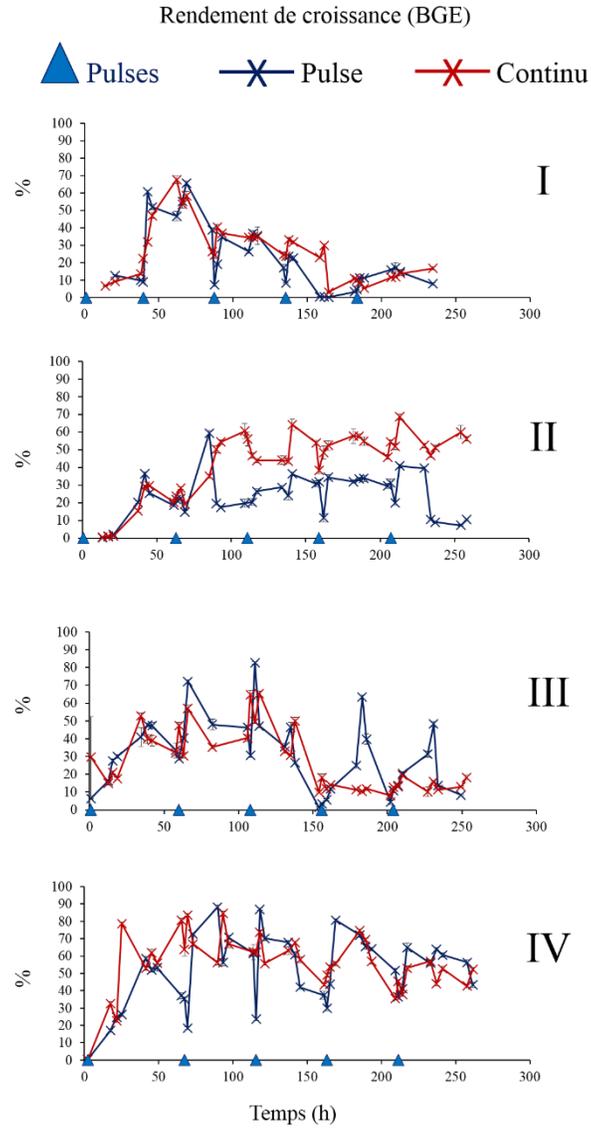


Figure 5.8. Evolution du BGE calculé dans les réservoirs P (pulsé) et C (continu) des 4 expériences réalisées : Nov-Déc.11 (I), Mar-Avr.12 (II), Juin-Juil.12 (III) et Sept-Oct.12 (IV)

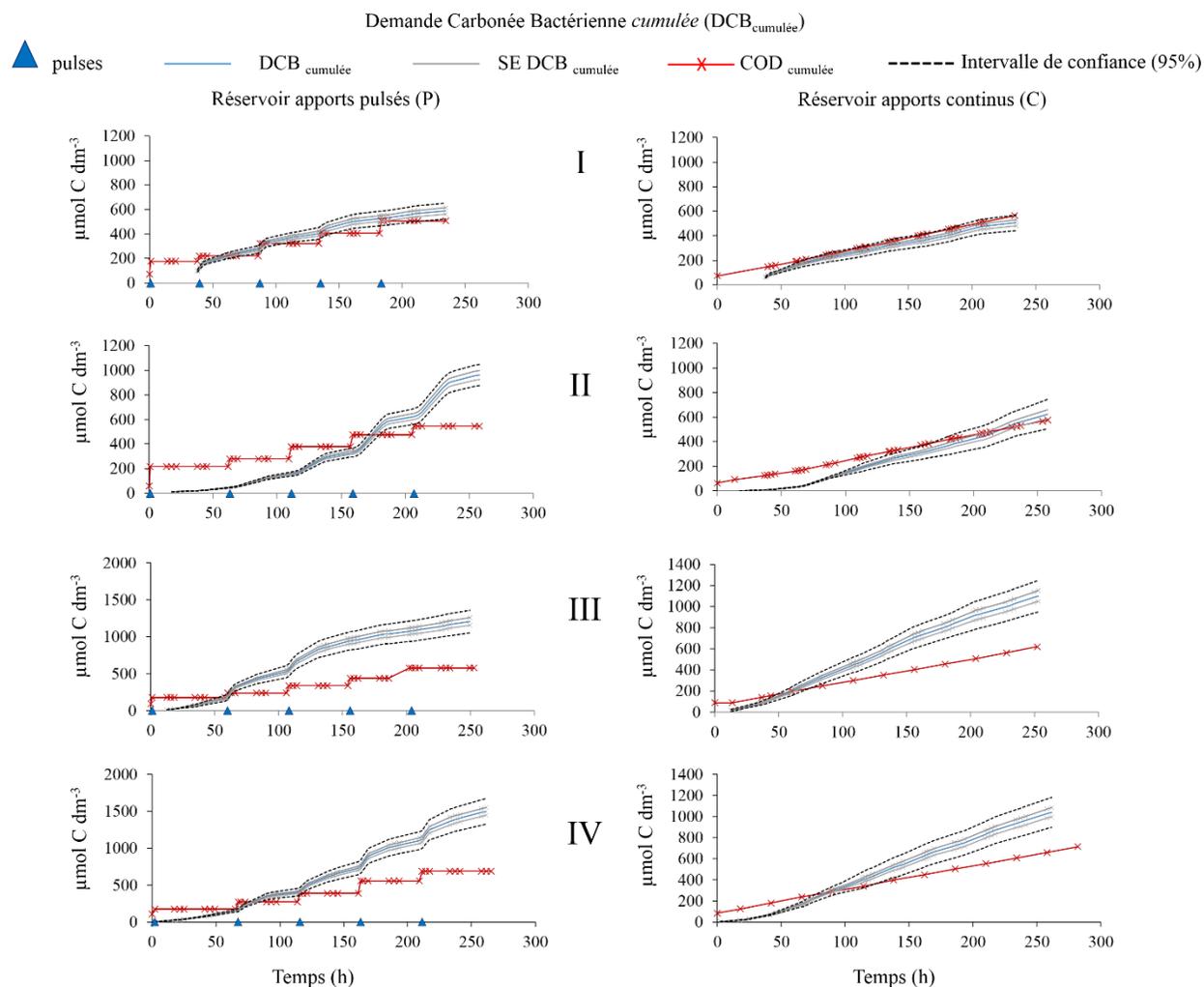


Figure 5.9. Demande Carbonée Bactérienne (DCB) cumulée (traits bleus) et cumul du COD ajouté (traits rouges) de manière pulsée ou continue dans les réservoirs P (pulsé) et C (continu) des 4 expériences réalisées : Nov-Déc.11 (I), Mar-Avr.12 (II), Juin-Juil.12 (III) et Sept-Oct.12 (IV). La plage d'erreurs ($\pm se$) des DCB_{cumulées} est dessinée (traits gris) et calculée à partir des sommes des erreurs des PB_{cumulées} et des RB_{cumulées}. Les intervalles de confiance à 95% sont représentés en traits pointillés noirs

4.5. Structure des communautés bactériennes

Pour l'interprétation des profils CE-SSCP, je définis un pic comme étant un ribotype, c'est-à-dire un assemblage de un ou plusieurs groupes phylogénétiques migrant au même endroit (Chapitre 2, paragraphe 2.5.3).

Les profils issus des analyses en CE-SSCP montrent que les inoculums des populations bactériennes initiales (eau de mer filtrée sur filtre polycarbonate 0,6 μm) diffèrent selon les expériences I, III et IV (Fig. 5.10). Néanmoins, les expériences III et IV ont un ribotype similaire apparaissant au même endroit sur le profil CE-SSCP (montré par le trait pointillé, Fig. 5.10). Une

fois confinée dans les réservoirs de culture, l'eau de mer perd toute une partie de sa diversité et ne conserve qu'un ribotype majoritaire (pics sur la droite des profils). Ils apparaissent dans les réservoirs P, C et T des expériences I, III et IV aux points d'échantillonnage n°1 se situant après le premier pulse de pyruvate (Fig. 5.11, 5.12 et 5.13). Ce ribotype majoritaire domine durant le temps de culture dans le réservoir T de l'expérience I et IV mais diminue ou disparaît dans le réservoir T de l'expérience III ainsi que dans les réservoirs C et P des expériences I et III et seulement dans le réservoir C de l'expérience IV.

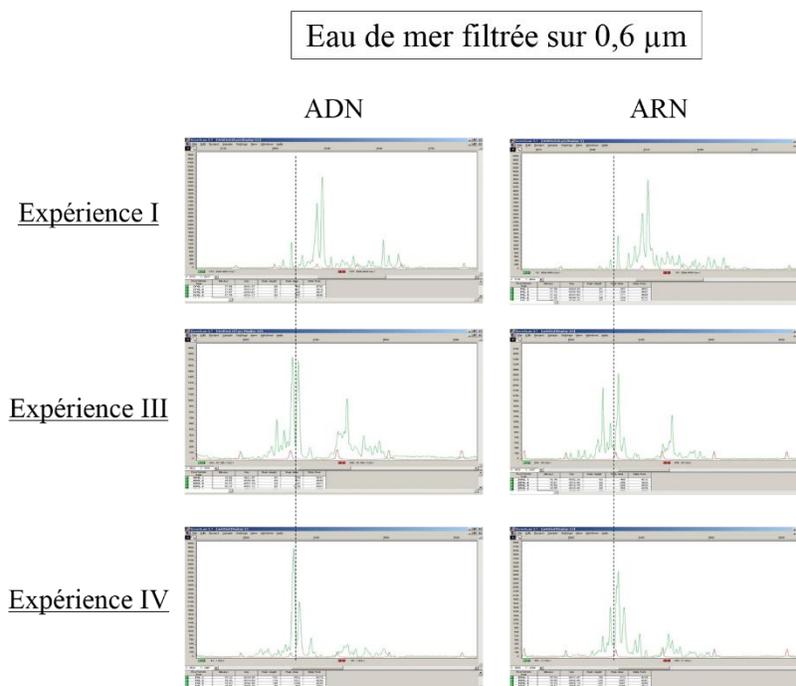


Figure 5.10. Profils CE-SSCP des échantillons d'ADN et d'ARN des communautés bactériennes dans l'eau de mer filtrée sur un filtre polycarbonate de porosité 0,6 μm dans l'expérience I (Nov-Déc. 2011), l'expérience III (Juin-Juil. 2012) et l'expérience IV (Sept-Oct. 2012). Traits pointillés noirs : même ribotype

Ces phases de diminution-disparition correspondent à l'apparition de nouveaux ribotypes (pics à gauche des profils). Ces changements de communautés bactériennes surviennent en fin d'expérience (C4 à C5 et P4 à P5) et coïncident avec des phénomènes de broutage causés par la contamination de nos cultures par les flagellés hétérotrophes. Quels que soient les expériences et les réservoirs de culture, il n'y a pas de différence notable entre les profils CE-SSCP de l'ADN et de l'ARN.

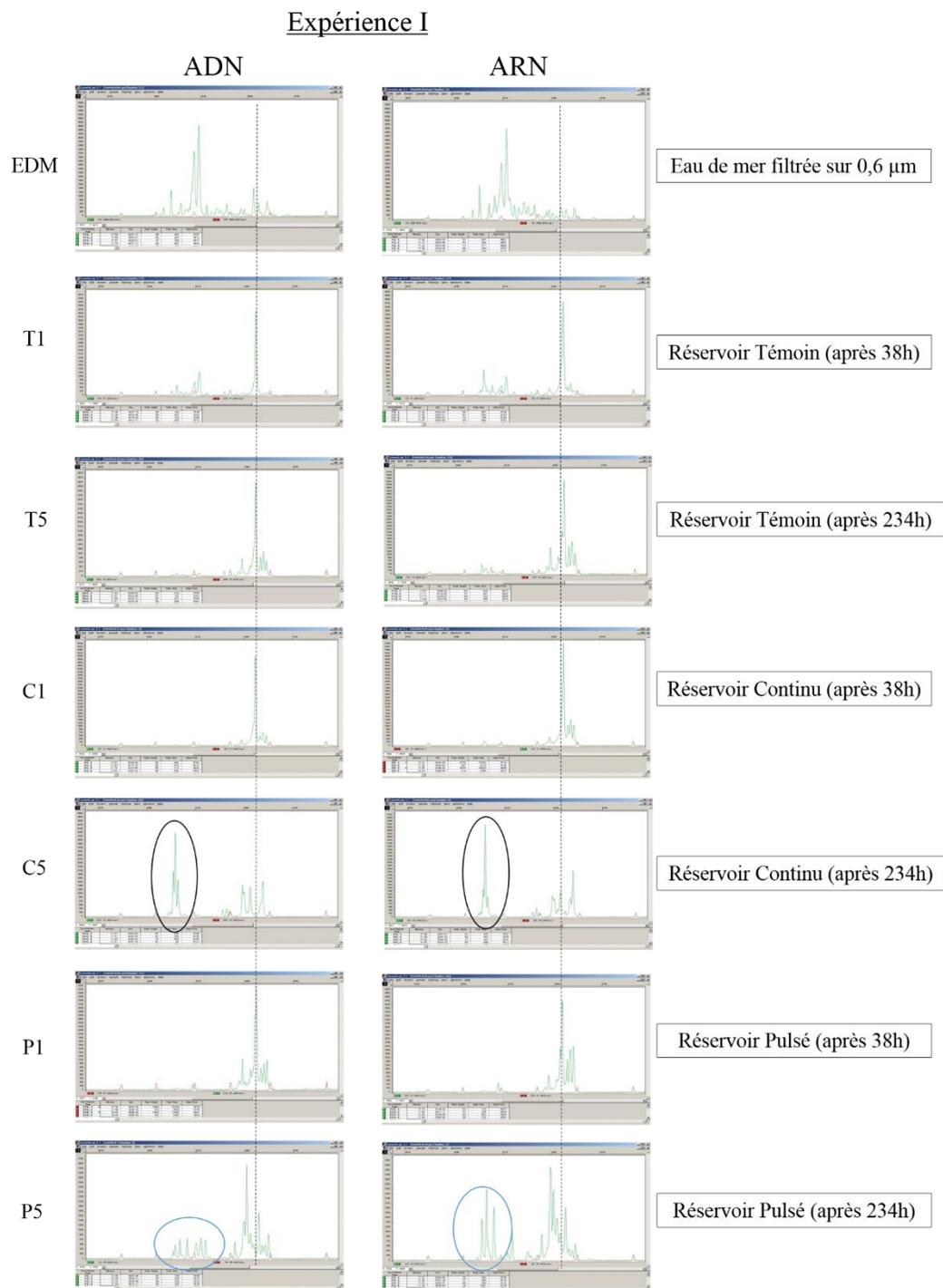


Figure 5.11. Profils CE-SSCP des échantillons d'ADN et d'ARN des communautés bactériennes dans les réservoirs P, C et T de l'expérience I (Nov-Déc. 2011). EDM : eau de mer filtrée sur filtre polycarbonate 0,6 µm. T1 et T5 : échantillons prélevés dans le réservoir T après 38h et 234h de culture, respectivement. C1 et C5 : échantillons prélevés dans le réservoir C après 38h et 234h de culture, respectivement. P1 et P5 : échantillons prélevés dans le réservoir P après 38h et 234h de culture respectivement. Traits pointillés noirs : même ribotype. Ellipses noires et bleues : 2 ribotypes différents

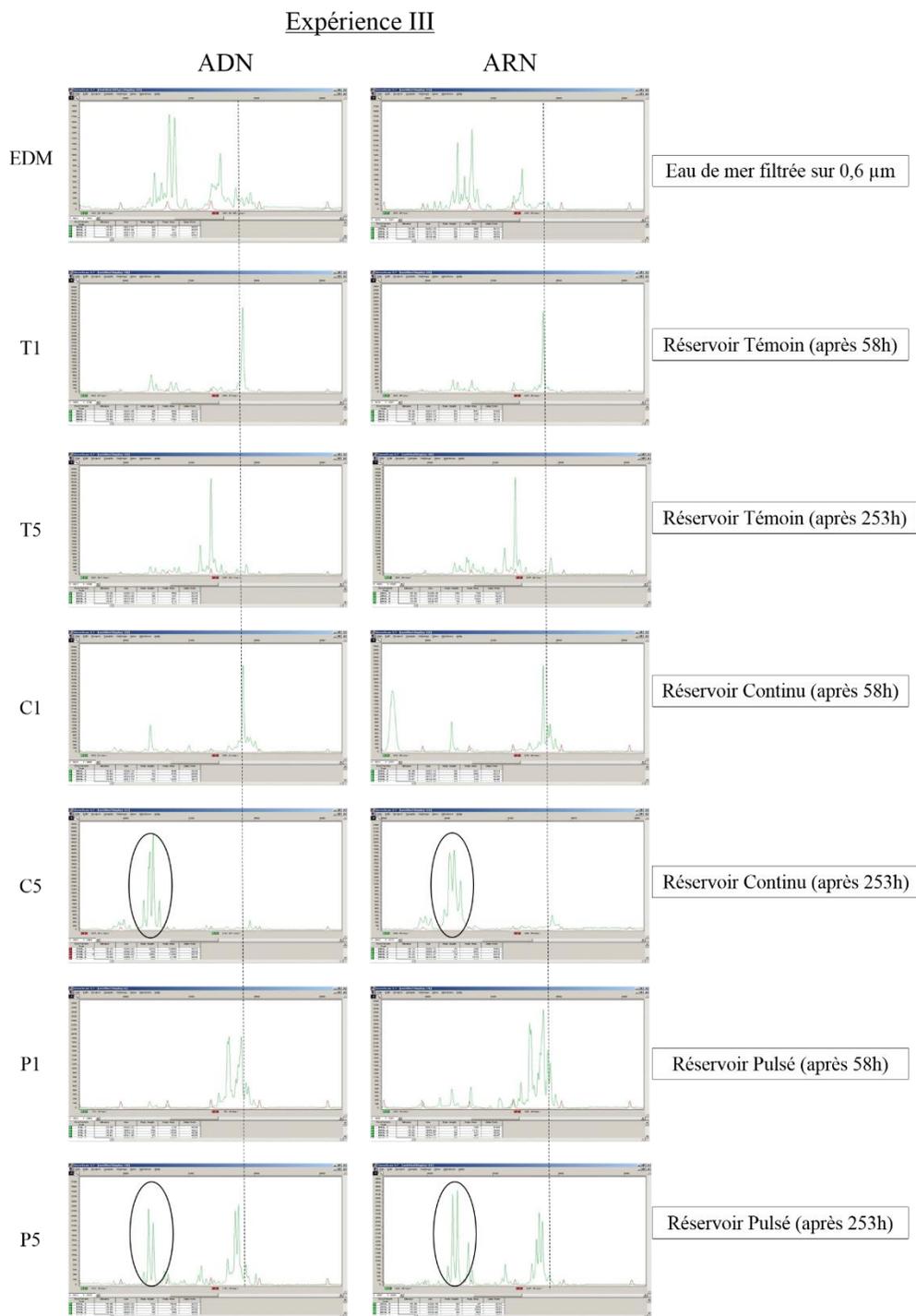


Figure 5.12. Profils CE-SSCP des échantillons d'ADN et d'ARN des communautés bactériennes dans les réservoirs P, C et T de l'expérience III (Juin-Juil. 2012). EDM : eau de mer filtrée sur filtre polycarbonate 0,6 µm. T1 et T5 : échantillons prélevés dans le réservoir T après 58h et 253h de culture, respectivement. C1 et C5 : échantillons prélevés dans le réservoir C après 58h et 253h de culture, respectivement. P1 et P5 : échantillons prélevés dans le réservoir P après 58h et 253h de culture respectivement. Traits pointillés noirs : même ribotype. Ellipses noires : 1 ribotype différent

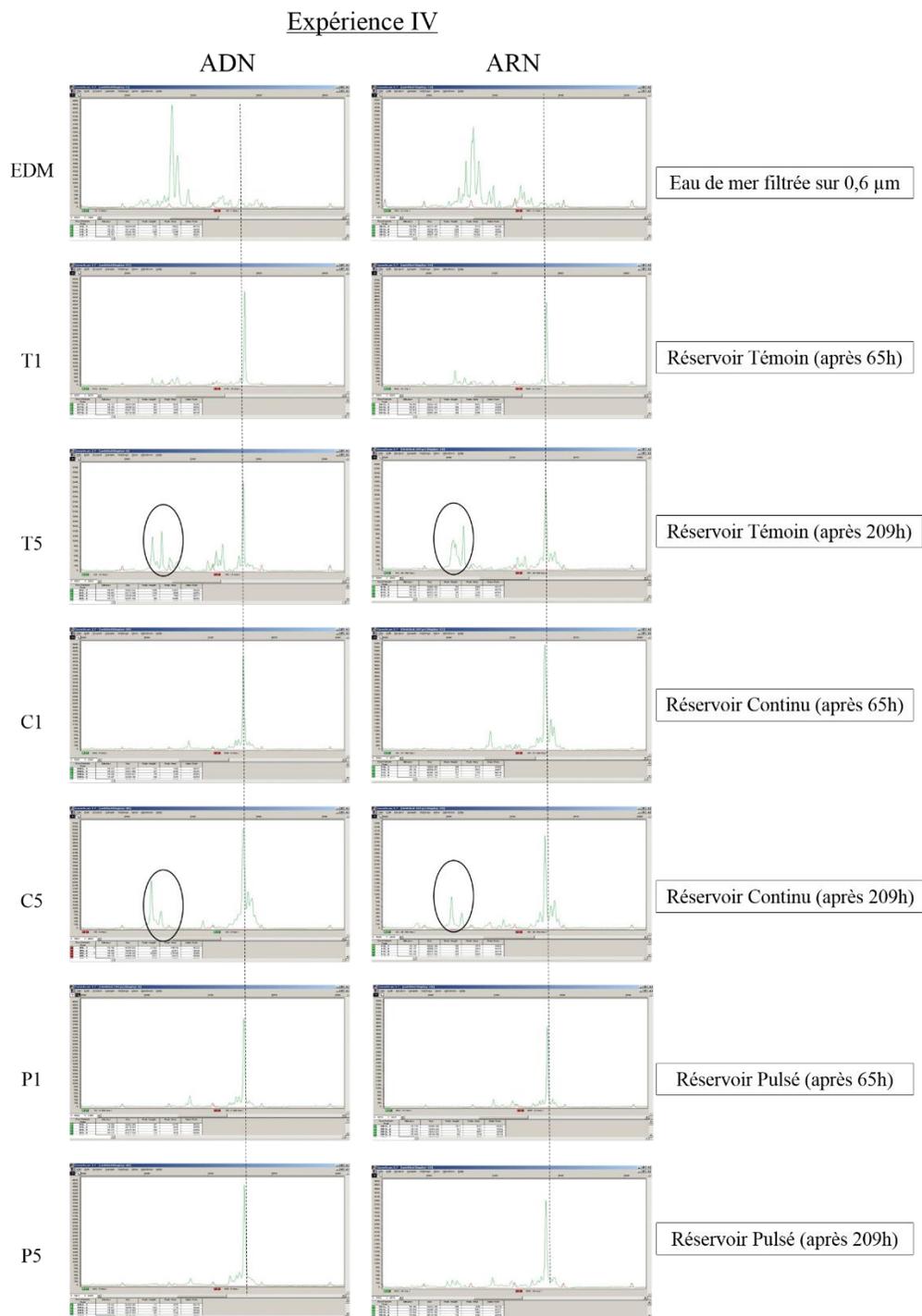


Figure 5.13. Profils CE-SSCP des échantillons d'ADN et d'ARN des communautés bactériennes dans les réservoirs P, C et T de l'expérience IV (Sept-Oct. 2012). EDM : eau de mer filtrée sur filtre polycarbonate 0,6 µm. T1 et T5 : échantillons prélevés dans le réservoir T après 65h et 209h de culture, respectivement. C1 et C5 : échantillons prélevés dans le réservoir C après 65h et 209h de culture, respectivement. P1 et P5 : échantillons prélevés dans le réservoir P après 65h et 209h de culture respectivement. Traits pointillés noirs : même ribotype. Ellipses noires : 1 ribotype différent

Les dendrogrammes de similarité (Bray Curtis) réalisés à partir des profils CE-SSCP confirment nos premières observations. Dans l'expérience I, 4 clusters se distinguent (Fig. 5.14). Ces clusters se composent d'une part des échantillons ADN/ARN de l'eau mer filtrée sur 0,6 μm . Se regroupent ensuite tous les échantillons T1 à T4 du réservoir « témoin », puis le groupe hétérogène des échantillons C1 à C4 et P1 à P3 des réservoirs « continu » et « pulsé » et enfin, les échantillons ayant subi la prédation par les flagellés, c'est-à-dire C5 et P4 à P5.

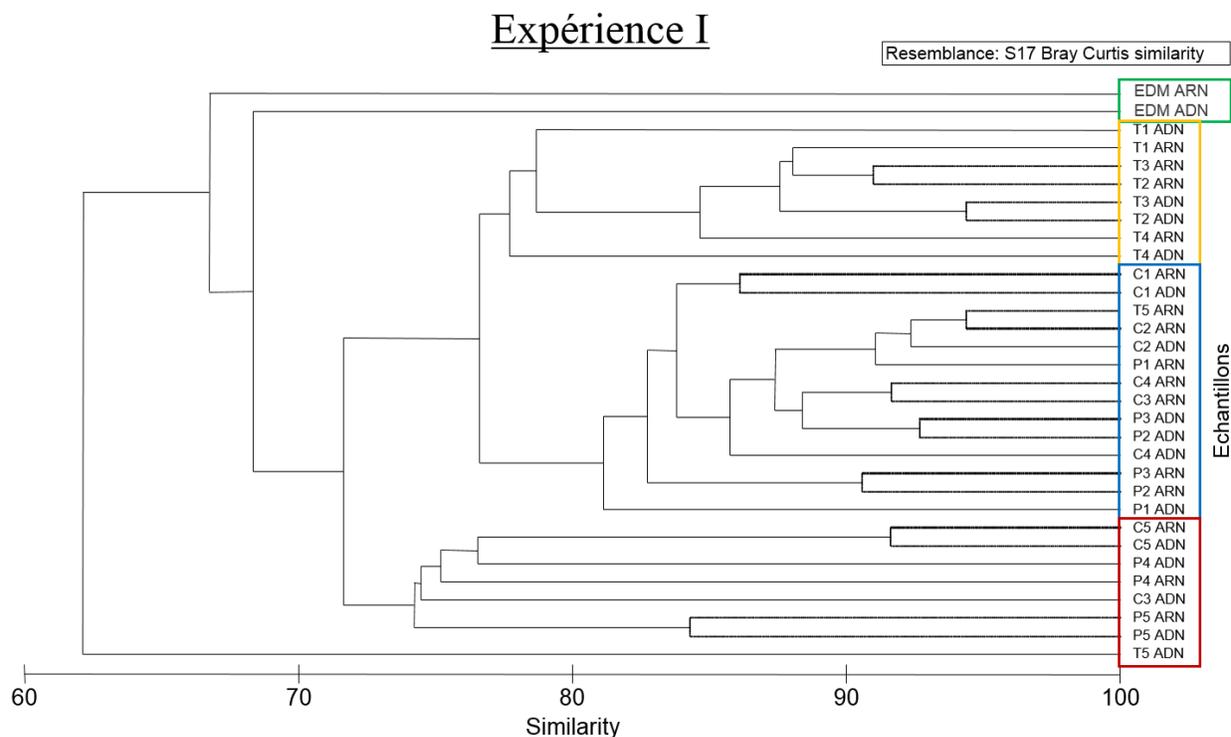


Figure 5.14. Dendrogramme réalisé à partir des profils CE-SSCP des échantillons d'ADN et d'ARN des communautés bactériennes dans les réservoirs P, C et T de l'expérience I (Nov-Déc. 2011). 4 clusters peuvent se distinguer selon le test de similarité Bray Curtis. Boîte verte : eau de mer filtrée sur 0,6 μm . Boîte jaune : échantillons T1 à T4 prélevés dans le réservoir « Témoin ». Boîte bleue : échantillons C1 à C4 et P1 à P3 prélevés dans les réservoirs « Continu » et « Pulsé ». Boîte rouge : échantillons C5 et P4 à P5 prélevés dans les réservoirs « Continu » et « Pulsé »

Dans l'expérience III, 5 clusters se différencient (Fig. 5.15). Les échantillons ADN/ARN de l'eau de mer filtrée sur 0,6 μm dans les réservoirs P, C et T (P0, C0 et T0) ainsi que tous les échantillons T3 à T4 se regroupent. Se distinguent ensuite les échantillons P1 à P3 d'un côté puis P4 à P5 de l'autre à cause du broutage par les flagellés dans le réservoir « Pulsé » en fin d'expérience. Les échantillons C1 à C2 et T1 à T2 se regroupent également dans un cluster à part.

Enfin, un dernier cluster se composant des échantillons C4 à C5 apparaît en bas du dendrogramme à cause également du broutage par les flagellés dans le réservoir « Continu » en fin d'expérience.

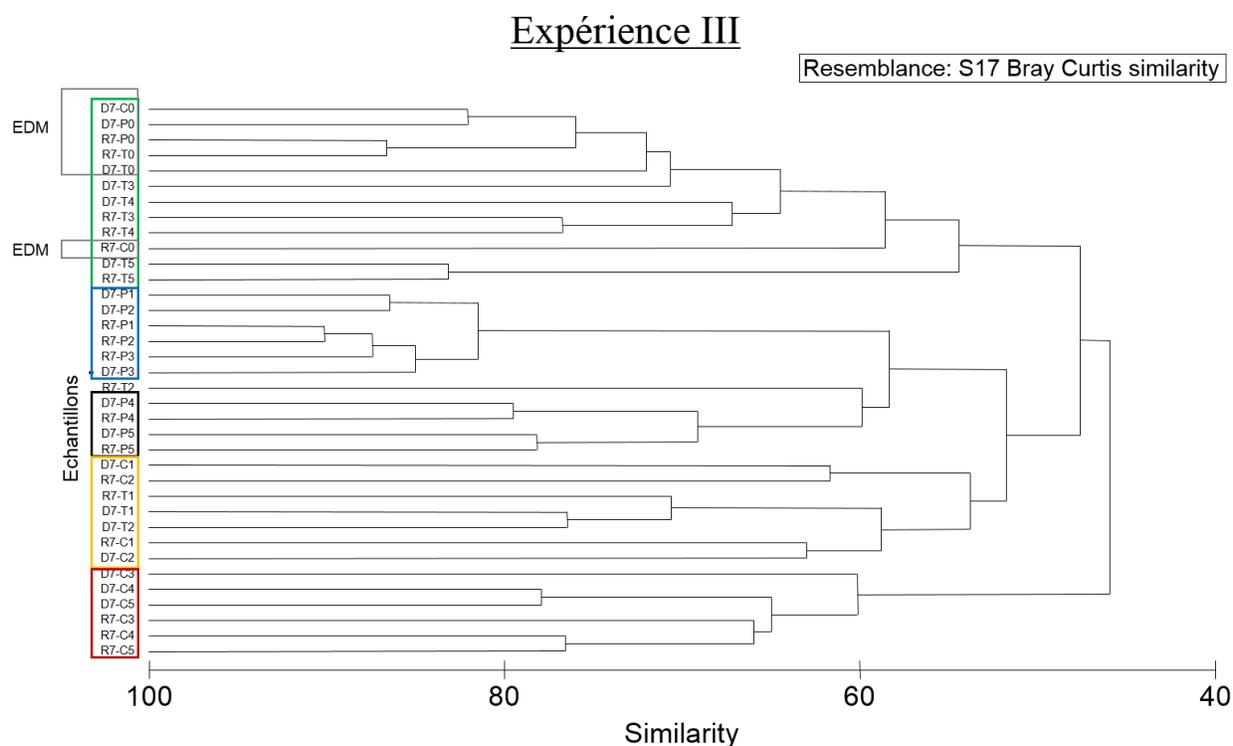


Figure 5.15. Dendrogramme réalisé à partir des profils CE-SSCP des échantillons d'ADN et d'ARN (D7 et R7, respectivement) des communautés bactériennes dans les réservoirs P, C et T de l'expérience III (Juin-Juil. 2012). 5 clusters peuvent se distinguer selon le test de similarité Bray Curtis. Boîte verte : eau de mer filtrée sur 0,6 μm (boîte grise : échantillons P0, C0 et T0) et échantillons T2 à T5 prélevés dans le réservoir « Témoin ». Boîte bleue : échantillons P1 à P3 prélevés dans le réservoir « Pulsé ». Boîte noire : échantillons P4 et P5 prélevés dans le réservoir « Pulsé ». Boîte jaune : échantillons T1 à T2 et C1 à C2 prélevés dans les réservoirs « Témoin » et « Continu ». Boîte rouge : échantillons C3 à C5 prélevés dans le réservoir « Continu »

Comparée aux expériences I et III, les échantillons des réservoirs P, C et T de l'expérience IV se retrouvent dans 3 clusters bien définis. L'eau de mer filtrée sur 0,6 μm compose toujours un cluster à part mais cette fois-ci, il y a un cluster d'échantillons avec C1 à C4, un cluster avec P1 à P4 et un cluster avec T1 à T4. Cette différenciation très nette entre les 3 réservoirs est particulièrement visible car cette dernière expérience n'est pas contaminée en fin de culture par des flagellés hétérotrophes et n'occasionne donc pas de variabilité temporelle marquée.

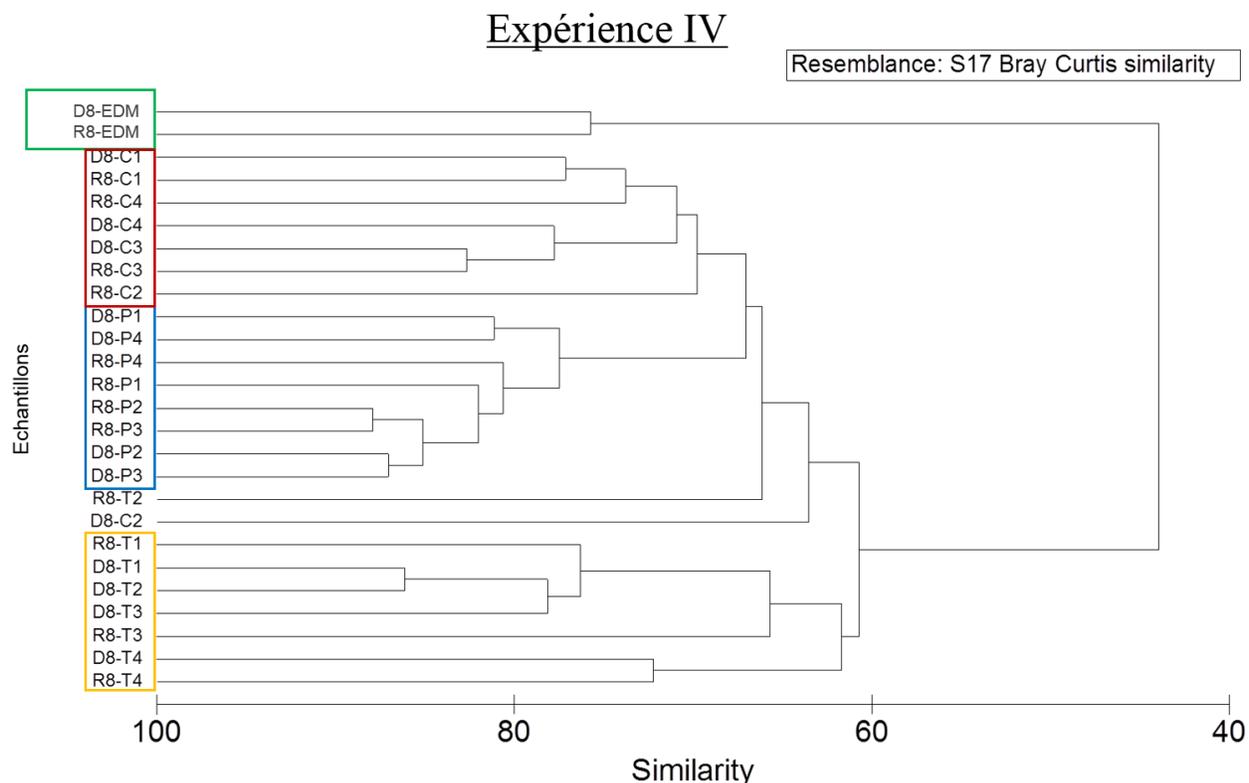


Figure 5.16. Dendrogramme réalisé à partir des profils CE-SSCP des échantillons d'ADN et d'ARN (D8 et R8, respectivement) des communautés bactériennes dans les réservoirs P, C et T de l'expérience IV (Sept-Oct. 2012). 4 clusters peuvent se distinguer selon le test de similarité Bray Curtis. Boîte verte : eau de mer filtrée sur 0,6 μm . Boîte rouge : échantillons C1 à C4 prélevés dans le réservoir « Continu ». Boîte bleue : échantillons P1 à P4 prélevés dans le réservoir « Pulsé ». Boîte jaune : échantillons T1 à T4 prélevés dans le réservoir « Témoin »

5 Bilan de l'étude

Les résultats permettent tout d'abord de constater que les expériences I, II et III présentent un ajout de COD cumulé dans les réservoirs P et C du même ordre de grandeur et proche des 500 $\mu\text{mol C dm}^{-3}$ théoriquement désirés. Ce résultat ne se vérifie pas dans l'expérience IV où le COD cumulé est de 689 $\mu\text{mol C dm}^{-3}$ dans le réservoir P et de 772 $\mu\text{mol C dm}^{-3}$ dans le réservoir C (Tableaux 5.12). Dans les réservoirs C, du COD s'accumule plus ou moins en début d'expérience mais il est rapidement consommé après la croissance des bactéries. Les réservoirs P et C des expériences III et IV présentent des DCB cumulée nettement supérieures aux ajouts de COD cumulé. Théoriquement, dans un système hétérotrophe, les flux cumulés de PB et de RB (c'est-à-dire de DCB) ne devraient pas dépasser la quantité totale de carbone organique fournie. Nous avons donc testé plusieurs hypothèses afin de comprendre cette différence. Ces hypothèses sont basées sur les

activités biologiques envisageables dans le système expérimental en fonction de la méthodologie et des échelles de temps considérées.

5.1. Les activités biologiques

Dans un système fermé, il n'est pas exclu que les bactéries hétérotrophes réutilisent du carbone initialement produit par les bactéries des générations précédentes, provenant des sources de mortalité telles que la lyse virale ou le broutage. Nous avons vu que lors d'épisodes de prédation importante, du carbone organique issu des processus de mortalité a pu être réutilisé plusieurs fois. Toutefois, dans un système hétérotrophe, le CO₂ respiré ne peut pas être, en principe, réintroduit sous forme de molécule organique sauf via des réactions anaplérotiques, que nous ne pouvons pas quantifier. Notre système est entouré d'enceintes normalement obscures. Nous avons donc, à priori, éliminé la photo-hétérotrophie ou la présence active d'éventuels organismes photosynthétiques (nous n'avons pas réalisé de mesures de photosynthèse pour vérifier). Or, même la RB cumulée dépasse à elle seule, dans certains cas, le COD cumulé (Tableau 5.12).

5.3. Le pas d'échantillonnage

La dynamique de la RB et de la PB est très rapide. Nous avons supposé un modèle exponentiel entre 2 points d'échantillonnage et non plus un modèle linéaire pour nos calculs de cumuls. Cette méthode de calcul diminue les cumuls (Fig. 5.17), mais maintient une différence entre le DCB cumulé et COD cumulé. Il faudrait moduler le système en intégrant sur des pas d'échantillonnage plus faibles pour tenir compte de la dynamique des stocks et des abondances sur les flux de PB et de RB. Le temps de mesure influe également sur le calcul du BGE, puisque les PB sont calculées à partir d'incubation de 15 minutes alors que les RB sont déterminées sur des incubations de 2 heures. En effet, lors d'études *in situ*, il a été montré qu'il existe un biais introduit par un développement exponentiel supposé de la PB pendant une mesure de RB (qui dure souvent 24h). Cette caractéristique conduit à des changements de l'état trophique du système et une croissance bactérienne déséquilibrée (Pomeroy et al. 1994). Nous avons donc déterminé une nouvelle série de BGE, en supposant un développement exponentiel de la PB pendant 2h entre 2 points pour obtenir une PB moyenne pendant cette période et calculer ensuite les BGE avec des

intervalles de mesure cohérents entre la PB et la RB. Cette mesure aboutit à une diminution moyenne du BGE d'environ 23 % dans le cas, par exemple, du réservoir P de l'expérience IV (Fig. 5.18).

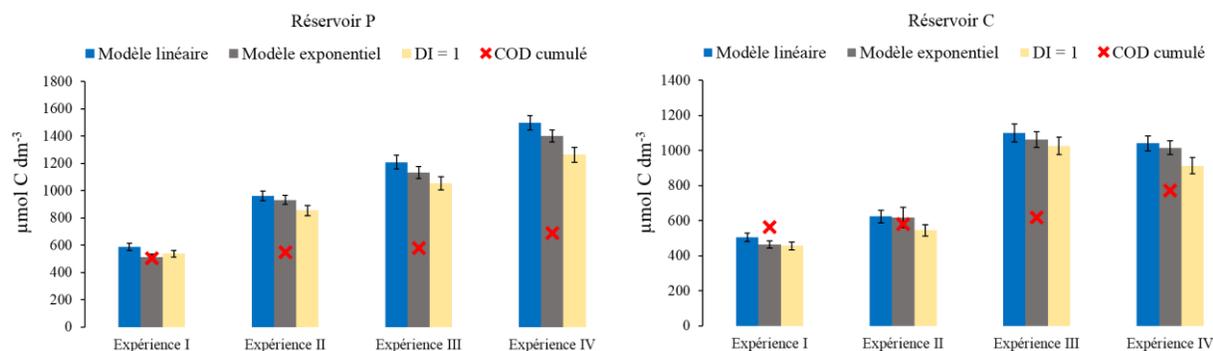


Figure 5.17. DCB cumulées et barres d'erreurs associées (somme des erreurs types de PB cumulée et de RB cumulée) calculées dans les réservoirs P et C des expériences I, II, III et IV en supposant un modèle linéaire d'intégration entre 2 points d'échantillonnages (barres bleues), un modèle exponentiel d'intégration entre 2 points d'échantillonnage (barres grises) et un facteur de dilution isotopique de 1 pour les mesures de PB cumulée (barres jaunes). Les croix rouges représentent les valeurs finales du COD cumulé

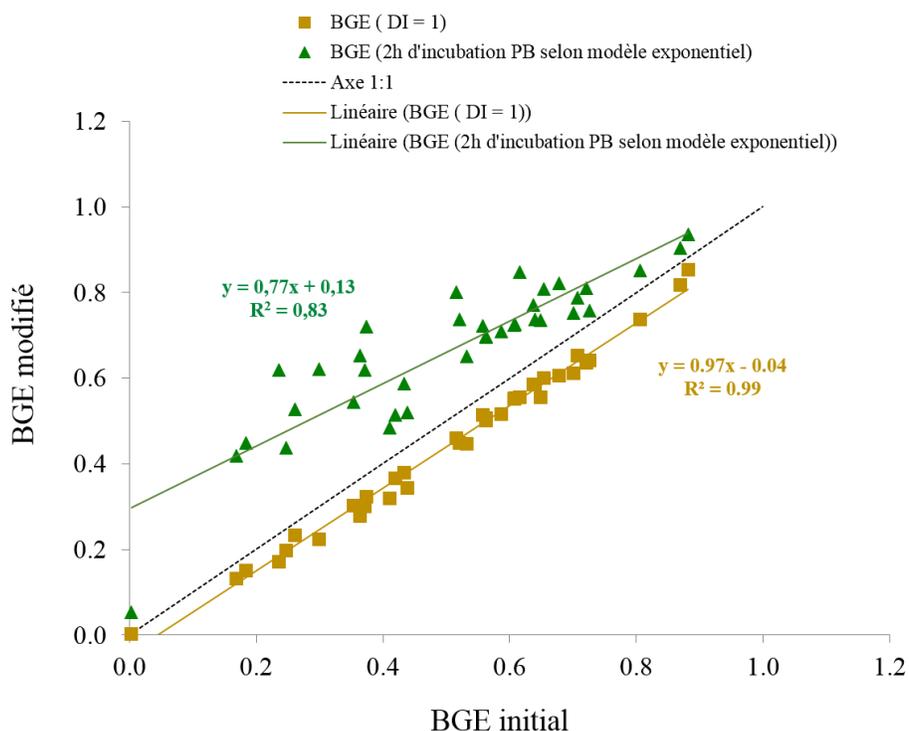


Figure 5.18. Exemple de l'expérience IV, réservoir P (pulsé). Importance de différents facteurs sur le calcul du BGE. En marron, tous les BGE sont calculés en supposant une dilution isotopique (DI) égale à 1 pour le calcul du facteur de conversion leucine-carbone (FC_{leu-C}). En vert, les BGE sont calculés avec un facteur de dilution isotopique variable, mais en supposant un développement exponentiel de PB pendant 2 heures entre deux points de mesure. En pointillés : axes 1 :1. Axe des x : BGE calculés avec un facteur de dilution isotopique variable

5.3. Les facteurs de conversion leucine-carbone

Le facteur de conversion leucine-carbone (FC_{leu-C}) peut être calculé de façon théorique ou empirique (Kirchman et al. 1982, Simon & Azam 1989, Kirchman 1992, Calvo-Díaz & Morán 2009, Alonso-Sáez et al. 2010). Dans ce manuscrit, nous avons utilisé un facteur de conversion théorique, en ayant toutefois pris la précaution de vérifier la dilution isotopique (DI) plusieurs fois par expérience. Hormis l'expérience I, où la concentration totale en leucine ajoutée est rectifiée un peu tard, la DI varie entre 1,0 et 1,6, ce qui génère des FC_{leu-C} entre 1,5 et 2,4 kg C mole⁻¹. En supposant une DI de 1, les BGE calculés diminuent légèrement (entre 7% et 9% selon l'expérience et le réservoir) mais les DCB cumulées restent importantes et supérieures à la quantité de pyruvate introduite.

Cependant, la DI est vérifiée régulièrement et il n'y a pas de raison de ne pas l'appliquer. Le facteur de conversion empirique est rarement estimé car, pour des raisons de facilité, la plupart des auteurs préfèrent utiliser un facteur de conversion théorique. En effet, ces facteurs de conversion empiriques nécessitent de suivre simultanément abondance et assimilation de leucine dans des expériences de croissance, ce qui est long et fastidieux. De plus, le facteur de conversion varie énormément selon la méthode utilisée (intégrative, cumulée, etc...) et il est souvent basé sur l'étude de l'évolution des abondances et non de la biomasse, ce qui nécessite également l'estimation d'un facteur de conversion cellule-carbone (FC_{cell-C}). Les données initiales des expériences montrent une augmentation régulière de PB et d'AB. En supposant une prédation non négligeable pendant cette période de croissance, cette période permet de calculer des facteurs de conversion empiriques.

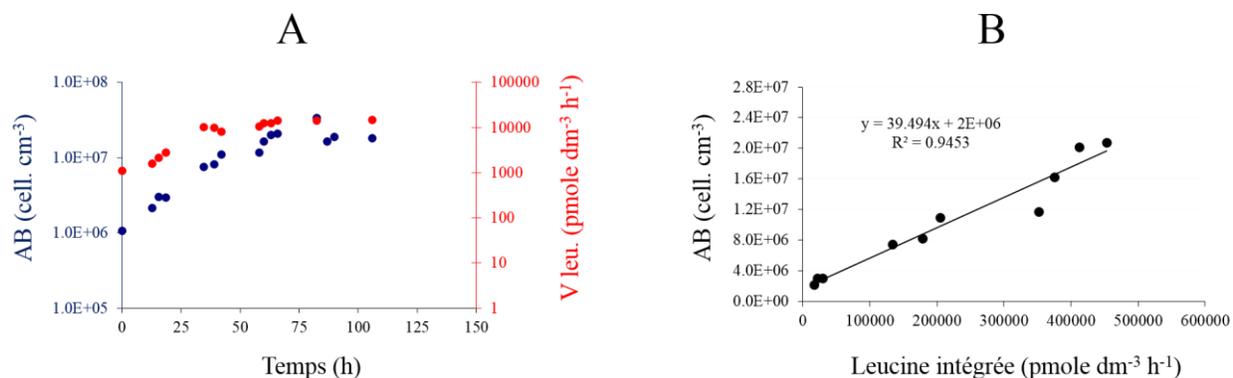


Figure 5.19 : Exemple du réservoir C de l'expérience III. A : Evolution du nombre et de la vitesse d'incorporation de la leucine initiales; B : calcul du facteur de conversion empirique de la leucine par la méthode cumulée

La figure 5.19 montre le calcul de FC basé sur une méthode empirique (Simon & Azam 1989). Dans cet exemple, le FC nombre-leucine est ensuite converti en nombre-carbone ($FC_{\text{cell-C}}$) en utilisant la valeur moyenne du COP par cellule calculée entre 0h et 66 h, soit $54 \text{ fg C cell}^{-1}$. Cela aboutit à un $FC_{\text{leu-C}}$ de $2,54 \text{ ng C pmole}^{-1}$ de leucine. Les résultats globaux des $FC_{\text{leu-C}}$ calculés selon la méthode théorique de Kirchman (Kirchman et al. 1982) pour les 8 réservoirs (P et C des expériences I à IV) montrent des $FC_{\text{leu-C}}$ variant entre 1,7 et 2,1 ng C pmole^{-1} de leucine alors que les $FC_{\text{leu-C}}$ empiriques varient entre 0,69 et $10,8 \text{ ng C pmole}^{-1}$ de leucine (Tableau 5.14).

Tableau 5.14. Valeurs minimales (Min.), maximales (Max.) et moyennées (Moy.) des facteurs de dilution isotopique (DI) calculées dans les réservoirs P (pulsé) et C (continu) durant expériences I, II, III et IV. Valeurs minimales (Min.), maximales (Max.) et moyennées (Moy.) des facteurs de conversion leucine-carbone ($FC_{\text{leu-C}}$) calculées 1) selon l'équation théorique (Théo.) de kirchman (Kirchman et al. 1982) et 2) selon la méthode intégrée empirique (Empi.) (Simon & Azam 1989) qui tient compte des facteurs de conversion cellule-carbone ($FC_{\text{cell-C}}$).

	Réservoir P				Réservoir C			
	DI	$FC_{\text{leu-C}}$ (Théo.)	$FC_{\text{cell-C}}$	$FC_{\text{leu-C}}$ (Empi.)	DI	$FC_{\text{leu-C}}$ (Théo.)	$FC_{\text{cell-C}}$	$FC_{\text{leu-C}}$ (Empi.)
		ng C pmole ⁻¹				ng C pmole ⁻¹		
Exp. I (28/11/11-08/12/11)	Min. 1,05 Max. 4,53 Moy. 1,42	Min. 1,6 Max. 6,8 Moy. 2,1	0 – 42h 82	0 – 42h 10,8*	Min. 1,01 Max. 2,47 Moy. 1,37	Min. 1,5 Max. 3,7 Moy. 2,1	0 – 46h 51	0 – 46h 6,5*
Exp. II (26/03/12-06/04/12)	Min. 1,05 Max. 1,38 Moy. 1,16	Min. 1,6 Max. 2,1 Moy. 1,7	1 – 69h 15	1 – 69h 1,5	Min. 1,05 Max. 1,56 Moy. 1,26	Min. 1,6 Max. 2,3 Moy. 1,9	1 – 85h 27	1 – 85h 2,0
Exp. III (25/06/12-06/07/12)	Min. 1,07 Max. 1,70 Moy. 1,34	Min. 1,6 Max. 2,6 Moy. 2,0	0 – 66h 59	0 – 66h 2,6	Min. 1,03 Max. 1,65 Moy. 1,23	Min. 1,6 Max. 2,5 Moy. 1,8	0 – 66h 55	0 – 66h 2,5
Exp. IV (27/09/12-08/10/12)	Min. 1,14 Max. 1,49 Moy. 1,33	Min. 1,7 Max. 2,2 Moy. 2,0	2 – 73h 57	2 – 73h 1,3	Min. 1,14 Max. 1,74 Moy. 1,28	Min. 1,7 Max. 2,6 Moy. 1,9	2 – 73h 52	2 – 73h 0,7

*Biais sur le COP_{spécifique} (fortes valeurs en fin d'expérience)

Hormis ces 2 extrêmes, les valeurs sont du même ordre de grandeur pour les 2 méthodes. Les valeurs élevées de l'expérience I sont dues à des $FC_{\text{cell-C}}$ particulièrement élevés. Il faut noter également que dans certains cas, les valeurs initiales du contenu en carbone des bactéries n'étaient pas accessibles à cause de la limite de détection du COP pour les faibles volumes filtrés (100 cm^3).

Il est possible qu'il se produise un marquage non spécifique de la leucine, le précipité TCA pouvant inclure d'autres macromolécules ayant incorporé la leucine tritiée. En général, il a peu de problèmes de marquage non spécifique avec la leucine en milieu naturel (Torréton & Bouvy 1991). De temps en temps, le marquage spécifique a été vérifié par France Van Wambeke (comm.pers) qui a travaillé avec une méthode dérivée de Torréton & Bouvy (1991), en l'appliquant sur les extraits centrifugés. Les quelques tests réalisés n'ont pas révélé de marquage non spécifique.

5.4. Biais de la mesure de RB

En l'état actuel, les différents tests réalisés sur l'effet de l'agitation et la comparaison entre les optodes à oxygène presens® et la méthode Winkler (Annexe 8) ne permettent pas de conclure sur une surestimation ou une sous-estimation de la RB mesurée avec l'une ou l'autre méthode. Toutefois, les fortes valeurs de RB cumulée calculées au cours des expériences en minicosme laissent penser que la présence des flagellés hétérotrophes dans nos cultures contribue fortement à la respiration biologique du système.

Il est possible de donner un ordre de grandeur de la respiration des flagellés hétérotrophes (HF) lors de la phase de broutage. Par exemple, si nous considérons 1) une abondance d'HF de $1,65 \times 10^7$ cell. dm^{-3} et une AB de $2,1 \times 10^{10}$ cell. dm^{-3} (réservoir C de l'expérience I, Fig. 5.3), et 2) une quantité théorique de carbone par cellule de $20 \text{ fg C cell}^{-1}$, il est possible d'estimer une demande carbonée pour les HF à partir de l'AB et de la quantité de carbone par cellule équivalant à $10^{-3} \text{ g C dm}^{-3}$ soit $8,33 \times 10^{-5} \text{ mol C dm}^{-3}$. De cette manière, si nous supposons un rendement de croissance de 50% pour les HF, nous trouvons une consommation de carbone pour la respiration des HF équivalente à $41,67 \text{ } \mu\text{mol C dm}^{-3}$ (rendement de croissance des HF x demande carbonée des HF). Sur une période de 24 heures (temps nécessaire au processus de broutage pour faire diminuer l'AB de $2,1 \times 10^{10}$ cell. dm^{-3} à $0,3 \times 10^{10}$ cell. dm^{-3}), nous pouvons quantifier la respiration des HF à un ordre de grandeur de $1,8 \text{ } \mu\text{mol C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (RQ = 1), ce qui n'est pas négligeable comparées aux valeurs moyennes des RB dans les expériences I, II, III et IV (Tableau 5.11).

5.5. Effets sur le rendement de croissance

Malgré ce problème de DCB cumulé excédentaire par rapport aux apports de carbone organique, les conditions de cultures mises en place (sels nutritifs en excès, pulses de carbone, ajout en continu de carbone, température, agitation, oxygénation, ...) permettent d'obtenir des résultats intéressants. Tout d'abord, les premières analyses des résultats ne permettent pas de voir une différence significative du BGE (qu'il soit moyenné ou obtenu par intégration cumulée de la RB et de la PB) entre le mode d'apport pulsé (P) et le mode d'apport continu (C) de carbone sur les activités bactériennes. Les cultures I, II et III voient leurs AB respectives chuter après 150 h d'expérience à cause de l'apparition de flagellés hétérotrophes : ils sont probablement responsables d'un broutage important qui expliquerait les diminutions brutales des activités bactériennes (PB et

RB) dans les cultures I, II et III. Les processus de lyse virale peuvent également être apparentés à ces diminutions rapides de l'AB.

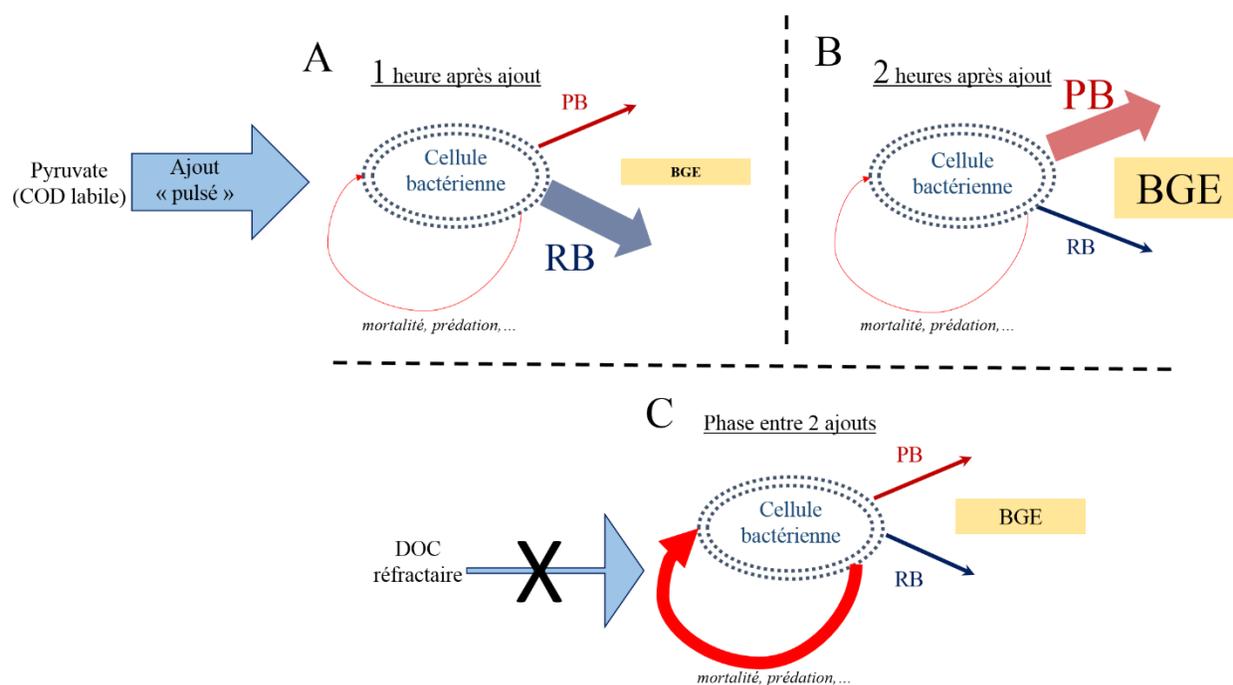


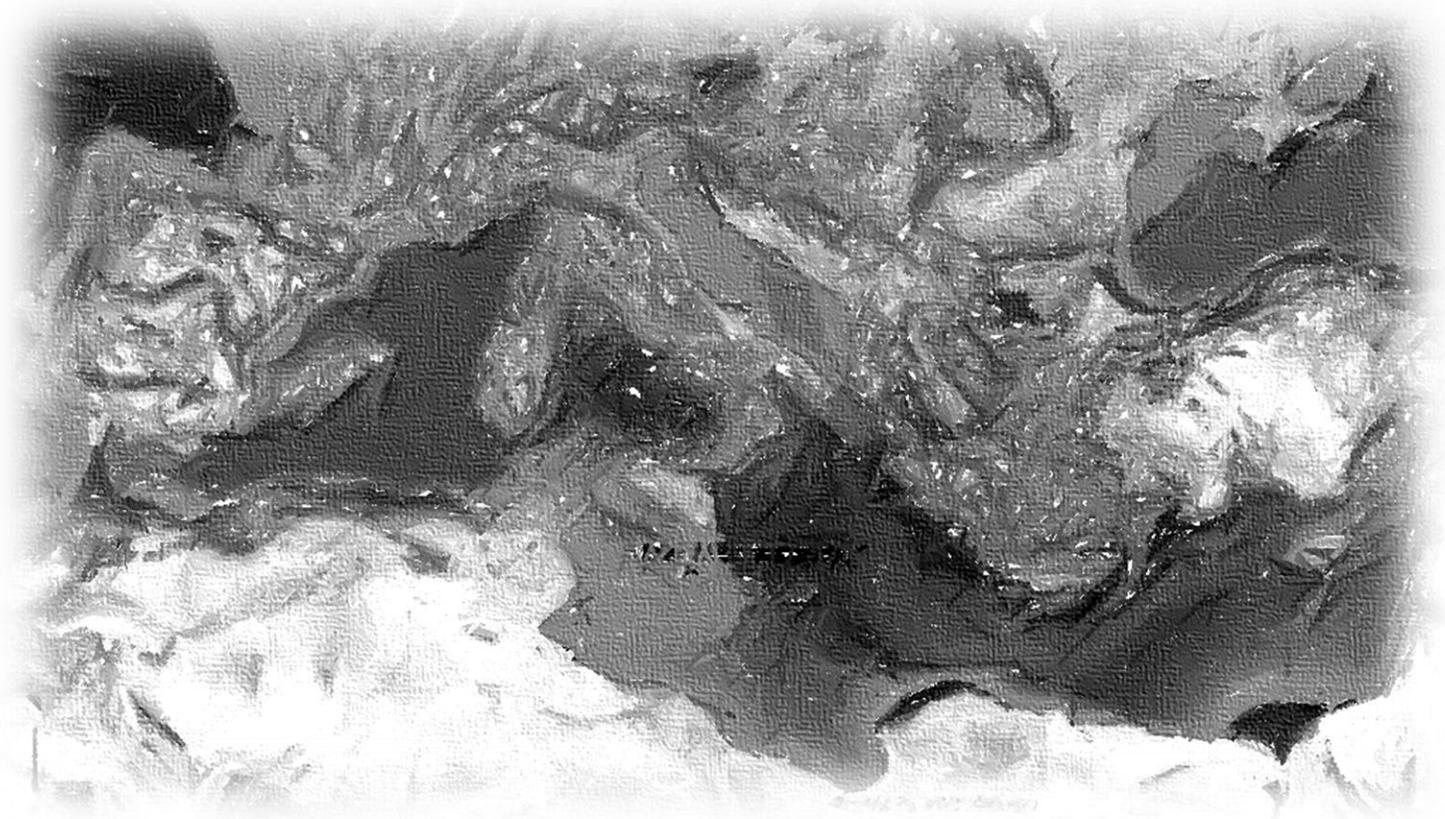
Figure 5.20. Schéma conceptuel du flux de carbone (C) à travers une cellule bactérienne hétérotrophe dans le réservoir P (pulsé) suite à un ajout de pyruvate. Les flèches représentent le flux de C et la largeur des flèches représente l'importance du flux. La taille des lettres représente l'augmentation du paramètre illustré. A : 1 heure après ajout, la RB augmente (flèche bleue) plus vite que la PB (flèche marron) et le BGE diminue. B : 2 heures après ajout, la PB augmente, la RB diminue et le BGE augmente. C : Phase entre 2 ajouts, c'est-à-dire quand le pyruvate est entièrement consommé et que la cellule bactérienne survit en fonction de ses réserves et du COD labile généré par les phénomènes de mortalité ou de prédation (flèches rouges). Il en résulte une BGE optimal en fonction des conditions limitantes (COD labile) du milieu

Dans les conditions expérimentales des réservoirs P (pulsé), la RB augmente avant la PB après un ajout de pyruvate. Ce décalage dans le temps entre les valeurs de RB et les valeurs de PB après un pulse de pyruvate entraîne une décroissance rapide du BGE, suivi d'une augmentation (Fig. 5.20). Les réservoirs P présentent donc une variabilité particulièrement importante du BGE. Malgré cette variabilité des valeurs extrêmes de BGE (plus fortes dans les réservoirs P que dans les réservoirs C), les BGE moyens ne sont pas significativement différents entre les réservoirs P et C, excepté dans l'expérience II (Tableau 5.13).

5.6. Structure des communautés bactériennes

Les profils CE-SSCP montrent clairement des changements de populations bactériennes avec une perte de diversité entre les échantillons d'eau mer filtrée sur 0,6 μm et les premiers échantillons (T1, P1 et C1). D'après la localisation des pics sur les profils (à gauche), il semble que ce ribotype, probablement composé d' α -protéobactéries (Roséobactérie, SAR-11,...) disparaisse pour laisser la prédominance à un seul groupe phylogénétique. La localisation de ce ribotype dominant (à droite sur les profils CE-SSCP) suggère l'apparition des γ -protéobactéries, bactéries opportunistes se développant souvent lors d'expériences d'enrichissement en matière organique (Lebaron et al. 1999). Ces bactéries opportunistes ne correspondent pas à un seul groupe phylogénétique, car plusieurs pics persistent vers la droite du spectre. Cependant, l'alignement des spectres les uns en dessous des autres suggère que c'est une espèce associée à un seul ribotype qui prend le dessus à chaque pulse. L'identification exacte des groupes phylogénétiques de ces pics nécessiterait des analyses par clonage-séquençage. L'étude de ces profils a néanmoins révélé que le broutage par les flagellés hétérotrophes se caractérise par la diminution ou la disparition immédiate du pic du ribotype dominant et l'apparition de plusieurs nouveaux ribotypes correspondants à une ou des espèces résistantes à la prédation (plus à gauche sur le spectre, donc supposément des α -proteobacteria). La modification du spectre de diversité résultant de la prédation est telle qu'elle masque les différences de diversité entre les réservoirs P et C (Fig. 5.14 et 5.15). Pourtant en l'absence de prédation, la diversité des bactéries des réservoirs C et P est légèrement différente, puisque les clusters ne se regroupent pas sur le dendrogramme (Fig. 5.16). Il semble également que la dynamique bactérienne dans les réservoirs est telle qu'il n'y a pas de différence notable entre les populations actives (profils ARN) et présentes (profils ADN). Ces résultats en CE-SSCP demandent à être approfondis en 1) déterminant des indices de diversité (indice de Shannon, indice de biodiversité de Simpson, ...) et 2) en identifiant les pics dominants afin de les comparer entre eux. Ce travail supplémentaire pourrait apporter des informations pertinentes et des éléments de réponse sur le rôle des communautés bactériennes dans la consommation du COD, sur la saisonnalité des activités bactériennes en fonction des communautés présentes et sur l'impact que cela peut avoir sur le BGE.

Il est donc nécessaire de poursuivre ces analyses et de valoriser au mieux les résultats des expériences en minicosme, en particulier, au moyen des outils de modélisation. La mise en place du modèle DEB, par exemple, serait pertinente considérant la forte dynamique des abondances, des activités et des quotas cellulaires. Pour la première fois, l'ajustement des données de tels modèles pourrait être ajusté sur des données de flux au lieu de l'être sur des données de stocks.



CHAPITRE 6

Conclusions & Perspectives

1 Conclusions

1.1. Bilan du travail de thèse

La compréhension des fluctuations des processus hétérotrophes bactériens (production, respiration, activités ectoenzymatiques) est un enjeu essentiel pour prédire la dynamique des éléments C, N et P au sein du réseau trophique microbien. Ces processus hétérotrophes subissent en continu l'influence de leur environnement qui, dans le contexte du changement global, est amené à être modifié. Dans de nombreux systèmes océaniques, la température et la disponibilité en ressources nutritives sont les deux facteurs qui expliquent le plus le contrôle de la production bactérienne (Kirchman et al. 1993, Shiah & Ducklow 1995, del Giorgio & Cole 1998, López-Urrutia & Morán 2007, Sarmiento et al. 2010).

L'objectif de cette thèse est de mieux comprendre l'influence de la température et de la disponibilité des ressources sur les processus hétérotrophes bactériens. La littérature ne procure pas un avis tranché sur la question. Les conclusions majeures relatives à l'effet de la température sur les bactéries marines (diminution du BGE quand la température augmente, plus forte température - dépendance de la RB) sont souvent issues d'analyses croisées de systèmes avec des mesures d'activités hétérotrophes faites à température *in situ* (Rivkin & Legendre 2001, Apple et al. 2006). Or, l'analyse d'un seul facteur forçant sur des analyses croisées de systèmes est biaisée à cause des caractéristiques environnementales propres à chaque système (disponibilité de la MOD, composition des communautés, stade du bloom phytoplanctonique, ...). C'est pourquoi nous avons choisi un site fixe. Nous avons ainsi mené une étude sur de l'eau de surface prélevée à la station SOLEMIO dans la baie de Marseille et observé l'effet de la température au moyen de réelles cinétiques pour 4 processus hétérotrophes (PB, RB, *phos* et *prot*). Nous avons mis en évidence les facteurs limitants la PB au moyen d'expériences d'enrichissement (PO₄, NO₃ + NH₄, glucose), et nous avons réalisé une étude de l'influence des modes d'apports de MO en utilisant des inoculums naturels suivis dans des réservoirs expérimentaux. Cette démarche originale a nécessité la mise en place de nouveaux outils qui n'ont pas tous permis d'obtenir des résultats satisfaisants. Par exemple, l'incapacité à mesurer le pyruvate en condition trace nous empêche de conclure sur la production éventuelle de MO réfractaire. Le développement de prédateurs bactériens dans certaines de nos expériences (I, II et III) ne nous permet pas de les comparer directement et impacte les mesures de RB. Par contre, d'autres outils développés ont suscité de réelles retombées positives tels que les systèmes de gradient thermique (*Temperature Gradient block*) et les chambres

d'incubation presens®. De plus, puisque aucune étude saisonnière sur les activités bactériennes hétérotrophes n'est disponible au site SOLEMIO, cette thèse permet de contribuer à l'étude du fonctionnement de l'écosystème « SOLEMIO », et aidera à assoir la modélisation biogéochimique qui sera effectuée ultérieurement.

1.2. Effets des variations saisonnières sur les processus hétérotrophes bactériens

Le suivi *in situ* permet de caractériser l'évolution saisonnière de PB, RB, *phos* et *prot* à la station SOLEMIO dans la baie de Marseille (Chapitre 3, Céa & al., 2014). Les mesures simultanées de processus hétérotrophes et du BGE en lien avec l'évolution des paramètres biogéochimiques représentent une véritable originalité. En effet, en considérant les activités hétérotrophes responsables de la dégradation, de la production et de la reminéralisation de la MO, cette étude apporte une vision détaillée du flux de cette MO à travers les bactéries marines hétérotrophes. Les processus hétérotrophes montrent une forte variabilité saisonnière (PB : 0,01 à 0,82 $\mu\text{g C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$; $\text{RC} = \text{RB}/0,9$: 0,11 à 2,32 $\mu\text{g C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$; Vm phos : 0,1 à 116,5 $\text{nmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$; Vm prot : 5,1 à 85,1 $\text{nmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) en relation avec la disponibilité des ressources (P-limité de Mai à Novembre) et la température *in situ* (12,8°C à 25,8°C). Les résultats témoignent également d'une large gamme de BGE (1% à 39 %) déterminée sur une année au niveau de la couche de surface. Les expériences d'enrichissement mettent en évidence le caractère très P-limitant du site d'étude apportant, en plus des faibles valeurs de Chl *a*, NO₃ et COD, un argument supplémentaire au caractère oligotrophe de cette zone côtière. Par ailleurs, il est montré que la disponibilité en P peut limiter à la fois la croissance (Van Wambeke et al. 2002) et la respiration (Obernosterer et al. 2003). Dans notre cas, nous trouvons une relation positive entre PB et *phos* mais également entre PB et Chl *a* alors que RB n'en a pas. Ce résultat suggère que PB est plus ressource – dépendent que RB, comme l'avait précédemment suggéré López-Urrutia & Morán (2007). Cela peut s'expliquer par le fait que tout comme N, P est indispensable à la synthèse des protéines, la production cellulaire et l'énergie de transport (Kritzberg et al. 2010a). Enfin, dans les milieux profonds, il est suggéré que *phos* faciliterait l'hydrolyse des molécules réfractaires donnant ainsi accès à N et C pour la dégradation par d'autres enzymes (Hoppe 2003). Ainsi, la présence de *phos* et *prot* semble favoriser l'accès à la MO (Hoppe et al. 1988).

1.3. Contrôle des processus hétérotrophes bactériens par la température

Les expériences de cinétique température réalisées (entre 12°C et 32°C) durant la campagne saisonnière permettent de mettre en évidence la variabilité de la température optimale (quand nous avons pu l'observer) selon le processus hétérotrophe considéré (T_{opt} entre 22°C et 26°C pour PB, T_{opt} entre 23°C et 31°C pour *phos* et T_{opt} entre 23°C et 28°C pour *prot*). En revanche, la température optimale de RB n'est jamais atteinte dans la gamme de température testée. Cette différence de relation entre la PB et la RB au-delà de la température optimale de la PB fait que le BGE diminue fortement une fois ce seuil atteint. Ce résultat est en accord avec celui de Rivkin & Legendre (2001) et suggère un fort surcroît de demande énergétique lors d'un stress de température aux dépens de la production de biomasse. Ces cinétiques permettent également de montrer que dans la phase où les activités sont stimulées par la température, de fortes différences sont observées selon les activités : Q_{10} PB : 1,76 à 4,08 ; Q_{10} CR : 1,97 à 7,68; Q_{10} *phos* : 1,22 à 2,42; Q_{10} *prot* : 1,43 à 1,88. Cette variabilité du Q_{10} témoigne que contrairement à la valeur 2 communément admise (Pomeroy & Wiebe 2001), le Q_{10} peut varier saisonnièrement et de manière inégale en fonction du processus étudié. Par ailleurs, les valeurs de Q_{10} suggèrent que 1) les activités ectoenzymatiques sont moins dépendantes de la température que la production ou la respiration et 2) les processus hétérotrophes sont affectés différemment par l'augmentation de la température. En effet, lorsque la température est abaissée, les réactions possédant les Q_{10} les plus élevés tendent à devenir limitantes. Pour cette raison, on devrait s'attendre à observer des discontinuités si l'on s'intéresse à l'effet de la température sur la croissance globale (Jumars et al. 1993). Enfin, il est suggéré qu'au lieu de considérer le Q_{10} comme un moyen décrivant l'effet de la température sur un processus métabolique, le Q_{10} pourrait être, à la place, un indice caractérisant la gamme de température à laquelle un organisme est adapté (Berges et al. 2002).

1.4. Les conséquences de la température sur le rapport C/N/P

Nous avons vu au chapitre 4 que les activités ectoenzymatiques et la PB réagissent de manière différente face à un stress thermique. En effet, les activités de la protéase et de la phosphatase augmentent relativement moins que la PB en hiver face à une augmentation de la température. Par contre, en été, elles sont moins ralenties que la PB après un épisode de refroidissement. En supposant que la phosphatase fournit la majorité des ressources en P et que la

protéase fournit la majorité des ressources en N, cela aurait des conséquences sur les rapports stœchiométriques des flux C, N et P transitants à travers les bactéries hétérotrophes. Selon cette hypothèse, une augmentation de la température favoriserait les flux de C au détriment des flux N et P alors qu'une baisse de la température favoriserait les flux de N et P au détriment de ceux du C. Un effort de modélisation nous permettrait de tester ces hypothèses car les flux de régénération de N et P favorisent également des monomères ou des minéraux qui ne nécessitent pas une activité ectoenzymatique pour être consommés par les bactéries hétérotrophes. De plus, les activités de protéase libèrent également du N labile, et nous avons vu précédemment que la phosphatase permettait d'accéder à des sources de carbone labile. Ces situations seraient à tester via des modèles de stœchiométrie cellulaire variable en incluant l'hydrolyse enzymatique dans les flux ou en réalisant des expériences de cinétique température sur les taux d'assimilation du NH_4 et du PO_4 .

1.5. Le couplage température – ressource : synergique ou antagoniste ?

Notre approche a consisté à combiner l'effet de la température à celle des ressources nutritives et à constater après 48h de confinement à l'obscurité si ces deux paramètres ont un effet antagoniste ou synergique sur la PB (Fig. 6.1). En se basant sur de telles expériences et sur des combinaisons de facteurs de stimulation de la PB (Chapitre 4), cette interaction est toujours présente et principalement d'ordre synergique (excepté durant les périodes chaudes d'été où cette interaction peut être de nature antagoniste). Il n'est pas aisé de confirmer ces effets car la cinétique d'évolution de la PB pendant 48 heures n'est pas connue. Lorsque l'augmentation de la température testée se produit dans la phase d'Arrhenius (lors de l'augmentation exponentielle) lors d'une situation où P est limitant, la PB est stimulée par un ajout de P et réagit en 48 heures en montrant probablement une phase de latence plus courte, et un développement exponentiel plus précoce. Cette situation génère des pics de PB notables en 48 heures, d'où une apparente synergie. Cependant, dans un cas de croissance cellulaire importante, la phase stationnaire pourrait elle-même être atteinte, complexifiant ainsi l'interprétation antagoniste – synergique.

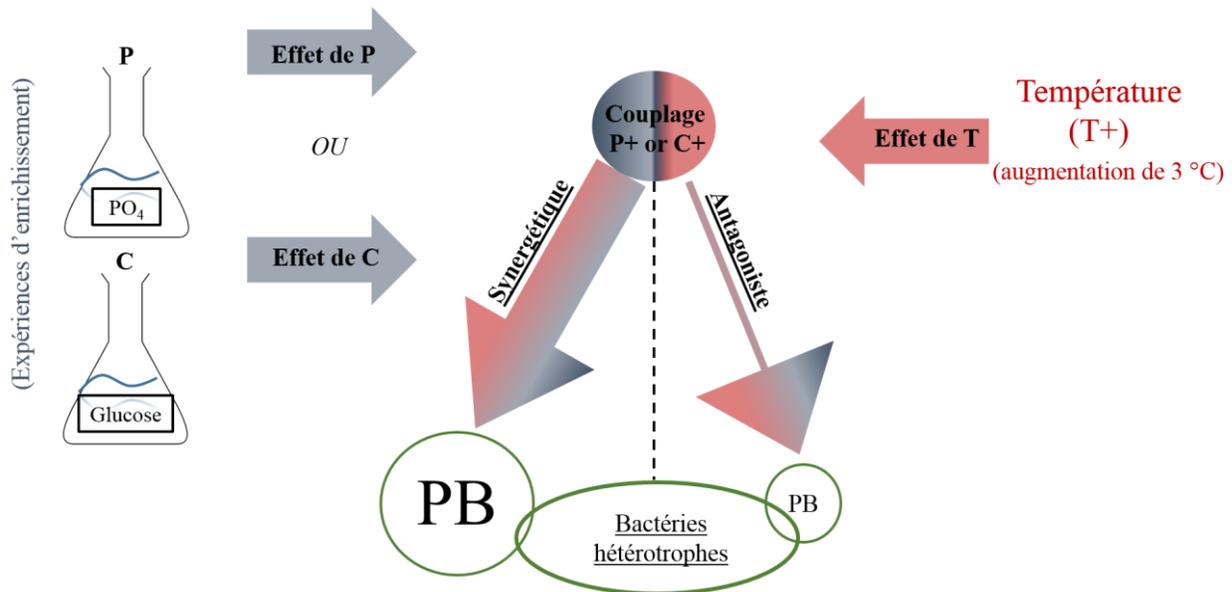


Figure 6.1. Schéma conceptuel de l'effet cumulé de la température et des ressources nutritives sur la PB des bactéries hétérotrophes pouvant être de nature synergique ou antagoniste

1.6. Effets de la température sur le BGE et la dynamique bactérienne

Le travail sur le suivi saisonnier montre que contrairement à la tendance extrapolée des larges séries de données *in situ* (Rivkin & Legendre 2001, Apple et al. 2006), le BGE ne diminue pas forcément quand la température augmente. Selon que le $Q_{10}RB$ est supérieur ou non au $Q_{10}PB$, le BGE augmentera ou diminuera dans une gamme de température bien définie. Les expériences de cinétique température permettent de constater que 1) selon les saisons, la réponse du BGE à la température peut changer et 2) les bactéries optimisent leur métabolisme : leur BGE, en condition de température *in situ*, est proche de la valeur maximale de BGE atteinte sur le gradient de température testé (12°C à 32°C). Ainsi, les bactéries hétérotrophes semblent tendre vers une adaptation saisonnière optimale en fonction des conditions thermiques et nutritionnelles du milieu considéré.

Toutefois, nous avons étudié avec nos expériences de cinétique température, l'effet d'un changement rapide de la température (quelques heures) sur une même communauté bactérienne de départ. Dans le milieu naturel, il est possible d'observer des variations de température à court terme. Par exemple, la PB peut être régulée par la température sur des cycles journaliers (Shiah & Ducklow 1995). Dans le cas de la baie de Marseille, la température de surface change vite (quelques heures) à cause des changements de masse d'eau (*upwelling*, *downwelling*, courants, ...). Il est

probable que l'arrivée de ces nouvelles masses d'eau apporte avec elles de nouvelles communautés bactériennes (possédant des optima de température adaptées à ces eaux). Aussi, dans le milieu naturel, il est plus difficile de connaître l'adaptabilité de communautés bactériennes locales avec des variations rapides de température. Des études réalisées en mésocosme avec des consortiums naturels montrent qu'il y a une succession de nombreuses générations et des changements de structure communautaire que ce soit sous l'influence d'une augmentation progressive (Petchey et al. 1999) ou brutale (Hoppe et al. 2008, Wohlers et al. 2009) de la température. Selon les prédictions du changement global (+2°C dans 100 ans) et en tenant compte d'un taux de croissance moyen de 1 d^{-1} ; après 100 ans et 300 000 générations de bactéries, chaque génération bactérienne sera affectée par $0,000007^\circ\text{C}$. Cette observation suggère que les bactéries auront suffisamment de temps pour s'adapter au réchauffement. Il est donc probable que les changements brusques de la température dans les expériences en culture affecteront les bactéries de manière fondamentalement différente de celles susceptibles de se présenter dans la réalité (Sarmiento et al. 2010).

Il existe également un effet indirect de la température à travers les organismes régénérateurs de C labile ou de P (phytoplancton, flagellés hétérotrophes, virus, ...). En effet, les bactéries fonctionnent le plus souvent en situation de limitation en C ou en P avec des substrats labiles qui leur sont fournis « en flux tendu », c'est-à-dire aussitôt produits, aussitôt consommés. D'après Sarmiento et al. (2010), si nous nous basons dans la couche supérieure d'un océan stratifié et oligotrophe (c'est-à-dire la majeure partie de l'océan de surface), la hausse des températures entraînera 1) une augmentation probable de la RB, 2) une augmentation du flux de mortalité bactérienne par broutage augmentant ainsi le flux de biomasse entre ces deux niveaux trophiques et 3) si suffisamment de ressources sont disponibles (MO labile), une augmentation de la PB. Cependant, les pertes par broutage seraient moins stimulées que la PB, entraînant théoriquement une accumulation de biomasse qui renforcerait le rôle des microbes. En parallèle d'un potentiel réchauffement, les communautés phytoplanctoniques pourraient avoir tendance à diminuer leur taille ce qui renforcerait encore plus le rôle dominant des bactéries marines hétérotrophes dans le cycle du carbone dans l'océan (Falkowski & Raven 1997, Daufresne et al. 2009, Morán et al. 2010).

Enfin, la littérature relative aux virus de l'environnement marin témoigne des effets non négligeables de ces organismes infectieux sur la régulation des communautés bactériennes. Par exemple, une étude mesurant l'impact des virus sur la mortalité bactérienne montre qu'en moyenne 20% des bactéries marines hétérotrophes seraient infectées par des virus et que 10%-20% de la

communauté bactérienne serait lysée quotidiennement par les virus (Suttle 1994). Il a également été montré à partir d'expériences en culture avec des communautés microbiennes issues d'une lagune méditerranéenne que la présence de nanoflagellés hétérotrophes favoriserait la diminution du nombre de virus intracellulaires par bactérie mais augmenterait le rapport virus/bactéries (Bouvy et al. 2011). Ces mêmes auteurs se sont intéressés également aux effets de la température et des UV et ils montrent que ces deux paramètres tendent à faire diminuer l'abondance virale ainsi que leur capacité infectieuse. Bien que peu investiguée, la sensibilité des virus naturels à la température et aux UV a déjà été observée dans de précédentes études montrant que la température a un effet significatif sur la capacité infectieuse des virus (Suttle & Chen 1992, Giladi et al. 1995, Noble & Fuhrman 1997). Ainsi, les virus naturels ne doivent pas être exclus de l'équation pour notre compréhension de l'effet de la température sur la dynamique des communautés bactériennes.

1.7. Influence de la variabilité des apports de la MO sur la dynamique bactérienne

Les cultures saisonnières réalisées en minicosme permettent, par rapport au suivi *in situ*, d'apporter un point de vue différent sur la disponibilité des ressources. L'avantage de travailler en culture est d'influer sur un seul paramètre en gardant les autres constants dans le temps. Dans notre cas, c'est la variabilité des apports de la MO que nous abordons en simulant des apports pulsés (P) ou continus (C) de COD. L'intérêt est d'observer si le mode d'apport peut avoir un impact sur la dynamique des bactéries hétérotrophes en termes d'AB, de PB, de RB et de BGE. Les résultats des cultures en minicosme montrent qu'en terme de flux maximum de PB et de RB atteints dans les réservoirs P au moment des pulses, et en terme de maximum de biomasse bactérienne atteinte, les processus hétérotrophes, soumis au même protocole expérimental, varient selon les saisons (printemps, été et automne). Les $PB_{cumulées}$, les $RB_{cumulées}$ et les $BGE_{cumulés}$ varient aussi selon les saisons et la présence ou non d'épisodes de broutage (Tableau 6.1). Concernant le mode d'apport, les conclusions ne peuvent être apportées, en l'absence de modélisation, que sur les bilans cumulés qui présentent l'intégrale des flux observés pour un apport total de pyruvate supposé identique.

Tableau 6.1. Valeurs cumulées du COD, de la PB, de la RB et du BGE dans les réservoirs P (pulsé) et C (continu) des expériences I, II, III et IV. Le calcul des cumuls est fait à partir d'une intégration linéaire entre 2 points d'échantillonnage. Si la présence de broutage est révélée dans une culture (chute de l'AB) alors les calculs des cumuls du COD, de la PB, de la RB et du BGE sont arrêtés avant : 141h et 162h dans l'expérience I (pour les réservoirs P et C, respectivement), 210h dans l'expérience II (pour le réservoir P uniquement) et 138h dans l'expérience III (pour les réservoirs P et C).

	Réservoir P				Réservoir C			
	COD _{cumulé}	PB _{cumulée}	RB _{cumulée}	BGE _{cumulé}	COD _{cumulé}	PB _{cumulée}	RB _{cumulée}	BGE _{cumulé}
Exp. I 28/11/11-08/12/11	407*	106*	339*	23*	408*	115*	248*	30*
Exp. II 26/03/12-06/04/12	547*	189*	447*	20*	582	306	318	48
Exp. III 25/06/12-06/07/12	339*	404*	460*	27*	352*	250*	357*	50*
Exp. IV 27/09/12-08/10/12	689	845	660	56	772	598	451	57

*Calculs de cumul arrêté avant l'épisode de broutage

Les résultats de cette étude sont encore préliminaires et nécessitent d'être approfondis par des analyses supplémentaires, en particulier de modélisation. Les résultats en CE-SSCP sont à valoriser afin d'apporter des informations sur l'évolution des communautés en fonction des saisons et des apports de COD. Pour le moment, les résultats nous permettent de dire que 1) nos conditions de culture favorisent la dominance d'un ribotype (probablement des γ -protéobactéries) et la diminution/disparition d'un autre (probablement des α -protéobactéries), 2) le broutage par les flagellés hétérotrophes dans les expériences I et III dessert le ribotype dominant et favorise l'apparition d'un ribotype résistant à la prédation, 3) les populations bactériennes présentes reflètent celles qui sont actives (profils CE-SSCP des échantillons d'ADN = échantillons d'ARN) et 4) le régime d'apport semble définir l'émergence de groupes phylogénétiques distincts lors de l'expérience IV. Il est probable que les populations légèrement différentes apparaissent aussi selon le mode d'apport dans les autres expériences, mais le changement de population du au broutage masquerait ces divergences sur l'étude des profils CE-SSCP. Identifier les changements de diversité est essentiel pour comprendre les variations saisonnières des activités des bactéries hétérotrophes. En effet, de précédentes études réalisées en mer Méditerranée nord occidentale aux stations DYFAMED, MOLA et SOLA montrent des changements de communautés bactériennes liés aux cycles jour - nuit, à la saison et à la profondeur (Ghiglione et al. 2005, 2007, Rodríguez-Blanco et al. 2009, Obernosterer et al. 2010).

Notre étude en minicosme a contribué à développer un nouvel outil de mesure dynamique de la RB : la chambre d'incubation presens®, capable de déterminer de faibles valeurs de respiration en continu. Toutefois, ces chambres d'incubation presens® nécessitent encore des

améliorations méthodologiques (Annexe 8) car la mise en œuvre de cet outil nécessite la mise en place d'une procédure rigoureuse pour l'interprétation des données.

2 **Perspectives**

Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse ont soulevé de nouvelles problématiques auxquelles il est nécessaire de répondre. De précédentes études montrent qu'au sein d'une communauté bactérienne, il existe des groupes bactériens possédant des températures d'adaptation différentes (Crump & Hobbie 2005, Lymer et al. 2008, Adams et al. 2010). Les changements de température doivent contribuer à réguler la structure des communautés. Il était prévu dans cette thèse de suivre par CE-SSCP l'évolution saisonnière des communautés bactériennes. Malheureusement, les échantillons destinés à cette analyse ont été perdus suite à une rupture de la chaîne du froid et aucune observation n'a pu être menée. Il serait possible de simuler des augmentations de température sur des durées un peu plus longues et de suivre l'évolution de la diversité au cours du temps. Ce travail pourrait toujours se faire par CE-SSCP (Ghiglione et al. 2008) ou si les moyens le permettent, par du pyroséquençage. Par exemple, des organismes thermophiles de sources d'eau chaude du plateau Tibétain ont été étudiés avec cette technique. Les auteurs montrent des phylums dominants qui varient selon les températures des sources chaudes, mais par contre, une diversité qui se maintient (Wang et al. 2013). Ainsi, nous serions en mesure d'apporter des informations sur la variabilité des activités hétérotrophes en lien avec l'évolution des communautés bactériennes dans le contexte du changement global.

Nous avons également soulevé le fait que nos expériences de cinétique température mesurent l'effet d'un changement rapide de la température (quelques heures) sur une même communauté bactérienne de départ. A l'échelle du changement global, l'augmentation de la température se fait de manière progressive. Il serait donc intéressant d'étudier l'adaptabilité d'une même communauté bactérienne subissant des augmentations ou diminutions lentes de température telles que nous pourrions les observer dans le milieu naturel, avec une masse d'eau qui ne changerait pas. De cette manière, nous observerions non plus des modifications physiologiques, comme dans nos expériences de cinétique température, mais des modifications génétiques intervenant au sein des communautés bactériennes subissant les augmentations lentes de température.

Les expériences de cinétique température mettent en évidence une sensibilité à la température différente en fonction du processus observé. Les apports pulsés de pyruvate dans nos expériences en culture entraînent probablement un quota cellulaire très dynamique. Par exemple, les abondances fluctuent plus que le COP lors de nos expériences. Par ailleurs, nous avons vu que le rapport C/N variait très peu dans nos expériences à cause de la présence excédentaire du N. Alors, sachant qu'en Mer Méditerranée P est le principal facteur limitant, reproduire ce type d'expérience en minicosme en remplaçant les pulses de C par des pulses de P serait un moyen d'observer les variations cellulaires du rapport C/P. En revanche, il serait nécessaire de développer des techniques plus sensibles que pour les mesures de COP et des abondances, comme par exemple, en mettant en œuvre des proxy de contenus en protéines, lipides par cytométrie en flux (Zubkov et al. 1999). Une autre méthode serait de travailler avec des outils cellule à cellule tel que le « *synchrotron X-ray microprobes* » permettant d'obtenir les contenus élémentaires C, N, P des cellules (Twining et al. 2008).

L'expérience qui consiste à incuber tous les mois des volumes d'eau de mer enrichis en P et en C à 3°C au-dessus de la température *in situ* montre une stimulation quasi générale de la PB. Il serait nécessaire d'optimiser cette expérience en y ajoutant des mesures simultanées de RB. Cela permettrait de pouvoir déterminer effectivement si RB ou PB sont majoritairement stimulées par un ajout de P. Cette démarche apporterait des informations supplémentaires sur l'effet du réchauffement dans le transfert de la MO à travers les bactéries hétérotrophes.

Un intérêt majeur de ce travail est d'avoir à disposition une base de données importante sur l'évolution des différents paramètres bactériens tels que : la PB, l'AB, la RB, *phos*, *prot* mais aussi sur les mesures variables de Q_{10} de 4 activités hétérotrophes. En général, les bactéries représentent une boîte noire dans les modèles écologiques et l'effet de la température sur la dynamique des bactéries et d'autres processus sont formalisés la plus part du temps par un Q_{10} unique et proche de 2 (Cossins & Bowler 1987). Aussi, développer des modèles à deux niveaux trophiques dans une configuration de type *bottom-up* (bactéries hétérotrophes - phytoplancton) en utilisant les données issues de ce travail de thèse serait un moyen supplémentaire de valoriser nos résultats en important de nouvelles informations sur la dynamique des transferts de MO entre ces deux groupes phylogénétiques.

Il existe également d'autres modèles permettant de mesurer l'effet de la température sur des processus hétérotrophes tel que le modèle de Ratkowsky et al. (1982) (Li & Dickie 1987). Dans

cette étude, toute une série de modèles mathématiques non linéaires sont utilisés: le modèle de Johnson, le modèle d'Hinshelwood, le modèle de Morh et Kraweic, le modèle de Kamykowski et le modèle de Stoermer et Ladewski. Les auteurs insistent sur la nécessité d'avoir un spectre de données suffisant, couvrant toute la phase d'inhibition afin de choisir le modèle le plus adapté pour interpréter au mieux les variations d'un processus biologique *in situ*. Or, dans notre étude sur les Q_{10} , nous avons mesuré l'augmentation des activités hétérotrophes seulement dans la phase exponentielle. Il serait donc opportun d'augmenter la plage de température expérimentale de nos « *Temperature Gradient Block* » (entre 5°C et 40°C, par exemple) afin de dégager les températures cardinales ($T_{min.}$, $T_{max.}$, $T_{opt.}$) de chacune des activités étudiées. Nous aurions ainsi la possibilité de travailler avec d'autres modèles que celui d'Arrhenius.

Un travail de modélisation à partir de la théorie *DEB* (*Dynamic Energetic Budget*) avait précédemment été réalisé sur une culture en mode batch par Marie Eichinger (2010) afin de mettre en évidence l'impact de la disponibilité du COD et de la maintenance cellulaire sur le BGE. Les résultats de cette recherche avaient montré, en particulier, qu'un apport pulsé de COD pouvait doubler le BGE. Cette étude avait également conduit à l'hypothèse d'une production de COD réfractaire par les bactéries hétérotrophes en culture (Eichinger et al. 2010). Ce modèle *DEB* pourrait alors être adapté à nos conditions de cultures saisonnières et ces sorties comparées à nos résultats. D'autres auteurs ont déjà eu recours à ce genre de modèle théorique. Par exemple, afin d'expliquer l'impact du changement global sur l'équilibre dans le milieu naturel entre la production primaire et la respiration des communautés, le modèle *MET* (« *Metabolic Theory of Ecology* ») a été utilisé. Les auteurs trouvent qu'il y aura une réponse négative des communautés de l'océan suite au réchauffement climatique car moins de CO_2 sera piégé avec l'augmentation de la température de l'océan (López-Urrutia et al. 2006). Ainsi, une collaboration modélisation – expérimentation apporterait une plus-value au modèle. Elle permettrait, par exemple, de vérifier l'hypothèse d'une production de COD réfractaire par les bactéries quand celles-ci sont confrontées à des pulses de carbone ou de mieux comprendre l'impact de la hausse de la température à l'échelle du changement global. En parallèle, il faudrait également poursuivre l'optimisation du protocole de dosage du pyruvate aux faibles concentrations afin de pouvoir quantifier expérimentalement le potentiel COD réfractaire produit par les bactéries hétérotrophes en culture.

Les cultures bactériennes sont des excellents outils pour observer l'effet d'un seul paramètre sur un organisme vivant. Toutefois, en voulant contrôler un paramètre plutôt qu'un autre,

l'expérimentateur est obligé de faire un choix qui impactera forcément l'organisme qu'il observe. Dans nos cultures saisonnières, nous avons choisi d'enrichir avec une seule source de carbone labile. Nous n'étudions donc pas la capacité de dégradation de la MO naturellement présente *in situ*. Par ailleurs, il est montré que le confinement (*in situ* vers *in vitro*) a un effet de sélection sur les communautés bactériennes naturelles (Ferguson et al. 1984). Aussi, c'est dans l'intérêt de l'expérimentateur d'être le moins invasif possible sur sa communauté d'observation afin de tirer les résultats les plus proches possible de la réalité. C'est pourquoi, il est primordial de limiter la pression de sélection sur les organismes observés. Dans notre cas, à la place de fournir une source de MO unique à nos communautés bactériennes, la prochaine étape serait de leur fournir une source de MO issue directement du phytoplancton. Cela nécessiterait de mettre en place des cultures en minicosme à deux étages avec 2 niveaux trophiques. Il y'aurait tout d'abord, les producteurs (phytoplancton) dans un premier étage axénique qui permettrait de voir les flux de production et d'excrétion de MO. Puis, les consommateurs primaires (bactéries hétérotrophes) seraient disposés dans un deuxième étage afin d'observer l'évolution des processus hétérotrophes bactériens en fonction : de la température, des UV ou de la limitation en sels nutritifs, etc... . Une telle étude fournirait certainement de nombreux résultats utiles pour l'amélioration des modèles écologiques et pour les relations bactéries – phytoplancton en fonction des communautés présentes.

Références bibliographiques

- Abboudi M, Jeffrey WH, Ghiglione J-F, Pujo-Pay M, Oriol L, Sempéré R, Charrière B, Joux F (2008) Effects of photochemical transformations of dissolved organic matter on bacterial metabolism and diversity in three contrasting coastal sites in the Northwestern Mediterranean Sea during summer. *Microb Ecol* 55:344–357
- Adams HE, Crump BC, Kling GW (2010) Temperature controls on aquatic bacterial production and community dynamics in arctic lakes and streams. *Environ Microbiol* 12:1319–1333
- Alonso-Sáez L, Gasol JM (2007) Seasonal variations in the contributions of different bacterial groups to the uptake of low-molecular-weight compounds in northwestern Mediterranean coastal waters. *Appl Environ Microbiol* 73:3528–3535
- Alonso-Sáez L, Pinhassi J, Pernthaler J, Gasol JM (2010) Leucine-to-carbon empirical conversion factor experiments: does bacterial community structure have an influence? *Environ Microbiol* 12:2988–2997
- Alonso-Sáez L, Vázquez-Domínguez E, Cardelús C, Pinhassi J, Sala MM, Lekunberri I, Balagué V, Vila-Costa M, Unrein F, Massana R, Simó R, Gasol JM (2008) Factors Controlling the Year-Round Variability in Carbon Flux Through Bacteria in a Coastal Marine System. *Ecosystems* 11:397–409
- Aminot A, Kérouel R (2004) Dissolved organic carbon, nitrogen and phosphorus in the N-E Atlantic and the N-W Mediterranean with particular reference to non-refractory fractions and degradation. *Deep Sea Res Part I Oceanogr Res Pap* 51:1975–1999
- Amon RMW, Benner R (1996) Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnol Oceanogr* 41:41–51
- Apple JK, Giorgio PA del, Kemp WM (2006) Temperature regulation of bacterial production, respiration, and growth efficiency in a temperate salt-marsh estuary. *Aquat Microb Ecol* 43:243–254
- Aranguren-Gassis M, Teira E, Serret P, Martínez-García S, Fernández E (2012) Potential overestimation of bacterial respiration rates in oligotrophic plankton communities. *Mar Ecol Prog Ser* 453:1–10
- Arnosti C, Jørgensen B (2003) High activity and low temperature optima of extracellular enzymes in Arctic sediments: implications for carbon cycling by heterotrophic microbial communities. *Mar Ecol Prog Ser* 249:15–24
- Arnosti C, Jorgensen BB, Sagemann J, Thamdrup B (1998) Temperature dependence of microbial degradation of organic matter in marine sediments : polysaccharide hydrolysis , oxygen consumption , and sulfate reduction. *Mar Ecol Prog Ser* 165:59–70
- Azam F, Ammerman J (1984) Cycling of Organic Matter by Bacterioplankton in Pelagic Marine Ecosystems: Microenvironmental Considerations. In: Fasham MJR (ed) *Flows of Energy and Materials in Marine Ecosystems SE - 14*. Springer US, p 345–360
- Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Rei LA, Thingstad F (1983) The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 10:257–263

- Azam F, Smith DC, Steward GF, Hagström Å (1994) Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microb Ecol* 28:167–179
- Barillier A, Garnier J (1993) Influence of Temperature and Substrate Concentration on Bacterial Growth Yield in Seine River Water Batch Cultures. *Appl Environ Microbiol* 59:1678–1682
- Benitez-Nelson CR, Buesseler KO (1999) Variability of inorganic and organic phosphorus turnover rates in the coastal ocean. *Nature* 398:502–505
- Berges J, Varela D, Harrison P (2002) Effects of temperature on growth rate, cell composition and nitrogen metabolism in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *Mar Ecol Prog Ser* 225:139–146
- Berggren M, Laudon H, Jonsson A, Jansson M (2010) Nutrient constraints on metabolism affect the temperature regulation of aquatic bacterial growth efficiency. *Microb Ecol* 60:894–902
- Bethoux JP, Morin P, Chaumery C, Connan O, Gentili B, Ruiz-Pino D (1998) Nutrients in the Mediterranean Sea, mass balance and statistical analysis of concentrations with respect to environmental change. *Mar Chem* 63:155–169
- Biddanda B, Ogdahl M, Cotner (2001) Dominance of bacterial metabolism in oligotrophic relative to eutrophic waters. *Limnol Oceanogr* 46:730–739
- Billen G (1984) Heterotrophic Utilization and Regeneration of Nitrogen. In: Hobbie J, Williams P leB. (eds) *Heterotrophic Activity in the Sea* SE - 15. Springer US, p 313–355
- Billen G, Servais P, Becquevort S (1990) Dynamics of bacterioplankton in oligotrophic and eutrophic aquatic environments: bottom-up or top-down control? *Hydrobiologia* 2047:37–42
- Bohdansky AB, Puskaric S, Herndl GJ (1995) Influence of zooplankton grazing on free dissolved enzymes in the sea. *Mar Ecol Prog Ser* 121:53–63
- Bouvy M, Bettarel Y, Bouvier C, Domaizon I, Jacquet S, Flocc'h E Le, Montanié H, Mostajir B, Sime-
Ngando T, Torréton JP, Vidussi F, Bouvier T (2011) Trophic interactions between viruses, bacteria and nanoflagellates under various nutrient conditions and simulated climate change. *Environ Microbiol* 13:1842–1857
- Briand E, Pringault O, Jacquet S, Torreton J-P (2004) The use of oxygen microprobes to measure bacterial respiration for determining bacterioplankton growth efficiency. *Limnol Oceanogr Methods* 2:406–416
- Broche P, Devenon J-L, Forget P, Maistre J-C de, Naudin J-J, Cauwet G (1998) Experimental study of the Rhone plume. Part I: physics and dynamics. *Oceanol Acta* 21:725–738
- Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, Noller HF (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 148:107–127
- Bruland KW, Lohan MC (2003) Controls of trace metals in seawater (H Elderfield, Ed.). *Ocean Mar Geochemistry* 6:23–47

- Calvo-Díaz A, Morán XAG (2009) Empirical leucine-to-carbon conversion factors for estimating heterotrophic bacterial production: seasonality and predictability in a temperate coastal ecosystem. *Appl Environ Microbiol* 75:3216–3221
- Carlson CA (2002) Production and removal processes. In: Hansell DA, Carlson CA (eds) *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*. Academic Press, San Diego. p 91–151
- Carlson C a., Ducklow HW (1995) Dissolved organic carbon in the upper ocean of the central equatorial Pacific Ocean, 1992: Daily and finescale vertical variations. *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr* 42:639–656
- Carlson CA, Ducklow HW (1996) Growth of bacterioplankton and consumption of dissolved organic carbon in the Sargasso Sea. *Aquat Microb Ecol* 10:69–85
- Carlson C, Giovannoni S, Hansell D, Goldberg S, Parsons R, Otero M, Vergin K, Wheeler B (2002) Effect of nutrient amendments on bacterioplankton production, community structure, and DOC utilization in the northwestern Sargasso Sea. *Aquat Microb Ecol* 30:19–36
- Carlson CA, Giovannoni SJ, Hansell DA, Goldberg SJ, Parsons R, Vergin K (2004) Interactions among dissolved organic carbon, microbial processes. *Limnol Oceanogr* 49:1073–1083
- Caron DA, Dam HG, Kremer P, Lessard EJ, Madin LP, Malone TC, Napp JM, Peele ER, Roman MR, Youngblut MJ (1994) The contribution of microorganisms to particulate carbon and nitrogen in surface waters of the Sargasso Sea near Bermuda. *Deep Res I* 42:943–972
- Castelbon C (1972) Etude de la circulation des masses d'eau dans le golfe de Marseille. *Tethys* 4:269–312
- Cauwet G (1994) HTCO method for dissolved organic carbon analysis in seawater: influence of catalyst on blank estimation. *Mar Chem* 47:55–64
- Céa B, Lefèvre D, Chirurgien L, Raimbault P, Garcia N, Charrière B, Grégori G, Ghiglione J-F, Barani A, Lafont M, Van-Wambeke F (2014) An annual survey of bacterial production, respiration and ectoenzyme activity in coastal NW Mediterranean waters: temperature and resource controls. *Environ Sci Pollut Res*
- Céa B, VanWambeke F, Lefèvre D, Chirurgien L Regulation of bacterial production, bacterial respiration and ectoenzymatic activities by temperature and resource over an annual cycle in the Bay of Marseille (In review). *Aquat Microb Ecol*
- Cembella AD, Antia NJ, Harrison PJ (1984) The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part 1. *Crit Rev Microbiol* 10:317–391
- Cherrier J, Bauer J (2004) Bacterial utilization of transient plankton-derived dissolved organic carbon and nitrogen inputs in surface ocean waters. *Aquat Microb Ecol* 35:229–241
- Chin W-C, Orellana M V, Verdugo P (1998) Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels. *Nature* 391:568–572

- Christakill U, Wambeke F Van, Dolan JR (1999) Nanoflagellates (mixotrophs, heterotrophs and autotrophs) in the oligotrophic eastern Mediterranean: standing stocks, bacterivory and relationships with bacterial production. *Mar Ecol Prog Ser* 181:297–307
- Christian JR, Karl DM (1994) Microbial community structure at the U.S.-Joint Global Ocean Flux Study Station ALOHA: Inverse methods for estimating biochemical indicator ratios. *J Geophys Res* 99:14269
- Christian JR, Karl DM (1995) Bacterial ectoenzymes in marine waters: activity ratios and temperature responses in three oceanographic provinces. *Limnol Oceanogr* 40:1042–1049
- Chrost RJ (1989) Characterization and significance of P-glucosidase activity in lake water. *Limnol Oceanogr* 34:660–672
- Chrost RJ (1990) Microbial ectoenzymes in aquatic environments In: Overbeck J, Chrost RJ (eds) *Aquatic Microbial Ecology. Biochemical and molecular approaches*. Springer, New York.
- Chróst R (1989) Characterization and significance of B-glucosidase activity in lake water. *Limnol Oceanogr* 34:660–672
- Chróst RJ (1991) Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. In: Chróst RJ (ed) *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. Springer-Verlag, p 29–59
- Church MJ (2008) *Source Control of Bacterial Dynamics in the Sea*. Kirchman, D L, Second Ed *Microb Ecol Ocean* John Wiley Son, New York, NY:335–382
- Coffin RB, Connolly JP, Harris PS (1993) Availability of dissolved organic carbon to bacterioplankton examined by oxygen utilization. *Mar Ecol Prog Ser* 101:9–22
- Cole J, Findlay S, Pace M (1988) Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Mar Ecol Prog Ser* 43:1–10
- Cole JJ, Pace ML (1995) Bacterial secondary production in oxic and anoxic freshwaters. *Limnol Oceanogr* 40:1019–1027
- Cossins A, Bowler K (1987) *Temperature biology of animals*.
- Cotner JB, Ammerman JW, Peele ER, Bentzen E (1997) Phosphorus-limited bacterioplankton growth in the Sarcasso Sea. *Aquat Microb Ecol* 13:141–149
- Cottrell MT, Kirchman DL (2000) Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Appl Environ Microbiol* 66:1692–1697
- Crump BC, Hobbie JE (2005) Synchrony and seasonality in bacterioplankton communities of two temperate rivers. *Limnol Oceanogr* 50:1718–1729
- Cullen JJ (1991) Hypotheses to explain high-nutrient conditions in the open sea. *Limnol Oceanogr* 36:1578–1599

- Cunha A, Almeida A, Gomes NCM, Oliveira V, Santos AL, Santiago C De, Extracellular K, Activity E, Bacteria A, Changes G (2010) Bacterial Extracellular Enzymatic Activity in Globally Changing Aquatic Ecosystems. *Appl Microbiol Microb Biotechnol*:124–135
- Currie DJ, Kalf J (1984) The relative importance of bacterioplankton and phytoplankton in phosphorus uptake in freshwater. *Limnol Ocean* 29:311–321
- Daneri G, Riemann B, Williams PJL (1994) In-Situ Bacterial Production and Growth-Yield Measured by Thymidine, Leucine and Fractionated Dark Oxygen-Uptake. *J Plankton Res* 16:105–113
- Daufresne M, Lengfellner K, Sommer U (2009) Global warming benefits the small in aquatic ecosystems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12788–12793
- Delbès C, Moletta R, Godon JJ (2001) Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol* 35:19–26
- Del Giorgio PA, Cole JJ (1998) Bacterial Growth Efficiency in Natural Aquatic Systems. *Annu Rev Ecol Syst* 29:503–541
- Del Giorgio PA, Williams PJ (2005) Respiration in Aquatic Ecosystems.
- Diaz F, Raimbault P, Boudjellal B, Garcia N, Moutin T (2001) Early spring phosphorus limitation of primary productivity in a NW Mediterranean coastal zone (Gulf of Lions). *Mar Ecol Prog Ser* 211:51–62
- Duce RA, LaRoche J, Altieri K, Arrigo KR, Baker AR, Capone DG, Cornell S, Dentener F, Galloway J, Ganeshram RS, Geider RJ, Jickells T, Kuypers MM, Langlois R, Liss PS, Liu SM, Middelburg JJ, Moore CM, Nickovic S, Oschlies A, Pedersen T, Prospero J, Schlitzer R, Seitzinger S, Sorensen LL, Uematsu M, Ulloa O, Voss M, Ward B, Zamora L (2008) Impacts of atmospheric anthropogenic nitrogen on the open ocean. *Science* 320:893–897
- Duce RA, Tindale NW (1991) Chemistry and biology of iron and other trace metals in the ocean. *Limnol Oceanogr* 36:1715–1726
- Ducklow H (2000) Bacterial Production and Biomass in the Oceans. In: Chapter 4 in: *Microbial Ecology of the Oceans*. ed, Kirchman David. New york: Wiley.
- Dyhrman S, Palenik B (1999) Phosphate stress in cultures and field populations of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* detected by a single-cell alkaline phosphatase assay. *Appl Environ Microbiol* 65:3205–3212
- Eichinger M, Sempéré R, Grégori G, Charrière B, Poggiale J, Lefèvre D (2010) Increased bacterial growth efficiency with environmental variability: results from DOC degradation by bacteria in pure culture experiments. *Biogeosciences* 7:1–9
- Eichinger M, Sempéré R, Poggiale J, Grégori G, Charrière B, Lefèvre D Biodegradation experiment in variable environments: substrate pulses and impact on growth efficiencies. in prep
- Eiler A, Langenheder S, Bertilsson S, Tranvik LJ (2003) Heterotrophic Bacterial Growth Efficiency and Community Structure at Different Natural Organic Carbon Concentrations. *Appl Environ Microbiol* 69:3701–3709

- Estournel C, Broche P, Marsaleix P, Devenon J-L, Auclair F, Vehil R (2001) The Rhone River Plume in Unsteady Conditions: Numerical and Experimental Results. *Estuar Coast Shelf Sci* 53:25–38
- Falkowski PG, Raven JA (1997) *Aquatic photosynthesis*. Malden, MA: Blackwell Scientific.
- Felip M, Pace ML, Cole JJ (1996) Regulation of Planktonic Bacterial Growth Rates: The Effects of Temperature and Resources. *Microb Ecol* 31:15–28
- Fenchel T (2002) Microbial behavior in a heterogeneous world. *Science* 296:1068–1071
- Ferguson RL, Buckley EN, Palumbo A V (1984) Response of Marine Bacterioplankton to Differential Filtration and Confinement. *Appl Environ Microbiol* 47:49–55
- Feudale L, Shukla J (2007) Role of Mediterranean SST in enhancing the European heat wave of summer 2003. *Geophys Res Lett* 34:1–4
- Fischer U, Velimirov B (2002) High control of bacterial production by viruses in a eutrophic oxbow lake. *Aquat Microb Ecol* 27:1–12
- Francois R, Altabet MA, Yu E-F, Sigman DM, Bacon MP, Frank M, Bohrmann G, Bareille G, Labeyrie LD (1997) Contribution of Southern Ocean surface-water stratification to low atmospheric CO₂ concentrations during the last glacial period. *Nature* 389:929–935
- Fraysse M, Pairaud I, Ross ON, Faure VM, Pinazo C Intrusion of Rhone River diluted water into the bay of Marseille: generation processes and impacts on ecosystem functioning. *Geophys Res*
- Fraysse M, Pinazo C, Faure VM, Fuchs R, Lazzari P, Raimbault P, Pairaud I (2013) Development of a 3D coupled physical-biogeochemical model for the Marseille coastal area (NW Mediterranean Sea): what complexity is required in the coastal zone? *PLoS One* 8:e80012
- Fraysse M, Pinazo C, Pairaud I (2014) Rôle du forçage physique sur l'écosystème à l'est du Golfe du Lion : modulation de l'impact des apports anthropiques en sels nutritifs et matière organique étudiée par modélisation 3D couplée physique et biogéochimique
- Fuhrman J a, Hewson I, Schwalbach MS, Steele J a, Brown M V, Naeem S (2006) Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13104–9
- Fukuda R, Ogawa H, Nagata T, Koike I (1998) Direct Determination of Carbon and Nitrogen Contents of Natural Bacterial Assemblages in Marine Environments. *Appl Environ Microbiol* 64:3352–3358
- Garde K, Gustavson K (1999) The impact of UV-B radiation on alkaline phosphatase activity in phosphorus-depleted marine ecosystems. *J Exp Mar Bio Ecol* 238:93–105
- Gasol JM, Moran XAG (1999) Effects of filtration on bacterial activity and picoplankton community structure as assessed by flow cytometry. *Aquat Microb Ecol* 16:251–264
- Gasol J, Pinhassi J, Alonso-Sáez L, Ducklow H, Herndl G, Koblížek M, Labrenz M, Luo Y, Morán X, Reinthaler T, Simon M (2008) Towards a better understanding of microbial carbon flux in the sea. *Aquat Microb Ecol* 53:21–38

- Gatti J (2008) Intrusions du courant nord méditerranéen sur la partie est du plateau continental du golfe du Lion.
- Gatti J, Petrenko A, Devenon J-L, Leredde Y, Ulses C (2006) The Rhone river dilution zone present in the northeastern shelf of the Gulf of Lion in December 2003. *Cont Shelf Res* 26:1794–1805
- Ghiglione J, Larcher M, Lebaron P (2005) Spatial and temporal scales of variation in bacterioplankton community structure in the NW Mediterranean Sea. *Aquat Microb Ecol* 40:229–240
- Ghiglione JF, Mevel G, Pujo-Pay M, Mousseau L, Lebaron P, Goutx M (2007) Diel and seasonal variations in abundance, activity, and community structure of particle-attached and free-living bacteria in NW Mediterranean Sea. *Microb Ecol* 54:217–231
- Ghiglione JF, Palacios C, Marty JC, Labrune C, Conan P, Garcia N, Goutx M (2008) Role of environmental factors for the vertical distribution (0–1000 m) of marine bacterial communities in the NW Mediterranean Sea. *Biogeosciences* 5:1751–1764
- Ghuysen J., Hakenbeck R (1994) *Bacterial Cell Wall*. Elsevier Science
- Giladi H, Goldenberg D, Koby S, Oppenheim AB (1995) Enhanced activity of the bacteriophage A PL promoter at low temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2184–2188
- Goldman JC, Caron D a., Dennett MR (1987) Regulation of gross growth efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C:N ratio. *Limnol Oceanogr* 32:1239–1252
- Goldman JC, Dennett MR (1991) Ammonium regeneration and carbon utilization by marine grown on mixed substrates. *Mar Biol* 378:369–378
- Goldman JC, Dennett MR (2000) Growth of marine bacteria in batch and continuous culture under carbon and nitrogen limitation. *Limnol Oceanogr* 45:789–800
- Grégori G, Colosimo A, Denis M (2001) Phytoplankton group dynamics in the Bay of Marseilles during a 2-year survey based on analytical flow cytometry. *Cytometry* 44:247–256
- Guieu C, Chester R, Nimmo M, Nicolas E, Keyset S, Guerzoni S (1996) Atmospheric input of dissolved and particulate metals to the northwestern Mediterranean. *Deep Res II* 44:655–674
- Hall EK, Singer G a., Kainz MJ, Lennon JT (2010) Evidence for a temperature acclimation mechanism in bacteria: an empirical test of a membrane-mediated trade-off. *Funct Ecol* 24:898–908
- Hopmans EC, Weijers JW., Schefuß E, Herfort L, Sinninghe Damsté JS, Schouten S (2004) A novel proxy for terrestrial organic matter in sediments based on branched and isoprenoid tetraether lipids. *Earth Planet Sci Lett* 224:107–116
- Hoppe H (1983a) Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar Ecol Prog Ser* 11:299–308
- Hoppe H-G (1991) *Microbial Extracellular Enzyme Activity: A New Key Parameter in Aquatic Ecology*. *Microb Enzym Aquat Environ* Springer-verlag, New york:60–63

- Hoppe HG (2003) Phosphatase activity in the sea. *Hydrobiologia* 493:187–200
- Hoppe H, Breithaupt P, Walther K, Koppe R, Bleck S, Sommer U, Jürgens K (2008) Climate warming in winter affects the coupling between phytoplankton and bacteria during the spring bloom: a mesocosm study. *Aquat Microb Ecol* 51:105–115
- Hoppe H, Kim S, Gocke K (1988) Microbial Decomposition in Aquatic Environments: Combined Process of Extracellular Enzyme Activity and Substrate Uptake. *Appl Environ Microbiol* 54:784–790
- Hu ZY, Petrenko a. a., Doglioli a. M, Dekeyser I (2011) Numerical study of eddy generation in the western part of the Gulf of Lion. *J Geophys Res* 116:C12030
- Huang B, Hong H (1999) Alkaline phosphatase activity and utilization of dissolved organic phosphorus by algae in subtropical coastal waters. In: *Marine Pollution Bulletin*.p 205–211
- Huber AL, Kidby DK (1984a) An examination of the factors involved in determining phosphatase activities in estuarine water . 1 : Analytical procedures. *Hydrobiologia* 111:3–11
- Huber AL, Kidby DK (1984b) An examination of the factors involved in determining phosphatase activities in estuarine waters . 2 : Sampling procedures. *Hydrobiologia* 111:13–19
- Huston AL, Krieger-Brockett BB, Deming JW (2000) Remarkably low temperature optima for extracellular enzyme activity from Arctic bacteria and sea ice. *Environ Microbiol* 2:383–388
- Jahnke RA, Craven DB (1995a) Quantifying the role of heterotrophic bacteria in the carbon cycle: A need for respiration rate measurements. *Limnol Oceanogr* 40:436–441
- Jansson M, Olsson H, Pettersson K (1988) Phosphatases; origin, characteristics and function in lakes. *Hydrobiologia* 170:157–175
- Jickells TD, An ZS, Andersen KK, Baker AR, Bergametti G, Brooks N, Cao JJ, Boyd PW, Duce RA, Hunter KA, Kawahata H, Kubilay N, laRoche J, Liss PS, Mahowald N, Prospero JM, Ridgwell AJ, Tegen I, Torres R (2005) Global iron connections between desert dust, ocean biogeochemistry, and climate. *Science* 308:67–71
- Jones TW, Malone TC, Pike S (1990) Seasonal contrasts in diurnal carbon incorporation by phytoplankton size classes of the coastal plume of Chesapeake Bay. *Mar Ecol Prog Ser Ecol* 68:129–136
- Jumars PA, Deming JW, Hill PS, Karp-boss L, Yager PL, Dade WB (1993) Physical Constraints on Marine Osmotrophy in an Optimal Foraging Context. *Mar Microb Food Webs* 7:121–159
- Kamer M, Rassoulzadegan F (1995) Extracellular enzyme activity: Indications for high short-term variability in a coastal marine ecosystem. *Microb Ecol* 30:143–156
- Karner M, Herndl GJ (1992) Extracellular enzymatic activity and secondary production in free-living and marine-snow-associated bacteria. *Mar Biol* 113:341–347
- Kersalé M, Petrenko A, Doglioli AM, Dekeyser I, Nencioli F (2013) Physical characteristics and dynamics of the coastal Latex09 Eddy derived from in situ data and numerical modeling. *J Geophys Res* 118:399–409

- Kim J-H, Schouten S, Buscail R, Ludwig W, Bonnín J, Sinninghe Damsté JS, Bourrin F (2006) Origin and distribution of terrestrial organic matter in the NW Mediterranean (Gulf of Lions): Exploring the newly developed BIT index. *Geochemistry, Geophys Geosystems* 7:1593–1606
- Kiorboe T, Grossart H-P, Ploug H, Tang K (2002) Mechanisms and Rates of Bacterial Colonization of Sinking Aggregates. *Appl Environ Microbiol* 68:3996–4006
- Kirchman DL (1992) Incorporation of thymidine and leucine in the subarctic Pacific: application to estimating bacterial production. *Mar Ecol Prog Ser* 82:301–309
- Kirchman DL (1994) The uptake of inorganic nutrients by heterotrophic bacteria. *Microb Ecol* 28:255–271
- Kirchman DL (2000) *Microbial Ecology of the Oceans*.
- Kirchman DL (2012) *Processes in microbial ecology*.
- Kirchman D, Ducklow H, Mitchell R (1982) Estimates of Bacterial Growth from Changes in Uptake Rates and Biomass. *Appl Environ Microbiol* 44:1296–1307
- Kirchman D, K'nees E, Hodson R (1985) Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Appl Environ Microbiol* 49:599–607
- Kirchman DL, Keil RG, Simon M (1993) Biomass and production of heterotrophic bacterioplankton in the oceanic subarctic Pacific. *Deep Sea Res Part I Oceanogr Res Pap* 40:967–988
- Kirchman DL, Malmstrom RR, Cottrell MT (2005) Control of bacterial growth by temperature and organic matter in the Western Arctic. *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr* 52:3386–3395
- Kirchman DL, Rich JH (1997) Regulation of Bacterial Growth Rates by Dissolved Organic Carbon and Temperature in the Equatorial Pacific Ocean. *Microb Ecol* 33:11–20
- Kirchman DL, Rich JH, Barber RT (1995) Biomass and biomass production of heterotrophic bacteria along 140°W in the equatorial Pacific: Effect of temperature on the microbial loop. *Deep Res II* 42:603–619
- Koch O, Tschérko D, Kandeler E (2007) Temperature sensitivity of microbial respiration, nitrogen mineralization, and potential soil enzyme activities in organic alpine soils. *Global Biogeochem Cycles* 21:1–11
- Kovárová-kovar K, Egli T (1998) Growth Kinetics of Suspended Microbial Cells : From Single-Substrate-Controlled Growth to Mixed-Substrate Kinetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:646–666
- Kragh T, Søndergaard M, Tranvik L (2008) Effect of exposure to sunlight and phosphorus-limitation on bacterial degradation of coloured dissolved organic matter (CDOM) in freshwater. *FEMS Microbiol Ecol* 64:230–239
- Krishnamurthy A, Moore JK, Mahowald N, Luo C, Zender CS (2010) Impacts of atmospheric nutrient inputs on marine biogeochemistry. *J Geophys Res* 115:G01006
- Kritzberg E, Arrieta J, Duarte C (2010a) Temperature and phosphorus regulating carbon flux through bacteria in a coastal marine system. *Aquat Microb Ecol* 58:141–151

- Kritzberg ES, Duarte CM, Wassmann P (2010b) Changes in Arctic marine bacterial carbon metabolism in response to increasing temperature. *Polar Biol* 33:1673–1682
- Kroer N (1993) Bacterial growth efficiency on natural dissolved organic matter. *Limnol Oceanogr* 38:1282–1290
- Krom MD, Kress N, Brenner S, Gordon LI (1991) Phosphorus limitation of primary productivity in the eastern Mediterranean Sea. *Limnol Oceanogr* 36:424–432
- Laghdass M, Catala P, Caparros J, Oriol L, Lebaron P, Obernosterer I (2012) High Contribution of SAR11 to Microbial Activity in the North West Mediterranean Sea. *Microb Ecol* 63:324–333
- Laghdass M, West NJ, Bataillier N, Caparros J, Catala P, Lantoine F, Oriol L, Lebaron P, Obernosterer I (2010) Impact of lower salinity waters on bacterial heterotrophic production and community structure in the offshore NW Mediterranean Sea. *Environ Microbiol Rep* 2:761–769
- Lami R, Ghiglione J-F, Desdevises Y, West NJ, Lebaron P (2009) Annual patterns of presence and activity of marine bacteria monitored by 16S rDNA – 16S rRNA fingerprints in the coastal NW Mediterranean Sea. *Aquat Microb Ecol* 54:199–210
- Lebaron P, Servais P, Troussellier M, Courties C, Vives-Rego J, Muyzer G, Bernard L, Guindulain T, Schäfer H, Stackebrandt E (1999) Changes in bacterial community structure in seawater mesocosms differing in their nutrient status. *Aquat Microb Ecol* 19:255–267
- Lee DH, Zo YG, Kim SJ (1996) Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl Environ Microbiol* 62:3112–3120
- Lekunberri I, Lefort T, Romero E, Vazquez-Dominguez E, Romera-Castillo C, Marrase C, Peters F, Weinbauer M, Gasol JM (2010) Effects of a dust deposition event on coastal marine microbial abundance and activity, bacterial community structure and ecosystem function. *J Plankton Res* 32:381–396
- Lemée R, Rochelle-Newall E, Van Wambeke F, Pizay M-D, Rinaldi P, Gattuso J-P (2002a) Seasonal variation of bacterial production, respiration and growth efficiency in the open NW Mediterranean Sea. *Aquat Microb Ecol* 29:227–237
- Li WKW, Dickie PM (1987) Temperature Characteristics of Photosynthetic and Heterotrophic Activities : Seasonal Variations in Temperate Microbial Plankton. *Appl Environ Microbiol* 53:2282–2295
- Loisel P, Harmand J, Zemb O, Latrille E, Lobry C, Delgenès JP, Godon JJ (2006) Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environ Microbiol* 8:720–731
- Long RA, Azam F (1996) Abundant protein-containing particles in the sea. *Aquat Microb Ecol* 10:213–221
- López-Urrutia A, Morán XAG (2007) Resource limitation of bacterial production distorts the temperature dependence of oceanic carbon cycling. *Ecology* 88:817–822

- López-Urrutia A, San Martin E, Harris RP, Irigoien X (2006) Scaling the metabolic balance of the oceans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8739 – 8744
- Lukianova O a, David SS (2005) A role for iron-sulfur clusters in DNA repair. *Curr Opin Chem Biol* 9:145–151
- Lymer D, Logue JB, Brussaard CPD, Baudoux AC, Vrede K, Lindstrom ES (2008) Temporal variation in freshwater viral and bacterial community composition. *Freshw Biol* 53:1163–1175
- Mackenzie BR, Schiedek D, Biology GC, Ecology M, Oceanography B, Seestrass K (2007) Daily ocean monitoring since the 1860s shows record warming of northern European seas. *Glob Chang Biol* 13:1335–1347
- Mari X (1999) Carbon content and C : N ratio of transparent exopolymeric particles (TEP) produced by bubbling exudates of diatoms. *Mar Ecol Prog Ser* 183:59–71
- Mari X, Rassoulzadegan F, Brussaard CPD (2004) Role of TEP in the microbial food web structure . II . Influence on the ciliate community structure. *Mar Ecol Prog Ser* 279:23–32
- Marie D, Partensky F, Jacquet S, Vaultot D (1997) Enumeration and Cell Cycle Analysis of Natural Populations of Marine Picoplankton by Flow Cytometry Using the Nucleic Acid Stain SYBR Green I. *Appl Environ Microbiol* 63:186–193
- Markaki Z, Loje-Pilot MD, Violaki K, Benyahya L, Mihalopoulos N (2010) Variability of atmospheric deposition of dissolved nitrogen and phosphorus in the Mediterranean and possible link to the anomalous seawater N/P ratio. *Mar Chem* 120:187–194
- Martinez J, Azam F (1993) Periplasmic aminopeptidase and alkaline phosphatase activities in a marine bacterium : implications for substrate processing in the sea. *Mar Ecol Prog Ser* 92:89–97
- Massana R, Pedros-Alio C, Casamayor EO, Gasol JM (2001) Changes in marine bacterioplankton phylogenetic composition during incubations designed to measure biogeochemically significant parameters. *Limnol Oceanogr* 46:1181–1188
- Mayer L (1989) Extracellular proteolytic enzyme activity in sediments of an intertidal mudflat. *Limnol Oceanogr* 34:973–981
- McHugh JP, Rodríguez-Quinoñes F, Abdul-Tehrani H, Svistunenko D a, Poole RK, Cooper CE, Andrews SC (2003) Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem* 278:29478–29486
- Mcmanus GB, Peterson WT (1988) Bacterioplankton production in the nearshore zone during upwelling off central Chile. *Mar Ecol Prog Ser* 43:11–17
- Meehl GA, Solomon S, Qin MMD, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, M. Tignor, Miller HL (2007) The physical science basis. In: *Climate change 2007 IPCC report*, Cambridge, UK: Cambridge University Press.p 748–845

- Mercado JM, Ramírez T, Cortés D, Sebastián M, Reul A, Bautista B (2006) Diurnal changes in the bio-optical properties of the phytoplankton in the Alborán Sea (Mediterranean Sea). *Estuar Coast Shelf Sci* 69:459–470
- Meybeck M (1982) Carbon, nitrogen, and phosphorus transport by world rivers. *Am J Sci* 282:401–450
- Mezzour H, I. M, Hellara I, Neffati F, Douki W, Najjar MF (2007) Dosage du pyruvate plasmatique évaluation d'une technique enzymatique alternative. *Feuill Biol* 48:49–53
- Middelboe M, Jorgensen N, Kroer N (1996) Effects of viruses on nutrient turnover and growth efficiency of noninfected marine bacterioplankton. *Appl Environ Microbiol* 62:1991–1997
- Middelboe M, Søndergaard M (1993) Bacterioplankton Growth Yield: Seasonal Variations and Coupling to Substrate Lability and beta-Glucosidase Activity. *Appl Environ Microbiol* 59:3916–3921
- Millot C (1990) The Gulf of Lions' hydrodynamics. *Cont Shelf Res* 10:885–894
- Millot C, Wald L (1980) The effects of Mistral wind on the Ligurian current near Provence. *Oceanol Acta* 3:399–402
- Minas H (1968) A propos d'une remontée d'eaux “profondes” dans les parages du golfe de Marseille (oct. 1964), conséquences biologiques. *Cah Océanographiques* 20:647–674
- Mitchell JG, Pearson L, Dillon S, Kantalis K, Mitchell JG, Pearson L, Dillon S (1995) Natural assemblages of marine bacteria exhibiting high-speed motility and large accelerations. *Appl Environ Microbiol* 61:4436–4440
- Montserrat Sala M, Peters F, Gasol JM, Pedrós-alió C, Marrasé C, Vaqué D (2002) Seasonal and spatial variations in the nutrient limitation of bacterioplankton growth in the northwestern Mediterranean. *Aquat Microb Ecol* 27:47–56
- Morán X, Calvo-Díaz a, Ducklow H (2010) Total and phytoplankton mediated bottom-up control of bacterioplankton change with temperature in NE Atlantic shelf waters. *Aquat Microb Ecol* 58:229–239
- Morita RY (1997) *Bacteria in Oligotrophic Environments*. Chapman & Hall, New York.
- Myklestad SM (1995) Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Sci Total Environ* 165:155–164
- Nagata T (2000) Production mechanism of dissolved organic matter. In: Kirchman DL (ed) *Microbial ecology of the oceans*. Wiley-Liss.p 121–152
- Nagata T, Kirchman DL (1999) Bacterial Mortality : A Pathway for the Formation of Refractory DOM? In: *Microbial Biosystems: New Frontiers - Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology* (eds. by Bell, C. R., Brylinsky, M, and Johnson-Green, P.). Atlantic Canada Society for Microbial Ecology.p 153–158
- Negro P Del, Celussi M, Crevatin E, Paoli A, Aubry FB, Pugnetti A (2008) Spatial and temporal prokaryotic variability in the northern Adriatic Sea. *Mar Ecol* 29:375–386

- Nikaido H, Vaara M (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 49:1–32
- Noble RT, Fuhrman JA (1997) Virus Decay and Its Causes in Coastal Waters. *Appl Environ Microbiol* 63:77–83
- Obernosterer I, Herndl G (1995) Phytoplankton extracellular release and bacterial growth: dependence on the inorganic N: P ratio. *Mar Ecol Prog Ser* 116:247–257
- Obernosterer I, Kawasaki N, Benner R (2003) P limitation of respiration in the Sargasso Sea and uncoupling of bacteria from P regeneration in size-fractionation experiments. *Aquat Microb Ecol* 32:229–237
- Obernosterer I, Lami R, Larcher M, Batailler N, Catala P, Lebaron P (2010) Linkage between bacterial carbon processing and the structure of the active bacterial community at a coastal site in the NW Mediterranean Sea. *Microb Ecol* 59:428–435
- Okin GS, Baker AR, Tegen I, Mahowald NM, Dentener FJ, Duce R a., Galloway JN, Hunter K, Kanakidou M, Kubilay N, Prospero JM, Sarin M, Surapipith V, Uematsu M, Zhu T (2011) Impacts of atmospheric nutrient deposition on marine productivity: Roles of nitrogen, phosphorus, and iron. *Global Biogeochem Cycles* 25:1–10
- Omta AW, Bruggeman J, Kooijman S a. LM, Dijkstra H a. (2006) Biological carbon pump revisited: Feedback mechanisms between climate and the Redfield ratio. *Geophys Res Lett* 33:1–4
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874–879
- Orr JC, Fabry VJ, Aumont O, Bopp L, Doney SC, Feely RA, Gnanadesikan A, Gruber N, Ishida A, Joos F, Key RM, Lindsay K, Maier-Reimer E, Matear R, Monfray P, Mouchet A, Najjar RG, Plattner G-K, Rodgers KB, Sabine CL, Sarmiento JL, Schlitzer R, Slater RD, Totterdell IJ, Weirig M-F, Yamanaka Y, Yool A (2005) Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437:681–686
- Ortega-Retuerta E, Joux F, Jeffrey WH, Ghiglione JF (2013) Spatial variability of particle-attached and free-living bacterial diversity in surface waters from the Mackenzie River to the Beaufort Sea (Canadian Arctic). *Biogeosciences* 10:2747–2759
- Paasche E, Erga SR (1988) Phosphorus and nitrogen limitation of phytoplankton in the inner Oslofjord (Norway). *Sarsia* 73:229–243
- Pairaud IL, Gatti J, Bensoussan N, Verney R, Garreau P (2011) Hydrology and circulation in a coastal area off Marseille: Validation of a nested 3D model with observations. *J Mar Syst* 88:20–33
- Para J, Coble PG, Charrière B, Tedetti M, Fontana C, Sempéré R (2010) Fluorescence and absorption properties of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in coastal surface waters of the northwestern Mediterranean Sea, influence of the Rhône River. *Biogeosciences* 7:4083–4103
- Petchey OL, McPhearson PT, Casey TM, Morin PJ (1999) Environmental warming alters food-web structure and ecosystem function. *Nature* 402:69–72

- Pinhassi J, Gómez-Consarnau L, Alonso-Sáez L, Sala M, Vidal M, Pedrós-Alió C, Gasol J (2006) Seasonal changes in bacterioplankton nutrient limitation and their effects on bacterial community composition in the NW Mediterranean Sea. *Aquat Microb Ecol* 44:241–252
- Pomeroy LR (1974) The Ocean's Food Web, A Changing Paradigm. *Bioscience* 24:499–504
- Pomeroy LR, Sheldon JE, Jr WMS, Peters F (1995) Limits to growth and respiration of bacterioplankton in the Gulf of Mexico. *Mar Ecol Prog Ser* 117:259–268
- Pomeroy LR, Sheldon JE, Sheldon WM (1994) Changes in Bacterial Numbers and Leucine Assimilation during Estimations of Microbial Respiratory Rates in Seawater by the Precision Winkler Method. *Appl Environ Microbiol* 60:328–332
- Pomeroy L, Wiebe W (2001) Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria. *Aquat Microb Ecol* 23:187–204
- Pomeroy LT, Wiebe WJ, Deibel D, Thompson RJ, Rowe GT, Pakulski JD (1991) Bacterial responses to temperature and substrate concentration during the Newfoundland spring bloom. *Mar Ecol Prog Ser* 75:143–159
- Price NM, Andersen LF, Morel FM (1991) Iron and nitrogen nutrition of equatorial Pacific plankton. *Deep Res* 38:1361–1378
- Pulido-Villena E, Baudoux a.-C, Obernosterer I, Landa M, Caparros J, Catala P, Georges C, Harmand J, Guieu C (2014) Microbial food web dynamics in response to a Saharan dust event: results from a mesocosm study in the oligotrophic Mediterranean Sea. *Biogeosciences Discuss* 11:337–371
- Pulido-Villena E, Wagener T, Guieu C (2008) Bacterial response to dust pulses in the western Mediterranean: Implications for carbon cycling in the oligotrophic ocean. *Global Biogeochem Cycles* 22:1–12
- Raimbault P, Diaz F, Pouvesle W, Boudjellal B (1999) Simultaneous determination of particulate organic carbon, nitrogen and phosphorus collected on filters, using a semi- automatic wet-oxidation method. *Mar Ecol Prog Ser* 180:289–295
- Raimbault P, Lantoiné F, Neveux J (2004) Dosage rapide de la chlorophylle a et des phéopigments a par fluorimétrie après extraction au méthanol. Comparaison avec la méthode classique d'extraction à l'acétone. *Océanis* 30:189–205
- Raimbault P, Slawyk G (1991) A semiautomatic , wet-oxidation method for the determination particulate organic nitrogen collected on filters. *Limnol Oceanogr* 36:405–408
- Raimbault P, Slawyk G, Coste B, Fry J (1990) Feasibility of using an automated procedure for the determination of seawater nitrate in the 0-100 nM range: examples from field and cultures. *Mar Biol* 104:347–351
- Ratkowsky DA, Olley J, Mcmeekin TA, Ball A (1982) Relationship Between Temperature and Growth Rate of Bacterial Cultures. *J Bacteriol* 149:1–5

- Reffray G, Fraunie P, Marsaleix P (2004) Secondary flows induced by wind forcing in the Rhone region of freshwater influence. *Ocean Dyn* 54:179–196
- Reichardt W (1987) Differential temperature effects on the efficiency of carbon pathways in Antarctic marine benthos. *Mar Ecol Prog Ser* 40:127–135
- Reichardt W, Overbeck J, Steubing L (1967) Free Dissolved Enzymes in Lake Waters. *Nature* 216:1345–1347
- Reinthal T, Herndl GJ (2005) Seasonal dynamics of bacterial growth efficiencies in relation to phytoplankton in the southern North Sea. *Aquat Microb Ecol* 39:7–16
- Riebesell U, Schulz KG, Bellerby RGJ, Botros M, Fritsche P, Meyerhofer M, Neill C, Nondal G, Oschlies A, Wohlers J, Zollner E (2007) Enhanced biological carbon consumption in a high CO₂ ocean. *Nature* 450:545–548
- Rivkin RB, Legendre L (2001) Biogenic carbon cycling in the upper ocean: effects of microbial respiration. *Science* 291:2398–2400
- Rivkin RB, Swift E (1980) Characterization of alkaline phosphatase and organic phosphorous utilization in the oceanic dinoflagellate *Pyrocystis noctiluca*. *Mar Biol* 61:1–8
- Rodríguez-Blanco A, Ghiglione J-F, Catala P, Casamayor EO, Lebaron P (2009) Spatial comparison of total vs. active bacterial populations by coupling genetic fingerprinting and clone library analyses in the NW Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol Ecol* 67:30–42
- Rosso A, Azam F (1987) Proteolytic activity in coastal oceanic waters: depth distribution and relationship to bacterial populations. *Mar Ecol Prog Ser* 41:231–240
- Rueler JG, Ades DR (1987) The role of iron nutrition in photosynthesis and nitrogen assimilation in *SCENEDESMUS QUADRICAUDA* (Chlorophyceae) 1. *J Phycol* 23:452–457
- Russell JB, Cook GM (1995) Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol Rev* 59:48–62
- Sala MM, Karner M, Arin L (2001) Measurement of ectoenzyme activities as an indication of inorganic nutrient imbalance in microbial communities. *Aquat Microb Ecol* 23:301–311
- Sand-Jensen K, Pedersen NL, Sendergaard M (2007) Bacterial metabolism in small temperate streams under contemporary and future climates. *Freshw Biol* 52:2340–2353
- Sarmiento H, Montoya JM, Vázquez-Domínguez E, Vaqué D, Gasol JM (2010) Warming effects on marine microbial food web processes: how far can we go when it comes to predictions? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365:2137–2149
- Schäfer H, Bernard L, Courties C, Lebaron P, Servais P, Pukall R, Stackebrandt E, Troussellier M, Guindulain T, Vives-Rego J, Muyzer G (2000) Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: Changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiol Ecol* 34:243–253

- Sciandra A, Harlay J, Lefèvre D, Lemée R, Rimmelin P, Denis M, Gattuso J (2003) Response of coccolithophorid *Emiliana huxleyi* to elevated partial pressure of CO₂ under nitrogen limitation. *Mar Ecol Prog Ser* 261:111–122
- Sebastian M, Ammerman JW (2009) The alkaline phosphatase PhoX is more widely distributed in marine bacteria than the classical PhoA. *ISME J* 3:563–572
- Seiburth J, Smetacek V, Lenz J (1978) Pelagic ecosystem structure : Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol Oceanogr* 23:1256–1263
- Sempéré R, Charrière B, Wambeke F Van, Cauwet G (2000) Carbon inputs of the Rhône River to the Mediterranean Sea : Biogeochemical implications. *Global Biogeochem Cycles* 14:669–681
- Sherr EB, Sherr BF (1994) Bacterivory and herbivory: Key roles of phagotrophic protists in pelagic food webs. *Microb Ecol* 28:223–235
- Sherr EB, Sherr BF (1996) Temporal offset in oceanic production and respiration processes implied by seasonal changes in atmospheric oxygen: the role of heterotrophic microbes. *Aquat Microb Ecol* 11:91–100
- Shiah F, Ducklow HW (1995) Multiscale variability in bacterioplankton abundance , production , and specific growth rate in a temperate salt-marsh tidal creek. *Limnol Oceanogr* 40:55–66
- Simó R, Vila-Costa M, Alonso-Sáez L, Cardelús C, Guadayol Ò, Vázquez-Domínguez E, Gasol J (2009) Annual DMSP contribution to S and C fluxes through phytoplankton and bacterioplankton in a NW Mediterranean coastal site. *Aquat Microb Ecol* 57:43–55
- Simon M, Alldredge AL, Azam F (1990) Bacterial carbon dynamics on marine snow. *Mar Ecol Prog Ser* 65:205–211
- Simon M, Azam F (1989) Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* 51:201–213
- Siu N, Apple JK, Moyer CL (2014) The Effects of Ocean Acidity and Elevated Temperature on Bacterioplankton Community Structure and Metabolism. *Open J Ecol* 04:434–455
- Smith S V. (1984) Phosphorus versus nitrogen limitation in the marine environment. *Limnol Oceanogr* 29:1149–1160
- Smith DC, Azam F (1992) A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using 3H-leucine. *Mar Microb Food Webs* 6:107–114
- Smith S V., Hollibaugh JT (1993) Coastal metabolism and the oceanic organic carbon balance. *Rev Geophys* 31:75
- Smith DC, Simon M, Alldredge AL, Azam F (1992) Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature* 359:139–142
- Sohrin R, Sempéré R (2005) Seasonal variation in total organic carbon in the northeast Atlantic in 2000–2001. *J Geophys Res Oceans* 110:Citation No. C10S90

- Sokal RR, Rohlf FJ (1995) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research* (WH Freeman, Ed.). W. H. Freeman and Company
- Stemmann L, Prieur L, Legendre L, Taupier-Letage I, Picheral M, Guidi L, Gorsky G (2008) Effects of frontal processes on marine aggregate dynamics and fluxes: An interannual study in a permanent geostrophic front (NW Mediterranean). *J Mar Syst* 70:1–20
- Stocker R, Seymour JR, Samadani A, Hunt DE, Polz MF (2008) Rapid chemotactic response enables marine bacteria to exploit ephemeral microscale nutrient patches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4209–4214
- Suttle CA (1994) The Significance of Viruses to Mortality in Aquatic Microbial Communities. *Microb Ecol* 28:237–243
- Suttle CA, Chen F (1992) Mechanisms and Rates of Decay of Marine Viruses in Seawater. *Appl Environ Microbiol* 58:3721–3729
- Teira E, Martínez-García S, Fernández E, Calvo-Díaz A, Morán X (2010) Lagrangian study of microbial plankton respiration in the subtropical North Atlantic Ocean: bacterial contribution and short-term temporal variability. *Aquat Microb Ecol* 61:31–43
- Thingstad TF, Rassoulzadegan F (1995) Nutrient limitations, microbial food webs, and biological C-pumps: suggested interactions in a P-limited Mediterranean. *Mar Ecol Prog Ser* 117:299–306
- Thingstad TF, Zweifel UL, Rassoulzadegan F (1998) P limitation of heterotrophic bacteria and phytoplankton in the northwest Mediterranean. *Limnol Oceanogr* 43:88–94
- Thompson AW, Huang K, Saito MA, Chisholm SW (2011) Transcriptome response of high- and low-light-adapted *Prochlorococcus* strains to changing iron availability. *ISME J* 5:1–15
- Thyssen M, Mathieu D, Garcia N, Denis M (2008) Short-term variation of phytoplankton assemblages in Mediterranean coastal waters recorded with an automated submerged flow cytometer. *J Plankton Res* 30:1027–1040
- Timmermann A, Oberhuber J, Bacher A, Esch M, Latif M, Roeckner E (1999) Increased El Nino frequency in a climate model forced by future greenhouse warming. *Lett to Nat* 398:1996–1999
- Tison DL, Pope DH (1980) Effect of Temperature on Mineralization by Heterotrophic Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 39:584–587
- Toolan T (1996) *Microbial respiration and production rates in Massachusetts Bay*. Harvard University
- Torréton JP, Bouvy M (1991) Estimating bacterial DNA synthesis from [³H] thymidine incorporation: Discrepancies among macromolecular extraction procedures. *Limnol Oceanogr* 36:299–306
- Torréton J-P, Talbot V, Garcia N (2000) Nutrient stimulation of bacterioplankton growth in Tuamotu atoll lagoons. *Aquat Microb Ecol* 21:125–137
- Tréguer P, Corre P Le (1975) *Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer (utilisation de l'autoAnalyseur II Technicon)*. Laboratoire d'Océanographie chimique, Université de Bretagne occidentale.

- Twining BS, Baines SB, Vogt S, Jonge MD de (2008) Exploring ocean biogeochemistry by single-cell microprobe analysis of protist elemental composition. *J Eukaryot Microbiol* 55:151–162
- Tyrrell T (1999) The relative influences of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. *Nature* 400:525–531
- Unanue M, Azua I, Labirua-Iturburu A, Egea L, Iriberry J (1998) Bacterial colonization and ectoenzymatic activity in phytoplankton-derived model particles: cleavage of peptides and uptake of amino acids. *Microb Ecol* 35:136–146
- Vallino JJ, Hopkinson CS, Hobbie JE (1996) Modeling bacterial utilization of dissolved organic matter: Optimization replaces Monod growth kinetics. *Limnol Oceanogr* 41:1591–1609
- Van Wambeke F, Bonnet S, Moutin T, Raimbault P, Alarc G (2008) Factors limiting heterotrophic bacterial production in the southern Pacific Ocean. *Biogeosciences* 5:833–845
- Van Wambeke F, Christaki U, Giannakourou A, Moutin T, Souvemerzoglou K (2002) Longitudinal and vertical trends of bacterial limitation by phosphorus and carbon in the Mediterranean Sea. *Microb Ecol* 43:119–133
- Van Wambeke F, Ghiglione J-F, Nedoma J, Mével G, Raimbault P (2009) Bottom up effects on bacterioplankton growth and composition during summer-autumn transition in the open NW Mediterranean Sea. *Biogeosciences* 6:705–720
- Van Wambeke F, Nedoma J, Duhamel S, Lebaron P (2008) Alkaline phosphatase activity of marine bacteria studied with ELF 97 substrate: success and limits in the P-limited Mediterranean Sea. *Aquat Microb Ecol* 52:245–251
- Vargas-Yáñez M (2005) Trends and time variability in the northern continental shelf of the western Mediterranean. *J Geophys Res* 110
- Vázquez SC, Hernández E, Cormack WP Mac (2008) Extracellular proteases from the Antarctic marine pseudoalteromonas sp. P96-47 strain. *Rev Argent Microbiol* 40:63–71
- Vázquez-Domínguez E, Vaqué D, Gasol JM (2007) Ocean warming enhances respiration and carbon demand of coastal microbial plankton. *Glob Chang Biol* 13:1327–1334
- Vázquez-Domínguez E, Vaqué D, Gasol J (2012) Temperature effects on the heterotrophic bacteria, heterotrophic nanoflagellates, and microbial top predators of the NW Mediterranean. *Aquat Microb Ecol* 67:107–121
- Verdugo P, Alldredge AL, Azam F, Kirchman DL, Passow U, Santschi PH (2004) The oceanic gel phase: a bridge in the DOM–POM continuum. *Mar Chem* 92:67–85
- Vetter YA, Deming JW, Jumars PA, Krieger-Brockett BB (1998) A Predictive Model of Bacterial Foraging by Means of Freely Release Extracellular Enzymes. *Microb Ecol* 36:75–92
- Vetter Y A, Deming J (1994) Extracellular enzyme activity in the Arctic Northeast Water polynya. *Mar Ecol Prog Ser* 114:23–34

- Vidussi F, Mostajir B, Fouilland E, Floc'h E Le, Nougier J, Roques C, Got P, Thibault-Botha D, Bouvier T, Troussellier M (2011) Effects of experimental warming and increased ultraviolet B radiation on the Mediterranean plankton food web. *Limnol Oceanogr* 56:206–218
- Wang S, Hou W, Dong H, Jiang H, Huang L, Wu G, Zhang C, Song Z, Zhang Y, Ren H, Zhang J, Zhang L (2013) Control of temperature on microbial community structure in hot springs of the Tibetan Plateau. *PLoS One* 8:e62901
- Warkentin M, Freese HM, Karsten U, Schumann R (2007) New and fast method to quantify respiration rates of bacterial and plankton communities in freshwater ecosystems by using optical oxygen sensor spots. *Appl Environ Microbiol* 73:6722–6729
- Wheeler PA, Kirchman DL (1986) Utilization of inorganic and organic nitrogen by bacteria in marine systems. *Limnol Oceanogr* 31:998–1009
- White P a, Kalff J, Rasmussen JB, Gasol JM (1991) The effect of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and marine habitats. *Microb Ecol* 21:99–118
- Wiebe WJ, Sheldon WM, JR, Pomeroy LR (1992) Bacterial Growth in the Cold: Evidence for an Enhanced Substrate Requirement. *Appl Environ Microbiol* 58:359 – 364
- Williams PJJ, Jenkinson NW (1982) A transportable microprocessor-controlled precise Winkler titration suitable for field station and shipboard use. *Limnol Oceanogr* 27:576–584
- Wiltshire KH, Manly BFJ (2004) The warming trend at Helgoland Roads, North Sea: phytoplankton response. *Helgol Mar Res* 58:269–273
- Wohlers J, Engel A, Zöllner E, Breithaupt P, Jürgens K, Hoppe H-G, Sommer U, Riebesell U (2009) Changes in biogenic carbon flow in response to sea surface warming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:7067–7072
- Wojewodzic MW, Kyle M, Elser JJ, Hessen DO, Andersen T (2010) Joint effect of phosphorus limitation and temperature on alkaline phosphatase activity and somatic growth in *Daphnia magna*. *Oecologia* 165:837–846
- Woods HA, Makino W, Cotner JB, Hobbie SE, Harrison JF, Acharyas K, Elser JJ (2003) Temperature and the chemical composition of poikilothermic organisms. *Funct Ecol* 17:237–245
- Zemb O, Haegeman B, Delgenes JP, Lebaron P, Godon JJ (2007) SAFUM: Statistical analysis of SSCP fingerprints using PCA projections, dendrograms and diversity estimators. *Mol Ecol Notes* 7:767–770
- Zohary T, Robarts RD (1998) Experimental study of microbial P limitation in the eastern Mediterranean. *Limnol Oceanogr* 43:387–395
- Zubkov M V, Fuchs BM, Eilers H, Peter H, Amann R, Burkill PH (1999) Determination of Total Protein Content of Bacterial Cells by SYPRO Staining and Flow Cytometry. *Appl Environ Microbiol* 65:3251–3257
- Zweifel UL, Norrman B, Hagstrom A (1993) Consumption of dissolved organic carbon by marine bacteria and demand for inorganic nutrients. *Mar Ecol Prog Ser* 101:23–32

Annexe 1

Cinétiques températures réalisées lors du suivi annuel à SOLEMIO (Janvier 2012 à Février 2013)

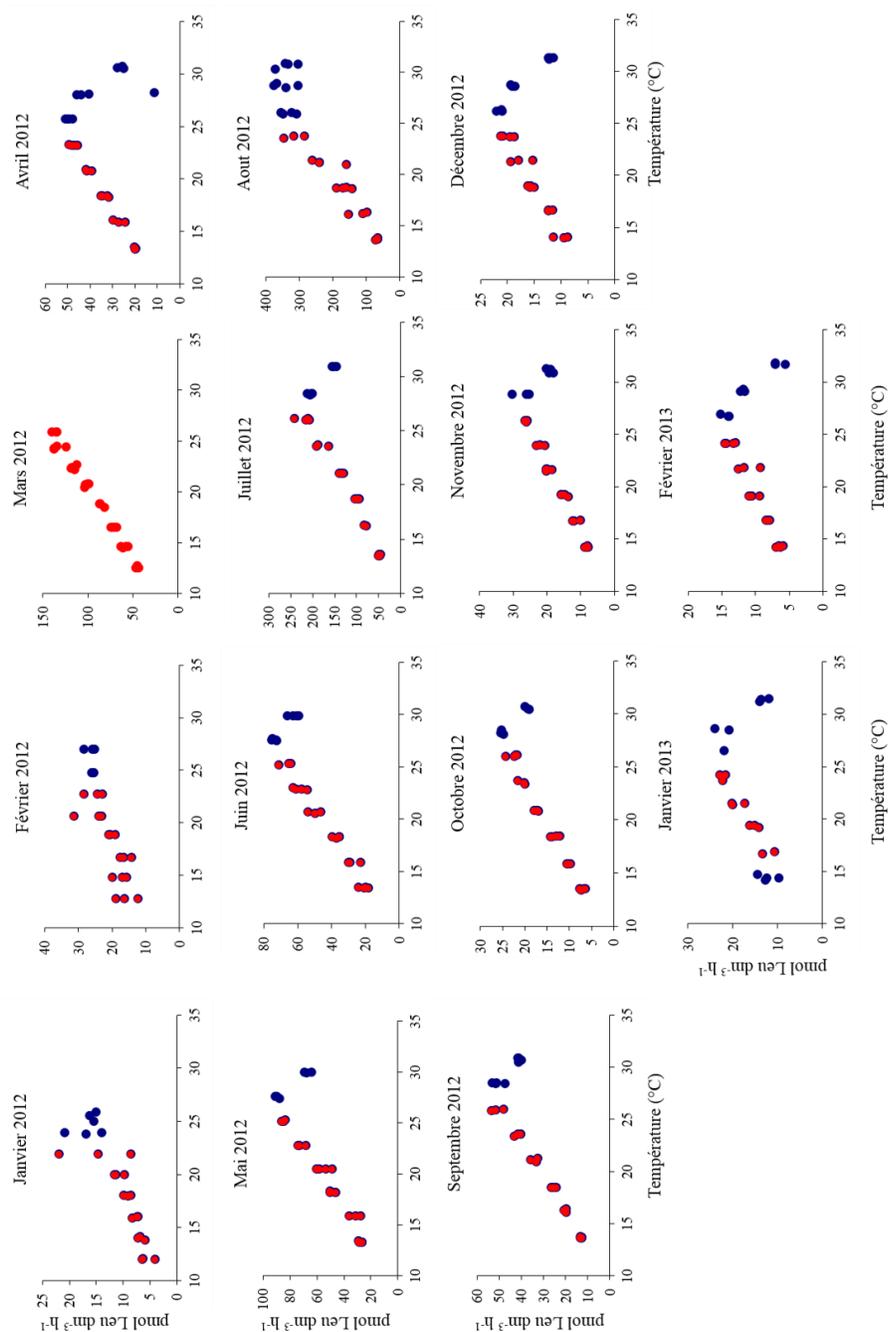


Figure A1. 1. Production Bactérienne. Points bleus : Duplicats de valeurs mesurées dans la gamme de température expérimentale (12°C - 32°C). Points rouges : valeurs appartenant au domaine de validité de la loi d'Arrhenius à partir desquelles les Q_{10} sont calculés

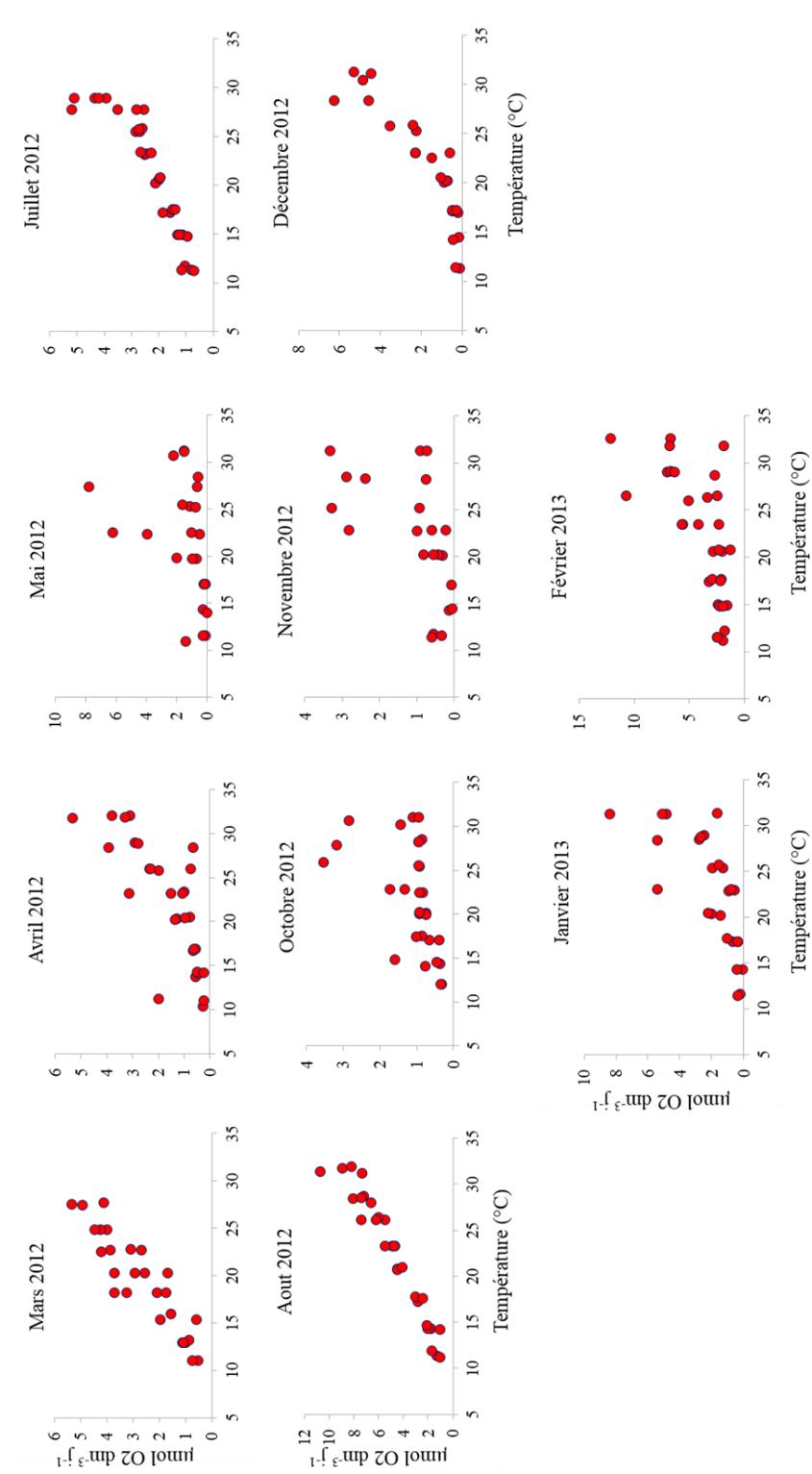


Figure A1. 2. Respiration Communautaire. Points rouges : 4 réplicats de valeurs mesurées dans la gamme de température expérimentale (12°C-32°C) et appartenant au domaine de validité de la loi d'Arrhenius à partir desquelles les Q_{10} sont calculés

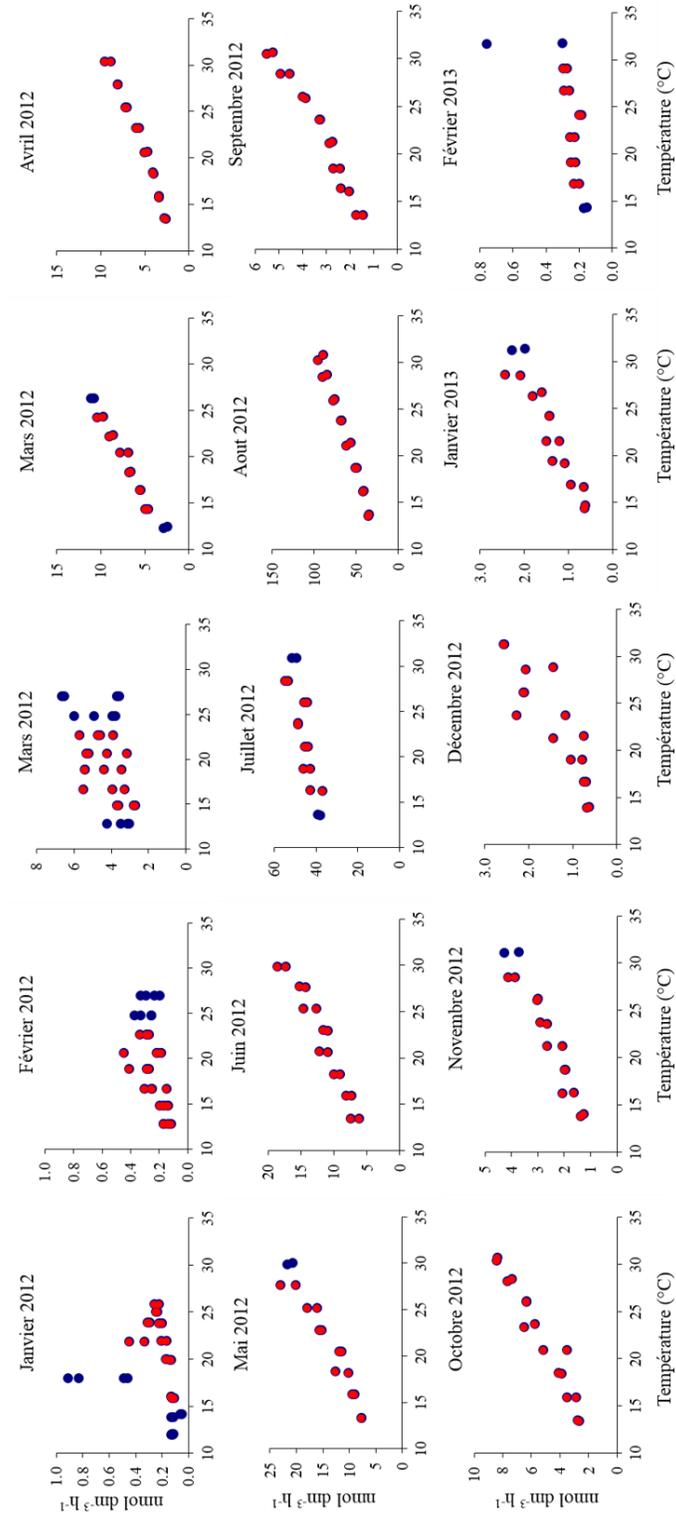


Figure A3. 3. Phosphatase Alcaline. Points bleus : Duplicats de valeurs mesurées dans la gamme de température expérimentale (12°C-32°C). Points rouges : valeurs appartenant au domaine de validité de la loi d'Arrhenius à partir desquelles les Q_{10} sont calculés

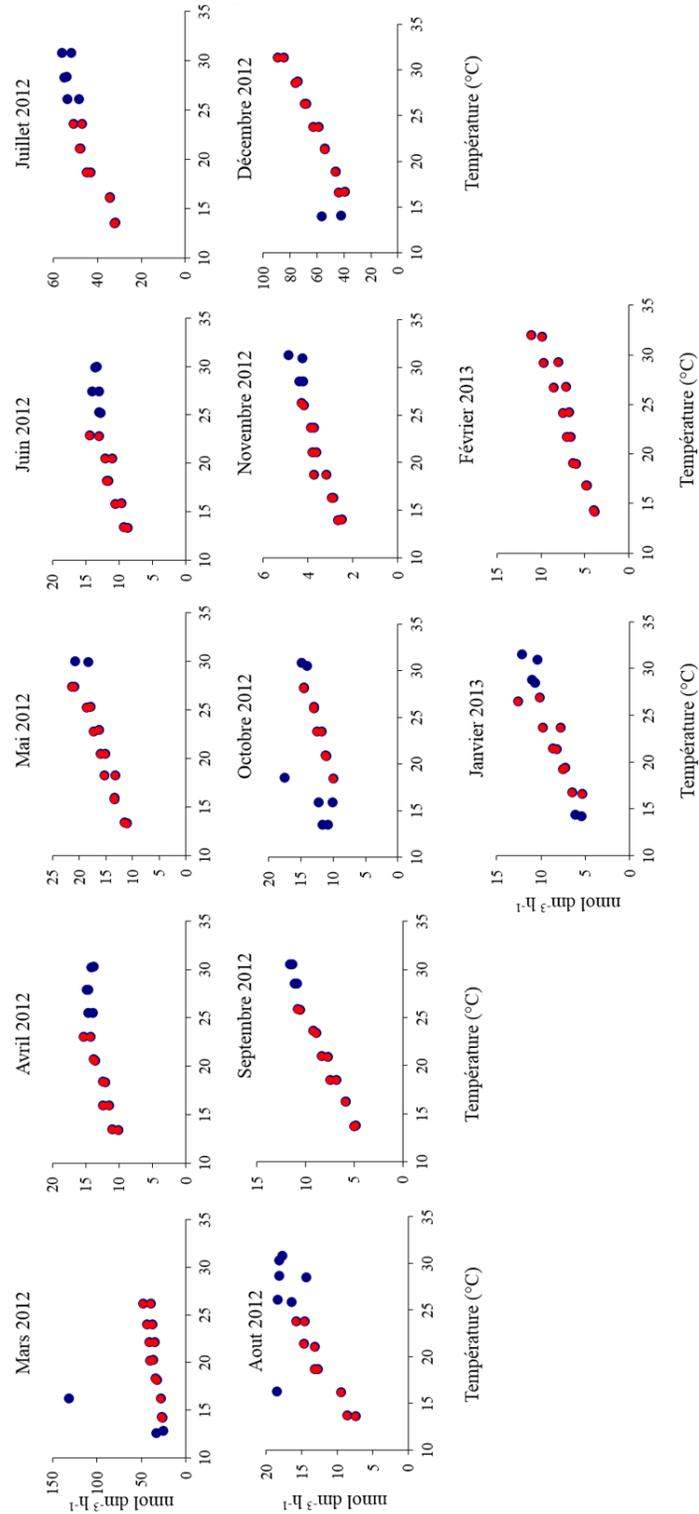


Figure A1. 4. Protéase. Points bleus : Duplicats de valeurs mesurées dans la gamme de température expérimentale (12 $^{\circ}\text{C}$ -32 $^{\circ}\text{C}$). Points rouges : valeurs appartenant au domaine de validité de la loi d'Arrhenius à partir desquelles les Q_{10} sont calculés

Annexe 2

Expériences d'enrichissements lors du suivi annuel au site SOLEMIO (Janvier 2012 à Février 2013)

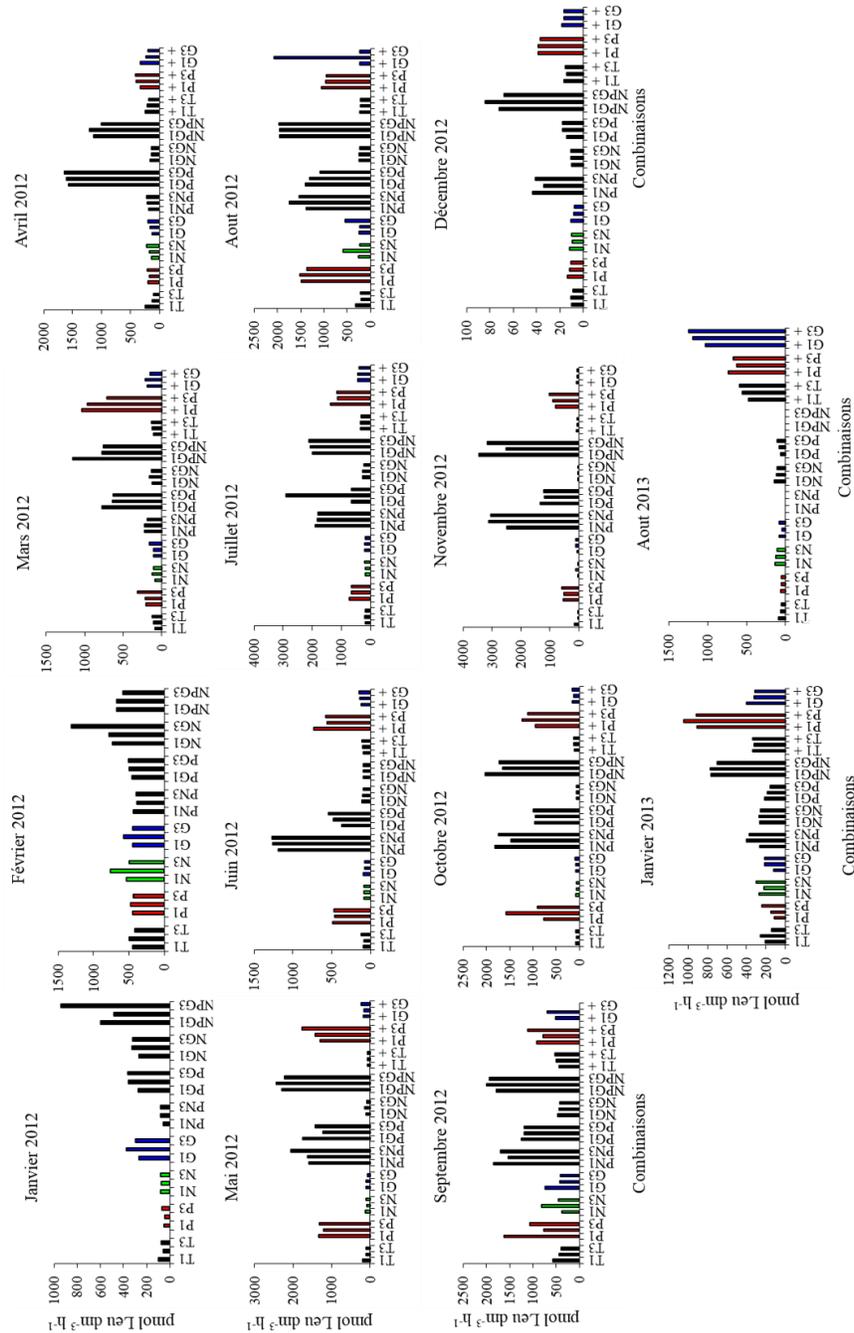


Figure A2.1. PB mesurées lors des expériences d'enrichissement réalisées durant le suivi *in situ* à la station SOLEMIO en baie de Marseille. En abscisse, les différentes combinaisons d'éléments : T (Témoin = pas d'ajouts), P (PO₄), N (NH₄ + NO₃), G (Glucose) incubé à température *in situ* et T+, P+ et G+ incubé à température *in situ* + 3°C

Annexe 3

Données environnementales au site SOLEMIO

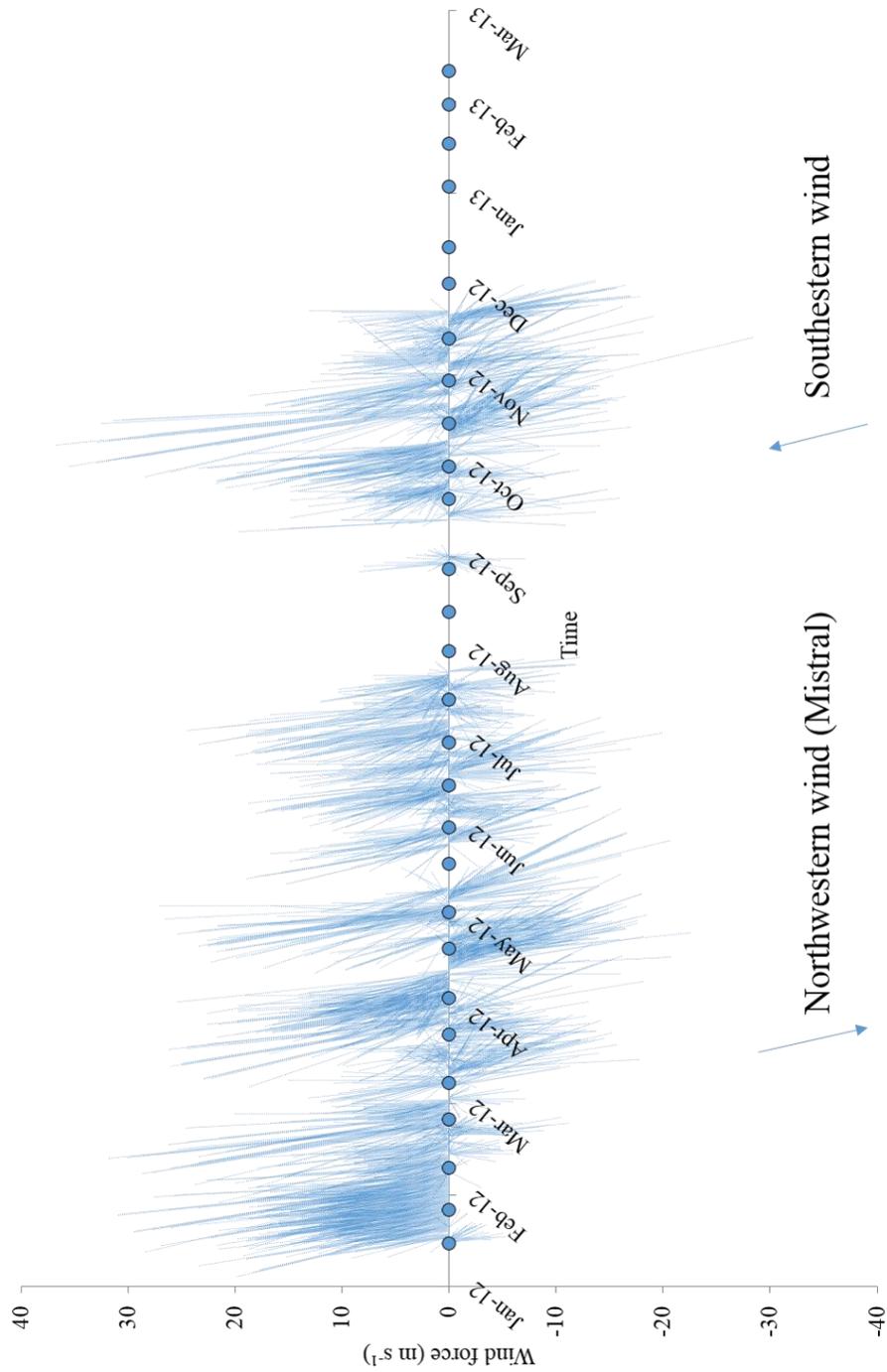


Figure A3.1. Evolution temporelle des vents (traits = direction et longueur des traits = intensité en m s^{-1}) dans la zone de la baie de Marseille (du 1er janvier 2012 au 28 Novembre 2012). Données issues de la station météo du Frioul (girouette + anémomètre). Le manque de données entre Août et Octobre est lié à une maintenance du système. Les données à partir du 28 Novembre ne sont pas encore archivées

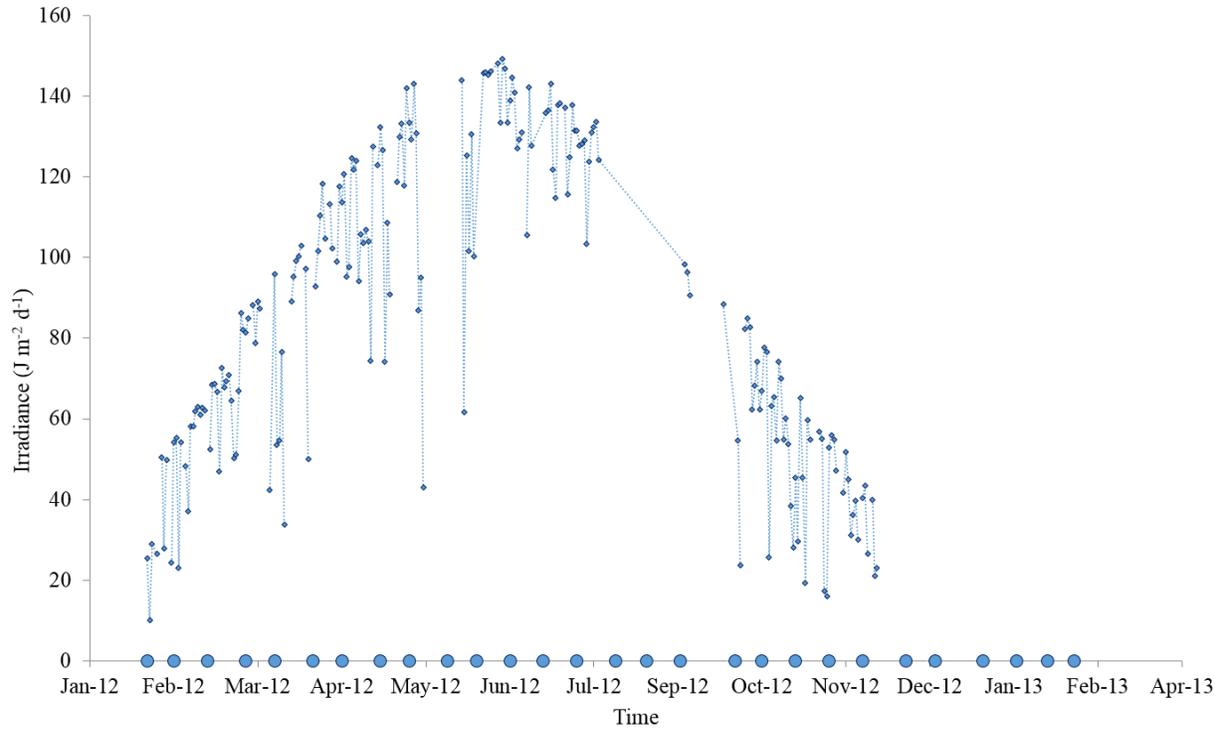


Figure A3.2. Evolution temporelle de l'irradiance moyenne journalière dans la zone de la baie de Marseille (données disponibles du 1er janvier 2012 au 28 Novembre 2012). Données d'irradiance issues de la station météo du Frioul (Pyranomètre)

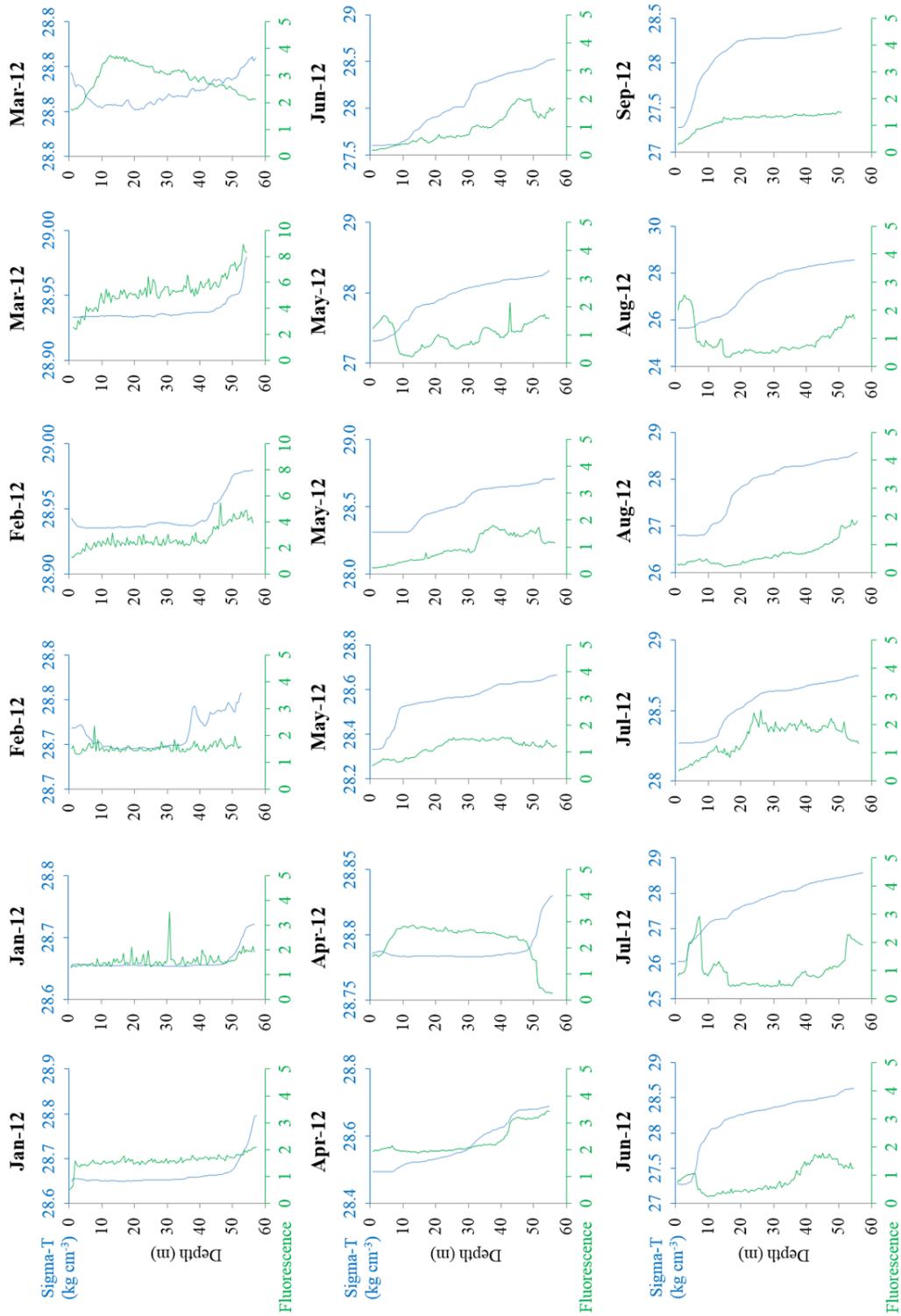


Figure A3.3. Profils de densité - fluorescence durant la campagne de suivi annuel à la station SOLEMIO (Janvier 2012 à Février 2013)

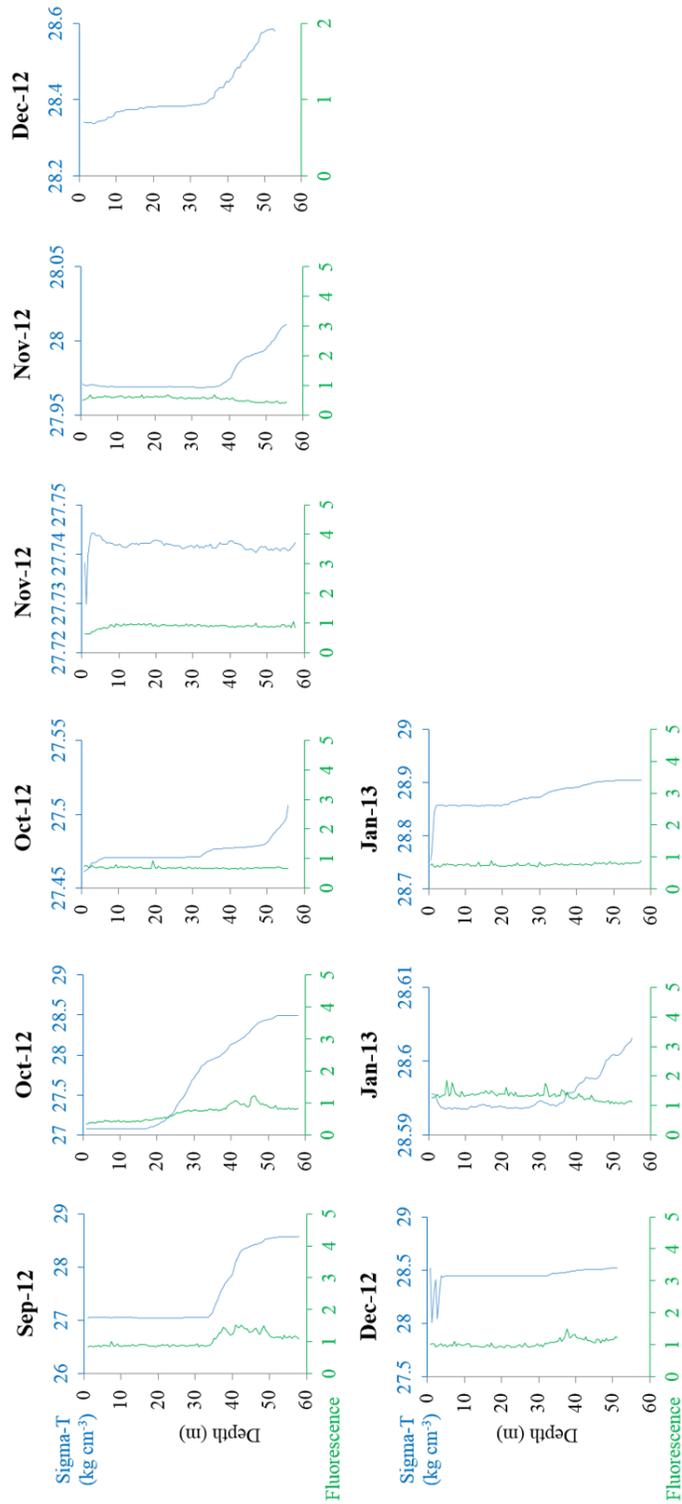


Figure A3.3.bis. Profils de densité - fluorescence durant la campagne de suivi annuel à la station SOLEMIO (Janvier 2012 à Février 2013)

Annexe 4

Protocole de dosage du pyruvate

J'ai travaillé au début de ma thèse sur une méthode enzymatique dérivée de celle utilisée pour doser le pyruvate dans le plasma sanguin (Mezzour et al. 2007), permettant de doser spécifiquement cette molécule. Cette méthodologie permet à la fois 1) de suivre la consommation réelle du pyruvate par les bactéries hétérotrophes et 2) de mettre en évidence une production potentielle de COD réfractaire dans nos cultures (par différence entre le dosage du COD par combustion haute température et la concentration en pyruvate).

La méthode utilisée pour doser le C pyruvate possède une limite de détection (ld) qui ne nous permet pas d'atteindre des mesures fiables dans les faibles concentrations en pyruvate ($< 60 \mu\text{mol C dm}^{-3}$). Or, lors de nos cultures saisonnières en minicosme, les concentrations en C dissous avoisinaient régulièrement cette limite de $60 - 70 \mu\text{mol C dm}^{-3}$. Cette partie est une synthèse des différents tests réalisés sur cette méthode.

A4.1. Principe de dosage

Le principe repose sur la réaction réversible de la fermentation lactique en voie anaérobie où une mole de NADH, H⁺ correspond à une mole de pyruvate (Fig. A4.1). L'acide pyruvique est mis en présence d'un excès de NADH, H⁺ dans des conditions de milieu réactionnel optimales (pH, T°C, tampon, ...).

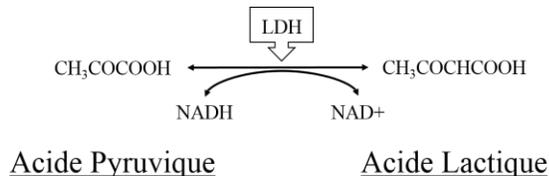


Figure A4.1. Réaction réversible de la lactate déshydrogénase

Après 15 secondes de réaction, un ajout de lactate déshydrogénase (LDH, 240 U dm^{-3}) va catalyser la conversion du pyruvate en lactate en régénérant du NAD⁺ à partir du NADH, H⁺. Le NADH, H⁺ absorbe fortement à 335 nm tandis que le NAD⁺ n'absorbe pas. La diminution de fluorescence du NADH, H⁺, induite par la transformation du pyruvate en lactate est alors suivie au cours du temps. En présence de NADH, H⁺ en excès, la diminution de fluorescence est

proportionnelle à la quantité de pyruvate présent dans l'échantillon (Fig. A4.2), en supposant qu'il est entièrement consommé lors de la réaction enzymatique.

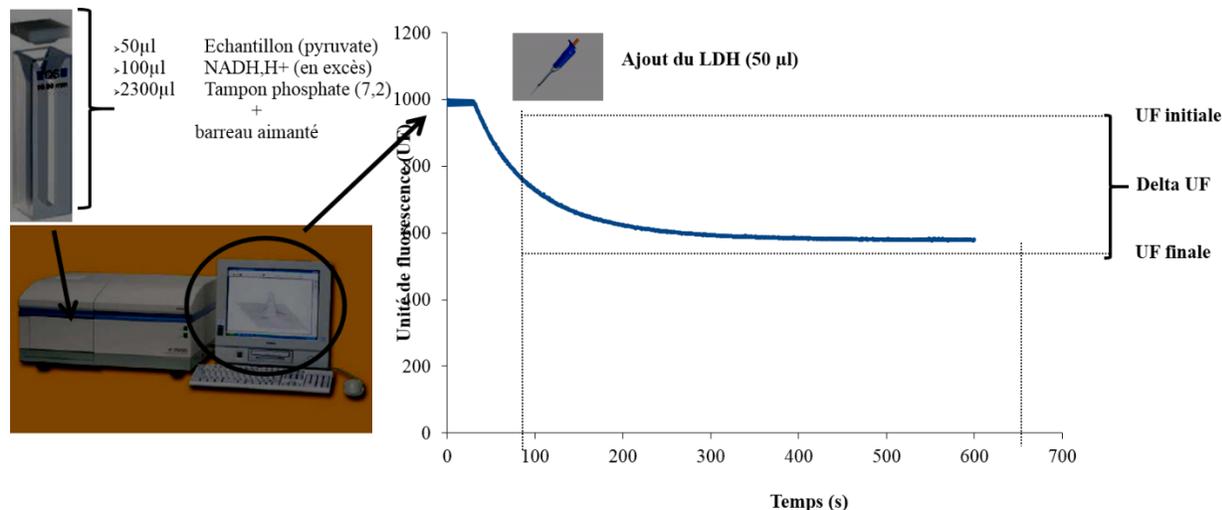


Figure A4.2. Principe de dosage enzymatique du pyruvate

Dans la pratique, 50 mm³ d'échantillon ou de solution étalon de pyruvate sont préparées dans une solution de NaCl 35g dm⁻³. Ils sont ajoutés dans une cuve 4 faces en quartz (3 cm³) munie d'un barreau aimanté en présence de 100 mm³ d'une solution de NADH, H⁺ et de 2300 mm³ de tampon phosphate (150 mmol dm⁻³, pH = 7,2). La solution stock de NADH H⁺ est conservée en tampon Tris (150 mmol dm⁻³, pH 7,2) et des solutions filles de travail sont réalisées tous les jours dans le tampon phosphate (150 mmol dm⁻³, pH 7,2). La préparation est telle que la concentration finale en NADH H⁺ est toujours en excès, c'est à dire plus de 50% supérieure à la plus forte concentration attendue en pyruvate. L'acquisition au spectrofluorimètre dure 600 secondes avec une longueur d'onde d'excitation à 335 nm et une longueur d'onde d'émission à 455 nm. 50 mm³ d'une solution d'enzyme L-lactate déshydrogénase sont rajoutés après 15 secondes d'acquisition afin de déclencher la réaction enzymatique. La solution stock est obtenue par re-suspension de LDH (L12.54, sigma) lyophilisée re-suspendue dans du tampon (NH₄)₂ SO₄ 2 mol dm⁻³, pH 6, et conservée à -20°C au congélateur. Les solutions filles (12 U cm⁻³) sont réalisées par dilution de la solution mère dans du tampon phosphate. Ainsi, la fluorescence précédant l'ajout de la LDH (UF initiale), moins la fluorescence à l'équilibre (10 minutes après l'ajout de la LDH = UF finale), est proportionnelle à la quantité de pyruvate dans l'échantillon.

A4.2. Les différentes étapes de validation du protocole

La première étape consiste à tester différentes concentrations en NADH, H⁺ (de 100 à 400 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) dans le tampon réactionnel pendant le temps d'analyse (600 s). Il s'agit de vérifier 1) la stabilité du NADH, H⁺ dans le milieu tamponné en l'absence de LDH et de pyruvate et 2) la réponse linéaire de la fluorescence en fonction de la concentration en NADH, H⁺ (Fig. A4.2).

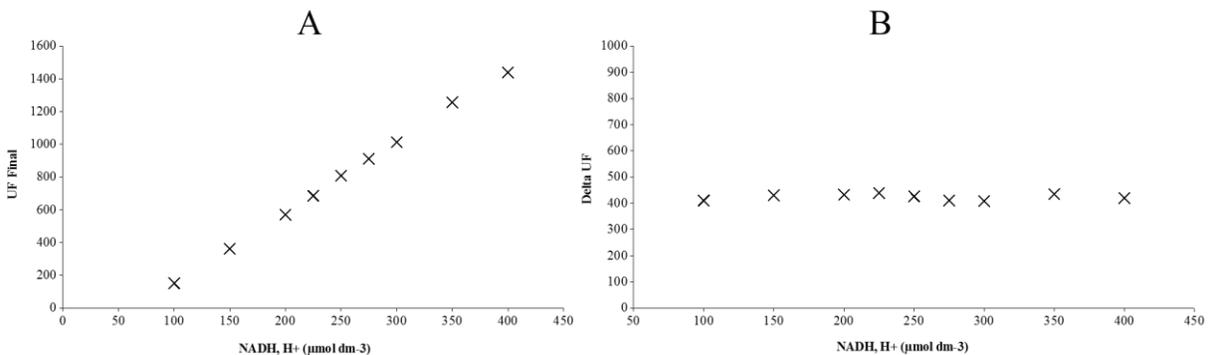


Figure A4.2. Gamme étalon NADH, H⁺. A : UF finale = f(concentration en NADH,H⁺) et B : Delta UF = f(concentration en NADH, H⁺)

La seconde étape consiste à tester plusieurs concentrations en LDH (0, 24, 60, 120, 240 et 480 U dm^{-3}) afin de vérifier si le même équilibre est toujours atteint en fin de réaction et de voir s'il y a possibilité de l'accélérer la réaction (Fig. A4.3). Dans notre protocole, ajouter 240 U dm^{-3} suffit.

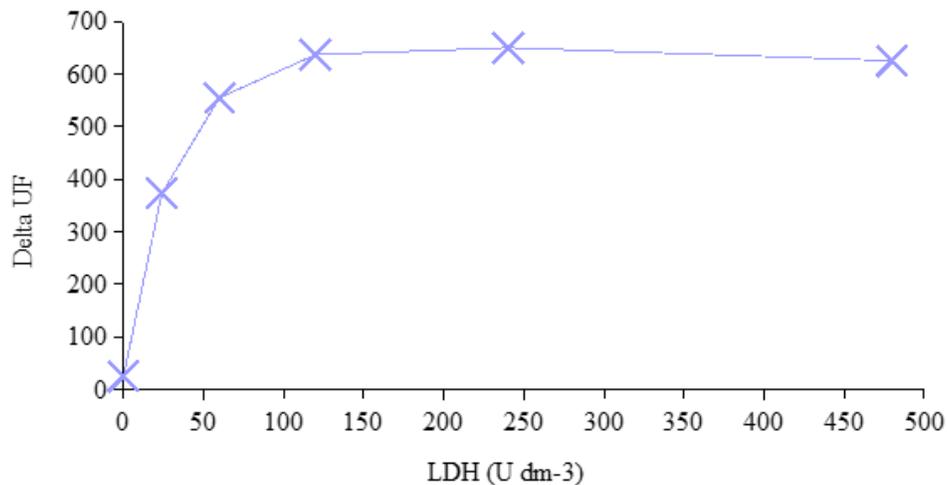


Figure A4.3. Gamme étalon de LDH où l'équilibre est atteint à partir de 120 U dm^{-3} .

La dernière étape consiste à construire une gamme étalon de pyruvate entre 0 et 900 $\mu\text{mol C dm}^{-3}$ (exemple de gamme figure A4.4). Avant chaque série de mesures, des gammes étalons de NADH, H^+ sont réalisées pour tenir compte de l'usure de la lampe du spectrofluorimètre. D'après l'ensemble des gammes étalons construites entre 0 et 900 $\mu\text{mol C dm}^{-3}$, le delta UF moyen obtenu à 0 $\mu\text{mol C dm}^{-3}$ (y-intercept) est de 85 ± 28 UF dans l'eau de mer. Les données de delta UF ne commencent à augmenter qu'aux alentours de 100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ de pyruvate. Un protocole pour les faibles concentrations en pyruvate (de 0 à 60 $\mu\text{mol C dm}^{-3}$) est élaboré mais il est impossible d'obtenir une augmentation linéaire (Fig. A4.5). À partir de ce protocole, les deltas UF obtenus se situaient seulement entre 10 UF et 30 UF soit en dessous de la limite de détection (ld) pour de si faibles concentrations en pyruvate. Même en augmentant la quantité de LDH dans la cuve (de 24 à 480 U dm^{-3}), aucune diminution suffisante de fluorescence n'est observée pour des concentrations en C pyruvate $< 60 \mu\text{mol C dm}^{-3}$. Au contraire, il s'avère qu'à de si faible concentration en pyruvate, le delta UF a tendance à diminuer au lieu d'augmenter. Ce résultat laisse penser que la réaction réversible prend le pas sur la dynamique du pyruvate.

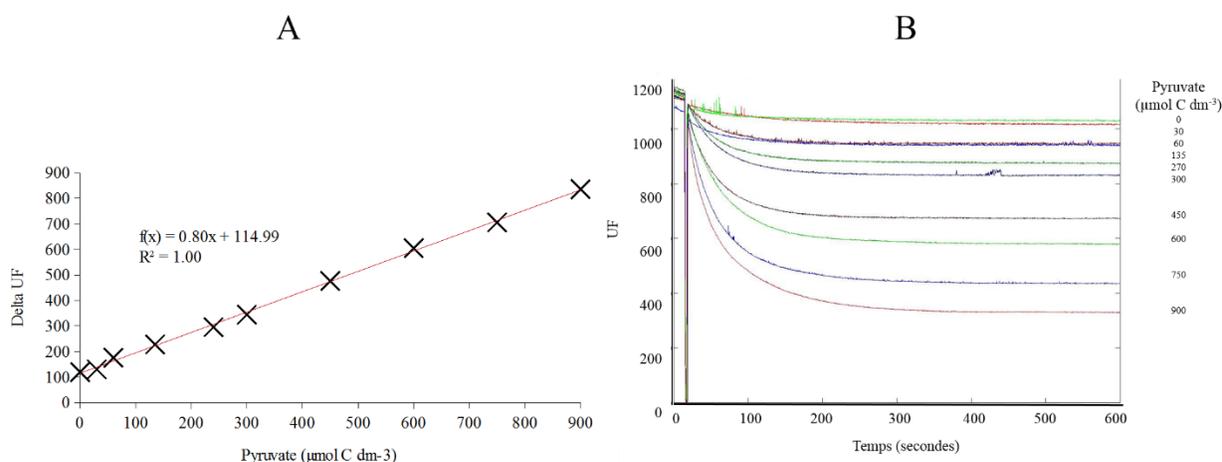


Figure A4.4. A : Gamme étalon pyruvate réalisée entre 0 et 900 $\mu\text{mol C dm}^{-3}$. B : Cinétiques pyruvate

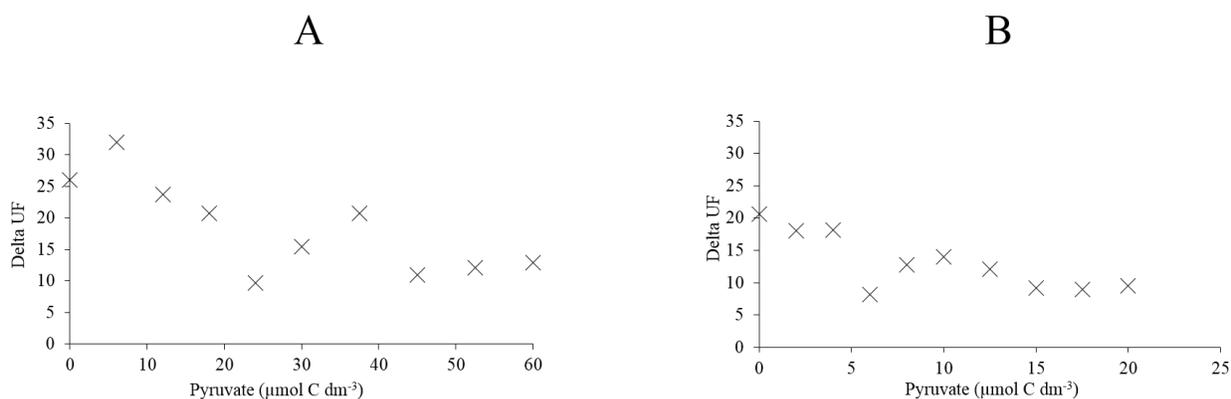


Figure A4.5. Gammes étalons pyruvate réalisées entre 0 et 60 $\mu\text{mol C dm}^{-3}$ (A) et 0 et 20 $\mu\text{mol C dm}^{-3}$ (B)

Finalement, des tests supplémentaires à partir de gammes d'étalonnages montrent que 1) la congélation n'a aucun effet sur les échantillons et que 2) les mesures faites par spectrofluorimétrie sont corrélées avec celles réalisées par Shimadzu TOC-5000 Analyzer (Fig. A4.6).

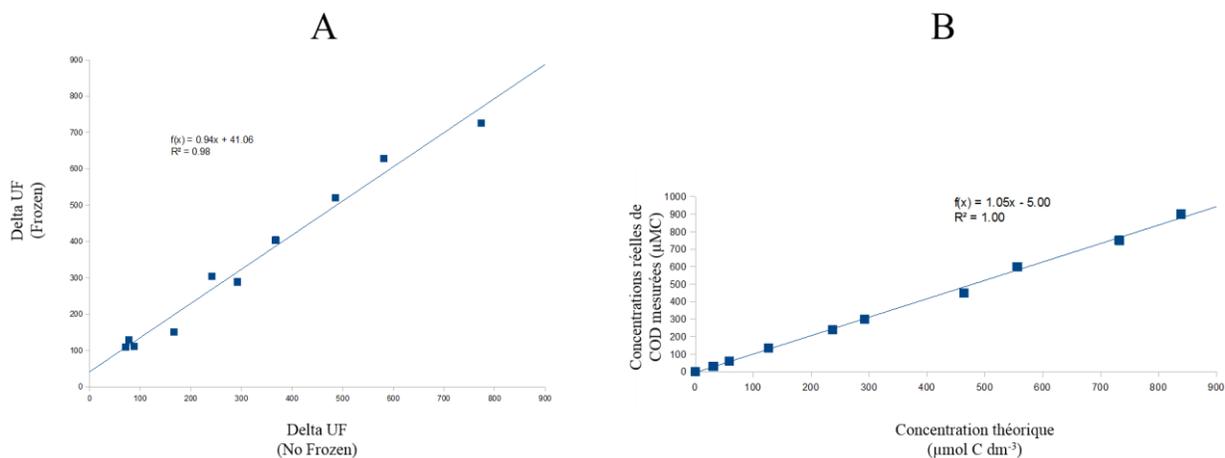


Figure A4.6. A : corrélation entre une gamme étalon congelée 24h et une gamme étalon non congelée. B : corrélation entre une gamme étalon de C pyruvate (0 – 900 μMC) analysée par spectrofluorimétrie et par Shimadzu TOC-5000 Analyzer

A4.3. Bilan

Bien que fiable pour les fortes concentrations en C (100 - 900 $\mu\text{mol C dm}^{-3}$), l'impossibilité d'obtenir une diminution de fluorescence proportionnelle à la concentration en pyruvate pour des gammes $< 60 \mu\text{mol C dm}^{-3}$ a rendu cette méthode inutilisable dans les expériences de pulses réalisées au chapitre 5. Il serait nécessaire de poursuivre l'investigation de ce protocole en trouvant, par exemple, un moyen d'inhiber la réaction réverse, si c'est bien elle qui est la cause de ce problème.

Annexe 5

Cytogrammes types établis lors du suivi annuel et des cultures en minicosme

A5.1. Bactéries hétérotrophes (suivi *in situ*) : prélèvements en surface du 7 Mars 2012

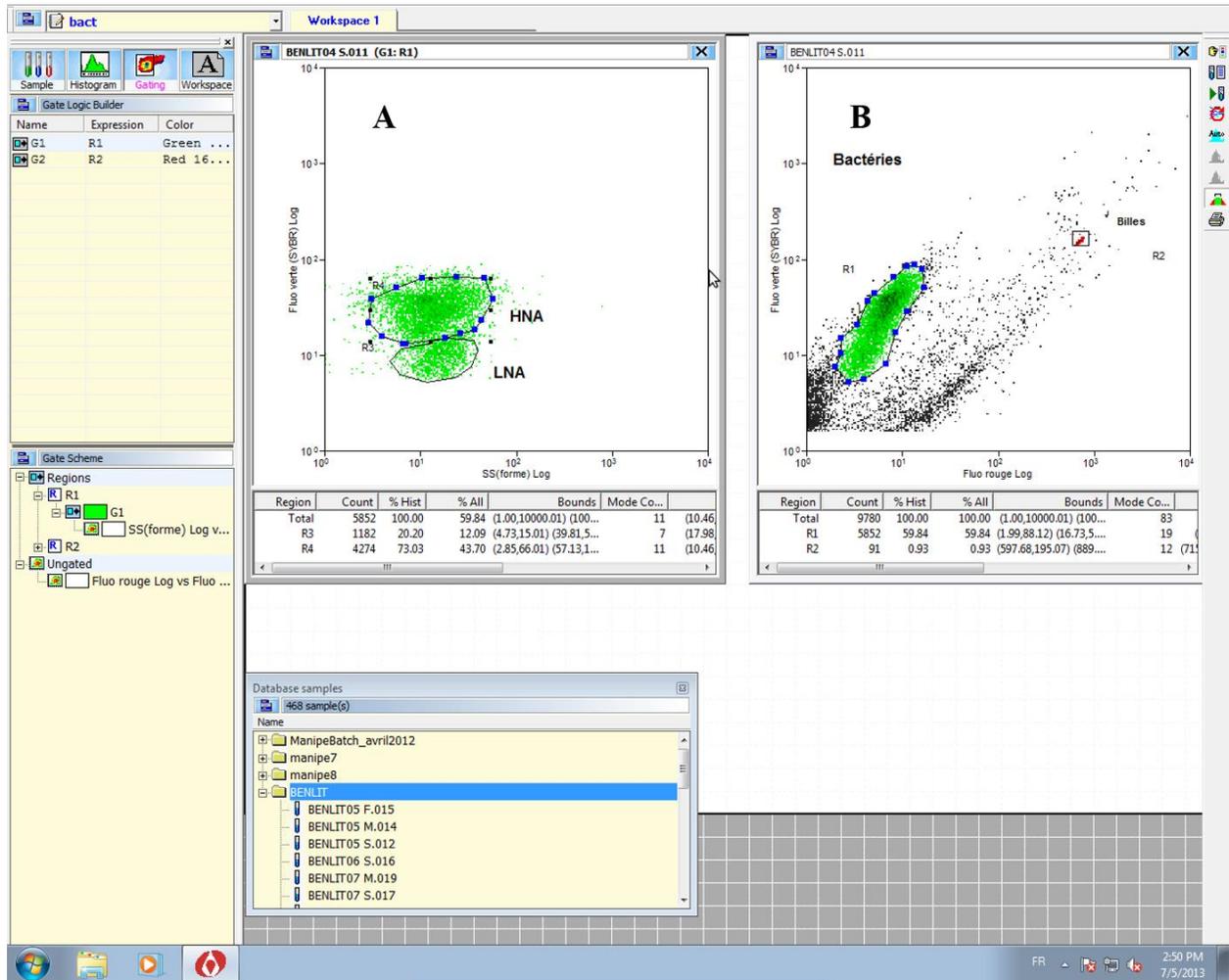


Figure A5.1. A : Fluorescence verte = f (side scatter), permet de séparer les bactéries riches (HNA) et pauvres (LNA) en acides nucléiques. B : Fluorescence verte = f (Fluorescence rouge), permet de voir les billes de calibration afin de déterminer le débit moyen du liquide de gaine durant l'analyse

A5.2. Phytoplanktons (suivi *in situ*) : prélèvements en surface du 7 Mars 2012

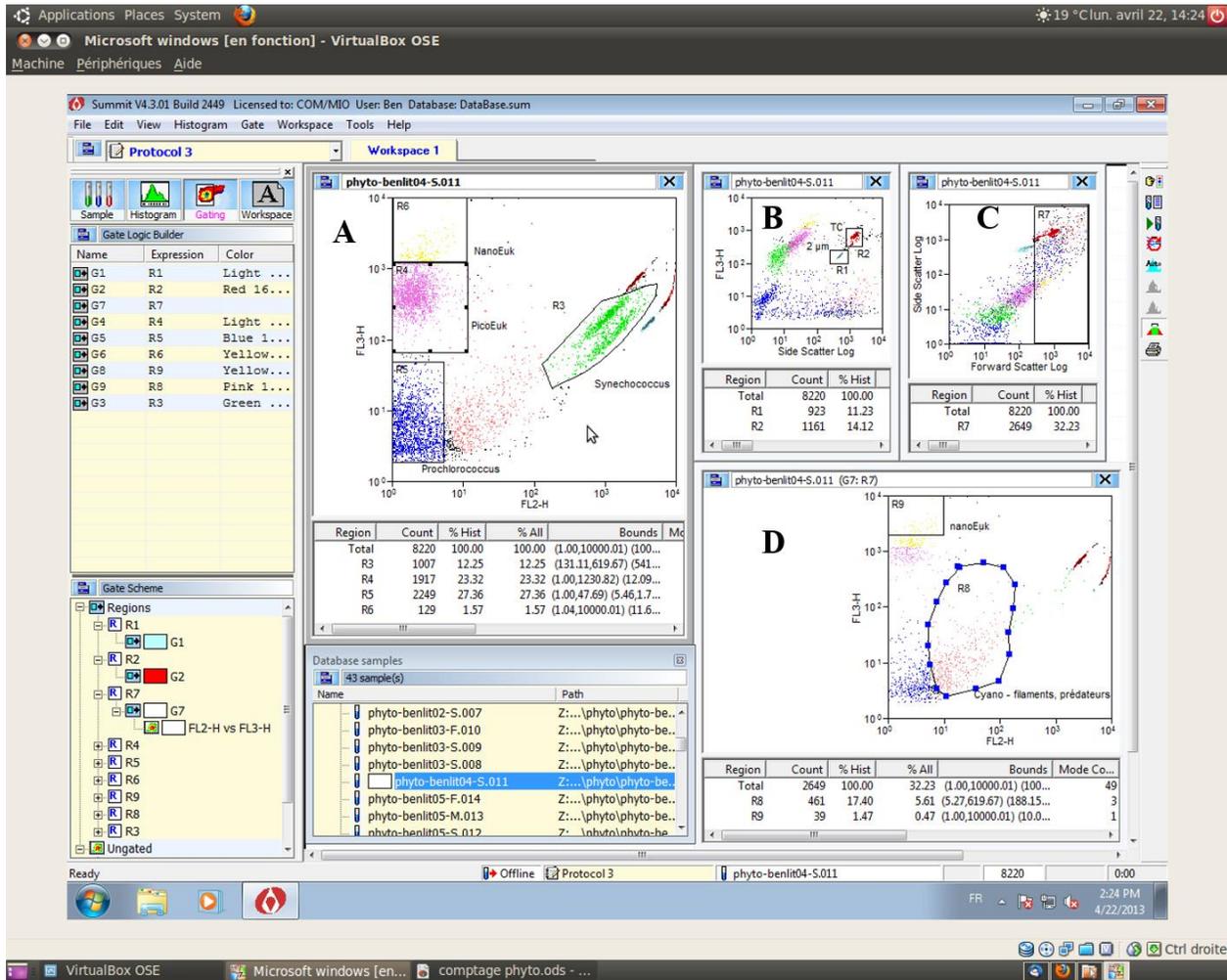


Figure A5.2. A : Fluorescence rouge = f (Fluorescence verte), permet de séparer les différents groupes d'ultra-phytoplanktons (Nanoeukaryote, Picoeukaryote, Prochlorococcus et Synechococcus). B : Fluorescence rouge = f (side scatter), permet de voir les 2 séries de billes (Truocount & $2\mu\text{m}$) afin de 1) déterminer le débit du liquide de gaine et 2) de repérer les cellules $< 2\mu\text{m}$. C : Side scatter = f (forward scatter), permet de représenter le groupe des cellules $< 2\mu\text{m}$. D : Fluorescence rouge = f (Fluorescence verte) appliquée dans le groupe des cellules $< 2\mu\text{m}$, permet de repérer les cyanobactéries

A5.3. Bactéries hétérotrophes (cultures en minicosme) : Exp. I, prélèvement n°5

Cultures en mésocosme

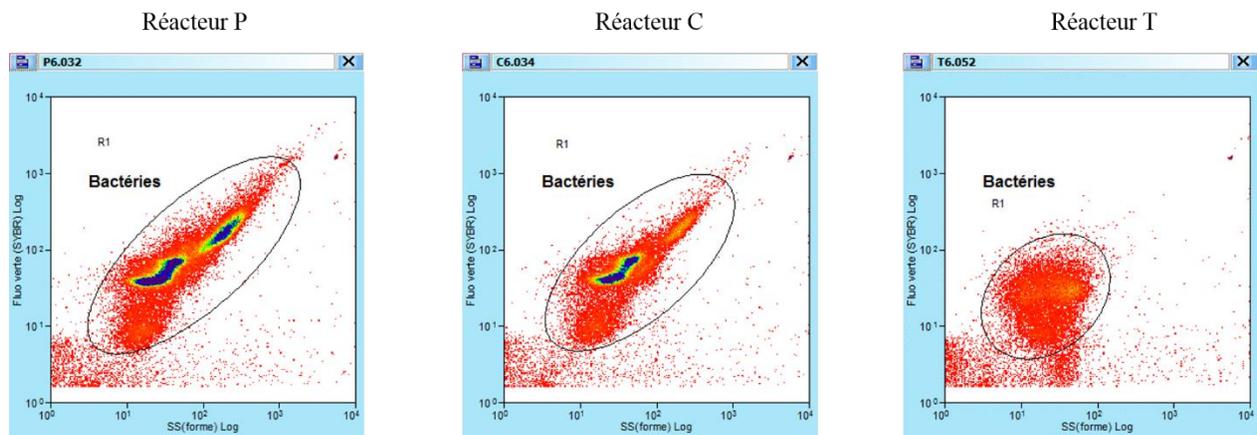


Figure A5.3. Cytogrammes des échantillons n°5 issus des réservoirs P, C et T de la culture en minicosme n° I. Fluorescence verte = f (side scatter), permet de séparer les bactéries riches (HNA) des pauvres (LNA) en acides nucléiques

Annexe 6

Principe de l'optode presens®

La saturation en oxygène est mesurée par des optodes Presens®. C'est une technique basée sur un système optique développée par Klimant *et al* (1995). La luminescence est la propriété de certains composés à absorber de la lumière et à la réémettre ensuite avec une énergie moindre (Fig. A6.1. B). Ce type de molécule est appelé luminophore. Après absorption de l'énergie lumineuse, le luminophore se trouve dans un état excité. Il retourne à son état stable en émettant des photons d'énergie inférieure. Dans le cas de l'optode à oxygène, le luminophore utilisé est un complexe porphyrine platine, excité par une lumière bleue (505 nm) émise par une diode luminescente. Le temps de vie de la luminescence est appelé phase. En présence d'O₂, une partie de l'énergie est captée par les molécules d'O₂ (*quenching*). Ce captage d'énergie réduit le temps de vie de la luminescence et crée un décalage de phase. Cette phase est proportionnelle à la pression partielle de O₂ (pO_2) mesurée par l'optode. La phase est d'autant plus faible que la concentration en oxygène est forte. Inversement, la phase est d'autant plus forte que la concentration en oxygène est faible. La relation entre la pO_2 et le temps de décroissance de luminescence est décrite selon l'équation de Stern-Volmer :

$$pO_2 = \frac{1}{K_{sv}} \times \left(\frac{t_0}{t} - 1 \right)$$

Avec, t le temps de décroissance de luminescence, t_0 le temps de décroissance de luminescence en l'absence d'O₂ et K_{sv} la constante de Stern-Volmer (efficacité de *quenching*).

La concentration d'O₂ est détectée par la partie sensible de l'optode (Fig. A6.1. A, « *Indicator layer* ») qui est protégée par une partie isolante (« *Optical isolation layer* ») à priori seulement perméable aux gaz. L'O₂ diffuse du milieu ambiant vers la partie sensible de l'optode. La mise à l'équilibre entre le milieu de mesure et la partie sensible de l'optode est caractérisée par le flux d'O₂. Ce flux est proportionnel à la différence de concentration d'O₂ entre ces 2 parties et le facteur de proportionnalité (K) est dépendant de la dynamique (turbulence) du milieu de mesure, de la température et de la salinité. Le flux d'O₂ se définit selon la relation suivante :

$$F = K \times (O_2\text{ext.} - O_2\text{int.})$$

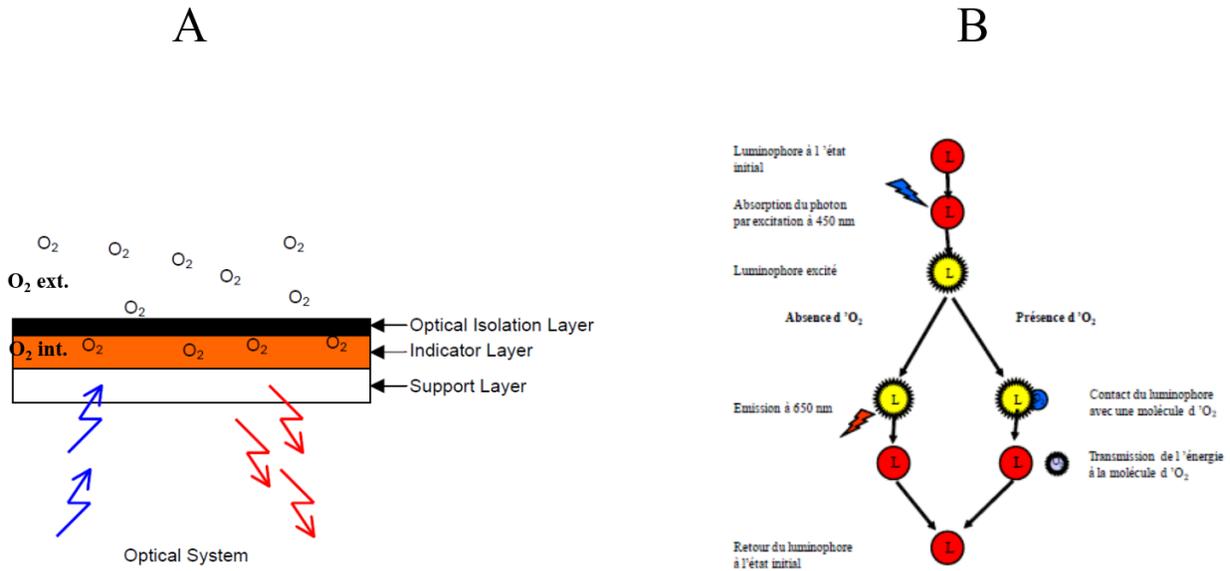


Figure A6.1. A : Système optique de l’optode presens® composé d’une partie isolante « *Optical isolation layer* », d’une partie sensible « *Indicator layer* » et d’un support de fixation « *Support layer* ». B : principe de la luminescence spontanée d’un luminophore en présence de molécule d’oxygène

Avec, F le flux d’ O_2 entre la phase extérieure et la phase intérieure en $\mu\text{mol } O_2 \text{ dm}^{-3}$. K la constante de diffusion définie selon la pression atmosphérique, la température et la salinité du milieu de mesure. $O_{2\text{ext.}}$ et $O_{2\text{int.}}$ les concentrations d’ O_2 en $\mu\text{mol dm}^{-3}$ du milieu de mesure et de la partie sensible de l’optode, respectivement. La concentration d’ O_2 est obtenue à partir de la relation suivante :

$$pO_2 \times C_s O_2 = [O_2]$$

Avec, $C_s O_2$ la solubilité de l’ O_2 selon les conditions de pression atmosphérique, de température et de salinité.

Annexe 7

Modèle de régression non linéaire appliqué sur les mesures acquises par les optodes presens® lors des études en minicosme sur les effets des apports fluctuants en MO

Pour tenir compte de la dynamique du système (en lien avec la turbulence et les propriétés physicochimiques : pression, température, salinité) en l'absence de biologie, un modèle d'ajustement non linéaire est utilisé pour considérer la mise en équilibre de la constante de diffusion liée aux changements de propriétés thermique et dynamique au voisinage de la partie sensible de l'optode. La mise en équilibre suit une loi de type :

$$dO_2/dt = k \times (O_{2ext} - O_{2int})$$

Avec, dO_2/dt : dérivée de la concentration en oxygène par rapport au temps. O_{2ext} la concentration de l' O_2 du milieu $\mu\text{mol dm}^{-3}$. O_{2int} la concentration de l' O_2 dans la partie sensible de l'optode en $\mu\text{mol dm}^{-3}$. k la constante de transfert qui est dépendante de la température et de la dynamique du milieu en h^{-1} .

En présence de biologie seule, dans un système à l'obscurité totale, on ne tient compte que de la respiration microbienne : l'équation devient alors :

$$d O_2/dt = -R$$

Avec, R le taux de respiration en h^{-1}

En tenant compte des deux processus, la dynamique de l' O_2 devient :

$$d O_2/dt = k \times (O_{2ext} - O_{2int}) - R$$

L'intégrale de cette fonction est alors:

$$O_2(t) = O_{2offset} - O_{2range} \times (1 - \exp(-k \times t)) - R \times t$$

Avec ; $O_{2offset}$ la concentration d' O_2 dissous à t_0 en $\mu\text{mol dm}^{-3}$. O_{2range} la diminution de la concentration d' O_2 dissous mesurée entre t_0 et t final en $\mu\text{mol dm}^{-3}$. La détermination des paramètres est effectuée par une minimisation des moindres carrés sur le jeu de données et la fonction ci-dessus.

Annexe 8

Optodes presens® et validation des chambres d'incubation

Le suivi de la cinétique de concentration de l'oxygène dissous dans les cultures en minicosme est effectué en utilisant la méthode optique des optodes presens® (Annexe 6). Moins sensible que la méthode chimique Winkler, cette approche permet d'accéder à des mesures haute fréquence (< 1 minute) pouvant s'effectuer dans des systèmes expérimentaux de faible volume (< 30 cm³) : les chambres d'incubation presens® (Fig. A8.1). Ces chambres d'incubation bénéficient d'une thermorégulation via un cryostat de type Huber® 240-cc ainsi que d'une agitation magnétique.

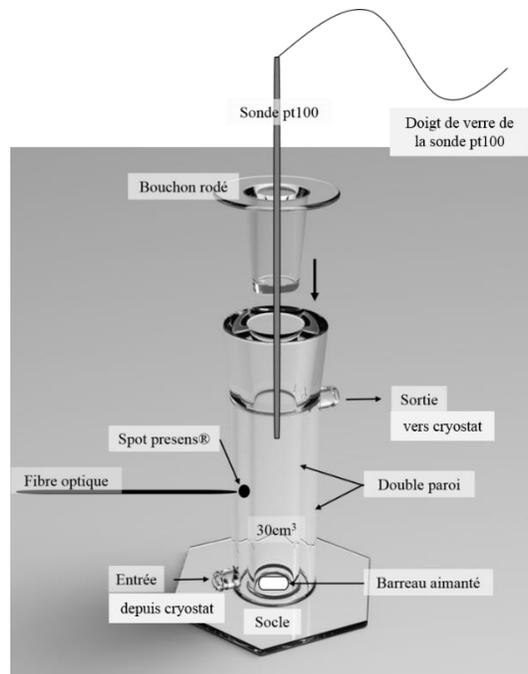


Figure A8.1. Schéma technique d'une chambre d'incubation presens®. La chambre d'incubation presens® est fabriquée en verre borosilicaté. Elle peut contenir un volume de 30 cm³ de culture et possède une double paroi afin d'être thermorégulée par un cryostat (Huber ministat 240-cc). Un doigt en verre est fixé au bouchon et permet d'introduire une sonde pt100 à l'intérieur de la chambre. Un large socle en verre est soudé à la chambre pour un meilleur maintien. Elle possède également un hublot en verre poli afin d'optimiser la communication entre l'optode presens® collé sur la face intérieure et la fibre optique sur la face extérieure. Elle est munie d'un barreau aimanté et elle est placée sur une plaque d'agitation. Lors de son utilisation, la chambre est rincée avec du milieu de culture (deux fois le volume) et elle est remplie par le fond au moyen du tube téflon (PTFE 1/8) coulant en continu. Une fois rincée et remplie, elle est fermée par un bouchon en verre rodé et l'absence de bulles est vérifiée. La chambre est placée à l'obscurité pendant le temps d'acquisition des mesures d'O₂.

Les mesures de concentration d'O₂ effectuées à partir de cette méthode optique nécessitent la mise en place d'un protocole rigoureux. Un des points essentiels est l'étalonnage des optodes presens® à 0% et 100% de la saturation en O₂ dissous. D'autres points demandent également à être validés pour la mise en place de cette méthodologie :

- ✓ Uniformiser l'O₂ *offset* (première valeur d'O₂ enregistrée par l'optode lors d'une acquisition) des valeurs absolues entre les 2 chambres d'incubation,
- ✓ Déterminer l'effet de l'agitation dans les chambres d'incubation sur les valeurs absolues d'O₂,
- ✓ Comparer les valeurs de concentration d'O₂ mesurées dans les chambres d'incubation avec la méthode chimique de référence Winkler.

Ainsi, des tests de validation réalisés à l'aide des 2 chambres d'incubation presens® utilisées lors des expériences de culture en minicosme sont décrits dans les paragraphes suivants. Les valeurs de RB obtenues dans les chambres d'incubation presens® sont calculées sur 2 heures maximum et selon le modèle dynamique de régression non linéaire (Annexe 6).

A8.1 Etalonnage et sensibilité des optodes presens®

L'étalonnage des optodes presens® est réalisé post expérience pour les cultures I, II, III et IV (réservoirs et chambres d'incubation) et pour le test de validation 1 (chambres d'incubation). Cet étalonnage consiste à établir pour chaque optode presens® un 0% et un 100% de saturation en O₂ dissous (Fig. A8.2). Pour obtenir le 0%, l'optode est plongée dans de l'eau milliQ bullée à l'azote. Cette méthode permet d'obtenir un milieu anoxique avec une décroissance rapide de la saturation en O₂ dissous. Le 100% de saturation est obtenu en humidifiant un coton d'eau milliQ mis en contact direct avec l'optode. Les valeurs de phase ainsi obtenues pour 0% et 100% de saturation en O₂ dissous sont ensuite utilisées dans l'algorithme de calcul de la pO_2 par le logiciel presens® afin de déterminer la concentration en O₂ dissous à l'instant t , selon les conditions expérimentales de température, de salinité et de pression atmosphérique.

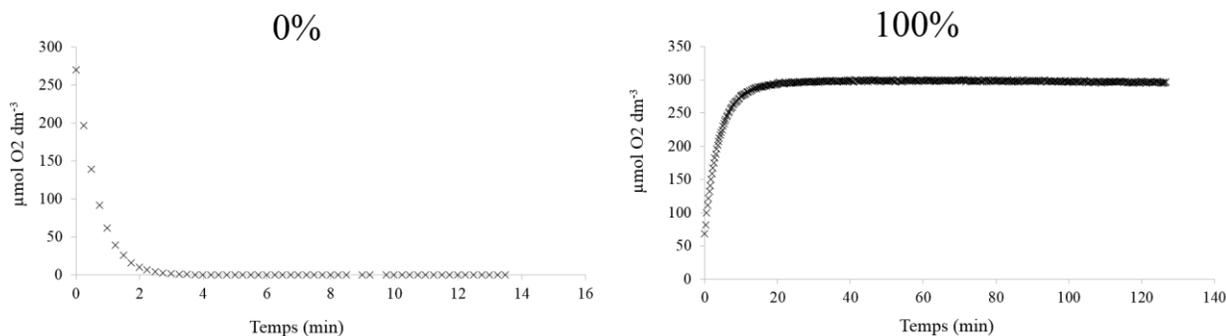


Figure A8.2. Exemple de cinétique de la saturation d'O₂ dissous lors des étalonnages des optodes presens® à 0 % et 100% dans l'eau douce

L'étalonnage des différentes optodes presens® permet d'avoir des valeurs absolues de concentration en O₂ dissous afin de rendre possible la comparaison des optodes dans le temps et dans l'espace. Malgré des étalonnages homogènes entre les chambres d'incubation A et B (Tableau A8.1), il s'avère qu'un décalage systématique de la saturation en O₂ dissous entraîne une différence de 10 à 30 μmol O₂ dm⁻³ à t₀ (« O₂ offset ») entre les optodes des 2 chambres d'incubation durant toutes les expériences (exemple figure A8.3). La source de ce décalage pourrait être liée à une anomalie dans la procédure d'étalonnage des optodes. En effet, les 2 chambres d'incubation presens® sont remplies avec un même inoculum de milieu de culture, les valeurs de saturation d'O₂ dissous enregistrées à t₀ devraient être les mêmes. Afin de pallier à ce biais méthodologique, nous avons choisi de corriger les valeurs de respiration d'une chambre par rapport à l'autre en appliquant un facteur correctif (FC). Ainsi, de manière arbitraire, les valeurs de respiration mesurées dans la chambre B (R_B) lors des tests de validation exposés dans les paragraphes suivants, sont toutes corrigées (R_{B corrigé}) à partir d'un FC déterminé selon la relation suivante :

$$R_{B \text{ corrigé}} = R_B \times FC \quad \text{où} \quad FC = \frac{O_2 \text{ Offset A}}{O_2 \text{ Offset B}}$$

Avec,

$$R_B = \frac{\Delta O_2}{\Delta t}$$

Cette méthode de correction permet de s'affranchir du décalage des optodes à t₀ afin de pouvoir comparer les valeurs de respiration mesurées dans les chambres d'incubation presens® A et B. Cette méthode est appliquée post traitement des données. Ce choix signifie que malgré

l'apparente distorsion d'échelle sur les graphiques de cinétiques concentration d'O₂ dissous au cours du temps présentés ici, les valeurs de RB sont bien corrigées de ces variabilités d'échelle.

Tableau A8.1. Résumé des concentrations d'O₂ dissous ($\mu\text{mol O}_2 \text{ dm}^{-3}$) enregistrées lors des étalonnages à 0% et 100% des optodes presens® dans les chambres A et B (réalisés post expérience des cultures en minicosme I, II, III, IV et du test de validation n°1).

	Chambre A		Chambre B		Facteur correctif (FC) $\frac{(A100 - A0)}{(B100 - B0)}$
	0 %	100 %	0 %	100 %	
Exp. I	-0,08	296,53	-0,03	296,41	0.999
Exp. II	-0,94	272,43	-0,87	272,12	1.001
Exp. III	-0,06	288,88	0,08	290,97	0.993
Exp. IV	-0,09	290,27	-0,53	290,47	0.998
Test n°1	-0,12	274,89	-0,31	274,10	1.002

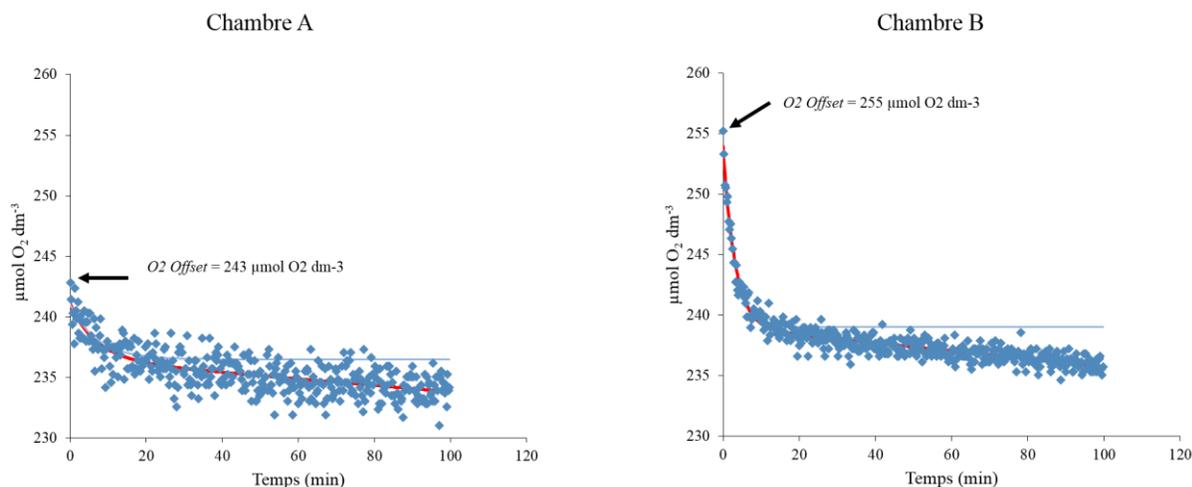


Figure A8.3. Séries temporelles de la concentration de l'O₂ dissous dans les chambres d'incubation presens® A et B enregistrées pendant le test de validation 1. Décalage d'O₂ Offset de 12 $\mu\text{mol O}_2 \text{ dm}^{-3}$ entre les 2 chambres. Ligne rouge : modèle dynamique de régression non linéaire incluant la respiration. Ligne bleue : modèle dynamique de régression non linéaire sans l'effet de la respiration

Nous avons vu que la pression partielle d'O₂ ($p\text{O}_2$) mesurée par les optodes presens® est sensible à différents paramètres tels que la température, la salinité et la pression atmosphérique. La possibilité de connecter un cryostat aux chambres d'incubation permet d'obtenir une régulation

thermique stable et de s'affranchir de ce paramètre. La pression atmosphérique peut également être une source de variabilité. Par exemple, pour une salinité de 38,2, une température de 18°C et des changements de pression atmosphérique sous nos latitudes (qui peuvent généralement osciller entre 990 hPa et 1020 hPa), la variation de concentration en oxygène dissous varie entre 252,18 $\mu\text{mol O}_2 \text{ dm}^{-3}$ et 260,13 $\mu\text{mol O}_2 \text{ dm}^{-3}$. Selon nos conditions expérimentales, les optodes sont placées dans des chambres d'incubation hermétiques dépourvues d'une phase gazeuse et donc indépendante des effets de variation de la pression atmosphérique sur la valeur absolue de la concentration d' O_2 à t_0 lors des phases d'incubation. Aussi, nous considérons pour l'ensemble de nos mesures d'oxygène, une pression atmosphérique fixée à 1013,25 hPa équivalente à une concentration d'oxygène dissous de 258,55 $\mu\text{mol O}_2 \text{ dm}^{-3}$ (pour une salinité de 38.2 et une température de 18°C). La salinité est également un paramètre qui influe sur la solubilité de l' O_2 dans l'eau. Un changement de salinité du milieu (de l'eau de mer à l'eau douce, par exemple) peut entraîner une augmentation de la concentration en O_2 dissous apparente s'expliquant par un échange ionique issu du temps de mise à l'équilibre osmotique entre la partie sensible de l'optode et l'inoculum (Fig. A8.4).

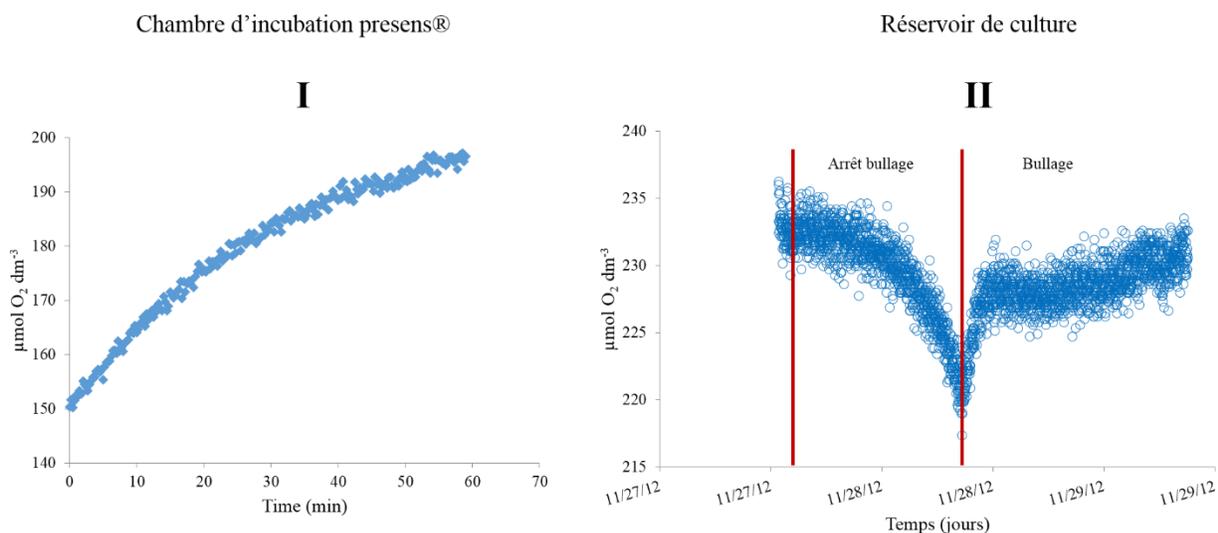


Figure A8.4. Phase d'équilibrage de la saturation d' O_2 dissous enregistré par l'optode presens®, qui se traduit par une augmentation de la concentration en O_2 dissous. Configuration I : passage d'un milieu à forte salinité (eau de mer) à un milieu à salinité nulle (eau douce). Configuration II : reprise du bullage dans un réservoir de culture

Cette augmentation s'observe également lors d'une reprise du bullage dans un réservoir de culture. Cela s'explique par une mise en équilibre de la saturation de l' O_2 dissous entre la phase gazeuse et liquide (Fig. A5.4). Ainsi, il semble indispensable avant de commencer une série

d'acquisition avec la technologie presens® de 1) attendre que les échanges ioniques et gazeux soient à l'équilibre si le système comporte une phase gazeuse et une phase liquide et de 2) immerger le temps nécessaire (à déterminer) les optodes presens® dans le futur milieu de mesure afin de s'affranchir de la phase de mise à l'équilibre osmotique.

Afin de maîtriser l'outil « optodes presens® », nous avons mis en place une première série de tests de validation. Ces tests de validation consistent en :

1. Confronter les valeurs de RB obtenues à partir de la méthode optique presens® et de la méthode chimique Winkler **sans agitation**,
2. Confronter les valeurs de RB obtenues à partir de la méthode optique presens® et de la méthode chimique Winkler **avec agitation**,
3. Comparer les valeurs de RB obtenues à partir de la méthode optique presens® entre les 2 chambres d'incubation presens® **avec agitation**.

Les résultats de cette première série de tests sont décrits dans les paragraphes suivants. Ils ont pour objectif d'améliorer notre protocole d'utilisation des optodes presens® en caractérisant les éventuelles anomalies méthodologiques, tout en apportant de nouveaux éléments de réflexion sur de potentielles futures expériences de validation.

A8.2. Test de validation 1 “*Mixing off*”

Ce test compare les mesures de RB réalisées avec les chambres d'incubation presens® et celles réalisées avec la méthode Winkler, sans faire intervenir le facteur agitation. Une culture de 10 dm³ d'eau de mer filtrée sur 0,6 µm est initiée par un apport en continu de pyruvate (environ 50 µmol C dm⁻³ d⁻¹), via une pompe péristaltique (Fig. A8.5). 48 heures après le lancement de la culture, les mesures de respiration (considérons ici seulement la respiration bactérienne RB) sont effectuées (Tableau A8.2). Le signal de l'optode est enregistré à l'obscurité dans chacune des chambres pendant 2 heures (Fig. A8.6) et 32 flacons Winkler sont remplis de manière homogène avec du milieu de culture et ils sont placés à l'obscurité dans un bloc thermorégulé en aluminium pendant 4h (Fig. A8.7). Toutes les 30 minutes (de t₀ à t₇), les réactifs Winkler sont ajoutés dans 3 réplicats. Un 4^{ème} réplicat est utilisé pour échantillonner la production bactérienne (PB), l'abondance bactérienne (AB) et le carbone organique total (COT) (Tableau A8.2). Les mesures de

PB, d'AB et de COT dans les flacons Winkler et à la fin des incubations dans les chambres A et B permettent de vérifier qu'il n'y pas eu de changements de population ou d'activités pendant le temps de l'expérience.

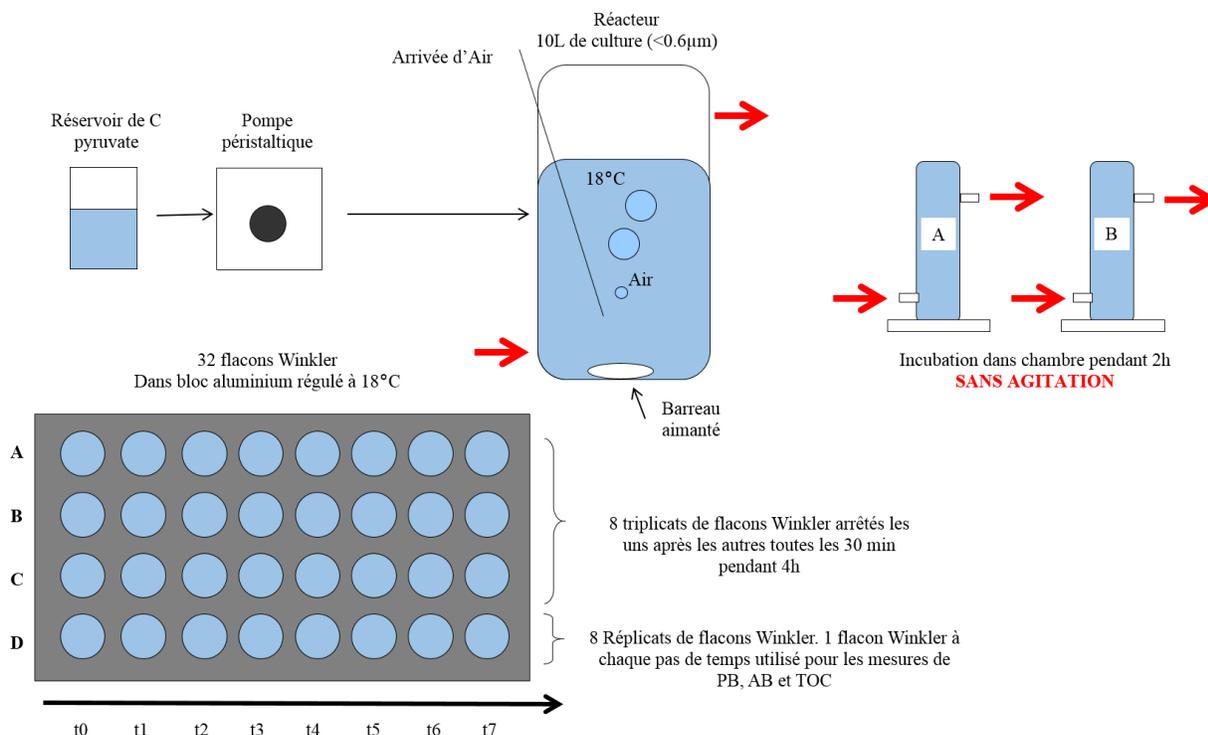


Figure A8.5. Schéma explicatif du test de validation n°1 « *Mixing off* » des chambres d'incubation presens® A et B. Les flèches rouges représentent la régulation thermique

Tableau A8.2. RB (\pm sd) mesurées dans 1) les 2 chambres d'incubation presens® A et B et 2) avec la méthode Winkler selon le protocole du test de validation n°1 « *Mixing off* ». La PB (\pm sd), l'AB et le COT sont seulement mesurés dans les flacons Winkler.

Test n°1 « <i>Mixing off</i> »	Chambre A	Chambre B	Flacons Winkler		
			2h d'incubation	4h d'incubation	
Séries temporelles	A	B			
RB ($\mu\text{mol O}_2 \text{ dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)	1,61 (\pm 0,12) $R^2 = 0,30$	1,82 (\pm 0,06) $R^2 = 0,69$	0,40 \pm 0,12 $R^2 = 0,49$	0,28 \pm 0,06 $R^2 = 0,48$	
			Sur 4h d'incubation		
			min	max	Moy (\pm sd)
PB($\mu\text{mol C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)	1,63 (\pm 0,04)	2,23 (\pm 0,03)	2,55	3,56	3,09 (\pm 0,36)
AB ($10^6 \text{ cell dm}^{-3}$)	nd		4,50	8,86	7,76 (\pm 1,31)
COT ($\mu\text{mol C dm}^{-3}$)	nd		87	109	93 (\pm 8)

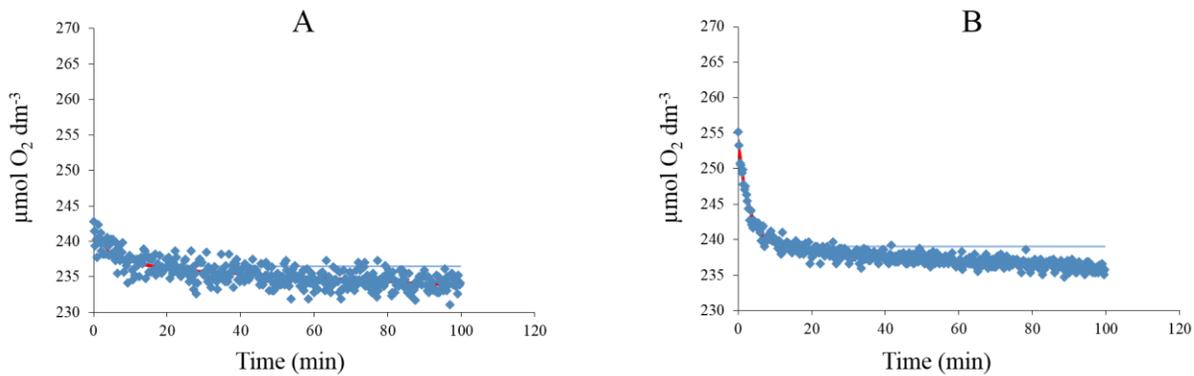


Figure A8.6. Séries temporelles de la concentration d'O₂ dissous dans les chambres d'incubation presens® A et B lors du test de validation n°1. Ligne rouge : modèle dynamique de régression non linéaire incluant la respiration. Ligne bleue : modèle dynamique de régression non linéaire sans l'effet de la respiration

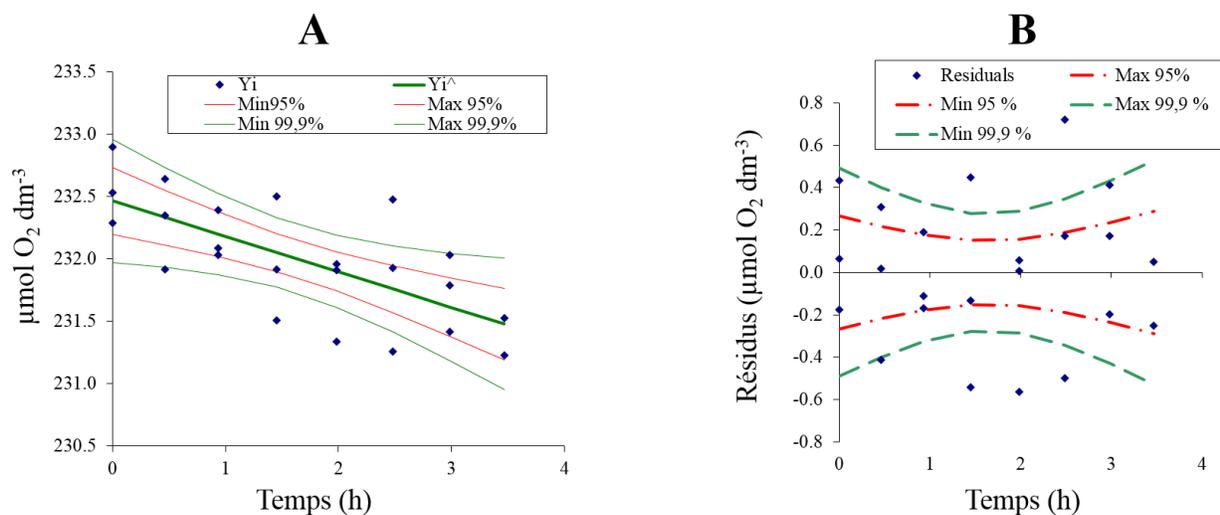


Figure A8.7. A : Série temporelle de la concentration d'O₂ dissous déterminée selon la méthode Winkler lors du test de validation n°1 avec les intervalles de confiance de la régression. B : résidus de la régression

D'après le test de validation n°1, les chambres A et B montrent 1) une valeur de RB non significativement différente ($n = 400$, $ddl = 796$, $t = 1,30$) et 2) une RB plus importante que celle de la méthode Winkler (Tableau A8.2). La qualité des réplicats des mesures d'O₂ dissous (Fig. A8.7) semble suffisamment robuste pour considérer la valeur de RB déterminée à partir de la méthode Winkler. Selon les conditions expérimentales de ce test de validation, les RB obtenues à partir des optodes presens® sont significativement différentes de celles obtenues par la méthode de référence Winkler ($ddl = 411$, $t = 5,84$, $p < 0,001$ et $ddl = 411$, $t = 7,84$, $p < 0,001$ pour A et B respectivement). Cependant, il est nécessaire de réitérer ce test pour confirmer ce résultat.

Par ailleurs, les valeurs de PB dans les chambres A et B sont non significativement différentes ($n = 3$, $ddl = 2$, $t = 1,01$) et les valeurs moyennes et cardinales d'AB et de COT mesurées dans les flacons Winkler ne montrent pas de variations importantes de la dynamique du système pendant la durée de l'expérience.

A8.3. Test validation n°2 “*Mixing on*”

L'objectif de ce test est de comparer les mesures de RB réalisées avec les chambres d'incubation presens® et celles réalisées avec la méthode Winkler, en maintenant les conditions d'agitation lors des incubations. Pour ce faire, une nouvelle culture de 10 dm³ d'eau de mer filtrée sur 0,6 µm est alimentée en continu par du carbone pyruvate (environ 50 µmol C dm⁻³ d⁻¹) via une pompe péristaltique (Fig. A8.8). 48 heures après la mise en culture, les mesures de RB sont effectuées (Tableau A8.3 et Fig. A8.10). Les 2 chambres d'incubation sont mises en route l'une après l'autre et placées à l'obscurité pendant 2 heures tandis qu'en parallèle, 30 flacons Winkler munis de barreaux aimantés sont remplis de manière parallèle avec du milieu de culture. Ils sont ensuite immergés dans des bacs d'eau, eux-mêmes posés sur des plaques d'agitation magnétiques, et disposés à l'obscurité dans un incubateur réfrigéré à 18°C (Fig. A8.9). Toutes les 20 minutes (de t₀ à t₅), 3 réplicats Winkler reçoivent les réactifs Winkler tandis qu'un 4^{ème} est échantillonné pour les mesures de PB et de COT.

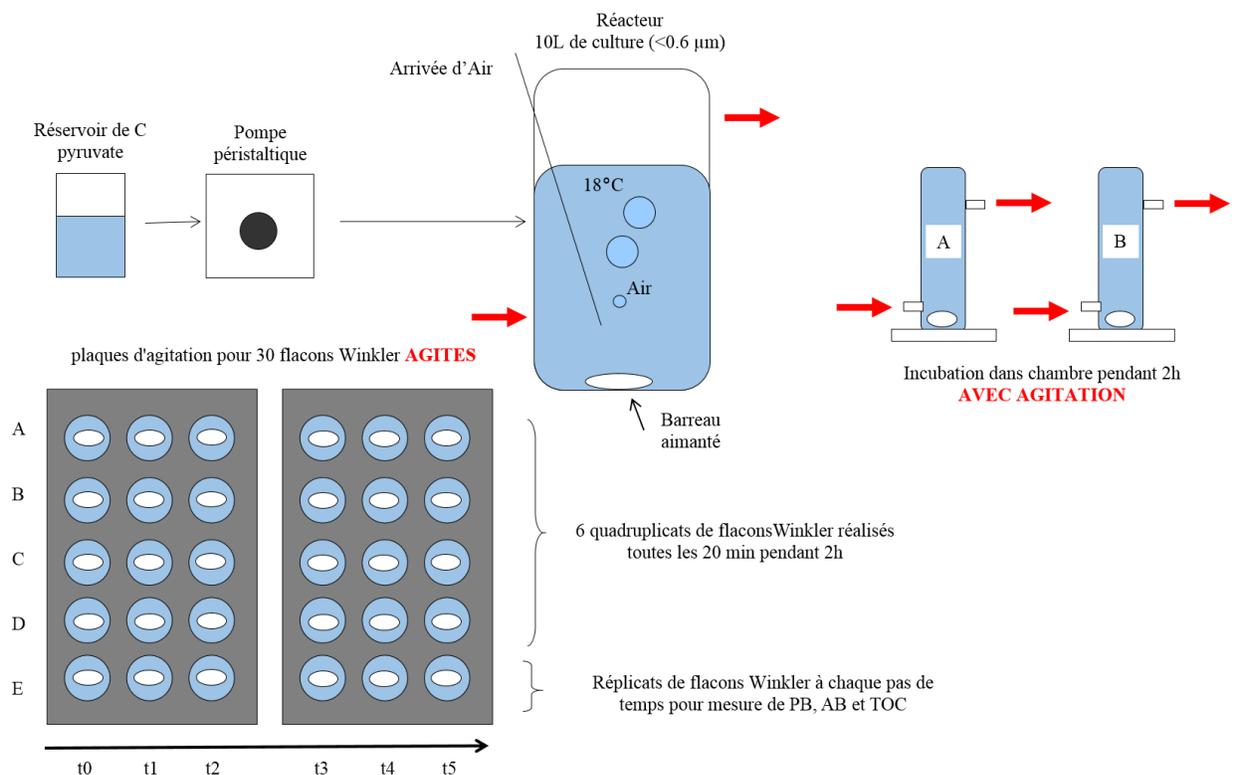


Figure A8.8. Schéma explicatif du test de validation n°2 « *Mixing on* » pour la validation des chambres d'incubation presens® A et B. Les flèches rouges représentent la régulation thermique

Tableau A8.3. RB (\pm sd) mesurées dans 1) les 2 chambres d'incubation presens® A et B et 2) avec la méthode Winkler selon le protocole du test de validation n°2 « *Mixing on* ». La PB et le COT (\pm 2% d'erreurs associées sur la mesure) sont également mesurés dans les 2 chambres et les flacons Winkler.

Test n°2 « <i>Mixing on</i> »	Chambre A	Chambre B	Flacons Winkler		
RB ($\mu\text{mol O}_2 \text{ dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)	0,80 (\pm 0,10) $R^2 = 0,37$	0,75 (\pm 0,10) $R^2 = 0,34$	2,82 (\pm 1,51) $R^2 = 0,16$		
			min	max	Moy (\pm sd)
PB ($\mu\text{mol C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)	nd		1,19	1,96	1,58 (\pm 0,25)
COT ($\mu\text{mol C dm}^{-3}$)	86 (\pm 1,7)	88 (\pm 1,8)	82	95	87 \pm 5

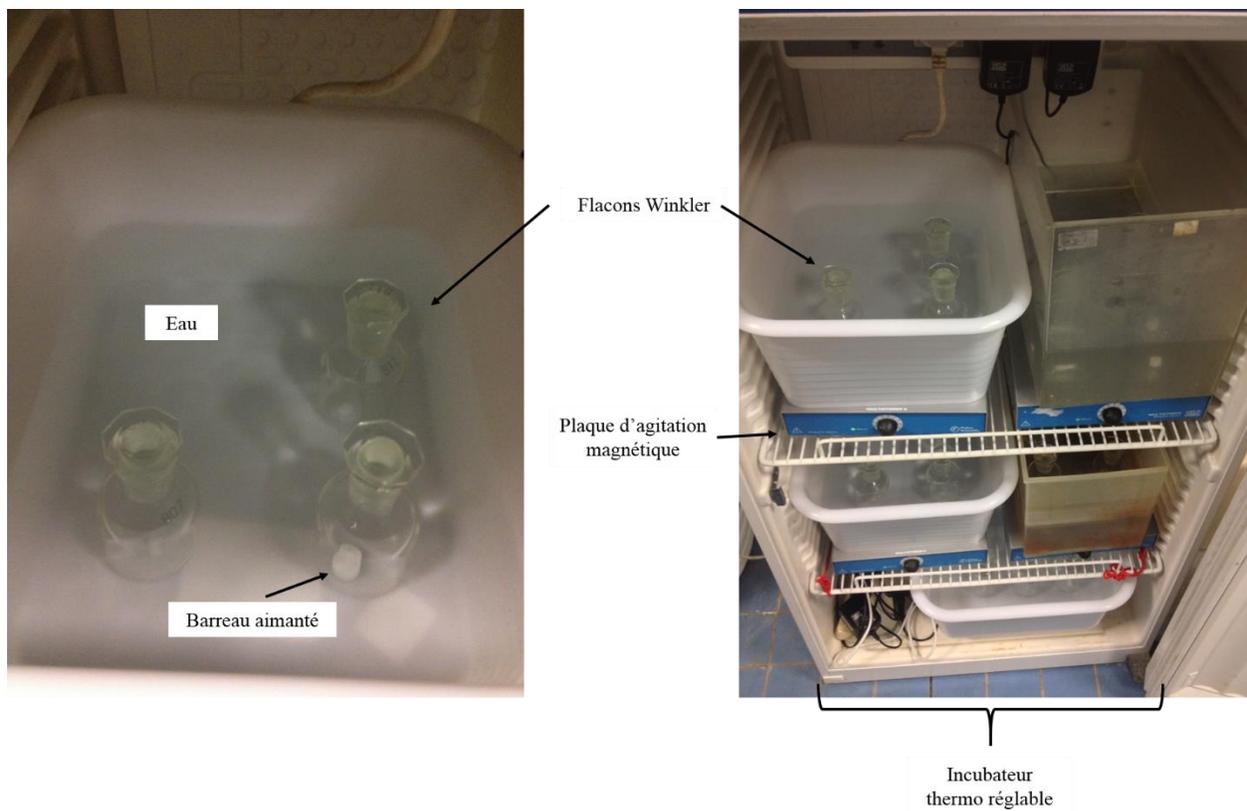


Figure A8.9. Photos des flacons Winkler sous agitation pendant le test de validation n°2 des chambres d'incubation presens® A et B

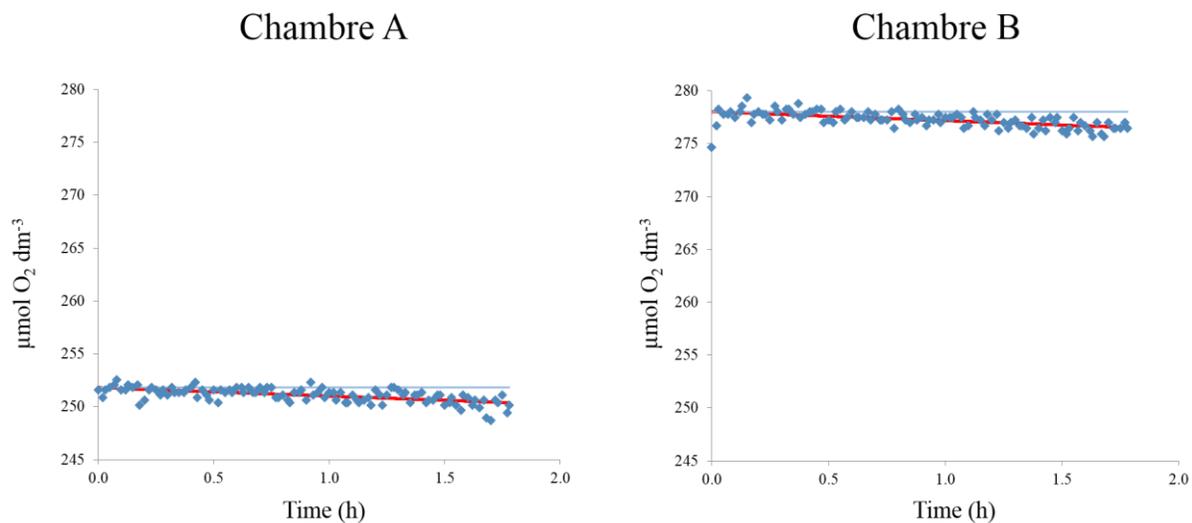


Figure A8.10. Séries temporelles de la concentration d' O_2 dissous dans les chambres d'incubation presens® A et B lors du test de validation n°2. Ligne rouge : modèle dynamique de régression non linéaire incluant la respiration. Ligne bleue : modèle dynamique de régression non linéaire sans l'effet de la respiration

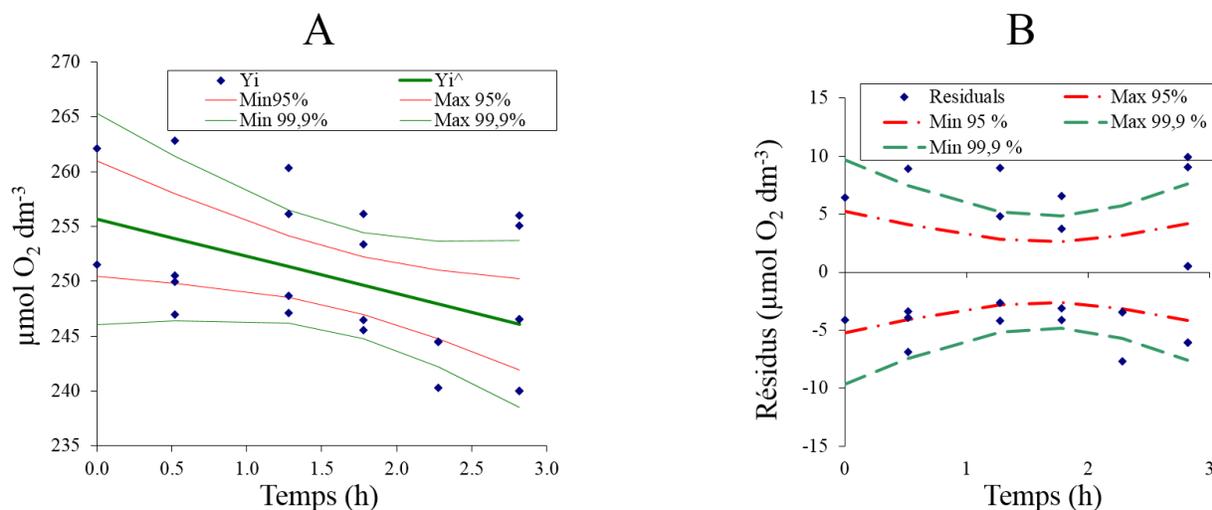


Figure A8.11. A : Série temporelle de la concentration d' O_2 dissous déterminée selon la méthode Winkler, lors du test de validation n°2 avec les intervalles de confiance de la régression. B : résidus de la régression

D'après le test de validation n°2, la RB mesurée dans les chambres d'incubation presens® A et B est non significativement différente ($n = 108$, $ddl = 212$, $t = 0,19$). La mauvaise qualité des réplicats obtenus avec la méthode Winkler est imputable à l'erreur associée liée à la variabilité des volumes des différents agitateurs magnétiques utilisés (un delta de volume de $1 \text{ cm}^3 = \text{un delta d}'O_2 \text{ de } 1,75 \mu\text{mol } O_2 \text{ dm}^{-3}$). Cela ne permet pas d'obtenir une RB fiable (Fig. A8.11). Ce résultat se confirme grâce aux RB mesurées dans les chambres A et B, significativement différentes de celle mesurée selon la méthode Winkler ($ddl = 124$, $t = 10,98$ $p < 0,001$ et $ddl = 124$, $t = 11,21$, $p < 0,001$ pour A et B respectivement). Il apparaît indispensable de réitérer ce test et d'améliorer le protocole en s'efforçant de standardiser au maximum l'agitation des flacons Winkler (barreaux aimantés et plaques d'agitations identiques).

Néanmoins, les valeurs de COT dans les chambres A et B et dans les flacons Winkler sont non significativement différentes ($ddl = 7$, $t = 1,79$ et $t = 1,80$ pour A et B respectivement) et la PB mesurée dans les flacons Winkler semble refléter une dynamique bactérienne stable pendant le temps de l'expérience.

A8.4. Test de validation n°3 « *Mixing off vs Mixing on* »

L'objectif est de tester un potentiel effet de l'agitation sur les mesures de RB dans les chambres d'incubation presens®. Une nouvelle culture de 10 dm³ d'eau de mer filtrée sur 0,6 µm est enrichie par 2 pulses (100 µmol C dm⁻³) de carbone pyruvate (le premier à t0 et le second à t + 48h) (Fig. A8.12). Après le second pulse, les mesures de RB sont effectuées à l'obscurité dans les deux chambres d'incubation A et B. Seule la chambre B est munie d'un barreau magnétique. Durant 24 heures, des mesures de RB sont réalisées toutes les 2 heures (Tableau A8.4). Les chambres d'incubation sont vidées, rincées et re-remplies avec la culture. Au moment de chaque remplissage, des prélèvements pour les mesures de PB et de COT sont réalisés (Tableaux A8.5 et A8.6).

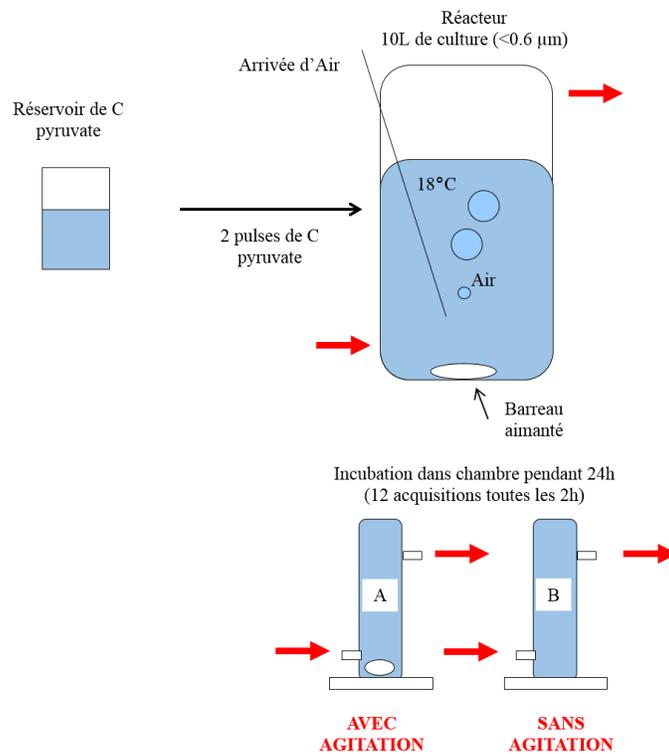


Figure A8.12. Schéma explicatif du test de validation n°3 « *Mixing off vs Mixing on* » pour la validation des chambres d'incubation presens® A et B. Les flèches rouges représentent la régulation thermique

Tableau A8.4. RB (\pm sd) mesurées dans les 2 chambres d'incubation presens® A et B selon le protocole du test de validation n°3. Un test-t est utilisé afin de lister les différences significatives (ns : non significatif ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ selon la table de *Student*) d'une même variable mesurée avec et sans agitation avec un degré de liberté $ddl = nA + nB - 4$.

Test n°3 » <i>Mixing off vs Mixing on</i> »	#	Chambre A		Chambre B		Test t (données log-transformées)		
		<i>Non Agitée</i>	<i>Agitée</i>	<i>t</i>	<i>ddl</i>	<i>p</i>		
RB ($\mu\text{mol O}_2 \text{ dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)	1	5,40 \pm 0,15	7,26 \pm 0,15	8,59	228	***		
	2	0,81 \pm 0,18	1,01 \pm 0,20	0,93	211	ns		
	3	0,94 \pm 0,18	1,25 \pm 0,19	1,44	218	ns		
	4	1,37 \pm 0,25	0,97 \pm 0,27	1,73	188	ns		
	5	2,13 \pm 0,18	1,45 \pm 0,21	3,07	212	**		
	6	1,37 \pm 0,20	1,38 \pm 0,20	0,07	228	ns		
	7	1,39 \pm 0,19	1,33 \pm 0,17	0,28	222	ns		
	8	1,51 \pm 0,20	0,87 \pm 0,20	2,96	220	**		
	9	1,59 \pm 0,19	1,71 \pm 0,19	0,53	222	ns		
	10	1,55 \pm 0,20	1,33 \pm 0,21	0,99	220	ns		
	11	0,98 \pm 0,18	1,15 \pm 0,19	0,81	228	ns		
	12	1,18 \pm 0,19	1,09 \pm 0,21	0,39	216	ns		

Tableau A8.5. PB (\pm sd) mesurées dans les 2 chambres d'incubation presens® A et B selon le protocole du test de validation n°3. Un test-t est utilisé afin de lister les différences significatives (ns : non significatif ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ selon la table de *Student*) d'une même variable mesurée avec et sans agitation avec un degré de liberté $ddl = nA + nB - 2$.

Test n°3 » <i>Mixing off vs Mixing on</i> »	#	Chambre A		Chambre B		Test t (données log-transformées)		
		<i>Non Agitée</i>	<i>Agitée</i>	<i>t</i>	<i>ddl</i>	<i>p</i>		
PB ($\mu\text{mol C dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)	1	4,13 \pm 0,12	4,64 \pm 0,24	3,25	4	ns		
	2	1,70 \pm 0,75	0,89 \pm 0,17	1,83	4	ns		
	3	1,26 \pm 0,02	1,22 \pm 0,07	1,09	4	ns		
	4	2,95 \pm 0,27	2,86 \pm 0,37	0,34	4	ns		
	5	1,69 \pm 0,11	1,47 \pm 0,08	2,96	4	ns		
	6	1,35 \pm 0,14	1,17 \pm 0,02	2,14	4	ns		
	7	2,01 \pm 0,55	1,59 \pm 0,22	1,23	4	ns		
	8	2,00 \pm 0,03	1,54 \pm 0,20	3,44	4	ns		
	9	2,87 \pm 0,10	1,86 \pm 0,09	16,89	4	**		
	10	2,19 \pm 0,10	2,58 \pm 0,06	4,88	4	*		
	11	1,16 \pm 0,01	2,63 \pm 0,18	13,90	4	**		
	12	3,62 \pm 0,00	3,42 \pm 0,00	538,76	4	***		

Tableau A8.6. COT ($\pm 2\%$ d'erreur associée sur la mesure) mesurées (erreurs associées à la mesure : 2%) dans les 2 chambres d'incubation presens® A et B selon le protocole du test de validation n°3. Un test-t est utilisé afin de lister les différences significatives (ns : non significatif ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ selon la table de *Student*) d'une même variable mesurée avec et sans agitation avec un degré de liberté $ddl = nA + nB - 2$.

Test n°3 »Mixing off vs Mixing on»	#	Chambre A		Chambre B		Test t (données log-transformées)		
		Non Agitée	Agitée	t	ddl	p		
COT ($\mu\text{mol C dm}^{-3}$)	1	116 ($\pm 2,3$)	134 ($\pm 2,7$)	8,80	4	*		
	2	114 ($\pm 2,3$)	121 ($\pm 2,4$)	3,65	4	ns		
	3	109 ($\pm 2,2$)	104 ($\pm 2,1$)	2,87	4	ns		
	4	101 ($\pm 2,0$)	116 ($\pm 2,3$)	8,45	4	*		
	5	100 ($\pm 2,0$)	nd	nd	nd	nd		
	6	103 ($\pm 2,1$)	110 ($\pm 2,2$)	4,02	4	ns		
	7	105 ($\pm 2,1$)	nd	nd	nd	nd		
	8	99 ($\pm 2,0$)	110 ($\pm 2,2$)	6,44	4	*		
	9	nd	nd	nd	nd	nd		
	10	109 ($\pm 2,2$)	112 ($\pm 2,2$)	1,66	4	ns		
	11	109 ($\pm 2,2$)	127 ($\pm 2,5$)	9,31	4	*		
	12	nd	92 ($\pm 1,8$)	nd	nd	nd		

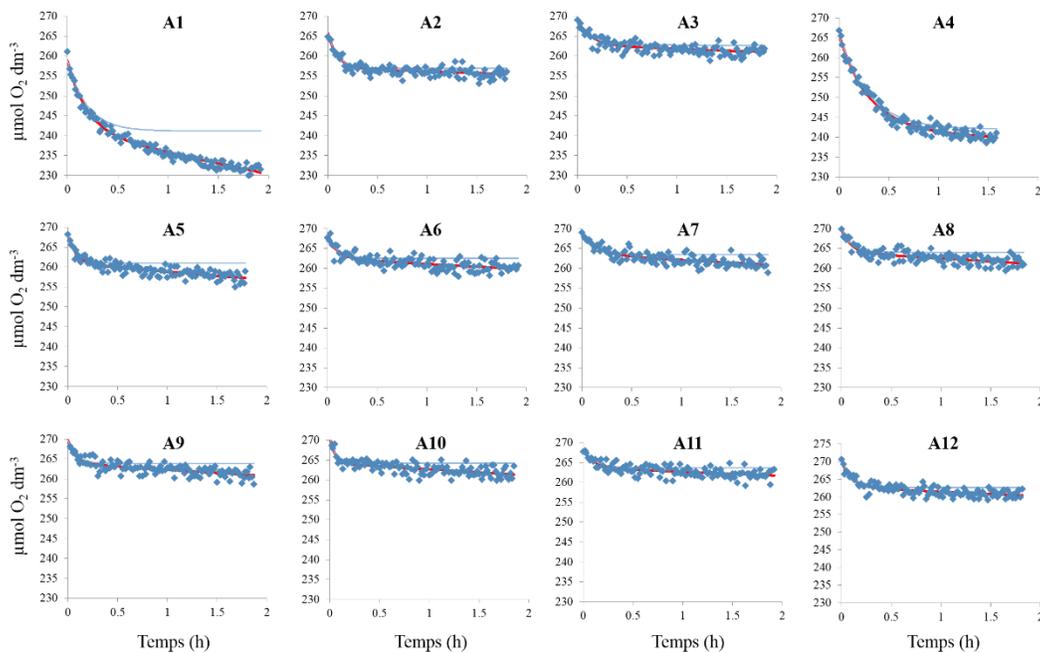


Figure A8.13. Séries temporelles de la concentration d'O₂ dissous dans la chambre d'incubation presens® A (non agitée) lors du test de validation n°3. Ligne rouge : modèle dynamique de régression non linéaire incluant la respiration. Ligne bleue : modèle dynamique de régression non linéaire sans l'effet de la respiration

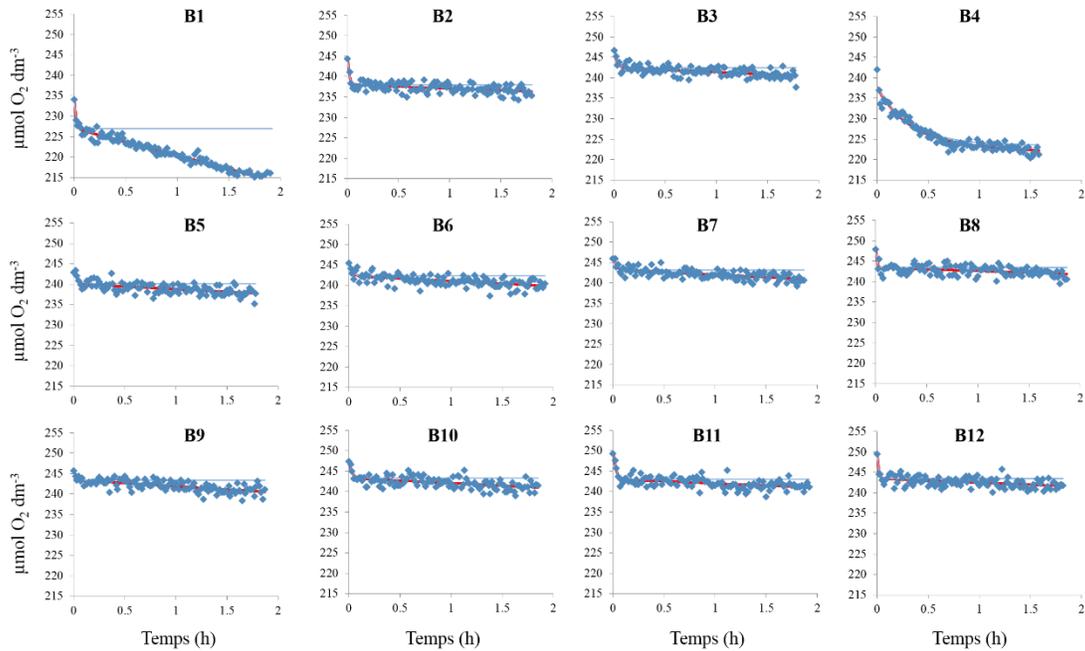


Figure A8.14. Séries temporelles de la concentration d'O₂ dissous dans la chambre d'incubation presens® B (agitée) lors du test de validation n°3. Ligne rouge : modèle dynamique de régression non linéaire incluant la respiration. Ligne bleue : modèle dynamique de régression non linéaire sans l'effet de la respiration

Les résultats suggèrent que les RB entre les chambres A et B sont majoritairement non significativement différentes, excepté pour 3 échantillons (Tableau A8.4). L'agitation accélère la mise à l'équilibre de la partie sensible de l'optode avec le milieu de mesure, ce qui permet d'obtenir plus rapidement la phase où la RB est quantifiable. Bien qu'il existe une méthode plus objective pour déterminer le temps de mise à l'équilibre de l'optode, nous avons fait le choix d'estimer, dans un premier temps, la mise à l'équilibre de l'optode de manière visuelle à partir des cinétiques d'O₂. Cette approche nous permet de visualiser cette phase de mise à l'équilibre à environ 3 minutes sous agitation, alors qu'elle peut dépasser 15 minutes sans agitation. L'agitation dans les chambres est donc un facteur essentiel pour garantir une mesure optimale de la RB.

Les PB mesurées sont non significativement différentes entre les deux chambres, excepté pour les 4 derniers points d'échantillonnage (Tableau A8.5). Par ailleurs, nous trouvons des séries temporelles de concentrations d'O₂ dissous atypiques aux points d'échantillonnages A1, B1 et A4, B4 (Fig. A8.13 et A8.14) concomitantes avec des valeurs de PB plus élevées qui suggèrent un changement dynamique du système. Toutefois, en l'état actuel, les conditions expérimentales et les informations disponibles ne permettent d'expliquer cette observation. Les valeurs de COT sont

réparties entre des valeurs significativement différentes, et d'autres non, selon les points d'échantillonnage considérés (Tableau A8.6).

A8.5. Bilan

Ces tests de validation permettent de mettre en lumière plusieurs points essentiels sur le fonctionnement des optodes presens® et d'aller vers une utilisation plus rigoureuse des chambres d'incubation. Malgré des étalonnages cohérents (à 0% et 100 % de saturation d'O₂ dissous), il subsiste un décalage de l'O₂ *Offset* entre les chambres A et B dans toutes les séries temporelles (10 à 30 μmol O₂ dm⁻³). Il est indispensable de calibrer chaque optode avant et après chaque expérience. Par ailleurs, il peut arriver que la saturation d'O₂ dissous augmente lors des phases d'acquisition. Ce phénomène peut être dû à :

- ✓ Des processus de diffusion liquide/gaz dans le réacteur de culture supérieurs à la respiration biologique du milieu d'analyse,
- ✓ La partie sensible de l'optode n'est pas à l'équilibre (thermique et osmotique) avec son milieu de mesure (si la température ou la salinité augmente, la concentration en O₂ dissous diminue).

Afin de préserver la qualité des mesures, il est nécessaire de 1) conserver l'optode presens® dans le futur milieu de mesure et en milieu liquide, 2) déterminer un temps de pré-conditionnement de la partie sensible de l'optode et 3) s'affranchir de la phase gazeuse par l'utilisation des chambres d'incubation presens®.

Les mesures en parallèle de la PB et du COT confirment que la dynamique des communautés bactériennes est restée stable lors des tests de validation n°1 et 2. Les mesures de RB et PB effectuées lors du test de validation n°3 révèlent 2 changements dynamiques au sein du système. Ils surviennent dans le réservoir de culture et ils sont observables de manière simultanée dans les 2 chambres d'incubation.

En considérant les résultats test par test, nous montrons qu'avec ou sans agitation les RB mesurées dans la chambre A et dans la chambre B sont non significativement différentes ($n = 400$, $ddl = 796$, $t = 1,30$, $n = 108$, $ddl = 212$, $t = 0,19$ et Tableau A8.4, pour les tests n°1, 2 et 3 respectivement). Les différences significatives de RB obtenues lors du test n°3 semblent liées à un

biais méthodologique dû à la mise à l'équilibre de la partie sensible de l'optode avec le milieu. L'agitation ne semble pas affecter les mesures de RB. La comparaison des séries temporelles réalisées lors du test n°3 montre que l'agitation accélère la mise en équilibre de la partie sensible de l'optode (< 3 minutes contre > 12 minutes sans agitation). L'agitation permet d'avoir plus rapidement la phase de respiration biologique. Ce résultat n'est pas négligeable pour nos cultures en minicosme où les temps d'incubation dans les chambres presens® oscillent entre 1h30 et 2h.

Les 2 tentatives de comparaison avec la méthode Winkler ne sont pas concluantes en l'état et demandent à être réitérées. Ces 2 tests préliminaires ont cependant permis de réaliser une première version de 2 systèmes expérimentaux thermorégulés avec et sans agitation, destinés à la mesure de la RB à partir de la méthode chimique Winkler. Les résultats obtenus mettent en évidence la nécessité d'avoir une agitation homogène dans chaque flacon afin d'avoir les meilleurs réplicats possible. Aussi, les tests de validation n°1 et n°2 sont à refaire en améliorant le protocole de notre système expérimental et sa démarche méthodologique afin de confirmer nos résultats. Des tests supplémentaires seraient également nécessaires :

- ✓ Tester si la RB mesurée dans nos chambres de 30 cm³ est représentative de celle mesurée dans nos réservoirs de culture de 10 dm³,
- ✓ Réaliser des mesures de RB en milieu abiotique, c'est-à-dire que les chambres d'incubation presens® seraient remplies d'eau milliQ. Cela permettrait d'observer le comportement des optodes au cours du temps sous les effets de processus physiques et thermodynamiques (vérification des hypothèses du modèle décrit en annexe 6).

En conclusion, les résultats de ces premiers tests de validation (Tableau A8.7) suggèrent la mise en place d'une procédure rigoureuse pour l'utilisation des chambres d'incubation presens® en effectuant un étalonnage pré et post expérimental ainsi qu'un préconditionnement de la partie sensible de l'optode. La régulation thermique, l'agitation et l'acquisition à l'obscurité doivent être conservées pour une mesure optimale de la RB.

Tableau A8.7. Synthèse des principaux résultats obtenus avec les tests de validation, problèmes rencontrés et solutions d'amélioration de la méthodologie d'utilisation des optodes presens®.

	Résultats	Problèmes rencontrés	Solutions	Amélioration du protocole
Etalonnage	Homogène	O ₂ offset différents entre A et B	Calcul d'un FC	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Etalonnage pré et post expérimental ➤ Préconditionnement de l'optode
Test n°1 « <i>Mixing off</i> »	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Différences non significatives de RB entre A et B ➤ Pas de changement de dynamique du système 	Bonne qualité des réplicats Winkler	Expérience à réitérer	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Conserver le remplissage des flacons Winkler de manière séquentielle ➤ Conserver l'incubation au noir et la thermorégulation
Test n°2 « <i>Mixing on</i> »	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Différences non significatives de RB entre A et B ➤ Pas de changement de dynamique du système 	Mauvaise qualité des réplicats Winkler	Expérience à réitérer	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Standardiser l'agitation des flacons Winkler ➤ Conserver l'incubation au noir et la thermorégulation
Test n°3 « <i>Mixing off vs Mixing on</i> »	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Différences non significatives de RB entre A et B ➤ Mise à l'équilibre de la partie sensible de l'optode < 3 minutes avec agitation ➤ Pas de changement de dynamique du système excepté pour 2 échantillons ➤ Les chambres d'incubation presens® reflètent de manière simultanée la dynamique de la culture 	Temps de mise l'équilibre de la partie sensible de l'optode	Expérience à réitérer	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Protocole de remplissage simultané des chambres ➤ Conserver l'incubation au noir et la thermorégulation

Résumé

Rôle de la température et des ressources nutritives dans le contrôle des activités des bactéries marines hétérotrophes: approches *in situ* et expérimentales

L'étude de la sensibilité des activités bactériennes hétérotrophes vis-à-vis la température et des ressources nutritives est essentielle dans notre compréhension de l'impact du changement global sur le compartiment microbien. Dans le cadre de cette thèse, une approche *in situ* et expérimentale en baie de Marseille (station SOLEMIO) est utilisée afin de répondre à cette problématique. Des mesures simultanées de la PB, de la RB, de l'activité de la phosphatase alcaline (*phos*) et de l'activité d'une ectoaminopeptidase (*prot*) sont réalisées. Des cinétiques températures (12-32°C) de ces 4 activités sont également effectuées. Les résultats montrent que 1) les températures optimales et les Q_{10} varient saisonnièrement, 2) le BGE ne diminue pas nécessairement lorsque la température augmente et 3) quelles que soit les conditions *in situ*, l'assemblage bactérien possède un BGE à la température *in situ* proche de sa température optimale. Des expériences d'enrichissements en PO_4 et glucose incubées à température *in situ* et température *in situ* + 3°C permettent de constater que la nature de l'interaction entre la température et les ressources est principalement synergétique. L'hypothèse d'un scénario supposant des changements relatifs de PB, *prot* et *phos* lors d'un changement de température suggère que les taux *prot*/PB et *phos*/PB diminuent avec une augmentation de la température et augmentent avec une diminution de la température. Si nous supposons que *phos* est un important fournisseur de P et *prot* de N alors cela devrait influencer le rapport C/N/P à travers les procaryotes hétérotrophes. Enfin, ces expériences montrent que la température et la disponibilité du PO_4 sont les principaux facteurs contrôlant les activités des bactéries hétérotrophes. L'étude sur le mode d'apport de la MO (pulsé ou en continu) menée à partir de 4 cultures saisonnières en minicosme montre que selon les conditions saisonnières et le mode d'apport de la MO, l'AB, la PB et la RB varient significativement. Toutefois, l'AB, la PB, la RB et le BGE ne montrent pas de différences significatives entre les réservoirs d'ajouts pulsés de MO (P) et d'ajouts continus de MO (C) suggérant des communautés bactériennes peu sensibles à la nature de la perturbation nutritionnelle alors que les activités bactériennes sont fortement dépendantes des additions de MO.

Mots-Clés : bactéries marines, activités hétérotrophes, production bactérienne, respiration bactérienne, BGE, phosphatase alcaline, ectoaminopeptidase, température, Q_{10} , mésocosme, SOLEMIO

Abstract

Role of temperature and resources in the control of heterotrophic marine bacteria activities: *in situ* and experimental approaches

The study of heterotrophic bacterial activities sensitivity with respect to temperature and resources is fundamental for our understanding of global change impact on the microbial compartment. In this work, *in situ* and experimental approaches have been carried out in Marseilles' Bay (SOLEMIO station) to address this issue. Simultaneous measurements of bacterial production (BP), bacterial respiration (BR), alkaline phosphatase activity (*phos*) and ectoaminopeptidase activity (*prot*) have been performed. Kinetic temperatures (12-32°C) of these activities (BP, BR, *phos* and *prot*) have been also conducted. The results demonstrate that i) the optimum temperature and Q_{10} values vary seasonally, ii) BGE value does not necessarily decrease with increasing temperature and iii) whatever the *in situ* conditions, the bacterial assemblage has a *in situ* temperature BGE value close to the optimal temperature of BP activity. Enrichments experiments in PO_4 and glucose incubated at *in situ* temperature and *in situ* temperature + 3°C allow to observe that the synergistic nature of the interaction between temperature and resources. The assumption of a scenario assuming that BP, *prot* and *phos* changes during a temperature change suggests that *prot*:BP and *phos*:BP ratios decrease with a temperature increase and increase with a temperature decrease. If we assume *phos* as an important provider of P and *prot* for N that might influence ultimately the C:N:P ratio of rates through heterotrophic prokaryotes. Finally, these experiments show that temperature and PO_4 availability are the main factors controlling heterotrophic bacteria activities. The study on OM availability and associated timing (pulsed or continuous) conducted during four seasonal minicosm cultures demonstrates that at different seasons and according to the delivery mode of OM, BA, BP and BR are varying significantly. However, the BA, BP and the BR does not show significant differences between the tanks with pulse OM addition (P) and continuous OM addition (C) suggesting that predominant bacterial communities are insensitive to the nature of nutritional disturbance whereas bacterial activity is highly dependent of the OM addition.

Key words: marine bacteria, heterotrophic activities, bacterial production, bacterial respiration, BGE, alkaline phosphatase, ectoaminopeptidase, temperature, Q_{10} , mesocosm, SOLEMIO